

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Investigação da Adequação de Membranas de Quitosana Quimicamente
Modificadas para Uso como Biomaterial: Estudo da Calcificação *in vitro*.

Autor: Cassiano Gomes Aimoli
Orientadora: Marisa Masumi Beppu

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

Campinas - São Paulo
Maio – 2007

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

Ai57i Aimoli, Cassiano Gomes
Investigação da adequação de membranas de quitosana
quimicamente modificadas para uso como biomaterial:
estudo da calcificação *in vitro*. / Cassiano Gomes Aimoli.--
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Quitosana. 2. Calcificação. 3. Fosfato de cálcio. 4.
Quitina. I. Beppu, Marisa Masumi. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
III. Título.

Título em Inglês: Investigations into the adequacy of chemically modified
chitosan membranes for use as biomaterial: study of *in vitro* calcification.

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Calcification, Chitin, Calcium
phosphate.

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo e Theo Guenter
Kieckbusch

Data da defesa: 18/5/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Cassiano Gomes Aimoli e aprovada em
18 de maio de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Marisa Masumi Beppu - orientadora



Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

DEDICATÓRIA

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Marisa M. Beppu', is written over a horizontal line.

Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu - orientadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram em meu convívio durante este trabalho:

- Meus pais Mauro e Neide e minha irmã Camila, que nunca hesitaram em me apoiar;
- Ana Rita, que mesmo de longe sempre esteve do meu lado;
- Companheiros eternos de ThunderToca: Daniel, Danilo, Roberto, Santizta, Ennio, Rafael, Guilherme e Tiba (membro honorário);
- Colegas de laboratório mais antigos: Marco, Rodrigo e Gilberto e colegas mais recentes: Grínia, Daniel e Aline;
- Prof.^a Marisa, que desde o princípio acreditou em mim e sempre me ensinou muito, tanto pessoalmente como profissionalmente;
- Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;
- Todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Este trabalho contém descobertas científicas que se encontram em processo de patente. A exploração do conhecimento apresentado aqui deve ser realizada com a anuência dos autores.

RESUMO

A utilização de materiais biologicamente compatíveis é de crescente interesse no meio científico e tecnológico. Associados à utilização de biomateriais em diversas áreas, estão fenômenos como a calcificação, que pode ser prejudicial e patogênica no caso de próteses cardíacas e lentes de contato, mas que pode ser indispensável para a produção de resinas de adsorção e substratos mais mecanicamente resistentes. Nesse contexto, a quitosana desponta como material de grande importância, já que além de ser biocompatível, é derivada do segundo biomaterial mais abundante na natureza: a quitina. Entretanto, a sua utilização com a finalidade de se promover calcificação é muito pouco estudada e pouco se sabe sobre os mecanismos e fenômenos associados.

Visando o entendimento detalhado sobre o mecanismo de calcificação deste material, foram realizados três diferentes experimentos, envolvendo a deposição de fosfatos e carbonatos de cálcio sobre substratos de quitosana natural e modificada quimicamente. Inicialmente, foi realizada a investigação dos estágios iniciais de deposição através de ensaios de curta duração. Em seguida, foram realizados ensaios em condições de deposição similares àsquelas observadas nos organismos vivos e por fim, testes de calcificação quimicamente induzida foram feitos com o objetivo de se observar a influência do substrato sobre os depósitos formados.

Os resultados indicam que em ambos os substratos utilizados o mecanismo geral de calcificação segue os estágios de nucleação e crescimento. Em estágios iniciais, a quitosana acetilada parece produzir uma deposição mais lenta enquanto que a quitosana natural provoca uma nucleação mais rápida e menos organizada em estágios iniciais. Porém em estágios posteriores de crescimento, este substrato aparentemente exerce maior influência sobre os aglomerados em crescimento que a quitosana acetilada.

Palavras-chave: quitosana, calcificação, biomaterial, fosfato de cálcio

ABSTRACT

The use of biocompatible materials presents increasing interest in the scientific and technological areas. Calcification phenomena are widely associated to the use of biomaterials. It can be desirable for production of resins for adsorption and mechanically resistant materials, but it can be harmful and pathogenic in cardiac valves and contact lenses. In this context, chitosan appears as a material of great importance, since besides being biocompatible, it is derived from the most abundant biomaterial in the nature: chitin. However, its use as substrate for calcification is not extensively studied and its mechanism remains still unknown.

Three different experiments involving the deposition of calcium phosphates and carbonates on pristine and acetylated chitosan were conducted in order to understand the mechanism of calcification on this material. Initially, dense membranes underwent calcium compounds deposition through preliminary experiments. Afterwards, deposition in similar conditions to those observed in the living organisms had been conducted and finally, quick tests to induce calcification were done with the intention to observe the influence of the substrate on the deposits.

The results indicate that the general mechanism of calcification seems to follow the stages of nucleation and growth in pristine and acetylated chitosan. In initial stages, the acetylated chitosan seems to induce a slower deposition whereas the pristine chitosan seems to provoke an less organized and faster nucleation and in initial stages. However, in the latest stages of growth, pristine chitosan apparently promotes a significant influence on the agglomerates.

Key words: chitosan, calcification, biomaterial, calcium phosphate

Sumário

1 - Introdução.....	1
1.1 - Estrutura do texto.....	3
2 - Objetivos.....	4
3 - Estado da Arte.....	5
3.1 - Biomateriais.....	5
3.2 - Biomineralização.....	8
3.3 - Calcificação de biomateriais.....	11
3.4 - Compostos de cálcio.....	15
3.5 - Quitina e quitosana.....	19
3.5.1 - Aspectos econômicos.....	23
3.6 - Modificações químicas da quitosana.....	24
3.6.1 - Mecanismo de acetilação da quitosana.....	26
3.7 - Quitosana como biomaterial.....	28
4 - Materiais e Métodos.....	32
4.1 - Síntese dos substratos de quitosana.....	32
4.1.1 - Solução de quitosana.....	32
4.1.2 - Membranas densas.....	33
4.1.3 - Membranas porosas.....	33
4.1.4 - Modificação química da quitosana.....	34
4.2 - Caracterização dos substrato.....	35
4.2.1 - Testes de citotoxicidade.....	35
4.2.2 - Testes mecânicos.....	36
4.2.3 - Determinação do grau de desacetilação.....	36
4.2.4 - Espectroscopia de infravermelho.....	38
4.2.5 - Análises térmicas.....	41
4.2.5.1 - Análise termogravimétrica.....	41
4.2.5.2 - Calorimetria exploratória diferencial.....	42

4.3 - Ensaios de calcificação.....	43
4.3.1 - Estudo do processo inicial de calcificação.....	45
4.3.1.1 - Fluorescência de raios-X.....	47
4.3.1.2 - Microscopia de força atômica.....	50
4.3.1.3 - Difração de raios-X.....	52
4.3.2 - Ensaios de calcificação de 7 dias.....	54
4.3.2.1 - Microscopia eletrônica de varredura.....	56
4.3.2.2 - Energia dispersiva de raios-X.....	57
4.3.3 - Calcificação quimicamente induzida.....	57
4.3.3.1 - Microscopia óptica.....	59
4.3.3.2 - Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	61
5 - Resultados e Discussão.....	64
5.1 - Caracterização dos substratos.....	64
5.1.1 - Titulação potenciométrica.....	66
5.1.2 - Espectroscopia de infravermelho.....	68
5.1.3 - Análises térmicas.....	70
5.2 - Estudo do processo inicial de calcificação.....	73
5.3 - Ensaios de calcificação de 7 dias.....	84
5.4 - Calcificação quimicamente induzida.....	92
6 - Discussão Final.....	108
7 - Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	114
8 - Referências.....	116
Anexo 1 - Produção Bibliográfica.....	134
Anexo 2 - Artigos Publicados.....	136

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais e novas aplicações para materiais já existentes desponta como opção extremamente viável e interessante em diversas áreas do conhecimento. Na ciência de materiais, é cada vez mais evidente a necessidade de se lidar com materiais que possibilitem a obtenção de produtos de necessidade humana, com a máxima qualidade e desempenho, ao menor custo possível^{1,2}. Na área médica, essa necessidade se torna ainda mais evidente com o aumento da expectativa de vida mundial e conseqüente envelhecimento da população³.

O desenvolvimento de materiais que possam substituir parte ou todo de um determinado órgão ou tecido humano deve apresentar uma série bem definida de características. No caso de próteses ósseas, esse material deve ser mecanicamente resistente e pouco susceptível à degradação em virtude do contato do dispositivo com fluidos humanos e devido à fricção⁴. Além disso, o material deve ser aceito pelo organismo, sem que este apresente reações imunogênicas⁵. No caso de próteses cardíacas, como válvulas semilunares, o material deve apresentar alta resistência a fadiga mecânica, além de apresentar maleabilidade e funcionalidade adequadas.

Nos casos ilustrados acima e nos demais casos em que se faz necessário o implante de dispositivos no organismo, um fenômeno extremamente importante a ser estudado é o processo de biomineralização.

Este processo pode ser extremamente favorável como no caso de implantes osteogênicos e próteses de correção ortopédica⁶, sendo, porém, indesejável em lentes de contato e em próteses do sistema cardiovascular como válvulas, implantes mamários e bombas para a circulação sangüínea, nas quais a calcificação é a causa primária de falha^{7,8}.

Nesse contexto, o conhecimento detalhado sobre o mecanismo de calcificação ao qual um determinado material está exposto é de fundamental importância na grande maioria dos casos. Através de tal conhecimento, é possível

favorecer a deposição de cálcio nos casos onde é desejável (como no caso de próteses ósseas) ou evitá-la em casos onde é indesejável (como no caso de implantes cardíacos).

O uso de experimentos de calcificação *in vitro* apresenta algumas vantagens, se comparado ao uso de experimentos *in vivo* convencionais. Além de ser um método mais barato e rápido, os resultados de calcificação obtidos *in vitro* são mais reprodutíveis, sendo menos influenciados pela variabilidade das condições experimentais observadas em testes com organismos vivos. Este tipo de experimento é largamente empregado em testes de matrizes desenvolvidas para a produção de válvulas cardíacas, onde é possível realizar experimentos conjugados do processo de calcificação e da fadiga do material⁹; posteriormente, a cinética de deposição também pode ser obtida¹⁰.

A quitosana é particularmente interessante para a aplicação como biomaterial, pois apresenta propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade^{11,12}, e os produtos de sua degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos¹³. Além disso, é um material interessante sob o ponto de vista econômico, pois se deriva da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante da superfície terrestre, ficando atrás apenas da celulose.

Atualmente, a quitosana apresenta um amplo campo de aplicações. Na medicina, é utilizada em bandagens hemostáticas¹⁴, fibras para suturas¹⁵, lentes de contato¹⁶, veículo para liberação controlada de fármacos¹⁷, estruturas para tecidos ósseos¹⁸ e complemento alimentar para a redução de colesterol no organismo humano¹⁹. Na área tecnológica cresce a utilização da quitosana como resina de adsorção de proteínas²⁰ e metais pesados^{21,22}.

A utilização de substratos de quitosana com a finalidade de se produzir enxertos ósseos ou próteses de válvulas cardíacas requer um cuidadoso estudo sobre os mecanismos e processos de deposição de compostos de cálcio associados a este material. Tal estudo é fundamental para o entendimento de processos de mineralização que ocorrem na natureza como a formação de conchas, nácar e do próprio osso humano, bem como para o conhecimento do comportamento do material quando colocado em contato com o soro humano.

Os resultados desse trabalho auxiliam na caracterização do comportamento da quitosana quando aplicada como biomaterial, e abrem novas possibilidades de aplicação, descrevendo o processo de biomineralização desse material.

1.1 Estrutura do texto

O presente documento está estruturado na forma de capítulos, sendo que o capítulo que se segue lista os objetivos do trabalho. Em seguida são discutidos aspectos referentes às publicações presentes na literatura que fundamentam os experimentos e auxiliam no entendimento e discussão dos resultados.

O quarto capítulo lista com detalhes todos os materiais, metodologias e equipamentos utilizados. Este capítulo está subdividido nas etapas realizadas em ordem cronológica de fatos, iniciando com a síntese de substratos de quitosana, seguindo a descrição das caracterizações feitas no substrato e por fim apresentando a descrição dos três diferentes grupos de ensaio realizados.

O quinto capítulo reúne todos os resultados obtidos, mantendo a estruturação do capítulo anterior. Nesse capítulo estão presentes discussões individuais de cada um dos resultados. O capítulo seguinte apresenta uma discussão final, concatenando as idéias apresentadas.

São listadas também as conclusões do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros na área, bem com uma lista das referências consultadas.

Por fim, apresenta-se uma lista com toda a produção bibliográfica fruto do presente trabalho, além de uma cópia dos artigos publicados em revistas científicas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo consistem em:

- 1) Preparar e caracterizar substratos de quitosana natural;
- 2) Verificar a viabilidade de se realizar a acetilação heterogênea de membranas de quitosana com o intuito de se obter substratos moldados com propriedades próximas às da quitina;
- 3) Realizar ensaios de calcificação para a caracterização do mecanismo de deposição de fosfatos de cálcio e carbonatos de cálcio sobre membranas densas e porosas, de quitosana acetilada e natural;
- 4) Caracterizar a natureza dos depósitos obtidos;
- 5) Estabelecer a influência do substrato no processo de deposição através de ensaios rápidos de calcificação.

3. ESTADO DA ARTE

Este capítulo descreve as principais definições que fundamentam o presente trabalho e estão presentes na literatura.

3.1 Biomateriais

O campo do conhecimento denominado Ciência dos Biomateriais é um campo relativamente novo para uma extensa descrição histórica. No entanto, é possível realizar algumas considerações que relacionam antigos conhecimentos na área com a perspectiva contemporânea desses materiais. Há aproximadamente dois mil anos romanos, chineses e astecas utilizaram ouro em próteses dentárias. Da mesma forma, muitos relatos históricos incluem o uso comum de olhos de vidro e membros de madeira. Na virada do século XX, com o advento de plásticos sintéticos, o campo dos biomateriais experimentou significativos avanços e o aumento de experimentos com implantes rendeu informações muito úteis sobre a toxicologia de biomateriais.

É importante ressaltar que durante muito tempo, raramente os biomateriais eram desenvolvidos para substituir ou tratar órgãos ou funções do corpo. Na verdade, a maioria desses materiais era estudada para aplicações tecnológicas como estruturas, revestimentos e equipamentos, mas a aplicabilidade na medicina fez com que esses materiais fossem modificados ou otimizados para tais fins²³.

A origem precisa do termo “biomaterial” é difícil de ser apontada. Entretanto, é provável que esse campo do conhecimento assim como se apresenta hoje tenha se solidificado através do Simpósio de Biomateriais da Universidade Clemson entre o final dos anos 60 e início dos anos 70⁷. O sucesso deste simpósio levou à criação da Sociedade de Biomateriais em 1975, que esteve intimamente ligada à evolução desse campo.

Muitos autores, desde então, vêm apresentando propostas para a definição de biomaterial. Uma definição endossada por profissionais da área é a apresentada por Williams em 1987, que diz que um biomaterial é um material utilizado em dispositivos médicos com a intenção de interagir com sistemas biológicos²⁴. Um conceito complementar para o entendimento dos objetivos dos biomateriais é a definição de biocompatibilidade, que segundo Williams, é a habilidade de um material provocar a resposta adequada de um determinado hospedeiro, em uma aplicação específica. Conexões quantitativas entre a química dos materiais e a resposta biológica a eles formam a regra base necessária para a predição da biocompatibilidade em diversas aplicações médicas. Esse conjunto de relações entre estrutura e reatividade é conhecido como a *ultima Thule*, ou seja, como o que há de mais recente na pesquisa de biomateriais²⁵.

Em 1998, Codaro propôs uma definição mais específica, afirmando que um biomaterial é qualquer substância ou combinação destas que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usado por tempo indeterminado, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer órgão, tecido ou função do corpo, sem desencadear reações desfavoráveis, imprevisíveis ou incontroláveis²⁶.

De acordo com a origem, os biomateriais são classificados em sintéticos e naturais. Estes últimos podem ainda ser classificados como autógenos, quando se realiza a retirada de um tecido para implante no próprio indivíduo (caso dos enxertos ósseos); homógenos, quando o implante é dado por um órgão ou tecido de indivíduos diferentes, porém pertencendo à mesma espécie (caso do transplante de fígado e de coração) e heterógenos, quando o implante é originário de uma espécie diferente (caso da utilização do pericárdio bovino em próteses cardíacas²⁷).

Um determinado material, para que seja perfeitamente adequando em sua aplicação como biomaterial, deve apresentar uma série de características comuns, entre elas²⁸:

- Ser biocompatível;
- Não ser tóxico nem carcinogênico;
- Ser quimicamente estável;
- Ter propriedades mecânicas adequadas;
- Ter massa específica e forma adequadas;
- Ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação;
- Ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com a máxima eficiência.

O aumento na demanda de materiais adequados para aplicação na medicina e o crescimento do valor agregado desses materiais são fatos que impulsionam o setor de pesquisa para o avanço na área de biomateriais. A aplicação de materiais não desenvolvidos especificamente para desempenhar uma determinada função de biomaterial vem perdendo espaço para estudos que visam à obtenção de novos materiais que possam apresentar propriedades mais adequadas a uma determinada aplicação. Um indicador importante desse crescimento é o aumento do número de publicações científicas relacionadas ao tema, além do aumento no número de patentes requeridas²⁹.

A diversidade de aplicações dos biomateriais mostrada pela **Tabela 1**, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de morfologias apropriadas para sua utilização, fazem da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo diversos fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e biocompatibilidade. Dentro deste contexto, são necessárias contribuições para a evolução desta área e para o aumento do leque de sua aplicabilidade, através do desenvolvimento de novos e eficazes biomateriais e também na elucidação dos mecanismos que governam o processo de biomineralização, que ocorre não somente em próteses ósseas de maneira

desejável, mas também está presente de maneira indesejável nos demais dispositivos e implantes.

Tabela 1: Aplicações de materiais sintéticos e materiais naturais modificados na medicina⁷.

Aplicação	Tipos de materiais
Esqueleto	
Substituição de articulações	Titânio, ligas Ti-Al-V, aço inoxidável, polietileno
Fixação de fraturas	Aço inoxidável, ligas cobalto-cromo
Cimento ósseo	Poli(metil metacrilato)
Reparação de defeitos	Hidroxiapatita
Tendões e ligamentos artificiais	Teflon [®] , Dacron [®]
Implantes para fixação de dentes	Titânio, alumina, fosfato de cálcio
Sistema cardiovascular	
Próteses de vasos sanguíneos	Teflon [®] , Dacron [®] , poliuretano
Válvulas cardíacas	Tecidos reprocessados, aço inoxidável, carbono
Cateter	Borracha de silicone, Teflon [®] , poliuretano
Órgãos	
Coração artificial	Poliuretano
Modelo de reparação para pele	Compósito silicone-colágeno
Rim artificial (hemodiálise)	Celulose, poliacrilonitrila
Aparelho coração-fígado	Borracha de silicone
Pele	Poliuretano
Sentidos	
Substituição de cóclea	Eletrodos de platina
Lentes intra-oculares	Poli(metil metacrilato), borrachas silicone, hidrogel
Lentes de contato	Silicone acrilato, hidrogel
Bandagem córnea	Colágeno, hidrogel

3.2 Biomineralização

O desenvolvimento de materiais destinados a aplicações de substituição ou regeneração deve ser baseado no entendimento da estrutura a ser substituída ou regenerada, particularmente na área médica. O conhecimento de quais propriedades de um determinado material são necessárias depende extensivamente do local de aplicação e da função a ser restaurada. De maneira

ideal, um material substituto deve mimetizar o tecido vivo, do ponto de vista mecânico, químico e biológico.

Tipicamente, a rota principal pela qual se formam tecidos mineralizados é aquela onde a matriz orgânica se torna uma espécie de suporte para o crescimento da fase inorgânica. Ossos, dentes, esqueletos de lagostas e caranguejos, conchas de ostras, corais, pérolas, espinhos de ouriços-do-mar e marfim são alguns exemplos de materiais produzidos pela engenharia exercida por organismos vivos³⁰.

Entretanto, apesar dos avanços substanciais no entendimento do processo de biomineralização, nem os mecanismos de formação e organização de biominerais nem a complexa microarquitetura de compósitos puderam ser replicados por métodos não biológicos.

A biomimética é uma área do conhecimento muito importante, que estuda como a natureza é capaz de produzir, processar e organizar blocos moleculares a fim de fabricar compósitos polímero-minerais de alta performance e então aplicar tais processos para engendrar novas moléculas e materiais com propriedades únicas³¹⁻³³.

O estudo da biomimética pode estar inserido em diferentes áreas: desenvolvimento de métodos que revelam os mecanismos pelos quais estruturas orgânicas como proteínas e peptídeos podem determinar a estrutura biomineral de dentes e ossos³⁴, determinação da estrutura hierárquica de ossos e dentes³⁵, conhecimento da base biológica da biomineralização usando paradigmas de invertebrados marinhos³⁶, entendimento dos fundamentos de auto-construção do esmalte dental³⁷, entre outros.

Como exemplo, a formação de ossos é um processo complexo no qual a precipitação de hidroxiapatita aparenta estar associada à matriz e subsequentemente às fibras de colágeno³⁸. Pequenos cristais se formam paralelos uns aos outros, sob a influência da estrutura das fibras de colágeno como resultado da composição dos sais inorgânicos presentes no fluido corpóreo. O osso é então sintetizado como um compósito complexo, e a organização e a

química interfacial dos componentes são otimizadas para seu uso funcional por processos mediados por células³⁹.

Nos últimos anos tem sido aceito dizer que a premissa essencial para que um material artificial apresente ligações do tipo das que são encontradas no osso é que esse material apresente em sua superfície a deposição de compostos de fosfato de cálcio similares às apatitas ósseas^{40,41}. De fato, a presença de apatitas na superfície de biomateriais ortopédicos é considerada como uma resposta biológica positiva do hospedeiro à presença do implante. Assim, espera-se que qualquer material coberto com uma camada de apatita similar à apatita presente no tecido ósseo deva apresentar bioatividade⁴² quando implantado. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos baseados nos processos naturais de deposição, para o desenvolvimento de metodologias *in vitro* sintéticas de biomineralização⁴³⁻⁴⁵. Em todos estes trabalhos, uma questão muito importante é a geração de condições químicas na interface que induzam a precipitação da fase mineral.

Apesar dos muitos avanços no conhecimento dos processos de biomineralização de ossos, pouco se conhece ainda sobre como essa mineralização é controlada. Os estudos mais esclarecedores nessa área foram feitos em tendões de peru, substratos com estrutura diferente da estrutura óssea⁴⁶. Ossos reais apresentam distribuições de matéria mineral que se alteram ao longo do processo, onde a precipitação inicial ocorre de maneira desordenada ao redor de vesículas da matriz e assim pode ocorrer primeiro a precipitação de fosfatos de cálcio amorfos^{47,48}. Estudos recentes realizados em pérolas lisas proporcionaram um entendimento mais claro da seqüência de eventos, mas sem esclarecer os mecanismos⁴⁹.

O modelo da formação de nácar é particularmente interessante, pois além de ser possível visualizar a formação de uma estrutura cerâmica fortemente laminar⁵⁰, a deposição em camadas alternadas de fases orgânicas e inorgânicas pode servir de exemplo para o estudo de outros sistemas nos quais ocorra biomineralização.

O estudo de processos de biomineralização é importante não somente para o desenvolvimento de novos materiais que possam ser aplicados na área médica,

mas também para o avanço na prevenção e tratamento de doenças e disfunções amplamente relacionadas à calcificação. Exemplos comuns são a arteriosclerose, que consiste na calcificação dos vasos sanguíneos, resultando na interrupção do fluxo sanguíneo e na formação de trombos e o hiperparatireoidismo, que é caracterizado pelo excesso de funcionamento das glândulas paratireóides, levando a sinais e sintomas decorrentes do aumento de cálcio no sangue (hipercalcemia), na urina (hipercalciúria) e da retirada de cálcio dos ossos (osteoporose e cistos ósseos), o que pode resultar em precipitações de cristais formando cálculos renais⁵¹.

3.3 Calcificação de biomateriais

Enquanto o processo de mineralização de biomateriais pode ser desejável no caso de próteses e enxertos ósseos, a calcificação desponta como principal patologia associada à falência de implantes e aparelhos médicos, principalmente relacionados ao sistema cardiovascular⁵²⁻⁵⁵. Entende-se como calcificação ou mineralização a formação de depósitos de fosfato de cálcio ou outros compostos de cálcio sobre um determinado substrato.

Apesar de a biomineralização ser um processo natural de deposição de sais para a formação de ossos e dentes, tal deposição pode ser extremamente indesejável em determinados biomateriais, limitando sua funcionalidade ou até mesmo desencadeando reações desfavoráveis que possam demandar a troca do material em questão. Esse caso é denominado calcificação distrófica, pois ocorre em biomateriais ou tecidos doentes de indivíduos com metabolismo de cálcio normal. A **Tabela 2** mostra alguns exemplos de calcificação distrófica.

Além da calcificação patológica de implantes e dispositivos médicos, são comuns também casos em que se observa a chamada calcificação metaestática, que corresponde à formação de depósitos de cálcio em tecidos inicialmente normais, como resultado de alguma anormalidade no metabolismo de cálcio do indivíduo.

Tabela 2: Aparelhos e próteses afetados por calcificação⁵⁶.

Aplicação	Biomaterial	Consequência
Próteses de válvulas cardíacas	Pericárdio bovino ou válvula suína pré-tratada com glutaraldeído Poliuretano	Obstrução da válvula ou enrijecimento (prolapso)
Bexigas de assistência cardíaca ventricular	Poliuretano	Disfunção por enrijecimento ou vazamento
Enxertos vasculares	Homoenxertos aórticos Enxertos de Dacron [®]	Obstrução do enxerto ou enrijecimento
Lentes de contato gelatinosas	Hidrogéis	Opacificação
Dispositivos contraceptivos intra-uterinos	Borracha de silicone, poliuretano contendo íons Cu^{2+} ou outros agentes	Controle de natalidade ineficaz devido à disfunção ou rejeição
Próteses urinárias	Borracha de silicone ou poliuretano	Incontinência e/ou infecção

A calcificação é associada tanto com implantes derivados de materiais biológicos como sintéticos. A fase mineral encontrada na maioria dos biomateriais que sofrem calcificação é composta basicamente de fosfatos de cálcio pouco cristalinos denominados apatitas^{57,58}, que possuem íntima relação com a hidroxiapatita, que é a fase inorgânica que proporciona a rigidez observada nos ossos⁵⁹. A biomineralização do implante depende tanto do metabolismo do hospedeiro como da estrutura e química do implante, sendo que, em geral essa biomineralização ocorre em maior escala em pontos de intensa deformação mecânica, como os pontos de flexão em dispositivos circulatórios⁶⁰.

A degeneração decorrente da calcificação de próteses de válvulas cardíacas pré-tratadas com glutaraldeído é o exemplo mais importante de disfunção clínica de um dispositivo médico⁸. Próteses cardíacas de porcina ou pericárdio bovino tratadas com glutaraldeído têm sido largamente utilizadas desde a década de 70. Entretanto, mais da metade de tais válvulas implantadas em pacientes apresentam falhas após um período de 12 a 15 anos devido,

principalmente ao aparecimento de nódulos ou ao enrijecimento decorrente da calcificação intrínseca⁶¹.

A deposição de cristais de cálcio na superfície de bexigas flexíveis limita a longevidade funcional de bombas sanguíneas compostas de poliuretano e usadas como sistemas ventriculares auxiliares ou como corações artificiais⁶². A rigidez causada pela deposição de matéria mineral pode provocar o comprometimento da bomba ou válvula através da diminuição de sua flexibilidade ou através do rompimento do material. Novamente, fatores mecânicos são aparentemente decisivos, já que a calcificação de bombas sanguíneas ocorre predominantemente sobre áreas flexíveis e junções⁶³.

A calcificação de componentes de bombas sanguíneas pode ser intrínseca ou extrínseca⁵⁴. A deposição de cristais está normalmente ligada a defeitos de superfície microscópicos, geralmente originados no processo de fabricação ou resultados dos efeitos mecânicos de sua aplicação. Uma hipótese aceita é a de que esses defeitos de superfície atuam como sítios preferenciais de calcificação em polímeros de superfície regular, mas essa hipótese não é comprovada⁶⁴⁻⁶⁶. Se células sanguíneas degradadas, presas no interior dos defeitos da superfície da matriz sofrem calcificação, observa-se o fenômeno denominado calcificação extrínseca. Entretanto, alguns depósitos de cálcio se localizam abaixo da superfície, na ausência de defeitos. Esse tipo de deposição é denominado calcificação intrínseca.

A calcificação de dispositivos intra-uterinos (DIUs) é suspeita de ser a causa de disfunções do implante tais como seu desprendimento ou falha na contracepção. O acúmulo de placas de cálcio em DIUs contendo íons cobre pode promover a inibição de liberação de cobre iônico e a conseqüente alteração na eficiência do dispositivo, já que a liberação de cobre é necessária para promover a contracepção.

Do mesmo modo, depósitos de cálcio que interfiram na liberação de um agente ativo também podem ser prejudiciais em DIUs com sistemas de liberação de hormônios. Estudos realizados por microscopia eletrônica de varredura e

transmissão acopladas com análises de raios-X mostraram que todos os dispositivos analisados apresentaram deposição superficial de cálcio⁶⁷.

Processos de calcificação são responsáveis pela opacificação de lentes de contato gelatinosas, através da deposição de fosfatos de cálcio provenientes de glândulas lacrimais⁶⁸. Os depósitos de cálcio crescem progressivamente com o decorrer do tempo e sua remoção é praticamente inviável sem que ocorra a destruição da lente. A calcificação de lentes de contato é geralmente associada ao nível de cálcio presente na lágrima e, apesar de não haver material completamente não susceptível à calcificação, o desenvolvimento de novos materiais e o acompanhamento das condições oculares de cada paciente antes mesmo da prescrição de lentes pode diminuir seu risco de falência.

Três estratégias para evitar a calcificação de biomateriais podem ser adotadas⁶⁹: (1) terapias sistêmicas com agentes anticalcificantes; (2) terapias locais com dispositivos de liberação controlada de fármacos; e (3) modificações do biomaterial, através de remoção de um agente calcificante, adição de um agente exógeno ou alteração química.

A adoção de uma estratégia anticalcificante deve não somente ser eficaz, mas também deve ser isenta de efeitos colaterais. Tais efeitos, nesse caso, podem incluir toxicidade sistêmica ou local, tendências trombóticas, efeitos imunológicos e conseqüente perda de estabilidade e comprometimento de propriedades mecânicas. A desvantagem de se usar agentes anticalcificantes sistêmicos para a prevenção de calcificação está na possibilidade de se verificar efeitos colaterais em ossos, através da diminuição das concentrações de fosfatos de cálcio no esqueleto.

Com a finalidade de se evitar esse tipo de efeito, a maioria dos estudos a fim de se evitar a calcificação patogênica de dispositivos implantáveis se concentra nas alterações do material e no uso de dispositivos de liberação controlada usados em conjunto com as eventuais próteses.

3.4 Compostos de Cálcio

Na precipitação e cristalização de sais inorgânicos, a estrutura e o tamanho do cristal podem ser induzidos pelo nível de saturação e pela presença de aditivos, porém o grau de especificidade cristalquímica é, em geral, baixo e pouco previsível⁷⁰. Em materiais naturalmente produzidos por seres vivos como ossos e conchas (que consistem em macromoléculas orgânicas como colágeno e quitina, impregnadas com cristais de fosfato e carbonato de cálcio, respectivamente), o controle da formação de cristais com orientação preferencial é comum, assim como a composição e morfologia dos mesmos é diferente das encontradas em precipitados de origem sintética. Tal especificidade é fruto da influência das macromoléculas que controlam a nucleação, o crescimento e o ordenamento dos cristais. Além disso, a presença de macromoléculas exerce papel importante nas propriedades biomecânicas destes materiais^{70,71}.

Em sistemas biológicos, a escolha dos elementos constituintes dos cristais é regida por quatro fatores: abundância, eficiência, conveniência e aumento da especificidade evolutiva⁷². Assim, os compostos de cálcio são os mais adequados para o desempenho de funções estruturais e de proteção, com boas propriedades de resistência a impacto, flexão e leveza, além de serem sintetizados a pressão e temperatura amenas^{73,74}.

Os tipos polimórficos de carbonato de cálcio (CaCO_3), formados biologicamente e mais comumente encontrados são a calcita e a aragonita, enquanto que a vaterita, menos estável, não é normalmente sintetizada por organismos vivos⁷¹. A calcita é termodinamicamente mais estável à pressão e temperatura ambientes do que a aragonita⁷⁵, mas ambas têm estruturas cristalinas similares, onde os íons cálcio estão localizados próximos às mesmas posições reticulares, alternadas por camadas de carbonato. A maior diferença entre estes pares polimórficos ocorre na organização e orientação do carbonato. A aragonita apresenta um empacotamento reticular mais denso e sob condições normais de temperatura e pressão se cristaliza em forma de agulhas sem se converter em cristais grandes e com tendência a formar aglomerados esferulíticos de alta

porosidade. A calcita, por outro lado, se cristaliza em romboedros, formando grandes cristais. Devido ao seu empacotamento, apresenta planos de clivagem por onde uma trinca se propaga com muita facilidade, apresentando fraca resistência mecânica e sendo extremamente quebradiça. A aragonita, não possuindo planos de fácil clivagem, se mostra mais resistente a trincas⁷⁴.

A presença de outros cátions de carga dupla na solução de CaCO_3 , em particular íons magnésio, bem como uma variedade de pequenas moléculas orgânicas, favorecem a deposição de aragonita⁷⁶. Dessa forma, acredita-se que a regulação do polimorfismo aragonita-calcita dependa da concentração de íons presentes, principalmente Mg^{2+} , na solução precipitante, existindo até mesmo uma modelagem teórica sobre os efeitos deste íon⁷⁷. Além deste fator, determinadas moléculas orgânicas também interferem na formulação destes cristais, alterando sua solubilidade e forma⁷⁸. Assim, o entendimento do processo biológico de controle da cristalização pode gerar a expectativa de se obter mecanismos análogos, aplicáveis em sínteses inorgânicas.

Em geral, as cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta a corpo estranho ou inflamatória e aparente habilidade de se ligar ao tecido hospedeiro. Estas características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, ou seja, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, os quais participam do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica.

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é pela sua razão molar Ca/P. Vários fosfatos de cálcio que possuem esta razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados pela precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas⁷⁹. Estas cerâmicas são biocompatíveis e osteocondutoras, ou seja, elas indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo com que isto ocorra sobre a superfície e através dos poros do material. A **Tabela 3** relaciona diversos fosfatos de cálcio e suas respectivas relações Ca/P.

Tabela 3: Tipos de fosfatos de cálcio⁸⁰.

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)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$

Entre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita com razão Ca/P igual a 1,67 para o composto estequiométrico é, sem dúvida, a mais estudada para finalidades clínicas^{81,82}, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos. No entanto, o uso clínico de cerâmicas de hidroxiapatita pode ser limitado por sua lenta biodegradação⁸³. Estudos por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente apenas após 4 ou 5 anos de implante⁸⁴. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, de modo que ele possa ser degradado lentamente, enquanto é repostado por osso em formação, evitando a presença de material estranho ao organismo durante longos períodos de tempo.

Em princípio, todas as biocerâmicas de fosfato de cálcio degradam em diferentes níveis, segundo a ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Esta reabsorção é causada por dissolução físico-química (que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico) por desintegração física em partículas menores e por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de

mediadores químicos que causam a redução do pH local. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial (pó > sólido poroso > sólido denso), com o decréscimo da cristalinidade, com a diminuição do tamanho dos grãos e, no caso da hidroxiapatita, por substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato e de Mg^{2+} e Sr^{2+} nos sítios de cálcio⁸⁵.

A **Tabela 4** ilustra a ocorrência de alguns tipos de fosfatos de cálcio em sistemas naturais.

Tabela 4: Ocorrência de fosfatos de cálcio em sistemas naturais⁸⁶.

Fosfatos de cálcio	Fórmula química	Ocorrências
Apatita	$(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4 \text{ Y})_6(\text{OH}, \text{X})_2$ (Z = Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Y = HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , X = Cl^- , F^-)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, cálculo urinário, calcificação de tecido mole
Fosfato de octacálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculos dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculos dentários, ossos decompostos
Fosfato de cálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculos dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos

A bruxita é encontrada no corpo humano, tanto na formação da fase óssea quanto em calcificações anormais. Este fosfato de cálcio é estável em valores de pH fracamente ácidos e pode ser usado como precursor da hidroxiapatita. Também é normalmente associado à monetita, que é a forma anidra desse fosfato⁸⁷.

O fosfato tricálcio (TCP) apresenta dois polimorfos principais, denominados α e β . Acredita-se que nenhum deles possa 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. A fase α por sua vez, só é obtida em temperaturas acima de 1125°C.

Os fosfatos tricálcio têm grande importância em engenharia biomédica. São muito mais solúveis que a hidroxiapatita e, por isso, são usados freqüentemente associados na fabricação de cerâmicas bioabsorvíveis. Controlando-se a razão entre HA (hidroxiapatita) e β -TCP (beta trifosfato de cálcio), 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.

3.5 Quitina e Quitosana

Os polissacarídeos ocorrem abundantemente na biomassa e se consistem em macromoléculas de longas cadeias em que os monossacarídeos são unidos por ligações glicosídicas. Eles são encontrados nos reinos animal, vegetal e também em microorganismos, nos quais podem exercer diversas funções, como o armazenamento de energia, material estrutural ou para conferir propriedades biológicas específicas.

A celulose é um polissacarídeo produzido no reino vegetal, sendo um dos principais componentes da biomassa (cerca de 50%). O segundo composto mais comum também é um polissacarídeo, a quitina, poli(β -(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetil-D-glucosamina), que ocorre em animais invertebrados nos quais é o principal constituinte do exoesqueleto. O termo quitina é derivado da palavra grega “*Khithon*”, que significa carapaça ou caixa protetora, sendo essa realmente a sua função⁸⁸. A **Fig. 1** ilustra a estrutura da quitina.

A quitina aparece na natureza na forma organizada de microfibras cristalinas, formando componentes estruturais no esqueleto de artrópodes ou em paredes celulares de fungos e leveduras. Além disso, é produzida por um grande número de organismos vivos nos reinos inferiores animal e vegetal, sendo aplicada em funções que exigem reforço e resistência.

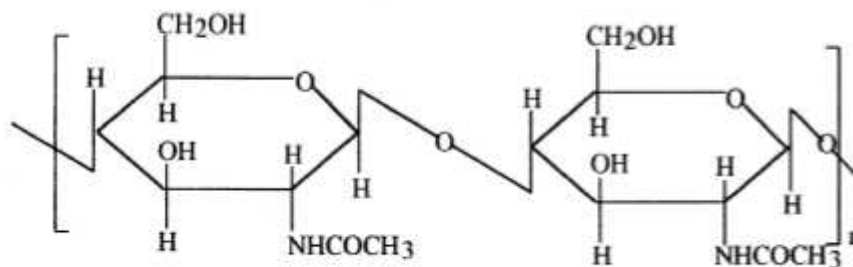


Figura 1: Estrutura da quitina.

Apesar da vasta ocorrência de quitina, até o momento as principais fontes desse material são cascas de caranguejo e camarão. No processo industrial, a quitina é extraída de crustáceos através de um tratamento ácido, responsável pela dissolução de carbonato de cálcio, seguido por uma extração alcalina para solubilização das proteínas. Posteriormente, promove-se um processo de descoloração, com o objetivo de se obter um material livre de pigmentos.

O processo acima descrito deve ser adaptado de acordo com a fonte de quitina disponível, considerando-se as diferenças existentes entre a ultra-estrutura do material inicial. O produto final precisa ser pautado em termos de pureza e cor, já que a presença de pigmentos e/ou proteínas pode causar problemas em aplicações futuras, especialmente na área médica.

Dependendo da fonte, a quitina ocorre na forma de dois alomorfos, denominados α e β ^{89,90}, que podem ser diferenciados por espectroscopia de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance - NMR), em conjunto com difração de raios-X. Um terceiro alomorfo, γ -quitina, também é descrito na literatura^{89,91}, mas sob uma análise mais detalhada, esse alomorfo parece ser apenas uma variante da família α ⁹². A α -quitina é a forma mais abundante desse biopolímero, podendo ser detectada em paredes celulares de fungos e leveduras, em conchas e nervos de lagostas e caranguejos, em cascas de camarão e em cutículas de insetos. O estudo da α -quitina tem se mostrado interessante no entendimento estrutural, em comparação com a quitina de

artrópodes, já que algumas amostras apresentam alta cristalinidade⁹³ aliada a alta pureza (já que são sintetizadas na ausência de pigmentos, proteínas ou calcita). Além disso, a α -quitina pode ser sintetizada através da recristalização em solução^{94,95}, de biosíntese *in vitro*^{96,97} ou de polimerização enzimática⁹⁸.

Variedade mais rara de quitina, a β -quitina é normalmente encontrada associada a proteínas em penas de calamar⁸⁹ e em tubos sintetizados por alguns tipos de minhocas⁹⁹. Uma forma particularmente pura de β -quitina é encontrada em espinhos monocristalinos produzidos pela espécie de alga *Thalassiosira fluviatilis*¹⁰⁰. Até o momento, não foi possível obter a β -quitina de forma sintética.

Existe um amplo leque de aplicações para a quitina. Além de apresentar baixa toxicidade e de ser inerte no trato gastrointestinal de mamíferos, a quitina é biodegradável devido à presença de quitinases distribuídas na natureza e encontradas em bactérias, fungos, plantas e no sistema digestivo de muitos animais, incluindo os seres humanos. As quitinases são enzimas envolvidas na defesa de um determinado hospedeiro contra uma invasão bacteriana. São relatadas aplicações da quitina como fase estacionária em colunas de cromatografia de afinidade¹⁰¹, curativos que aceleram a cicatrização, imobilização de enzimas¹⁰², na indústria alimentícia e de biosensores, tratamento de efluentes industriais¹⁰³, em compósitos quitina-quitosana-hidroxiapatita para preenchimento ósseo, entre outros.

A quitina se apresenta parcialmente desacetilada (com pequena concentração de unidades de glucosamina) naturalmente, dependendo da fonte. Porém, ambas as formas α e β são insolúveis em todos os solventes convencionais, apesar das variações de cristalinidade, o que dificulta o processamento desse material.

Quitosana é o nome dado ao produto obtido da desacetilação da quitina. Este processo causa mudanças na massa molecular e no grau de desacetilação do produto. Dependendo da fonte e do processo de produção, a massa molecular da quitosana pode variar entre 300 e mais de 1000kDa com um grau de desacetilação variando de 30 a 95%¹⁰⁴. Assim, quitosana é um nome genérico que

representa uma família de quitina *N*-desacetilada, com diferentes graus de desacetilação.

Em geral, quando o número de unidades *N*-acetil-glucosaminas é superior a 50%, o biopolímero é denominado quitina. De forma complementar, quando o número de *N*-glucosaminas é maior, o termo quitosana é utilizado. A quitosana apresenta três tipos de grupos funcionais reativos: um grupo amino e dois grupos hidroxil, primário e secundário, localizados respectivamente nas posições C-2, C-3 e C-6. A **Fig. 2** ilustra a estrutura da quitosana.

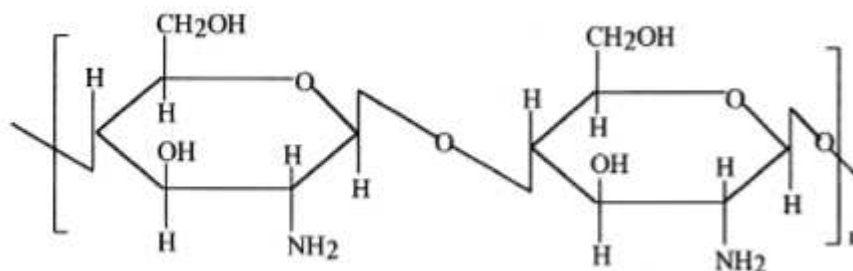


Figura 2: Estrutura da quitosana.

Estes grupos permitem modificações químicas da quitosana, que incluem acilação, alquilação, formação de base Schiff, alquilação redutiva, carboximetilação, carboxialquilação, silação, copolimerização, etc. As modificações químicas destes grupos resultam na formação de inúmeros derivados de quitosana, úteis para determinadas aplicações¹⁰⁵. As aplicações da quitina são restritas se comparadas às aplicações da quitosana devido à insolubilidade da quitina. Quitosana é normalmente insolúvel em condições de pH básico ou neutro e solúvel em pH ácido. Sua solubilidade depende da distribuição dos grupos amino livres e dos grupos *N*-acetil. Em meios fracamente ácidos (pH<6), os grupos amino livres são protonados e a molécula se torna solúvel¹⁰⁶.

3.5.1 Aspectos econômicos

Nas últimas décadas, a produção de quitina e quitosana esteve baseada no rejeito de cascas de camarão e caranguejo de indústrias de enlatados no Oregon, Washington, Virginia e Japão. Além disso, muitos países possuem grandes e inexploradas fontes de crustáceos, como a Noruega, o México e o Chile¹⁰⁷.

A produção de quitosana a partir de cascas de crustáceos, obtidas do rejeito de indústrias alimentícias é economicamente viável, especialmente no que diz respeito à recuperação de carotenóides. As cascas contêm quantidades consideráveis de astaxantim, um carotenóide de difícil produção sintética e que é comercializado como aditivo alimentar na piscicultura, especialmente na criação de salmão.

Para a produção de 1 kg de quitosana de casca de camarão com grau de desacetilação de 70%, são necessários 6,3 kg de ácido clorídrico, 1,8 kg de hidróxido de sódio, além de nitrogênio, água de processo (0,5 t) e água de resfriamento (0,9 t). Outros fatores importantes para se fazer uma estimativa do custo de produção da quitosana incluem custo de transporte, que pode variar de acordo com o custo de mão de obra e a localização. Na Índia, o Instituto Central da Tecnologia de Pesca descobriu que o rejeito seco de camarão grande contém cerca de 23% de quitina e o rejeito seco de camarão mantis contém cerca de 15%¹⁰⁸.

Atualmente, quitina e quitosana são produzidas em escala comercial na Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália. O preço mundial da quitosana, vendida em pequenas quantidades gira em torno de U\$750,/kg¹⁰⁹.

No Brasil, a produção de quitosana é incipiente, voltada para suprir a demanda de indústrias de produtos para a redução de peso. No entanto, existe um grande potencial inexplorado, tendo em vista que todo o rejeito da indústria pesqueira brasileira é simplesmente descartado.

3.6 Modificações químicas da quitosana

Para tornar a quitosana quimicamente mais inerte e resistente a variações de pH, costuma-se bloquear os grupos amino com um agente bifuncional. A **Tabela 5** mostra alguns exemplos de modificações químicas da quitosana e as respectivas finalidades e aplicações do material final.

Tabela 5: Derivados de quitosana e respectivas aplicações¹⁰⁹.

Derivado	Exemplos	Uso potencial
<i>N</i> -acil quitosana	Formil, acetil, propionil, butiril, hexanoil, octanoil, decanoil, dodecanoil, tetradecanoil, lauroil, miristoil, palmitoil, estearoil, benzoil, monocloroacetil, dicloroacetil, trifluoroacetil, carbamoil, succinil, acetoxibenzoil,	Tecidos, membranas e curativos médicos
<i>N</i> -carboxialquil (aril) quitosana	<i>N</i> -Carboxibenzil, glicina-glucana (<i>N</i> -carboximetilquitosana) alamina glucana, fenilalanina glucana, tirosina glucana, serina glucana, ácido glutâmico glucana, metionina glucana, leucina glucana	Meio cromatográfico e retenção de íons metálicos
<i>o</i> -carboxialquil quitosana	<i>o</i> -carboximetil, <i>o</i> -carboximetil reticulada	Peneiras moleculares e retenção de íons metálicos
Íons metálicos quelantes	Paládio, cobre, prata	Catálise, fotografia, produtos para saúde e inseticidas
Resinas semi-sintéticas de quitosana	Copolímeros de quitosana com metilmetacrilato, poliureiauretano, poli(amidaéster) anidrido de acrilamida maleica	Tecidos
Complexos naturais de polissacarídeos	Quitosana glucana de vários organismos Aquil quitina, benzil quitina Hidroxibutil quitina, cianoetil quitosana Hidroxietilglicol quitosana Glutaraldeído quitosana Complexo quitosana – ácido linoleico Uracilquitosana, teofilinaquitosana, adenina quitosana	Floculação e quelação de íons metálicos, dessalinização, sacos de diálise, imobilização de enzimas, aditivo alimentar e redutor de colesterol

O interesse em modificações químicas da quitosana tem crescido no sentido de se obter materiais com novas e melhores propriedades. Uma grande variedade de métodos tem sido empregada visando melhoria nas propriedades químicas e biológicas da quitosana através do grupo amino reativo presente nesse polímero.

São descritas modificações químicas da quitosana com o intuito de se melhorar as propriedades mecânicas do material, além de gerar materiais híbridos que apresentem propriedades desejáveis^{110,111}. São descritas também metodologias para a alteração de propriedades químicas da quitosana, onde filmes de quitosana contendo polietilenoglicol (PEG) ou poli(álcool vinílico) (PVA) são preparados através da mistura de PEG ou PVA com uma solução de acetato de quitosana¹¹². Com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas da quitosana, são reportadas ainda modificações com heparina¹¹³, sulfatação¹¹⁴, *N*-acilação¹¹⁵, etc.

Grupos carboxílicos são particularmente interessantes para a promoção de calcificação¹¹⁰. Além disso, com base nos sistemas encontrados na natureza, como o nácar, acredita-se que a quitina seja um bom substrato para calcificação através de processos biomiméticos. A **Tabela 6** mostra os diversos grupos *N*-Acil que podem ser usados na reação de acetilação.

A reação química de acetilação, sendo realizada em membranas densas e porosas de quitosana, representa uma rota conceitualmente interessante: a quitina, que se trata de uma quitosana altamente acetilada, é insolúvel em água, diferentemente da quitosana, que é solúvel em soluções ácidas. Tal solubilidade permite o molde do material em diversos formatos, utilizando-se soluções aquosas, o que seria impossível para a quitina. Assim, a acetilação da quitosana moldada permite que se obtenha uma quitina sintética moldada.

A acetilação dos grupos amino da quitosana é descrita para soluções¹¹⁰, sendo pouco estudada a acetilação heterogênea, feita diretamente em membranas, sejam elas densas ou porosas. O procedimento na literatura científica consiste na preparação de uma solução de quitosana em ácido acético e posterior adição de anidrido acético em metanol para promover a acetilação. O anidrido

acético é um composto muito reativo com grupos amino, produzindo assim grupos amida. As amins livres, como no caso da quitosana, possuem um par eletrônico, que é responsável pela reatividade do composto. Assim, a acetilação dos grupos amino diminui sua reatividade, pois os grupos acetil provenientes do anidrido acético recebem o par eletrônico livre.

Tabela 6: *N*-acilquitosana preparada pela *N*-acilação seletiva da quitosana com anidridos carboxílicos¹¹⁰.

Grupos <i>N</i> -Acil	Fórmula
Acetil	$[C_8H_{13}NO_5]_n$
Propionil	$[C_9H_{15}NO_5]_n$
Butiril	$[C_{10}H_{17}NO_5]_n$
Hexanoil	$[C_{12}H_{21}NO_5]_n$
Octanoil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,17}(C_8H_{15}O)_{0,83}]_n$
Decanoil	$[C_{16}H_{29}NO_5]_n$
Lauroil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,08}(C_{12}H_{23}O)_{0,92}]_n$
Miristoil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,13}(C_{14}H_{27}O)_{0,87}]_n$
Palmitoil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,18}(C_{16}H_{31}O)_{0,82}]_n$
Stearoil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,17}(C_{18}H_{35}O)_{0,83}]_n$
Benzoil	$[C_6H_{10}NO_4(H)_{0,18}(C_7H_5O)_{0,82}]_n$

3.6.1 Mecanismo de acetilação da quitosana

O átomo de nitrogênio presente na estrutura da quitosana é um nucleófilo, ou seja, é uma espécie química que busca um centro positivo, pois apresenta um par de elétrons não compartilhados. Assim, é possível afirmar, com base na literatura, que a reação de acetilação da quitosana com anidrido acético ocorre seguindo um mecanismo para a reação Sn2 (substituição nucleofílica bimolecular),

baseado nas idéias propostas por Edward D. Hughes e Sir Christopher Ingold, em 1937¹¹⁶. A mecanismo está esquematizado na **Fig. 3**:

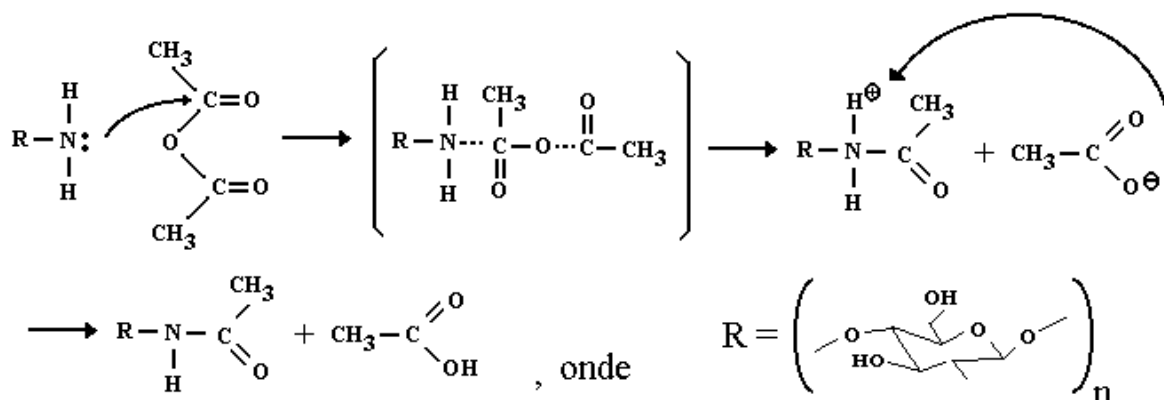


Figura 3: Mecanismo da reação de acetilação da quitosana

De acordo com este mecanismo, o nucleófilo (nitrogênio com par de elétrons não compartilhados) se aproxima, por trás, do carbono ligado ao grupo retirante (CH_3COO^-), isto é, pelo lado diretamente oposto ao deste grupo. O orbital que contém o par de elétrons do nucleófilo principia a se superpor ao orbital vazio (antiligante) do átomo de carbono ligado ao grupo retirante. À medida que a reação avança, a ligação entre o átomo de carbono e o grupo retirante se enfraquece. Quando isso acontece, a configuração do átomo de carbono se revira, isto é, a configuração se inverte e o grupo retirante é expelido. A formação da ligação entre o nucleófilo e o átomo de carbono proporciona a maior parte da energia necessária para romper a ligação entre o átomo de carbono e o grupo retirante. O mecanismo de Hughes-Ingold para a reação $\text{S}_\text{N}2$ envolve apenas uma etapa e, portanto, não há intermediários. A reação avança através da formação de uma configuração instável de átomos, o estado de transição.

3.7 Quitosana como biomaterial

Propriedades como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade fazem da quitosana um material adequado para aplicações como biomaterial e para formulações farmacêuticas¹¹⁷. A **Tabela 7** mostra algumas aplicações da quitosana na área médica.

Tabela 7: Formas e usos da quitosana na área médica¹¹⁸.

Forma	Uso
Filmes e Membranas	Bandagem, tratamento de queimaduras, cicatrização de lesão, hemodiálise, membrana artificial de rim, adsorção de proteínas e metais pesados
Gel e pasta	Veículo de liberação de drogas, agente de imobilização e encapsulamento de células e enzimas
Tabletes, microesferas e microgrânulos	Sistema de liberação de fármacos, adsorção de proteínas e metais pesados
Solução	Tratamento contra infecções bacterianas, agente hemostático
Esponjas	Agente hemostático, sistema de liberação de drogas
Fibras	Suturas e bandagem
Blendas quitina/quitosana	Suturas cirúrgicas

Atualmente, a quitosana é aplicada em casos de hipobilirrubinemia e hipocolesteremia¹¹⁹, além de possuir atividade antiácida e antiúlcera, propriedades de favorecimento de cura em ferimentos e queimaduras, e de ser adequada para a imobilização de enzimas e células vivas na oftalmologia. Devido a sua capacidade de formar filmes, a quitosana aparece como biopolímero interessante para o desenvolvimento de materiais como lentes de contato (rígidas e gelatinosas), além de ser usada na produção de lentes de bandagem ocular para a proteção de olhos

doentes. Membranas de quitosana também têm sido usadas em rins artificiais devido a sua permeabilidade e resistência mecânica adequadas¹²⁰.

Recentemente, com o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas cada vez menos agressivas, a ortopedia experimenta avanços na área de sistemas injetáveis que podem moldar a forma da cavidade óssea e polimerizar quando injetados *in situ*, para tratamento de defeitos e fraturas. Dispositivos como estes diminuem tempos de operação, minimizam os efeitos de dano devido à retração muscular, reduzem tamanho de cicatrizes e dores de pós-operatório e possibilitam aos pacientes uma recuperação mais rápida, barata e efetiva. Nesse contexto a quitosana é um material importante, apresentando bom desempenho em testes preliminares em fluido corpóreo simulado, além de apresentar citocompatibilidade e bioatividade¹²¹.

A quitosana é um importante polímero não viral natural para aplicação como agente portador de genes. Este material apresenta forte afinidade com DNA e pode espontaneamente formar micropartículas esféricas através de coacervação complexa. A eficiência dos complexos quitosana/DNA é dependente de muitos fatores, incluindo o grau de desacetilação e massa molecular da quitosana, a concentração de plasmídeos, a relação de cargas entre os grupos amino da quitosana e o fosfato do DNA, a concentração do soro humano, pH e o tipo de célula¹²². Devido às propriedades mucoadesivas da quitosana, sistemas de liberação de genes baseados nesse material têm sido aplicados com sucesso em terapias via oral e nasal.

Uma importante propriedade da quitosana é a sua atividade antibacteriana intrínseca. Estudos mostram que a quitosana é capaz de reduzir a taxa de infecção em ratos, causada pela indução experimental de osteomielite por *Staphylococcus aureus*¹²³. Os grupos amino catiônicos presentes na quitosana se associam com ânions presentes nas paredes celulares das bactérias, inibindo a biosíntese; além disso, a quitosana interrompe o transporte de massa através da parede celular, acelerando a morte da bactéria. Assim, devido a essa propriedade antibacteriana, a quitosana tem sido amplamente aplicada em blendas com outros polímeros¹²⁴. Quando adicionada a hidroxiapatita e ao emplastro de Paris com a

finalidade de se obter um compósito de sustentação para a liberação de vancomicina e fosfomicina, este compósito de quitosana é capaz de inibir a resistência da *S. aureus in vitro* ao antibiótico metilicina por períodos de 3 meses, tempo compatível ao tratamento da maioria das infecções ortopédicas¹²⁵.

A quitosana vem sendo combinada com uma grande variedade de materiais como o alginato, hidroxiapatita, ácido hialurônico, fosfatos de cálcio, poli metil metacrilato de metila (PMMA), poli ácido acrílico (PLLA) e fatores de crescimento para aplicação em ortopedia. Em geral, a quitosana oferece um grande número de possibilidades para engenharia de tecidos com base celular¹²⁶. A preparação de possíveis matrizes para a cultura celular inclui géis, esponjas, fibras, compósitos porosos de quitosana e cerâmica ou outro material polimérico como colágeno ou gelatina¹²⁷ para ajustar propriedades de semeio e comportamento mecânico de células para transplantes.

O conhecimento a respeito do comportamento e das aplicações da quitosana em sistemas como os citados anteriormente, se encontra relativamente avançado e cada vez mais esse material se concretiza como biopolímero versátil e funcional para aplicações na área médica. No entanto, poucos estudos estão direcionados ao entendimento sobre o mecanismo de calcificação sob o qual esse material está exposto.

A quitina se apresenta na natureza na forma mineralizada, ou seja, em associação com compostos de cálcio, principalmente carbonato de cálcio, na composição de conchas e carapaças de crustáceos. A quitosana, por ser uma forma desacetilada da quitina, aparece como substrato interessante para ensaios de biomineralização, tanto no sentido de enriquecer o entendimento de processos naturais de deposição, como para a caracterização do comportamento desse material quando colocado em contato com soluções que contêm íons cálcio, como o soro humano.

Fica claro que a viabilidade de se aplicar biomateriais a base de quitosana para a fabricação de enxertos ósseos ou implantes que apresentem contato direto com o soro humano passa pelo entendimento de mecanismos de calcificação deste substrato. Esse entendimento não somente pode elucidar processos

naturais de calcificação como também pode indicar rotas viáveis para tratamentos anticalcificantes no caso de próteses não voltadas para o tecido ósseo, como válvulas cardíacas, bexigas de assistência cardíaca ventricular, enxertos vasculares, próteses urinárias, etc. Além disso, no caso de próteses e enxertos ósseos, o conhecimento dos processos de mineralização e caracterização da influência exercida pela matriz na estrutura química do depósito são de suma importância para se analisar a adequação desse material à aplicação proposta.

Nesse sentido, a contribuição do presente trabalho se insere justamente no entendimento de tais processos de deposição e na avaliação dos efeitos causados pela reação de acetilação heterogênea da quitosana nesse processo de calcificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Durante todas as etapas experimentais deste estudo foram utilizados reagentes com grau analítico de pureza e todas as soluções e lavagens de amostra foram feitas em água milli-Q ultrapura. A pressão e temperatura ambientes médias para a localidade dos experimentos foram de 0,92 atm e 23°C, respectivamente.

4.1 Síntese dos substratos de quitosana

Para a síntese de membranas a partir de flocos de quitosana comercial, adotou-se a metodologia desenvolvida e descrita por Beppu¹²⁸. Essa metodologia sofreu pequenas modificações de caráter experimental, para que a produção de membranas fosse otimizada.

4.1.1 Solução de quitosana

Para a preparação de todos os substratos de quitosana utilizados durante este estudo, inicialmente preparou-se uma solução mãe de quitosana em ácido acético. Para tanto, foram utilizados flocos de quitosana comercial, fornecidos pela Sigma, com grau mínimo de desacetilação de 85%. Os flocos de quitosana, na proporção necessária para se obter uma solução 2,5% em massa, foram solubilizados em solução 3% em massa de ácido acético glacial 100%, fornecido pela Merck.

A solução foi armazenada a 4°C em frascos de polietileno com tampa durante período de 7 dias, com agitações diárias para completa solubilização. Posteriormente a solução foi filtrada em sistema de ultrafiltração a vácuo com placa sinterizada de vidro de aproximadamente 50 micrômetros de diâmetro médio de poros, para a remoção de impurezas insolúveis.

4.1.2 Membranas densas

A fabricação de membranas densas de quitosana ocorreu através do espalhamento de 50 g de solução de quitosana em uma placa de Petri lisa e estéril, de 15 cm de diâmetro. As placas foram então colocadas em estufa a 50°C durante um período de aproximadamente 24 horas, necessário para que todo o solvente presente sofra evaporação e a massa total da placa se estabilize.

Após este processo de secagem, as membranas são resfriadas até a temperatura ambiente e então mergulhadas em solução 1M de hidróxido de sódio, fornecido pela Synth, durante um período de 24 horas para a neutralização dos grupos amino da quitosana, antes protonados em meio ácido. As membranas são finalmente lavadas e armazenadas em água milli-Q, em frascos de polietileno com tampa à 4°C.

4.1.3 Membranas porosas

O procedimento adotado para a fabricação de membranas porosas de quitosana é o mesmo adotado para a fabricação de membranas densas, alterando-se apenas o tempo de secagem em estufa. No caso das membranas densas é necessário que todo o solvente presente sofra evaporação. Para a fabricação de membranas porosas, a evaporação do solvente deve ocorrer de forma que a massa inicial de solução de quitosana adicionada à placa de Petri se reduza à sua metade. Em estufa a 50°C, é necessário aproximadamente um período de secagem de 5 a 6 horas.

Após esse processo de secagem, as membranas porosas de quitosana passam pelo mesmo processo de neutralização, lavagem e armazenamento que as membranas densas, sendo necessário apenas um pouco mais de cautela na manipulação dessas amostras, que são aparentemente mais frágeis ao manuseio.

A **Fig. 4** ilustra o processo de fabricação de membranas densas e porosas de quitosana.

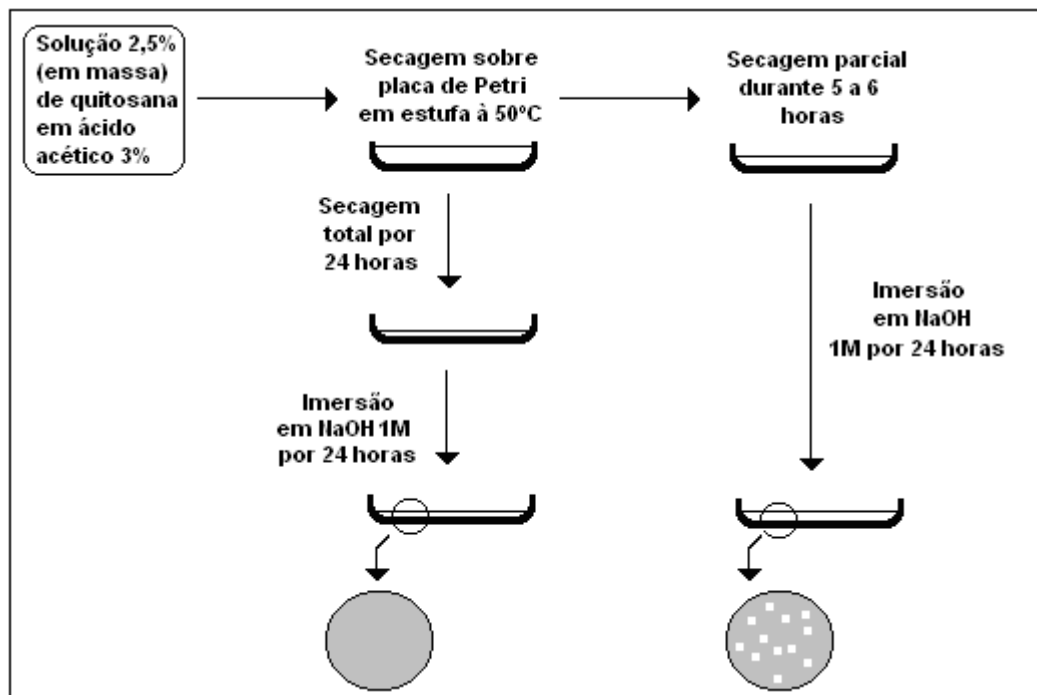


Figura 4: Figura esquemática para a produção de membranas densas e porosas de quitosana.

4.1.4 Modificação química da quitosana

A reação de acetilação da quitosana foi realizada com base na metodologia estabelecida por Hirano¹¹⁰, que descreve a acetilação da quitosana na forma de solução. No presente estudo, no entanto, a metodologia foi adaptada para que a reação fosse feita de maneira heterogênea, ou seja, diretamente sobre membranas de quitosana. Dessa forma, pequenos cortes de membrana (densa ou porosa) de aproximadamente 0,5 g em base úmida foram imersos em solução de anidrido acético fornecido pela Vetec em metanol fornecido pela Ecibra a concentração de 2% em volume.

As amostras foram então submetidas a agitação branda em agitador magnético durante um período de 24 horas, a fim de se garantir a acetilação total dos grupos amino presentes na quitosana. As amostras foram então lavadas em água milli-Q e armazenadas em frascos de polietileno com tampa a 4°C.

4.2 Caracterização dos substratos

4.2.1 Testes de citotoxicidade

Com o intuito de se avaliar a viabilidade de aplicação de membranas de quitosana para a produção de dispositivos médicos, foram realizados testes de citotoxicidade, seguindo a norma ISO 10993-5: *“Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”*. Foi utilizado um meio de cultura RPMI 1640, fornecido pela Gibco, através da metodologia CellTiter96® AQ_{ueous} Non – Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation.

O teste de proliferação celular não radioativo é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiosensitivos. O teste CellTiter96® AQ_{ueous} é composto de soluções de um composto tetrazólico (3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte; MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metasulfato de fenazida; PMS). O MTS é bio reduzido pelas células a produto formazan que é solúvel no meio de cultura tecidual. A absorbância do formazan a 490 nm pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros processos. A conversão do MTS em formazan solúvel aquoso é executada pela enzima desidrogenase encontrada em células metabolicamente ativas. A quantidade do produto de formazan como medida da quantidade de absorbância é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

A membrana de quitosana natural a ser testada foi recortada para preparação do extrato na concentração de 6 cm²/mL de meio de cultura (RPMI). Após 72 horas a 37°C, o extrato de meio de cultura foi filtrado em filtro para

seringa estéril, com poro 0,45 µm de membrana de acetato de celulose (Corning), e preparadas diluições seriadas de 100% a 6,25% do extrato em meio RPMI estéril.

Nesse experimento foi utilizado como controle positivo, ou seja, material que quando testado de acordo com a norma ISO 10993-5 promove resposta citotóxica, uma solução de fenol 0,4% em volume. O controle negativo, ou seja, material que quando testado de acordo com a norma ISO 10993-5, não promove resposta citotóxica, foi o extrato de PEAD (polietileno de alta densidade). Os testes foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), sob a coordenação da prof.^a Dr.^a Olga Z. Higa.

4.2.2 Testes mecânicos

Ensaios de resistência ao puncionamento e de alongamento foram realizados em membranas densas de quitosana utilizando-se o método 2065 1-82 FTMS 101 C – *“Puncture Resistance and elongation test (1/8 inch radius probe method)”*. Um equipamento universal de ensaios Emic – MEU-001 e um medidor de espessura digital ME-003 de resolução de 0,01mm foram utilizados. As amostras submetidas aos testes foram retiradas da água de armazenamento e o excesso de água foi drenado, realizando-se o teste imediatamente, a uma velocidade de 5 mm/minuto.

4.2.3 Determinação do grau de desacetilação

Uma precisa determinação do grau de desacetilação da quitosana é necessária, pois existe uma grande influência deste parâmetro nas propriedades da quitosana como reatividade, estabilidade, solubilidade e, por conseqüência, na sua aplicabilidade. Muitos métodos são sugeridos na literatura como espectroscopia no infravermelho, cromatografia gasosa e por permeação em gel,

espectroscopia UV, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), dentre outros¹². Infelizmente, existem grandes discrepâncias entre os valores obtidos.

Raymond¹²⁹ apresentou um método interessante para determinar o grau de desacetilação, baseando-se em ensaios de titulação potenciométrica. O método consiste em dissolver a amostra de quitosana em HCl, deixando-a tempo suficiente para que ocorra a protonação dos grupos amino. A solução é então titulada com NaOH. Ocorrem dois pontos de viragem: no primeiro é neutralizado o excesso de ácido e no segundo os grupos amino que foram protonados. A diferença entre esses dois pontos é utilizada para se determinar o grau de desacetilação.

Apesar do método de titulação apresentar uma imprecisão relativamente grande, ele é recomendável quando se trabalha com graus de desacetilação maiores que 5%. A quitosana comercial utilizada aqui apresenta no mínimo 85% de desacetilação, ou seja, possui em média 85 unidades D-glucosamina por 100 monômeros de quitosana, expresso como porcentagem.

As amostras de quitosana natural e acetiladas, de aproximadamente 0,75g foram colocadas em 100 mL de solução 0,02M de HCl fornecido pela Merck e deixadas por 24 horas para protonação e solubilização. A titulação com solução padrão de NaOH 0,1M foi feita com o auxílio de uma micropipeta, sob agitação constante, numa taxa de 0,5 mL a cada 5 minutos para obtenção de um valor estável de potencial condutimétrico.

Os gráficos de potencial condutimétrico em função do volume de titulante podem então ser construídos, assim como as curvas diferenciais e os pontos de equivalência. Esses valores são então determinados para o cálculo do número de equivalentes de grupos amino em cada amostra titulada. A diferença entre os pontos de equivalência corresponde ao volume de base necessário para neutralização destes grupos. O número de equivalentes ácidos pode ser calculado pela **Eq. 1**¹²⁹:

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161}{m} * 100 \quad (1)$$

onde M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH, V_1 e V_2 são respectivamente os volumes de NaOH, em litros, empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada, 161 é a massa molecular da unidade monomérica da quitosana e $W_{amostra}$ a massa seca do filtrado retirado do titulado, em gramas.

É importante observar que mesmo que o volume de HCl adicionado não seja conhecido é possível proceder a titulação normalmente, visto que a titulação do ácido ocorre juntamente com a neutralização dos grupos amino. O importante é que esse volume seja suficiente para protonar toda a amostra.

4.2.4 Espectroscopia de infravermelho

A absorção de radiações eletromagnéticas por parte de átomos ou moléculas exige que estas apresentem energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. O mecanismo apropriado à excitação vibracional é proporcionado pela variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações; a transferência de energia ocorre, então, por interação destes dipolos oscilatórios com o campo elétrico oscilatório da luz (radiação infravermelha) desde que a frequência com que ambos variam seja a mesma.

As moléculas diatômicas homonucleares, como H_2 , N_2 , O_2 , Cl_2 , etc., não possuem dipolo elétrico, qualquer que seja a respectiva energia vibracional. Por isso, das moléculas diatômicas só as heteronucleares como HCl, CO, etc., possuem espectros de absorção vibracional (espectro de infravermelho). No caso de moléculas poliatômicas sem dipolo elétrico, como por exemplo, CO_2 , há certas vibrações que produzem dipolos flutuantes; é o que se verifica com a flexão da molécula. Em regra, a excitação de vibrações de flexão exige menor energia do que a de vibrações de distensão.

No espectro de infravermelho é habitual, em vez de se representar absorvância como nos espectros de ultravioleta e visível, traçar a percentagem de luz transmitida em função do comprimento de onda (ou, vulgarmente, do número de ondas em cm^{-1}).

Os espectros das moléculas poliatômicas são em geral complicados. No entanto, é possível atribuir certas bandas a certos grupos de átomos na molécula. Como exemplo, os grupos -OH (álcoois), -NH₂ (aminas) e -CO (aldeídos e cetonas) dão origem a absorções características, respectivamente para: ~2800nm; ~2800, ~6300 e 12000 nm ; 5400-5900 nm. Um íon CO₃²⁻ dá origem a bandas em ~7000 e ~11500nm e um íon SO₄²⁻ em ~9000 e ~15500 nm.

A técnica do infravermelho próximo é um método altamente eficiente para análises quantitativas e qualitativas. Esta técnica oferece um método rápido de análise química que, em segundos, fornece resultados de múltiplas propriedades em amostras não preparadas. A região espectral do infravermelho próximo é o segmento do espectro eletromagnético entre 800 a 2500nm, onde as amostras apresentam absorvância muito menor do que na tradicional região do infravermelho médio (aproximadamente um fator de 10 – 100). A **Tabela 8** mostra os espectros eletromagnéticos e a respectiva faixa de comprimento de onda.

Tabela 8: Espectros eletromagnéticos.

Espectro Eletromagnético	Faixa (nm)
Ultra Violeta	< 400
Visível	400 até 800
Infravermelho Próximo	800 até 2500
Infravermelho	> 2500

O espectro infravermelho de polímeros pode ser considerado simples levando-se em consideração o grande número de átomos envolvidos¹³⁰. A análise vibracional de polímeros fornece informações sobre três importantes características estruturais:

- A composição química;
- A estrutura configuracional e conformacional;
- As forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares.

Devido à sua praticidade, o infravermelho é a ferramenta espectroscópica preferida na caracterização de polímeros e biopolímeros¹³¹. As amostras podem ser preparadas de diversas maneiras (pastilhas, fitas, filmes, etc.). Os dados obtidos podem ser tratados com subtração, adição, análise de fatores, deconvolução spectral e podem ser usados quantitativamente¹³².

Empregando-se um interferômetro tipo Michelson, como mostrado na **Fig. 5** como espectrômetro, as vantagens derivam tanto de uma abertura larga na entrada do sinal como da presença do espectro inteiro na saída.

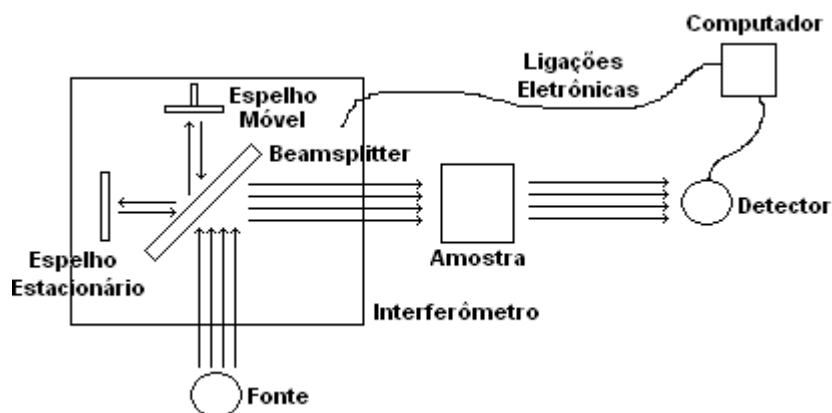


Figura 5: Instrumentação típica para espectroscopia infravermelho usando transformada de Fourier.

Assim, o espectrômetro por transformada de Fourier não é limitado, como os espectrômetros de prisma e de grade, pela presença de fendas estreitas que restringem tanto a irradiância como o intervalo de comprimentos de onda disponíveis. Além disso, a resolução obtida com esta técnica é muito alta, limitada apenas pela largura da janela da entrada e pela região de comprimentos de onda em análise.

No presente trabalho, foram realizadas análises de infravermelho por transformada de Fourier de membranas densas (após lavagem e secagem ao ar), por estas serem mecanicamente mais resistentes que as membranas porosas. O fato de se conseguir filmes densos de quitosana, com pouca irregularidade de superfície, propiciou o uso do aparato de ATR (attenuated total reflection – reflexão total atenuada), que permite o estudo químico da superfície do filme.

Foram obtidos espectros na faixa de $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ utilizando-se o instrumento FTIR da Nicolet Protégé 460, com acessório ATR de ZnSe.

4.2.5 Análises térmicas

4.2.5.1 Análise termogravimétrica

As análises térmicas foram realizadas para a observação do comportamento e da estabilidade térmica do material. Na análise termogravimétrica (Thermogravimetric Analysis - TGA), a variação da massa da amostra, em atmosfera controlada, é acompanhada em função do tempo e temperatura, em gradiente linear com o tempo. O gráfico da massa ou percentual da massa em relação ao tempo é chamado termograma. Estas curvas são características de um dado composto ou sistema em análise, devido ao caráter específico das seqüências de reações físico-químicas que ocorrem numa banda definida de temperatura, dependentes de uma cinética que é função da estrutura molecular.

As variações de massa resultam da ruptura e formação de diferentes ligações físicas ou químicas, as quais conduzem à liberação de voláteis ou produtos de reação mais pesados. As análises termogravimétricas foram realizadas com aproximadamente 8 mg de amostras previamente cortadas em pequenas frações e armazenadas em frascos de polietileno. Antes do início das análises, as amostras foram deixadas em dessecador durante 48 horas, para que o excesso de água fosse eliminado. Foi utilizado um analisador termogravimétrico TGA-50 da Shimadzu com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $25 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$. A faixa de temperatura estudada foi de 25 a 900°C .

4.2.5.2 Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC) é um método analítico termodiferencial no qual a ordenada, em qualquer tempo ou temperatura, é proporcional ao fluxo diferencial de calor entre a amostra e uma referência. Todos os eventos térmicos registrados em DSC são funções da composição e estrutura do material, como também de sua história térmica, que são mostrados como desvios da linha de base, na absorção ou liberação de calor, ou seja, na direção endo ou exotérmica.

As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas com aproximadamente 6 mg de amostras previamente cortadas em pequenas frações e armazenadas em recipiente de polietileno. As amostras foram então deixadas em dessecador por 48 horas e submetidas às análises no equipamento DSC-50 da Shimadzu, com prévia calibração, a partir da temperatura inicial de 25°C até a temperatura final de 450°C , com isoterma de 1,00 minuto em 25°C e em 450°C , rampa de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, em cadinho de alumínio não hermético em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

Ambas as análises (TGA e DSC) foram realizadas em duplicata.

4.3 Ensaios de calcificação

Muitas metodologias estão presentes na literatura para a realização de experimentos de calcificação *in vitro*, com o intuito de se conseguir reproduzir em laboratório as condições naturais de deposição de sais de cálcio observadas em seres vivos. Kokubo¹³³ propôs a preparação de uma solução que simula o fluido corpóreo humano (Simulated Body Fluid – SBF) através da mistura de soluções de diversos sais que contêm os íons presentes no plasma sanguíneo e de uma solução tampão. A **Tabela 9** mostra uma comparação entre as concentrações salinas no plasma humano e no SBF proposto por Kokubo.

Tabela 9: Concentração iônica no plasma sanguíneo e no SBF, em mM.

	pH	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma	7,2-7,4	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	7,4	142,0	5,0	2,5	1,5	148,8	4,2	1,0	0,5

A utilização de experimentos *in vitro* não elimina por completo a necessidade de se realizar experimentos *in vivo*, uma vez que estes últimos representam de forma mais fiel o processo natural de mineralização. Entretanto, a utilização de experimentos *in vitro* pode ajudar no planejamento inicial de experimentos, além de fornecer informações sobre o comportamento dos substratos e seu respectivo mecanismo de calcificação. Os procedimentos *in vitro* são ainda, em geral, mais simples e baratos, além de que, nesse caso, é possível manter certa reprodutibilidade e repetibilidade experimental, difícil de ser obtida em experimentos *in vivo* devido à própria variabilidade inerente aos seres vivos.

A preparação do SBF não é trivial. A adição dos sais e do ácido responsável pelo ajuste do pH da solução deve ser feita de maneira a não provocar a precipitação de cristais em nenhum momento, desde a preparação até a utilização. Além disso, por ser uma solução amplamente favorável à proliferação de bactérias e fungos, sua preparação deve ocorrer imediatamente antes de sua

aplicação, não sendo utilizadas soluções previamente preparadas e armazenadas. A **Tabela 10** mostra a preparação do SBF e da variante desse fluido sem íons fosfato, em duas diferentes concentrações.

Neste trabalho, foram realizados experimentos com diferentes amostras de quitosana, submetidas ao tratamento com SBF convencional, assim como o reportado por Kokubo, e com uma solução ligeiramente diferente, o SBF sem íons fosfato.

Tabela 10: Preparação das soluções SBF e SBF sem íons fosfato.

Sais	Conc.	SBF	SBF sem fosfato	SBFx1,5	SBFx1,5 sem fosfato
NaCl (J.T. Baker)	2,74 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75 mL
KCl (Synth)	0,06 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75 mL
CaCl ₂ (Synth)	0,05 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75 mL
MgCl ₂ (Ecibra)	0,03 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75mL
NaHCO ₃ (Nuclear)	0,0895 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75 mL
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0,02 M	12,5 mL	-	18,75 mL	-
Na ₂ SO ₄ (Ecibra)	0,01 M	12,5 mL	12,5 mL	18,75 mL	18,75 mL
“Tris” (PlusOne)*	0,4 M	31,25 mL	31,25 mL	31,25 mL	31,25 mL
HCl (Merck)	0,36 M	**	**	**	**
Volume final	-	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL

*- (CH₂OH)₃CNH₂

** - Aproximadamente 28mL (pH=7,4)

Busca-se, através do tratamento da quitosana com fluido corpóreo simulado sem o íon fosfato, observar as características dos depósitos presentes, que nesse caso, são formados predominantemente por carbonato de cálcio¹³⁴, diferentemente do que ocorre na deposição com SBF com íon fosfato, onde se observa a deposição predominante de fosfato de cálcio. Esse ensaio tem como objetivo mimetizar o nácar, onde carbonato de cálcio compõe cerca de 95% em

volume, sendo o restante composto por proteína e quitina: sua fase orgânica consiste em aragonita muito bem orientada que proporciona propriedades mecânicas singulares.

Além disso, foram estudadas também as eventuais diferenças nas características dos depósitos, resultantes de alterações no pH da solução calcificante ou de alterações em sua relação cálcio/fósforo.

Além dos ensaios com SBF, foi utilizada ainda uma metodologia diferente das encontradas na literatura, com o intuito de se verificar de maneira rápida a influência da matriz no processo de calcificação heterogênea. Este experimento consiste na deposição quimicamente induzida de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio, em condições ambiente, na presença de matrizes de quitosana. Tal precipitação é realizada através da imersão dos substratos de quitosana em solução concentrada de CaCl_2 e posterior adição de soluções que contenham íons fosfato ou carbonato. Através da análise dos cristais obtidos na presença e na ausência de substrato é possível verificar a influência da matriz no processo de deposição.

A vantagem de se utilizar esse tipo de experimento é poder testar rapidamente o comportamento da matriz quando submetida à deposição de sais de cálcio. Esse método é mais simples em comparação com os ensaios *in vitro* com fluido corpóreo simulado, sendo que os testes convencionais com SBF levam em média 7 dias e os testes de calcificação quimicamente induzida podem ser realizados e analisados em pouco mais de 30 minutos.

4.3.1 Estudo do processo inicial de calcificação

Com o intuito de se analisar o processo inicial e a evolução da calcificação de substratos de quitosana, foram preparados ensaios de dois períodos diferentes (30 minutos e 12 horas) de contato do substrato (quitosana natural e acetilada) com a solução calcificante (SBFx1,0 e SBFx1,0 sem fosfato). Os experimentos foram realizados com cortes de membranas de aproximadamente 2 cm^2 ,

colocados em pequenos frascos de polietileno com 50 mL de solução calcificante a 37°C (com variação de 2°C superiores ou inferiores a este valor) em banho termostático Shaker Bath Lab/Line ORBIT, com agitação branda de 50rpm apenas para se evitar que as amostras ficassem estagnadas no fundo do frasco. A

Fig. 6 mostra um esquema simplificado dos estudos de calcificação inicial.

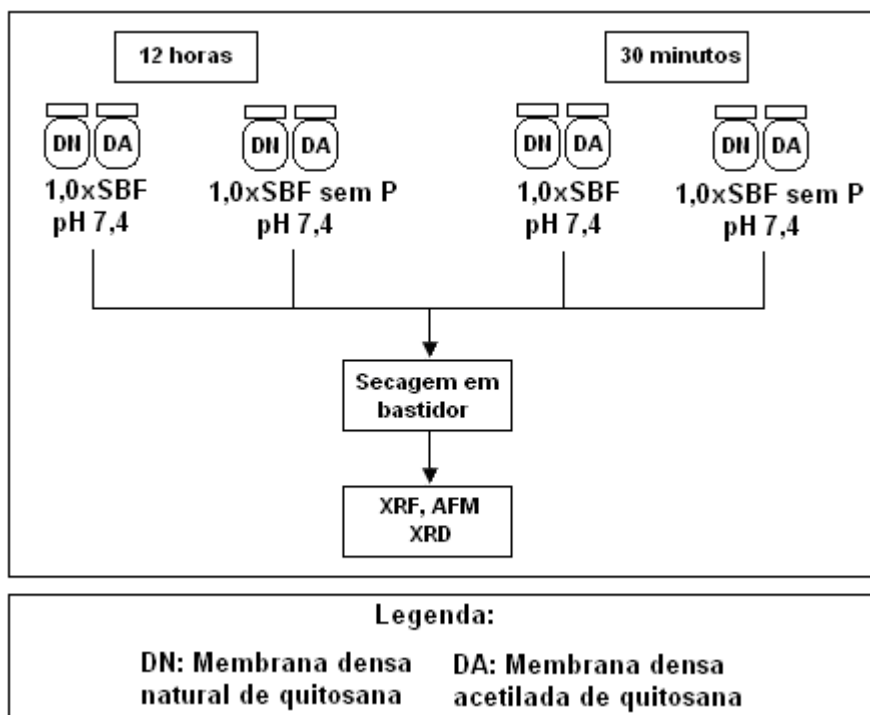


Figura 6: Fluxograma dos ensaios de calcificação inicial.

As amostras foram, então, lavadas cuidadosamente apenas para retirada do excesso de sais presentes na superfície que não estivessem efetivamente depositados no substrato. Por fim, as amostras foram secas a temperatura ambiente numa espécie de bastidor que garantiu que a superfície das amostras secasse de forma plana, sem sofrer nenhum contato físico que eventualmente pudesse alterar as características morfológicas dos depósitos.

Foram realizadas, então, análises de fluorescência de raios-X com o intuito de se visualizar a topografia relativa aos compostos de cálcio. Como esse tipo de

análise é não-destrutiva, foi possível realizar também análises de microscopia de força atômica nas mesmas amostras, com o objetivo de se visualizar a topografia geral da superfície das membranas. Além disso, os filmes foram analisados ainda por difração de raios-X (X-ray diffraction - XRD) para se obter informações sobre a cristalinidade dos depósitos.

4.3.1.1 Fluorescência de Raios-X

A análise por fluorescência de raios-X (X-Ray Fluorescence - XRF) é uma técnica que se baseia na medida das intensidades dos raios-X característicos emitidos pelos elementos químicos que constituem a amostra, quando esta é devidamente excitada¹³⁵. Assim, quando um fóton ou partícula carregada interage com um elétron das camadas mais internas do átomo, este é ejetado gerando uma vacância na camada atômica. Uma vez formada a vacância, o átomo tende a retornar ao seu estado natural através da emissão de raios-X, ou seja, através da fluorescência de raios-X.

A técnica de fluorescência de raios-X por dispersão em energia permite um grande número de aplicações em diversos ramos da ciência. Além de ser uma técnica instrumental e não destrutiva, permite a quantificação dos elementos em uma amostra utilizando as intensidades dos raios-X característicos emitidos¹³⁶. Esta técnica tem adquirido importante papel em análises químicas, devido à possibilidade de detecção simultânea de elementos numa ampla faixa de número atômico e de concentração, e de não necessitar de pré-tratamento químico.

A absorção das radiações primária e característica por parte da amostra (denominada efeito matriz) constitui a maior dificuldade para a realização da análise quantitativa. Os métodos empíricos e semi-empíricos requerem um número relativamente grande de padrões com composição similar à amostra desconhecida, os quais, na maioria das vezes, não são facilmente obtidos.

As análises de fluorescência de raios-X foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado em Campinas/SP. O equipamento utilizado

opera na faixa de raios-X com radiação síncrotron e é destinado à análise da composição química multielementar ($Z > 14$), em níveis de traços e ultra traços. A energia eletrônica no interior do anel é de 1,37 GeV com um campo de dipolo magnético de 1,65 T, que produz uma energia crítica de fóton de 2,08 keV. A fonte de radiação síncrotron utilizada na linha de luz XRF é D09B (15°)¹³⁷.

Suas principais aplicações são análises químicas de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico a 20 mm de resolução espacial. A **Fig. 7** mostra as linhas de luz presentes no LNLS.



Figura 7: Representação esquemática das linhas instaladas no LNLS.

Para a realização das análises, a amostra foi posicionada no plano de imagem com uma exatidão de 0,5 μm com estágio de controle remoto de 3 eixos (y, x, z). Um vídeo microscópio (aumento de 500 vezes) foi utilizado para posicionar a amostra no feixe. As medidas foram realizadas em geometria padrão ($45^\circ + 45^\circ$) com a excitação de um feixe branco e com a utilização de escalas ortogonais (300 μm x 300 μm). Deste modo, uma resolução de 300 μm x 300 μm pixels pôde ser obtida mantendo-se um alto fluxo de fótons na amostra. O espectro de fluorescência foi registrado com um detector de Si(Li) de 165 eV FWHM a 5,9 keV em ar atmosférico, posicionado a 90° na direção incidente. A

determinação dos elementos químicos nas amostras de quitosana foi realizada na linha K_{α} de cálcio (3.691 keV). Todos os espectros foram analisados utilizando-se o pacote Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS), que é um programa convencional para a análise de espectros¹³⁸.

As amostras previamente cortadas em tiras de aproximadamente 0,8 cm x 2 cm foram coladas no porta-amostra do equipamento e o tempo da análise foi de aproximadamente 2 horas, sendo a área analisada da amostra de 500 μm^2 . A **Fig. 8** mostra um esquema que representa a linha de XRF utilizada.

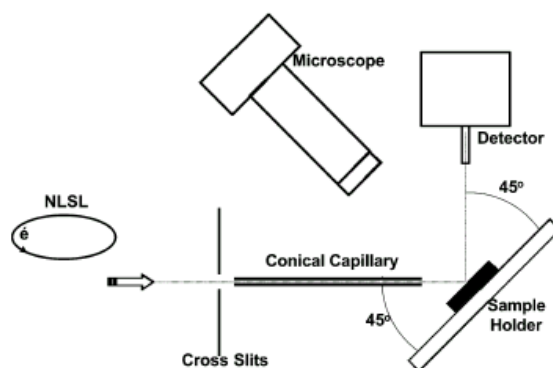


Figura 8: Representação da linha D09B – SRXRF¹³⁹.

Buscou-se, com essa análise, mapear a distribuição de cálcio na superfície das amostras de quitosana, naturais e acetiladas, submetidas a dois tempos de banho em solução calcificante com e sem fosfato. A quantificação dessa calcificação não foi objeto de estudo nessa análise, pois a intensidade dos picos obtidos na técnica depende do tempo de decaimento do feixe de elétrons no acelerador de partículas do LNLS, após sua injeção inicial.

4.3.1.2 Microscopia de força atômica

Os microscópios de varredura de sondas (SPMs – scanning probe microscopes) surgiram no início da década de 80, quando foram feitas as primeiras imagens de superfície em amostras de silício. Os SPM têm sido usados em diversas áreas do conhecimento, incluindo desde análises fundamentais de superfícies na física, até observação de DNA, na biologia. Estes microscópios formam uma família de instrumentos usados para estudos de propriedades de superfície, em escalas de microns no nível atômico.

A microscopia de força atômica (Atomic Force Microscope - AFM) faz parte dessa família, e seus componentes básicos são: scanner piezoelétrico (um dispositivo que sofre deslocamentos micrométricos quando uma tensão é aplicada entre seus eletrodos), laser, agulha (probe tip), cantilever (braço com uma extremidade livre na qual é colocada a agulha), fotodetector de posição, circuito de realimentação e parte computacional. A **Fig. 9** mostra esquematicamente o funcionamento dos microscópios de varredura.

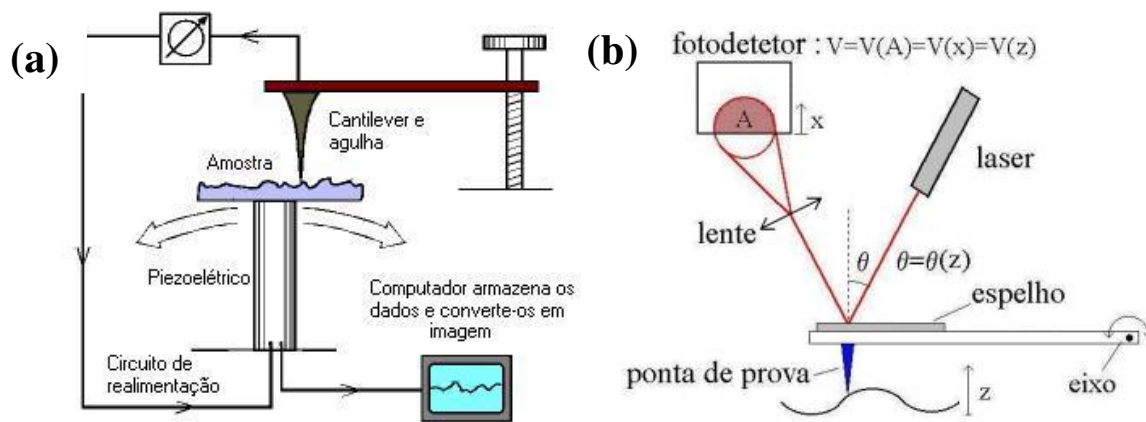


Figura 9: Esquema básico de (a) um microscópio de varredura e (b) um microscópio de força atômica.

O princípio básico de funcionamento do AFM é o seguinte: inicialmente, a amostra é colocada sobre o scanner. Uma determinada área desta amostra é varrida pela agulha (a varredura pode ser feita tanto com a agulha se movendo sobre a amostra, como o contrário). A contínua interação desta agulha com a superfície é usada como medida indireta da morfologia da área. Esta morfologia é representada por uma imagem, chamada de micrografia, obtida através de um programa computacional. A micrografia é, portanto, um mapa da superfície, originário de uma matriz de dados. A resolução da medida é dada pelo número de linhas e colunas desta matriz. A interação em questão é geralmente tratada como forças de Van der Waals e pode ser atrativa ou repulsiva.

Com base na distância entre a agulha e a superfície da amostra, podem ser utilizados dois regimes de medida: o regime de contato e o regime de não-contato.

- *Regime de contato:* neste regime há um leve “contato físico” entre a agulha e a superfície da amostra. A interação, neste caso, é de repulsão (da ordem de $10^{-6} - 10^{-8}$ N). Esta força faz com que o cantilever sofra um envergamento para se acomodar às mudanças da topografia. Essa flexão é medida através de um feixe de laser que incide na parte de trás do cantilever e é refletido para o fotodetector de posição.
- *Regime de não-contato:* neste regime, o cantilever vibra perto da superfície, sem tocá-la. A distância de separação pré-determinada pode ser da ordem de dezenas a centenas de ângstrons, enquanto que a frequência de vibração é tipicamente da ordem de 100 a 400 kHz. A interação é do tipo atrativa e da ordem de 10^{-12} N, bem menor do que no caso do regime de contato.

As informações a respeito da topografia da superfície podem ser obtidas através da variação da frequência de ressonância do cantilever. Esta frequência depende do gradiente da força aplicada pela agulha na superfície. Este gradiente depende da distância de separação agulha-amostra. Ou seja, mudanças na topografia ocasionam mudanças nesta separação, que modificam a frequência de ressonância. Assim, no modo de não-contato, o sistema monitora tal frequência (ou amplitude) de vibração de modo a mantê-la constante através do circuito de

retro alimentação. Para responder às mudanças de topografia, este circuito move o scanner (e a amostra) para cima e para baixo. Da mesma forma que no modo de força constante (regime de contato), este sinal do circuito é usado para gerar os dados da topografia.

No presente trabalho, esta técnica foi utilizada para analisar a topografia das amostras de quitosana num nível de detalhes maior que a oferecida pela microscopia eletrônica de varredura.

Para as análises de AFM, utilizou-se o modo não contato, no microscópio Autoprobe cp, Park Scient Instrument, cedido gentilmente pelo Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW/UNICAMP).

4.3.1.3 Difração de Raios-X

O espalhamento de raios-X é uma das técnicas mais antigas e mais comuns no estudo da estrutura de materiais. Um feixe de raios-X incidente pode ser parcialmente absorvido, espalhado e/ou transmitido sem modificação. O fenômeno de espalhamento, por sua vez, ocorre como um resultado da interação com os elétrons do material. Os raios-X espalhados sofrem interferência entre si produzindo um padrão de difração que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo dá informações sobre a distribuição de intensidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material.

Os compostos de cálcio representam uma classe extremamente vasta de minerais, orgânicos ou não, com inúmeras possibilidades de hábitos cristalinos disponíveis dependendo da composição e das condições nas quais foi sintetizado. Em sistemas orgânicos, é muito raro encontrar-se compostos de cálcio cristalinos, sendo mais comum a existência de materiais mais amorfos ou poucos cristalinos.

O padrão de espalhamento de polímeros e materiais amorfos é de picos alargados (halos) capazes, mesmo assim, de informar sobre o estado de empacotamento das moléculas no interior do material. Vários exemplos de

caracterização de amorfos através de raios-X são disponíveis na literatura, preponderantemente na área de polímeros e vidros.

A relação de Bragg pode ser utilizada como uma boa regra para estimar-se a escala de d da estrutura responsável pelo espalhamento. Em polímeros não cristalinos, o espalhamento médio molecular entre as cadeias $\bar{R}$ em ângstrons é calculado a partir do máximo mais intenso através da **Eq. 2**:

$$\bar{R} = \frac{5.\lambda}{8\sin\theta} \quad (2)$$

A largura a meia altura HW da banda de maior intensidade é usada para descrever a distribuição do espaçamento médio entre as cadeias. Os máximos num difratograma de WAXS (wide-angle X-Ray scattering) descrevem distâncias menores que 4 ângstrons, que surgem de distâncias intramoleculares, como as distâncias de carbonos conectados por ligações covalentes. Os picos a distâncias maiores surgem tanto de efeitos intra e intermoleculares. A discriminação entre eles é mais bem realizada em amostras altamente orientadas, onde o espalhamento de picos devido a pares intermoleculares tende a se localizar no equador enquanto as intramoleculares, mais ao longo do meridiano.

Para a realização das análises de difração de raios-X foi utilizado o equipamento X-Ray Diffractometer da Rigaku, da Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP. A análise de fases foi realizada utilizando radiação $\text{CuK}\alpha_1 = 0,1542 \text{ nm.}$, 40kV, 40mA. As varreduras foram feitas em intervalos 2θ variando de 5 a 60°.

4.3.2 Ensaios de calcificação de 7 dias

Foram realizados testes de calcificação *in vitro*, com duração de 7 dias, visando-se observar o comportamento dos substratos de quitosana quando colocados em contato com soluções de concentração similar à do soro humano. Tal observação teve como objetivo caracterizar o efeito biomimético do substrato, bem como analisar a influência da reação de acetilação no processo de calcificação.

Foram realizados experimentos com membranas densas e porosas de quitosana, ambas na forma natural e acetilada. Todos os ensaios seguiram o mesmo protocolo, alterando-se apenas as concentrações salinas e/ou o pH das soluções.

Inicialmente, cortes de aproximadamente 2 cm² de membranas densas e porosas de quitosana (sob a forma natural e acetilada) foram imersos em frascos individuais de polietileno com tampa, contendo cada um deles 50 mL de solução calcificante. As soluções calcificantes foram diferenciadas em SBF convencional a pH de 7,4, SBF convencional a pH de 7,8 e SBF sem íons fosfato a pH de 7,4.

A **Fig. 10** mostra um fluxograma simplificado do esquema experimental proposto para a realização dos ensaios de 7 dias.

Além dos ensaios já descritos, amostras de membrana porosa de quitosana acetilada foram também imersas em frascos de polietileno contendo dois diferentes tipos de solução calcificante: o SBF convencional a pH 7,8, preparado adicionando-se o dobro de íons cálcio; e o SBF convencional a pH 7,8, desta vez preparado com o dobro de íons fósforo.

A utilização de soluções com valores mais altos de pH teve como objetivo verificar a influência das matrizes na relação cálcio/fósforo nos depósitos, em condições extremas, mais favoráveis à deposição.

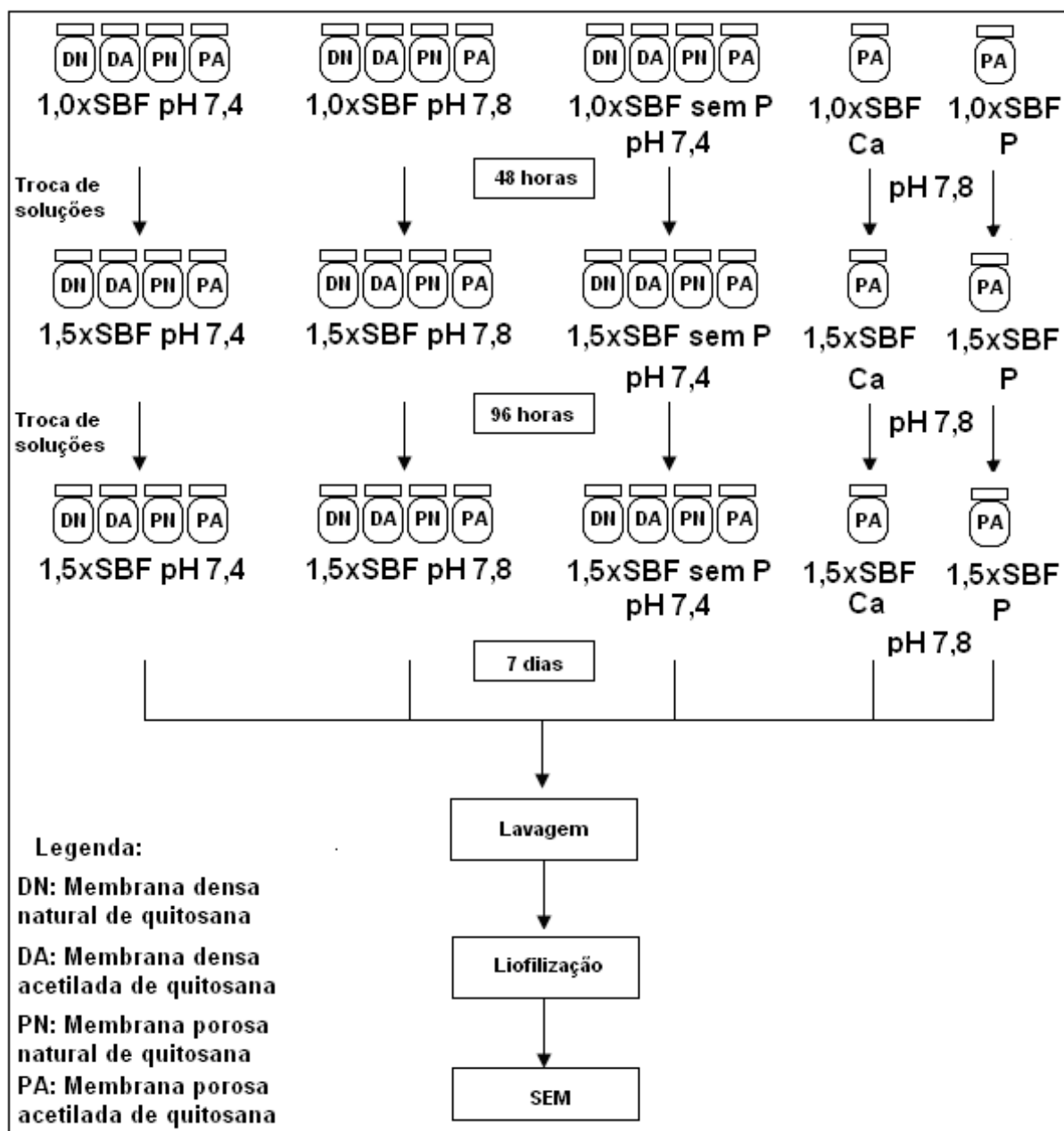


Figura 10: Fluxograma dos ensaios de 7 dias.

Os frascos contendo as amostras foram então mantidos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em banho termostatizado Shaker Bath Lab/Line ORBIT, com agitação de 50 rpm. Após 48 e 96 horas, as soluções calcificantes de cada frasco foram trocadas por soluções de mesma natureza, porém de concentração 50% maior que a inicial, conforme mostrado na **Tabela 10**. Tal troca é necessária para evitar a proliferação de microorganismos no frasco. As amostras foram lavadas cuidadosamente e

então liofilizadas no equipamento Labcomco, Freeze Dry System/Freezone 4.5 vácuo máximo 133×10^{-3} mBar.

Todas as amostras foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura e análise elementar por dispersão de raios-X (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy – EDS) para a observação e caracterização dos depósitos de cálcio.

4.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electronic Microscope – SEM) é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, ou seja, basicamente não transparentes ao feixe de elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, resultando em imagens com aparência tridimensional. O SEM consiste basicamente de uma coluna ótica eletrônica, da câmara para amostra, sistema de vácuo de controle eletrônico e sistema de imagem. As imagens são construídas ponto a ponto, de modo similar à formação de uma imagem de televisão. Um feixe de elétrons de alta energia (20 kV) é focalizado num ponto da amostra, o que causa emissão de elétrons com grande espalhamento de energia, que são coletados e amplificados para fornecer um sinal elétrico. Este sinal é utilizado para modular a intensidade do feixe de elétrons no tubo de raios catódicos (TRC). Para construir a imagem completa, o feixe de elétrons é varrido sobre a superfície da amostra enquanto que um feixe no TRC é varrido sincronizadamente sobre um rastro geometricamente similar¹³⁹.

A interpretação da imagem na microscopia eletrônica de varredura é direta, pois geralmente é possível associar a imagem observada às características superficiais da amostra.

Para a realização das análises, foi utilizado o microscópio LEICA, modelo LEO440i, da Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP e o microscópio JEOL 3XA-840^a, da Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP. As amostras foram observadas após liofilização e metalização com carbono, já que uma

eventual metalização com ouro impossibilitaria a visualização das bandas de fósforo, que são coincidentes com as bandas do próprio ouro.

4.3.2.2 Energia dispersiva de raios-X

Esta técnica é geralmente acoplada ao SEM. O EDS consiste em incidir um feixe de elétrons sobre a amostra, removendo elétrons da camada interna do átomo, fazendo com que o elétron da camada externa salte para ocupar a posição do elétron removido, resultando em uma emissão de energia característica do elemento analisado. Os raios-X são analisados e os valores obtidos são colocados em forma de gráfico como uma função de energia de raios-X. As posições dos picos dão informações quantitativas sobre os átomos presentes na amostra¹⁴⁰. O EDS possibilita a observação do espectro inteiro de raios-X de modo simultâneo, o que permite análise qualitativa rápida dos constituintes principais.

4.3.3 Calcificação quimicamente induzida

Com o intuito de confirmar o efeito biomimético da quitosana, foram realizados ensaios diferentes dos realizados anteriormente. Até o momento, a calcificação sobre matrizes de quitosana foi feita através de ensaios em fluídos corpóreos simulados de composições diferentes, para que fosse observada a característica dos depósitos e também o mecanismo de deposição tanto de carbonatos como de fosfatos de cálcio. Na etapa descrita aqui, foram realizados ensaios de calcificação quimicamente induzida, ou seja, promoveu-se a deposição química de compostos de cálcio sobre substratos de quitosana natural e modificada, através do tratamento desses substratos em soluções de sais que naturalmente depositam compostos de cálcio. Os ensaios dessa natureza foram realizados objetivando-se observar a influência do substrato na deposição de compostos de cálcio, e mesmo complementar os resultados obtidos com os ensaios em SBF, com a vantagem de este ser um método mais simples e rápido.

Os ensaios de calcificação foram realizados sobre membranas densas e porosas de quitosana, na forma natural e acetilada, com o intuito de se comparar a influência da morfologia e das características químicas do substrato na deposição dos cristais. Cortes de aproximadamente 2 cm^2 de área foram imersos em solução de CaCl_2 2M por um período de 15 minutos para a completa saturação das membranas com a solução de íon cálcio. Retirou-se o excesso de solução de CaCl_2 das membranas e as amostras foram, então, imersas em solução de Na_2CO_3 , K_2HPO_4 2M ou suspensão de NaHCO_3 2M por períodos de 20 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram então cuidadosamente lavadas, colocadas sobre placas de Petri e mantidas por 24 horas a 4°C . A **Fig 11** mostra um esquema dos experimentos de calcificação induzida.

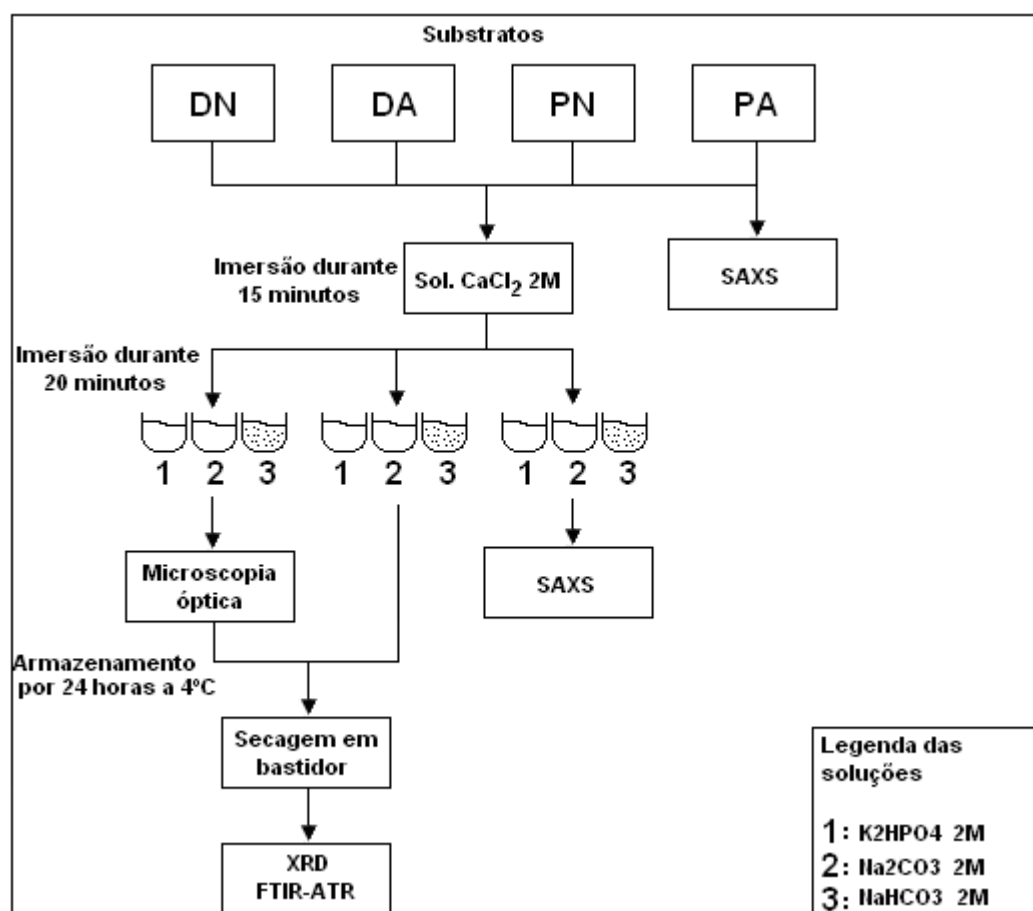


Figura 11: Fluxograma dos ensaios de calcificação quimicamente induzida.

As amostras foram então preparadas de acordo com a técnica de análise a ser utilizada. Para a realização de difratometria de raios-X e de espectrometria de infravermelho com cristal de germânio, foram utilizadas apenas membranas densas, naturais e acetiladas, e de superfície regular. Para garantir tal regularidade, as membranas foram secas a temperatura ambiente no mesmo bastidor utilizado anteriormente, evitando-se assim que a membrana enrugasse ou que sua superfície sofresse qualquer contato físico que pudesse alterar a morfologia dos depósitos.

Para as análises de microscopia óptica de luz polarizada foram utilizadas membranas porosas naturais e para análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram utilizadas membranas porosas de quitosana natural e acetilada.

4.3.3.1 Microscopia óptica

Com os estudos de Maxwell (1831-1879), constatou-se que a luz é uma onda eletromagnética composta por campos elétricos e magnéticos oscilantes, perpendiculares entre si e transversais à direção de propagação da onda. Os efeitos de polarização da luz associam-se, por convenção, com a vibração do campo elétrico da onda eletromagnética. Deste modo, quando o campo elétrico de uma onda oscila ao longo de uma única direção fixa no espaço, diz-se que ela está linearmente polarizada. Por outro lado, quando o campo elétrico (e conseqüentemente o magnético) apresenta uma amplitude constante, mas gira ao redor da direção de propagação de maneira que o extremo do vetor campo elétrico descreve um círculo, diz-se que a onda está circularmente polarizada. A polarização elíptica é um caso mais geral entre as duas anteriores, onde o vetor campo elétrico descreve uma elipse ao longo da direção de propagação da onda. Além disso, a luz também pode ser não-polarizada, que é o caso da luz do sol e de lâmpadas comuns, onde o vetor campo elétrico varia tanto em módulo como em direções de vibração igualmente prováveis.

Quando a luz se propaga em um meio opticamente isotrópico, as propriedades ópticas são as mesmas em todas as direções, isto é, existe um único índice de refração. Entretanto, quando uma frente de onda de luz incide em um meio anisotrópico, independente do estado inicial de polarização, a direção de oscilação do seu campo elétrico pode ser decomposta em duas componentes. Estas componentes são conhecidas como raio extraordinário (paralelo à direção do eixo óptico do meio) e raio ordinário (perpendicular à direção do eixo óptico do meio), os quais viajam com velocidades de propagação diferentes. Isso significa que existem dois índices de refração distintos: n_e e n_o relacionados com os raios extraordinário e ordinário, respectivamente (como mostrado na **Fig. 12**); e o meio é chamado de birrefringente.

Os dispositivos utilizados para obter uma polarização desejada a partir de luz não-polarizada são chamados de polarizadores. Existe uma outra classe de elementos ópticos conhecidos como retardadores, os quais servem para alterar o estado de polarização da luz incidente. Estes últimos possuem seus átomos organizados de tal forma que podem introduzir uma diferença fase ($\Delta\phi$) na propagação dos feixes extraordinário e ordinário, alterando, portanto o estado de polarização da luz. Um exemplo disso são as placas de onda, que podem ser construídas de quartzo, mica ou polímeros orgânicos.

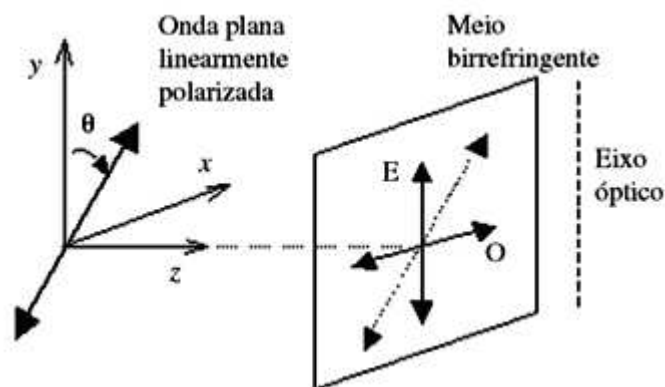


Figura 12: ilustração de um meio birrefringente.

Para a realização de estudos sobre a birrefringência dos depósitos resultantes dos ensaios de calcificação quimicamente induzida sobre substratos de quitosana, foram utilizadas análises em microscopia óptica com luz polarizada no Microscópio Óptico marca Leica, modelo DMLM com filtro polarizador. Lâminas de vidro para microscopia foram utilizadas para suportar as membranas úmidas. Tomou-se o cuidado de não se expor a amostra durante muito tempo à luz do microscópio, uma vez que o aquecimento da lâmpada poderia acelerar evaporação de água das amostras e conseqüentes alterações morfológicas das superfícies.

4.3.3.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Small Angle X-ray Scattering - SAXS) é uma ferramenta fundamental no estudo de macromoléculas biológicas em solução que variam entre poucos quilodaltons a vários megadaltons¹⁴¹. Esta técnica permite determinar várias características das macromoléculas, tais como raio de giro, massa molecular, volume, grau de hidratação, diâmetro máximo e forma. A baixos ângulos (resolução de 2 a 3 nm), os raios-X são insensíveis à estrutura interna e o espalhamento é essencialmente dado pela forma da partícula. A intenção da análise *ab initio* obtida através dos dados de SAXS é recuperar a estrutura tridimensional através do padrão de espalhamento unidimensional¹⁴².

O experimento para obtenção dos dados consiste em direcionar um feixe de radiação para a amostra e medir a variação de intensidade espalhada em função do ângulo de espalhamento. Essa radiação deve possuir comprimento de onda bem definido na faixa de raios-X, entre 0,5 e 2 Å, ter uma boa colimação e alta intensidade¹⁴³. Esta técnica fornece informações estruturais de flutuações ou heterogeneidades da densidade eletrônica com dimensões características da ordem de 10 a 1000 Å.

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos somente é observado quando as amostras analisadas apresentam heterogeneidade em sua densidade

eletrônica¹⁴⁴. A densidade eletrônica r é definida como a quantidade em mols de elétrons por unidade de volume. Quando partículas estão no vácuo, a amplitude de luz espalhada é proporcional à densidade eletrônica das partículas. Porém, quando partículas analisadas estão dispersas em uma matriz, a diferença entre a densidade eletrônica da partícula e da matriz é que influencia na amplitude de luz espalhada. Essa diferença é chamada de contraste de densidade eletrônica e é um dos principais parâmetros da amostra quando a técnica de SAXS é utilizada¹⁴¹.

A função $p(r)$ é chamada de função de distribuição de distâncias. Ela possui uma definição geométrica que pode ser entendida dividindo-se uma partícula em um grande número de elementos de volumes pequenos e idênticos. A função $p(r)$ descreve a distribuição de distâncias r que podem ser encontradas a partir de combinação de qualquer par de elementos de volume. Em princípio, a função de distribuição de distâncias $p(r)$ contém a mesma informação da intensidade de espalhamento $I(s)$, mas a representação do espaço real é mais intuitiva e a informação sobre a forma da partícula pode freqüentemente ser deduzida diretamente por uma inspeção visual da $p(r)$ ¹⁴⁴.

O raio de giro (R_g) é definindo como o raio de uma fina camada esférica de mesma massa e momento de inércia. Este parâmetro é uma medida da distribuição das cargas em relação ao centro de massa eletrônico de uma partícula e pode ser obtido através da função de distribuição de distâncias $p(r)$ ou diretamente pela curva de espalhamento. O conhecimento do raio de giro pode ser muito útil na investigação estrutural de uma partícula em solução, pois um aumento ou diminuição do mesmo, provocado por qualquer variação nas condições da solução, indicaria uma mudança nas posições relativas entre os átomos que compõe a partícula.

Para a análise dos resultados, a lei de Guinier, mostrada na **Eq. 3**, foi utilizada.

$$I(q) = A.e^{-\frac{q^2}{3}R_g^2} \quad (3)$$

onde I é a intensidade do raio-X espalhado, q é o comprimento de onda, A é uma constante e R_g é o raio de giro.

O evento de espalhamento envolve interferências de ondas emitidas por dois pontos na partícula, separados por uma distância $r = 1/q$. Assim, a probabilidade de interferência construtiva envolve a probabilidade de ondas emitidas por um dado ponto presente em uma partícula média encontrarem ondas emitidas por um segundo ponto presente na mesma partícula média, a uma distância $r = 1/q$. Em um sistema anisotrópico, é necessário considerar inicialmente o cálculo da média de qualquer ponto inicial da partícula e, posteriormente, o cálculo da média do vetor r em qualquer direção. Isto conduz a uma soma dupla que é idêntica à determinação do momento de inércia de uma partícula. Quando a densidade eletrônica é utilizada como parâmetro mássico, ao invés de se utilizar a massa específica, este momento de inércia é chamado de raio de giro da partícula. Para um sistema de forma dispersa com partículas de tamanhos definidos, o raio de giro reflete um segundo momento da distribuição de forma e tamanho sobre o meio.

As análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. O equipamento utilizado opera na faixa de raios-X com radiação síncrotron e é destinado às análises de materiais heterogêneos, caracterização de estruturas fractais, materiais microporosos, separação de microfases, compósitos nanocristalinos, polímeros e blends, membranas biológicas e proteínas em solução.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos substratos

As membranas densas obtidas formaram uma película transparente e resistente mecanicamente ao manuseio. Já as membranas porosas se mostraram mais frágeis que as densas e apresentavam-se opacas devido ao espalhamento de luz induzida pela existência dos poros. Além disso, as membranas porosas se mostraram mais espessas que as densas, pois estas últimas perderam maior quantidade de solvente por evaporação.

Após a acetilação, as membranas densas e porosas apresentaram maior rigidez que as membranas naturais, apesar de continuarem maleáveis. A reação que ocorre entre os grupos amino da quitosana e o anidrido acético confere maior rigidez à quitosana e diminui sua reatividade, já que os grupos amino antes existentes agora estão bloqueados. Este comportamento era esperado, já que o substrato acetilado possui propriedades muito próximas às da quitina, que é naturalmente mais rígida e menos reativa que a quitosana.

A **Fig. 13** mostra a morfologia de membranas densas e porosas de quitosana, vistas a olho nu:

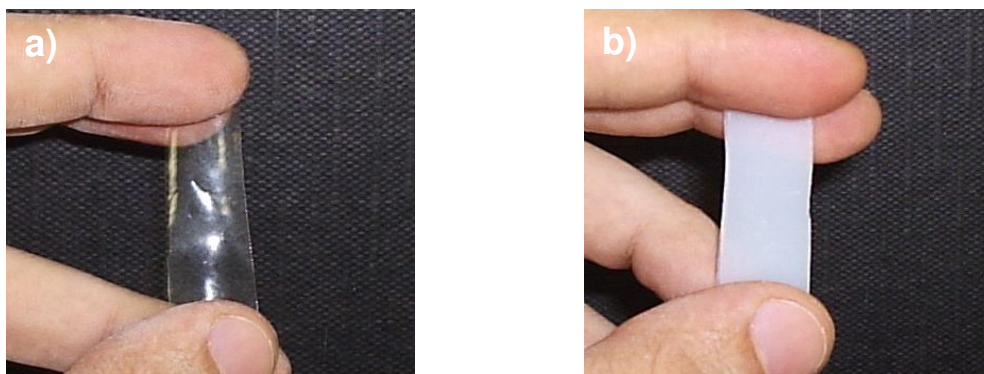


Figura 13: Membranas de quitosana natural (a) densa e (b) porosa.

A **Fig. 14** ilustra os resultados obtidos no teste de citotoxicidade realizado em membrana de quitosana natural. É possível observar que o substrato não apresenta atividade citotóxica, uma vez que a atividade celular obtida para todas as concentrações de extrato testadas se apresenta acima do valor de IC_{50} (concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis) além de se mostrar superior também ao valor obtido para o controle positivo.

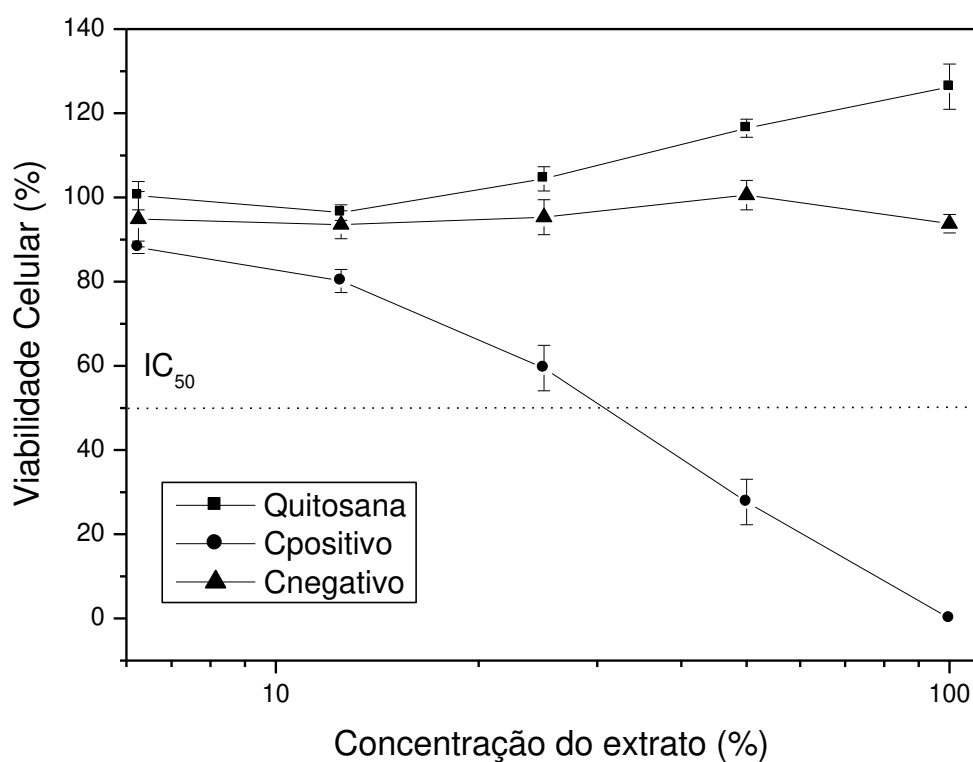


Figura 14: Teste de citotoxicidade de membrana natural de quitosana.

Os resultados obtidos demonstram que mesmo após o processo de protonação, filtração e neutralização, o substrato se apresenta citocompatível, não inibindo o crescimento celular e sendo, portanto, a primeira vista, adequado para a aplicação como biomaterial implantável.

Os testes mecânicos realizados em membranas densas são mostrados na **Tabela 11**. Os resultados obtidos possibilitam uma comparação entre as propriedades de filmes naturais e acetilados: a elongação dos filmes sofreu alterações devidas, provavelmente, à mudança na afinidade estrutural das amostras com água, tornando a membrana de quitosana acetilada menos maleável. Os ensaios de perfuração não mostraram diferenças significativas estatisticamente.

Tabela 11: Resultados dos testes mecânicos para membranas densas de quitosana natural e acetilada (ensaio com 5 replicatas).

Membrana	Espessura do filme (μm)	Resistência à perfuração (MPa)	Alongamento (%)
Natural (n=5)	$144,67 \pm 24,11$	$3,048 \pm 1,091$	$52,61 \pm 6,99$
Acetilada (n=5)	$189,00 \pm 10,39$	$2,888 \pm 0,770$	$38,37 \pm 8,33$

5.1.1 Titulação Potenciométrica

As amostras de membranas de quitosana natural mostraram-se solúveis em solução 0,02M de HCl, durante os experimentos de titulação potenciométrica. O grau de desacetilação foi determinado através do ponto de inflexão do gráfico de potencial *versus* volume de NaOH, mostrado na **Fig. 15**, conforme discutido anteriormente. O valor médio obtido para os experimentos em triplicata foi de 81%.

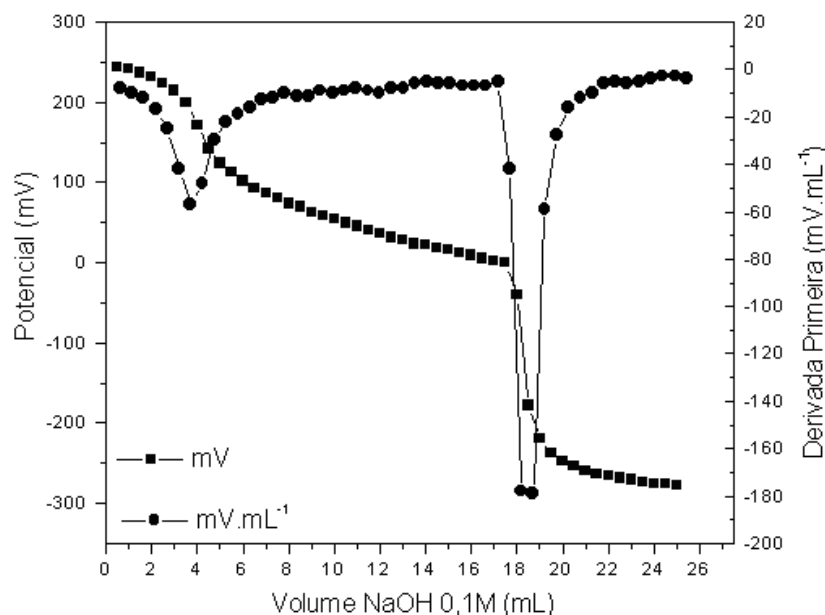


Figura 15: Titulação potenciométrica de quitosana natural.

Pode-se observar que o valor obtido não concorda de forma precisa com a informação cedida pelo fabricante, que afirma que o grau de desacetilação do reagente é de no mínimo 85%. No entanto, sabe-se que este método de determinação do grau de desacetilação não é um método preciso, sendo, porém suficiente para confirmar o alto grau de desacetilação do substrato utilizado.

A **Fig. 16** demonstra que o processo de acetilação converte os grupos amino presente nas cadeias de quitosana em grupos *N*-acetil. Desse modo, o NaOH utilizado durante a neutralização foi totalmente consumido apenas para neutralizar o HCl adicionado, mostrando que a acetilação dos grupos foi aproximadamente completa.

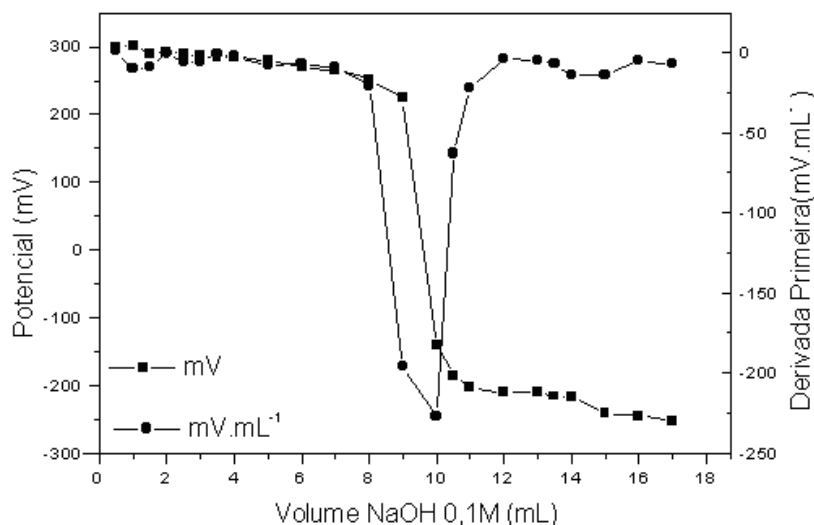


Figura 16: Titulação potenciométrica de quitosana acetilada.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho

É possível observar, através da **Fig. 17a**, as seguintes absorções:

- 1068 cm^{-1} – estiramento vibracional C-O de álcool primário (1090 cm^{-1} – grupo éter);
- $1070\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$ – aminas alifáticas;
- 1600 cm^{-1} – aminas (N-H);
- 1700 cm^{-1} – COOH (C=O);
- $1600\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ – amida;
- 1654 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} – vibração de deformação de intensidade média N-H de amina primária e de intensidade pequena C-H do grupo CH_3 referente ao grupo acetamido (ainda possivelmente presente em pequena proporção, pois a quitosana ainda não é completamente desacetilada);
- 1550 cm^{-1} – sobreposição de aminas, amida e ânion carboxilato;

- 1400 cm^{-1} – grupos alquís e carboxilatos (O-C-O);
- 1450 cm^{-1} – grupo alquil (CH);
- $1725\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ e $1230\text{-}1277\text{ cm}^{-1}$ – grupos ésteres;
- 2900 cm^{-1} – estiramento C-H;
- região de 3400 cm^{-1} – presença de hidroxilas (estiramento OH).

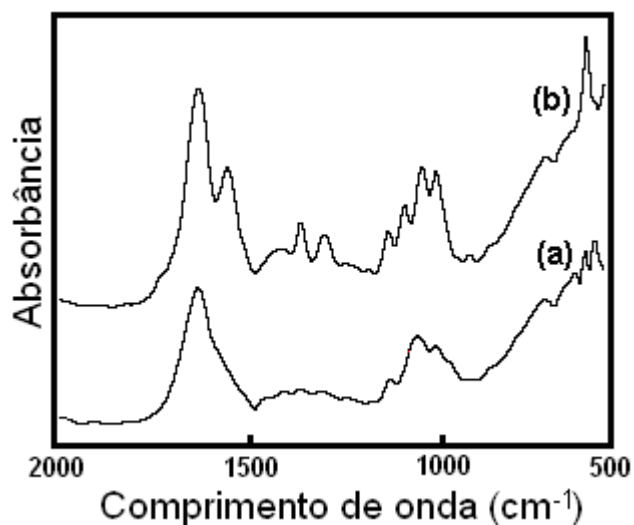


Figura 17: Espectroscopia de infravermelho de membranas de quitosana densa (a) natural e (b) acetilada.

As bandas obtidas na análise por espectroscopia de infravermelho são bandas típicas da quitosana e estão de acordo com dados obtidos na literatura¹³⁴. As diferenças observadas entre os espectros das **Figs. 17a e 17b** são decorrentes do processo de acetilação, onde os grupos amino antes presentes se encontram após a reação de acetilação totalmente bloqueados pelos grupos acetil. As intensidades de absorção em 1420 e 1320 cm^{-1} representam, respectivamente, um pico de referência e um pico característico dos grupos -OH , -NH_2 e -CO . A razão

entre estes dois picos demonstra a extensão da reação de acetilação nos grupos amino da quitosana¹⁴⁵.

5.1.3 Análises térmicas

As análises termogravimétricas realizadas para amostras de membranas densas de quitosana natural e acetilada estão representadas nas **Figs. 18 e 19**. Pode-se perceber, através da análise dos dois gráficos, que tanto a quitosana acetilada quanto a quitosana natural tem quedas muito semelhantes em suas respectivas massas devido à liberação de água, porém a perda ocorrida na quitosana acetilada se dá de maneira muito rápida no início do aquecimento, enquanto que a perda de massa sofrida pela quitosana natural é gradativa nesse processo.

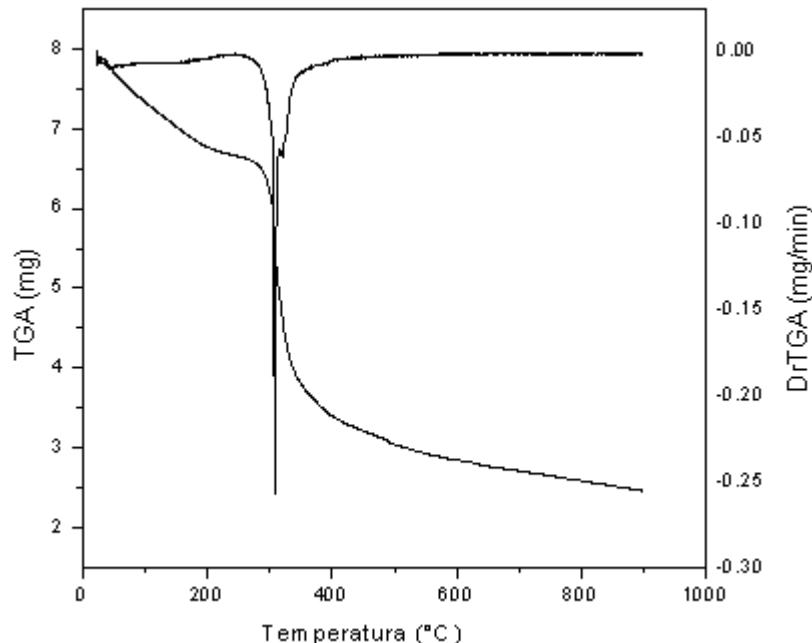


Figura 18: Análise termogravimétrica de quitosana natural.

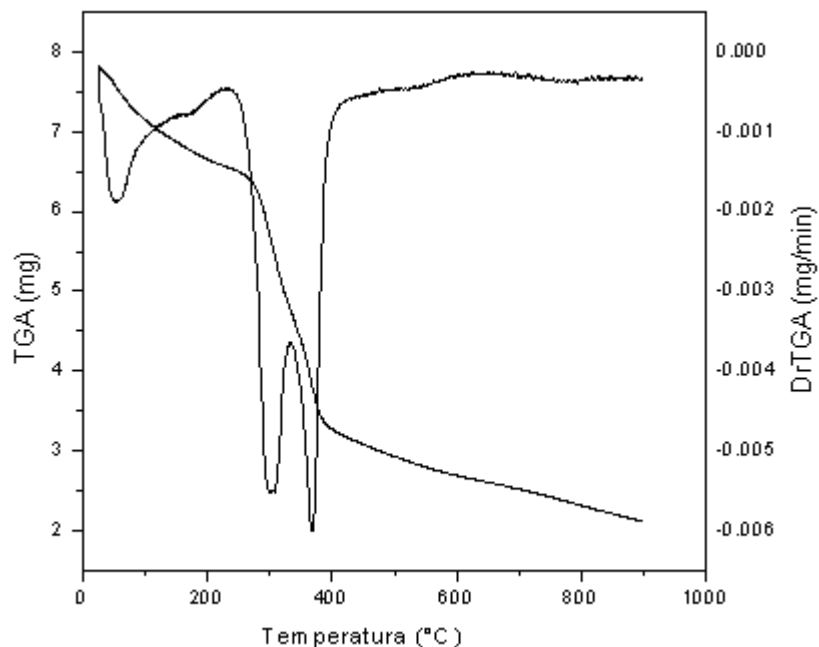


Figura 19: Análise termogravimétrica de quitosana acetilada.

As análises térmicas realizadas por DSC para amostras de membranas densas de quitosana natural e acetilada estão representadas na **Fig. 20**. Através de análise comparativa da quitosana natural e da quitosana acetilada, podemos perceber que o ponto de mínimo da curva correspondente à energia necessária para que ocorra a saída de água, no gráfico da quitosana natural ocorre em 117,7°C, enquanto que no gráfico da quitosana acetilada esse ponto de mínimo ocorre em 78,98°C. Além disso, analisando os picos relativos à decomposição do material nos dois casos, percebemos uma maior liberação de energia por parte da quitosana natural, já que os picos obtidos para a quitosana acetilada são bem atenuados, se comparados à quitosana natural.

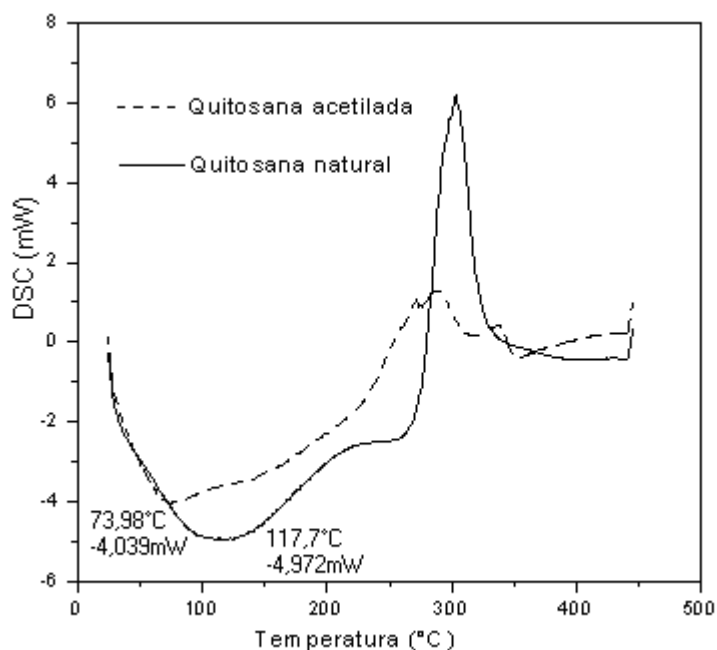


Figura 20: Calorimetria exploratória diferencial das amostras de quitosana natural e acetilada.

Comparando os resultados obtidos através da calorimetria exploratória diferencial e das análises termogravimétricas, podemos perceber que tanto a amostra de quitosana natural quanto a amostra de quitosana acetilada absorveram aproximadamente a mesma massa de água por massa de substrato. No entanto, o termograma DSC mostra que a temperatura necessária para promover a total saída de água na quitosana natural (117,7°C) é maior que a temperatura necessária na quitosana acetilada (73,98°C). Esse fato mostra que a reação de acetilação da quitosana diminuiu sua interação com a água, pois foi necessária uma menor quantidade de energia para promover a saída da mesma quantidade de água na quitosana acetilada, se comparada com a quitosana natural.

Além disso, os termogramas TGA mostram que a perda de massa correspondente à evaporação de água na quitosana acetilada ocorre de forma mais rápida que a observada na quitosana natural, reforçando o caráter mais

hidrofóbico da quitosana acetilada. É possível observar ainda, através do termograma DSC que os picos correspondentes à degradação do material são atenuados no caso da quitosana acetilada. Este fato sugere um aumento da resistência térmica do substrato, conferida pela reação de acetilação.

5.2 Estudo do processo inicial de calcificação

Utracki¹⁴⁶ considera que a precipitação de sólidos nada mais é que um caso particular de separação de fases. Em fenômenos de calcificação de matrizes, essa afirmação é embasada no fato de que inicialmente não há presença de precipitados na solução (apenas uma fase presente) e posteriormente, devido à presença e influência de um substrato adequado, ocorre a precipitação de sais, ou seja, ocorre uma separação de fases, onde a fase sólida se apresenta na forma de precipitados e a fase líquida é a solução-mãe. Assim, podemos admitir que os modelos termodinâmicos desenvolvidos para os fenômenos de separação de fase também são válidos para explicar o mecanismo pelo qual ocorre a precipitação de compostos. Dois mecanismos básicos, que regem a separação de fases são conhecidos por nucleação e crescimento (nucleation and growth – NG) e decomposição spinodal (spinodal decomposition - SD).

No fenômeno de nucleação e crescimento, a separação se inicia com o aparecimento de núcleos instáveis de uma fase dispersa já com a composição de equilíbrio. A separação evolui com aumento do diâmetro dos núcleos, sem que sua composição seja alterada. Somente a composição da matriz ou meio em que os núcleos estão dispersos varia. A morfologia observada durante todo o processo é do tipo matriz/domínio dispersos com larga faixa de distribuição de tamanhos, com pouca conectividade entre os núcleos¹⁴⁶.

A decomposição spinodal se inicia por flutuações de concentração. Se a concentração pudesse ser medida em diferentes regiões do sistema, seria possível obter curvas descrevendo variações senoidais da concentração em função da posição x (ao longo de uma linha imaginária, que corta o sistema). A

amplitude desta onda senoidal representa a variação da concentração naquela posição em relação à concentração inicial do sistema. Seu valor vai aumentando até que se possam distinguir duas fases contínuas cujas interfaces são inicialmente difusas. A concentração destas varia continuamente até que sejam atingidos valores de equilíbrio termodinâmico. Na separação de fases por decomposição spinodal, podem ser identificados três estágios distintos. No primeiro estágio, ocorrem flutuações de concentração em todo sistema e o comprimento de onda das flutuações é praticamente constante, porém, suas amplitudes aumentam com o tempo. No estágio intermediário, tanto as amplitudes quanto o comprimento de onda das flutuações aumentam. Finalmente, no último estágio, a amplitude e o comprimento de onda são máximos, caracterizando a coalescência das fases, que leva a uma morfologia do tipo matriz/domínio. É esperada uma conectividade entre os domínios maior que numa separação de fases por nucleação e crescimento.

As medidas realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron com o objetivo de se analisar as amostras através de fluorescência de raio-X foram utilizadas para se obter mapas de elementos com número atômico maior que 14. Este método pode ser utilizado essencialmente como uma técnica qualitativa devido à perda de intensidade do feixe de luz, que interfere na quantificação dos elementos. A intensidade do feixe de luz decresce ao longo do tempo devido à “morte” dos elétrons no acelerador, o que requer periódicas recargas de pacotes de fótons.

A distribuição espacial de cálcio, ou os mapas de cálcio mostraram a presença de depósitos de cálcio na forma de pequenos núcleos (representados por picos de concentração de cálcio) em membranas naturais e acetiladas de quitosana.

As **Figs. 21 e 22** apresentam os mapas de cálcio para membranas de quitosana natural imersa em SBF convencional. O mapeamento do elemento fósforo não foi possível por restrições do equipamento utilizado, pois o fósforo é elemento leve e de número atômico próximo ao limite da técnica.

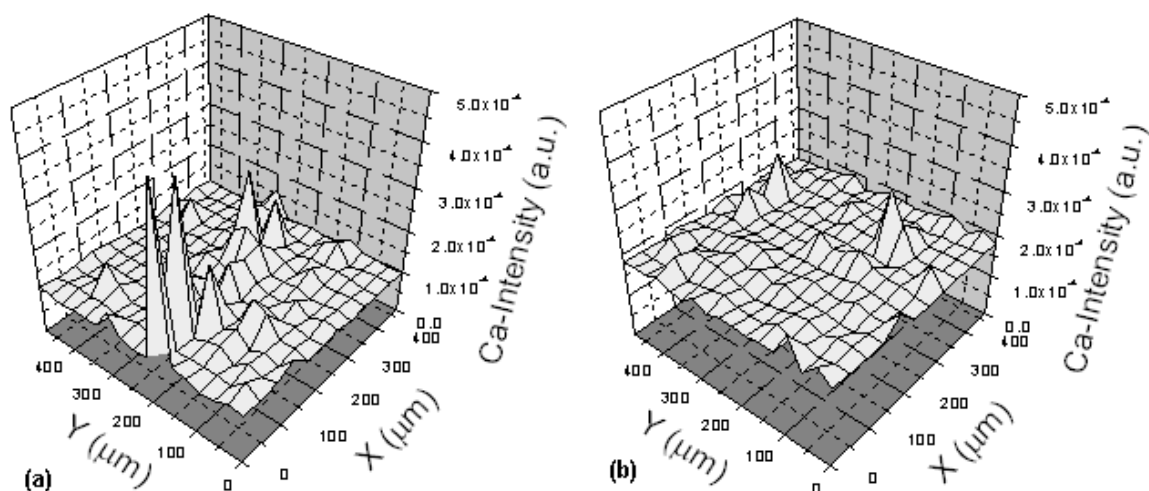


Figura 21: Distribuição de cálcio em membranas naturais de quitosana imersas em 1,0xSBF por (a) 30 minutos e (b) 12 horas.

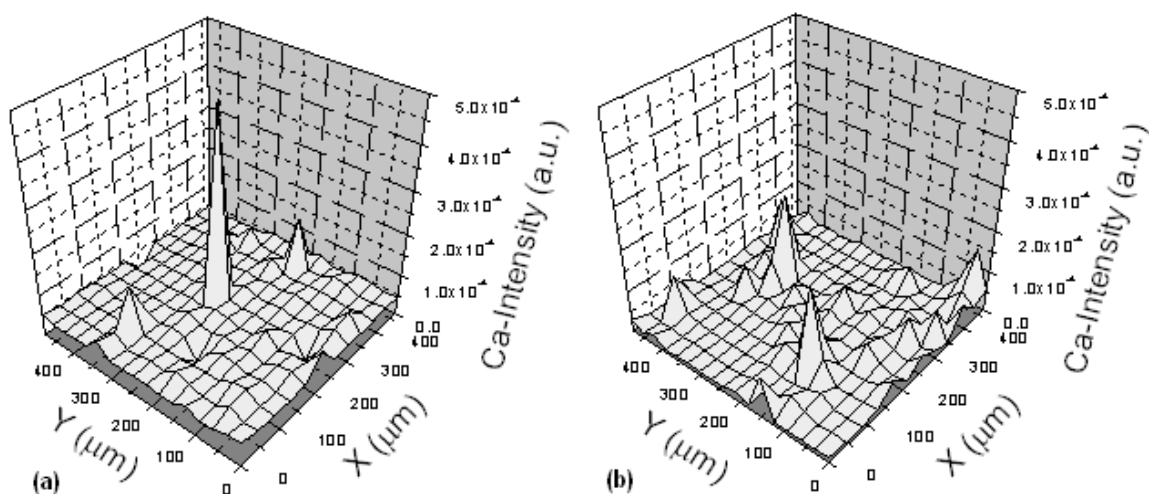


Figura 22: Distribuição de cálcio em membranas acetiladas de quitosana imersas em 1,0xSBF por (a) 30 minutos e (b) 12 horas.

Entretanto, a relação Ca:P foi investigada em ensaios de calcificação por 7 dias, como será detalhado posteriormente. Tal investigação pôde ser feita através de análises de SEM acopladas com EDS, mostrando que os depósitos presentes são predominantemente formados por fosfatos de cálcio (apatitas).

As **Figs. 23 e 24** apresentam os mapas de cálcio para membranas de quitosana tratadas com SBF sem íons fosfato. Provavelmente, nesse caso, os depósitos são predominantemente formados por carbonatos de cálcio, já que não há íons fosfato na solução e que o cloreto de cálcio (outro sal de cálcio que poderia formar os depósitos) apresenta alta solubilidade em água.

A presença pontual de cálcio nos mapas apresentados sugere que o mecanismo de deposição de cálcio requer um estágio de nucleação. Os picos de cálcio não são uniformemente distribuídos sobre a superfície das membranas após o tratamento com solução de cálcio por 30 minutos. Assim, a nucleação poderia ser ainda o responsável pela formação de depósitos nesse estágio. Por outro lado, os resultados mostram picos de cálcio com uma distribuição mais uniforme ao longo de toda membrana natural após o tratamento com soluções de cálcio por 12 horas. Esse fato pode indicar que os depósitos tenham crescido de forma suficiente para promover uma cobertura mais uniforme da superfície das amostras nesse estágio. Na membrana acetilada, mesmo após 12 horas de tratamento é possível visualizar ainda picos espalhados.

A distribuição de cálcio ao longo do tempo não apresentou diferenças significativas com mudanças na solução calcificante (SBF convencional ou sem íons fosfato). Entretanto, os contra-íons nos depósitos de cálcio provavelmente variaram com o tipo de SBF utilizado.

Puderam-se obter, a partir das análises de microscopia de força atômica, micrografias que retrataram a morfologia da superfície das membranas de quitosana. Através da comparação das micrografias foi possível observar as diferenças de morfologia das amostras decorrentes do tempo de tratamento das membranas com SBF convencional e sem íons fosfato.

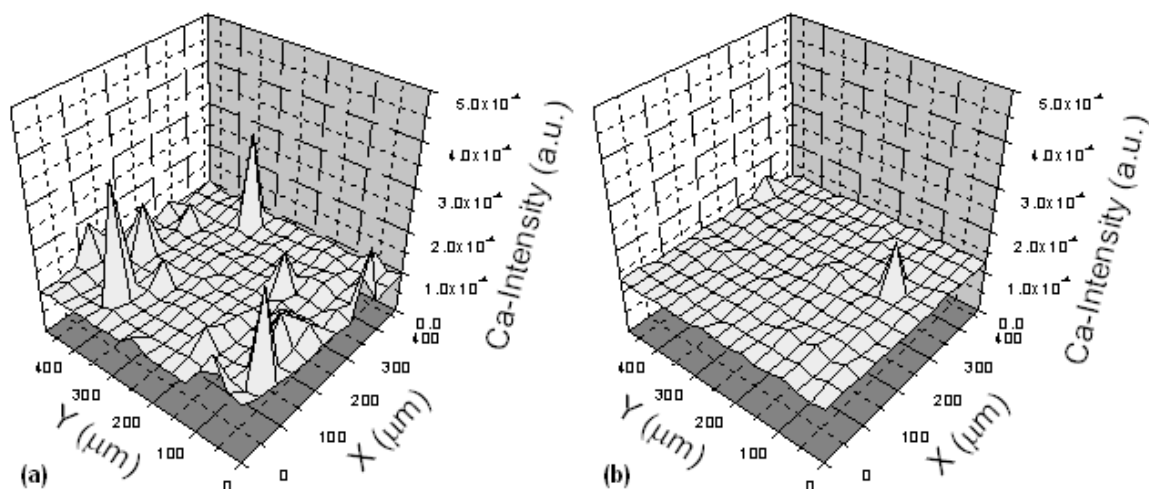


Figura 23: Distribuição de cálcio em membranas naturais de quitosana imersas em 1,0xSBF sem íons fosfato por (a) 30 minutos e (b) 12 horas.

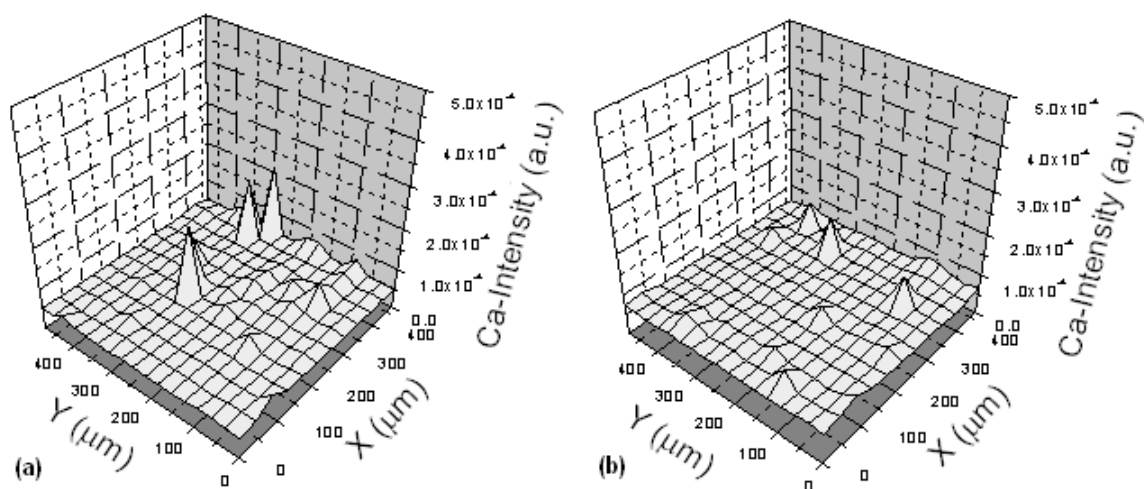


Figura 24: Distribuição de cálcio em membranas acetiladas de quitosana imersas em 1,0xSBF sem íons fosfato por (a) 30 minutos e (b) 12 horas.

A análise das **Figs. 25 e 26** não mostra diferenças significativas entre a morfologia das amostras de quitosana natural e acetilada submetidas ao tratamento com SBF por 30 minutos, sendo que em ambas figuras não foi possível

observar a presença de depósitos. Essa observação pode ser justificada com base na escolha do tempo de calcificação no qual foram feitas as análises.

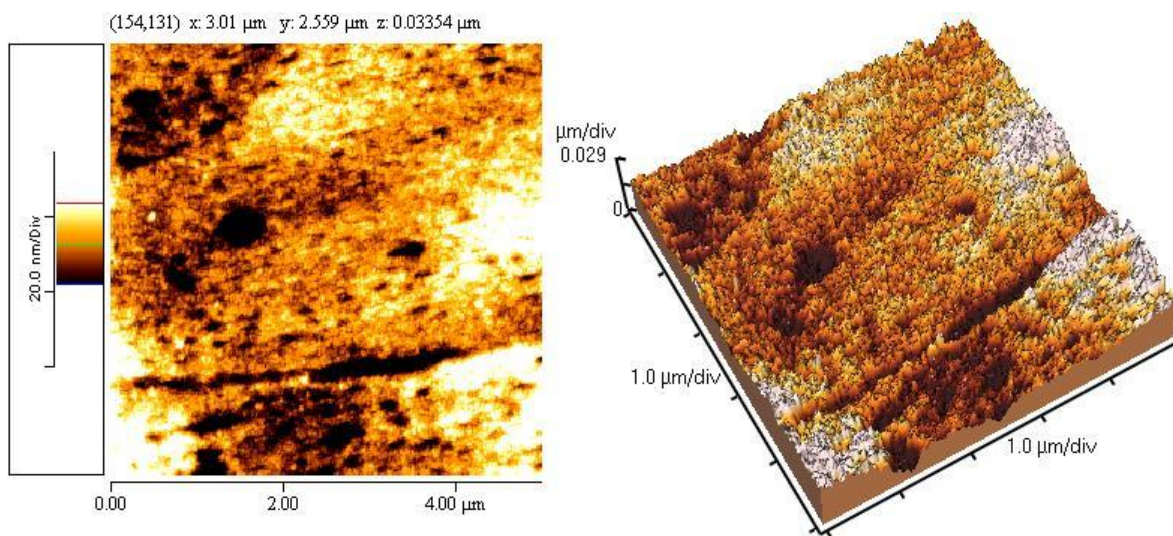


Figura 25: Microscopia de força atômica em membrana natural de quitosana imersas em 1,0xSBF por 30 minutos.

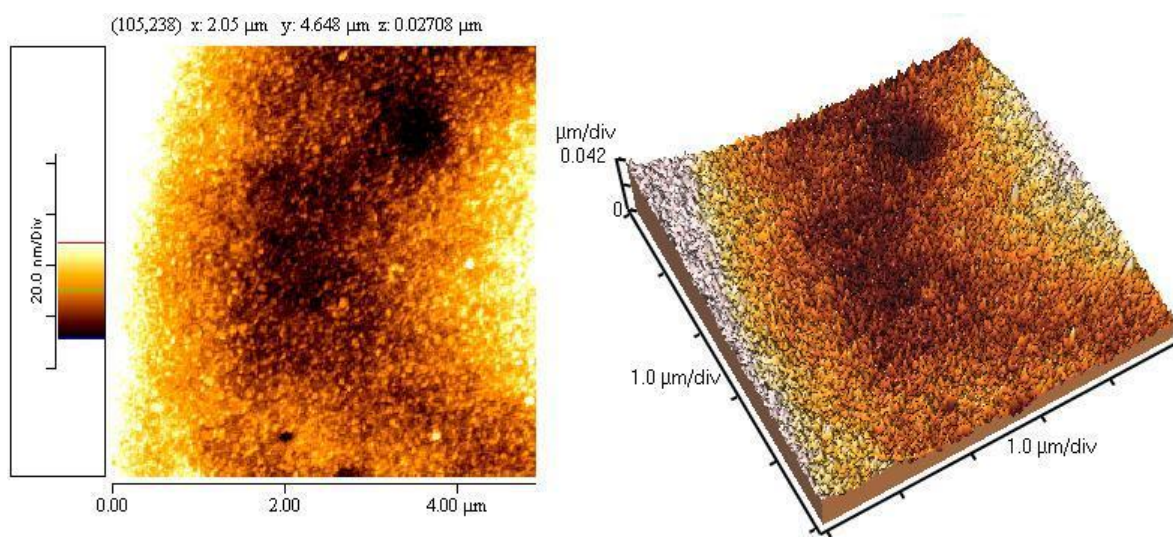


Figura 26: Microscopia de força atômica em membrana acetilada de quitosana imersas em 1,0xSBF por 30 minutos.

Aparentemente, após 30 minutos de tratamento em SBF, as membranas tanto naturais quanto acetiladas sofrem calcificação, como mostram as análises de fluorescência de raios-x. Porém essa nucleação ainda é muito incipiente nesse período e a análise de áreas muito reduzidas no microscópio de força atômica (da ordem de μm) não é capaz de gerar micrografias representativas de toda a área da amostra, já que os núcleos de cálcio nesse caso se encontram muito dispersos. As **Figs. 27 e 28** mostram micrografias de membranas submetidas ao tratamento com SBF por um período mais longo (12 horas). Nessas micrografias, é possível identificar que durante toda a análise ocorreu um arraste de material da amostra por parte da ponteira do microscópio, mesmo em escala maior que a utilizada para a análise das amostras tratadas com SBF por 30 minutos.

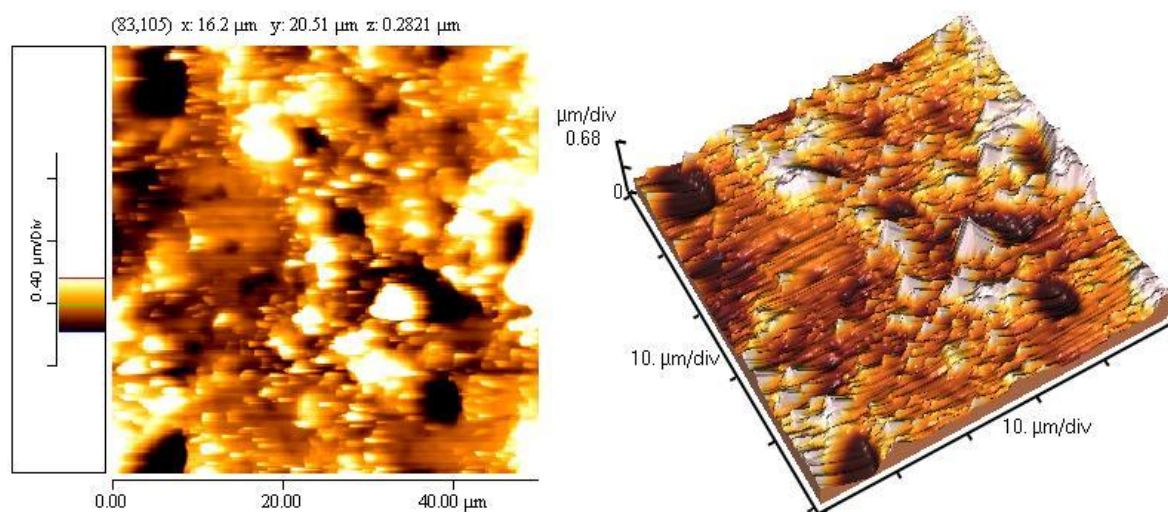


Figura 27: Microscopia de força atômica em membrana natural de quitosana imersas em 1,0xSBF por 12 horas.

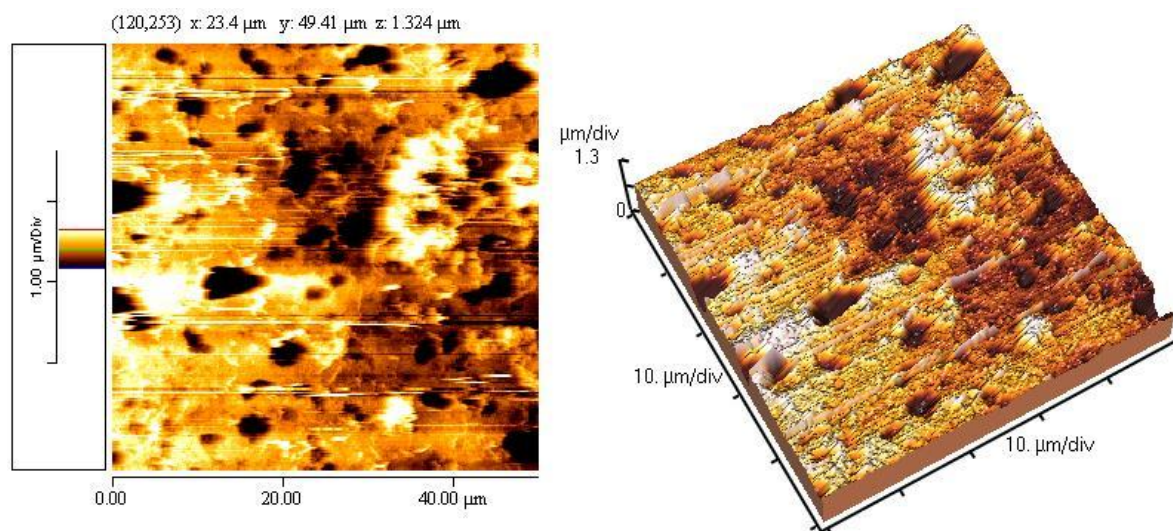


Figura 28: Microscopia de força atômica em membrana acetilada de quitosana imersas em 1,0xSBF por 12 horas.

Esse fato se deve à grande quantidade de depósitos de cálcio presente tanto em membranas naturais quanto acetiladas de quitosana calcificada em SBF por 12 horas, o que faz com que a superfície da amostra apresente irregularidades topográficas que freqüentemente colidem com a ponteira durante a análise. Esse fato sugere que já em 12 horas de tratamento é possível obter imagens representativas de toda a área da amostra, mesmo varrendo áreas pequenas, mostrando que esse período é suficiente para que ocorra uma deposição mais intensa e homogeneamente distribuída ao longo da membrana.

Os resultados obtidos com as análises de microscopia de força atômica reforçam os resultados de fluorescência de raios-x. O mecanismo de deposição é provavelmente caracterizado inicialmente por nucleação. Não há evidências de decomposição spinodal, já que os núcleos não são uniformemente dispersos sobre a superfície dos substratos, nos estágios iniciais de deposição. A calcificação obtida após o tratamento das amostras por 30 minutos foi incipiente, sob a forma de pequenos núcleos. Por outro lado, as soluções tratadas por 12 horas mostraram calcificação intensa e homogênea, sugerindo um processo de deposição por crescimento.

A literatura¹⁴⁷ mostra que a quitosana possui um arranjo atômico similar ao da quitina. O difratograma de raio-X da quitosana de casca de caranguejo apresenta normalmente picos a $2\theta = 10,4^\circ$, $19,6^\circ$ e $21,4^\circ$ que correspondem às reflexões (200), (020), e (220) e (202). Foi postulado, em estudos anteriores, que as moléculas de água estão fracamente ligadas entre as cadeias de quitosana ao longo da direção (010). Em amostras tratadas termicamente, além do desaparecimento da reflexão (020), há um surgimento de um pico a $15,1^\circ$ que corresponde à reflexão (120). O pico na posição (020) depende da quantidade de água e tende a diminuir em amostras secas ou tratadas termicamente a temperaturas mais altas (por exemplo, 200°C).

Através dos ensaios de difração de raios-X, pôde-se perceber que a reação de acetilação dos grupos amino da quitosana promovida sobre membranas densas altera profundamente a composição química do substrato, pois os difratogramas da quitosana natural e da quitosana acetilada apresentam diferenças significativas. Os picos característicos da quitosana se fazem presentes no difratograma da quitosana natural, mas não são visíveis no difratograma da quitosana acetilada.

A análise dos difratogramas ilustrados na **Fig. 29** mostra que praticamente não há diferenças na cristalinidade das amostras de quitosana natural devido ao tratamento das mesmas com SBF convencional ou SBF sem íons fosfato, já que nas três micrografias aparecem apenas picos relativos à quitosana. Visualmente a membrana calcificada apresentava depósitos, pois se mostrava mais opaca que a membrana natural. O fato do difratograma da quitosana calcificada não apresentar picos relativos a compostos cristalinos de cálcio indica que a deposição ocorrida nesse caso não se deu de maneira organizada e não se obteve significativo efeito epitaxial na cristalinidade dos depósitos.

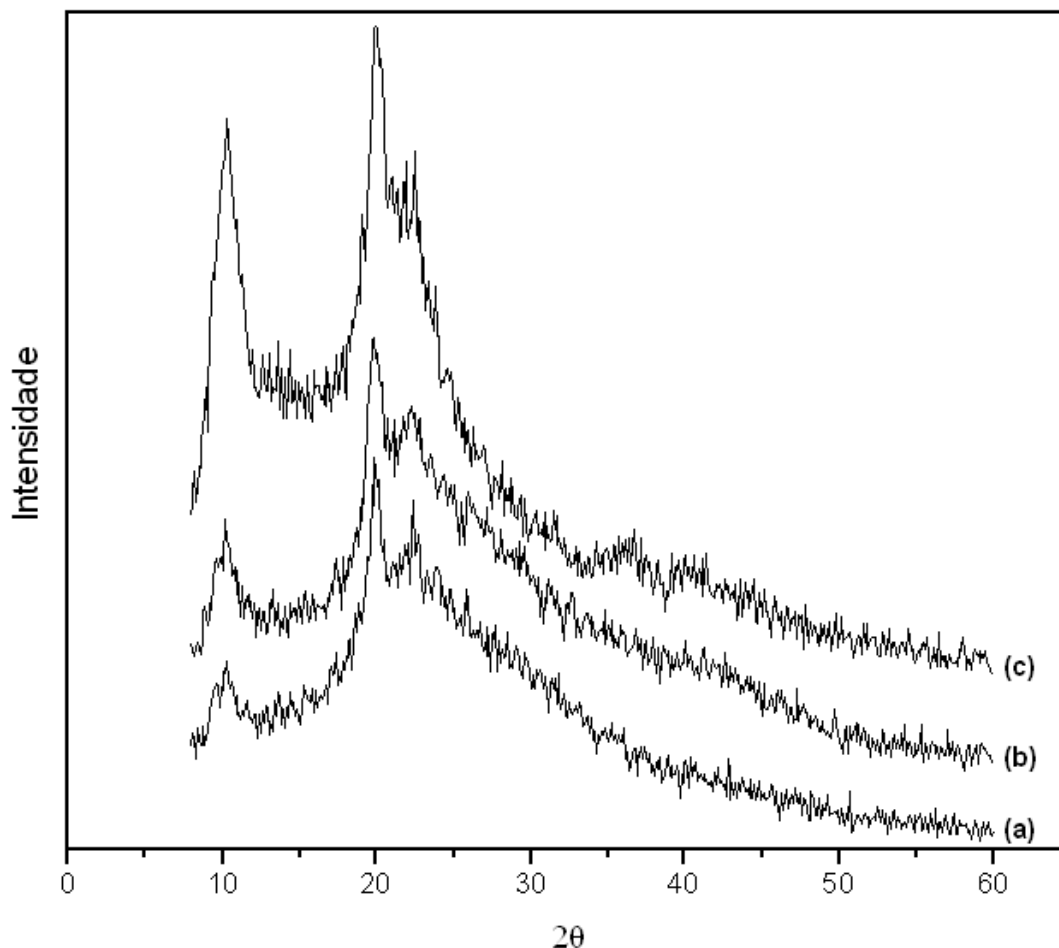


Figura 29: Difratogramas de raios-X de membranas de quitosana natural (a) não calcificada, (b) calcificada em SBF por 12 horas e (c) calcificada em SBF sem íons fosfato por 12 horas.

Através da análise dos difratogramas ilustrados na **Fig. 30** foi possível verificar diferenças de cristalinidade entre as amostras de quitosana acetilada com e sem tratamento em SBF convencional. Visualmente, as amostras acetiladas calcificadas apresentavam deposição mais intensa que os filmes naturais calcificados, pois eram mais esbranquiçadas. Pela análise dos difratogramas da quitosana acetilada e da quitosana acetilada tratado com SBF convencional, é possível perceber que nesta última aparecem picos cristalinos por volta de 26° e 33° , característicos de compostos de fosfato de cálcio. Esse fato indica que a acetilação, além de promover deposição mais intensa na membrana, faz com que

essa deposição seja mais organizada e, portanto aumente a cristalinidade da matriz.

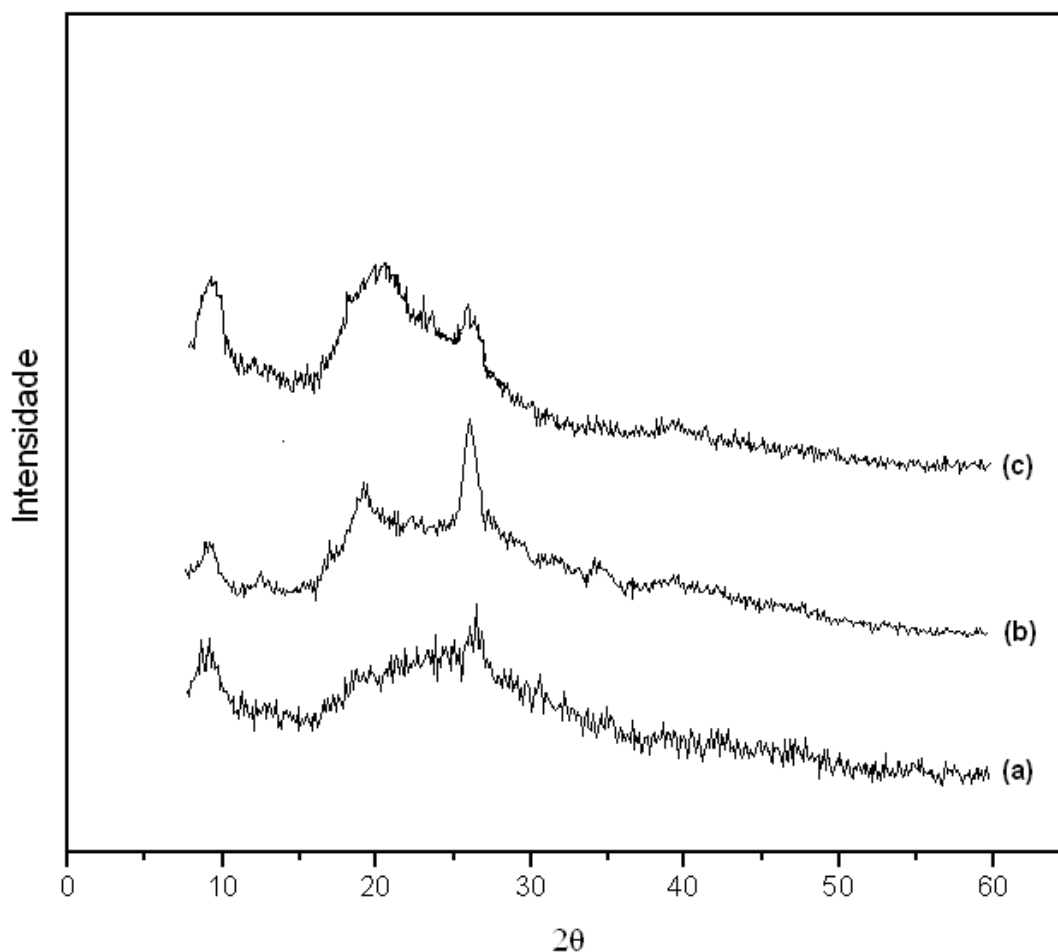


Figura 30: Difratomogramas de raios-X de membranas de quitosana acetilada (a) não calcificada, (b) calcificada em SBF por 12 horas e (c) calcificada em SBF sem íons fosfato por 12 horas.

O difratograma referente à amostra de quitosana acetilada tratada com SBF sem íons fosfato se mostra muito semelhante ao difratograma da membrana acetilada não calcificada. Nesse caso, a deposição de carbonato de cálcio aparentemente não ocorreu de forma cristalina, justificando assim a ausência de picos referente à presença de carbonato de cálcio no difratograma.

Os resultados obtidos sugerem, assim, que a reação de acetilação produz um substrato que induz de forma mais intensa a deposição de fosfatos de cálcio, formando depósitos mais cristalinos.

5.3 Ensaios de calcificação de 7 dias

Os ensaios de calcificação realizados durante um período de 7 dias apresentaram resultados significativos e interessantes, relacionados principalmente com a diferença entre substratos acetilados e naturais.

O monitoramento do pH das soluções calcificantes durante os ensaios mostrou que a solução tampão Tris/HCl promoveu relativa estabilidade da solução, tendo em vista que a variação dos valores medidos de pH antes e após cada troca de solução não ultrapassou 6%. Foi possível perceber também que na primeira troca, o pH das soluções de amostras acetiladas sofreu maiores variações, se tornando sempre mais ácido. Esse comportamento pode ser explicado pela influência do anidrido acético (que eventualmente não foi eliminado na lavagem das membranas acetiladas), que em meio aquoso dá origem ao ácido acético.

As **Figs. 31 e 32** mostram a comparação entre a morfologia de membranas naturais e acetiladas, respectivamente para substratos densos e porosos. Em ambos os casos, a reação de acetilação não altera significativamente a morfologia das amostras, no nível de detalhe obtido no microscópio eletrônico. A visualização da superfície das amostras demonstra que a superfície de membranas densas é relativamente regular, diferentemente das amostras porosas, que apresentam irregularidades e porosidade não uniformemente distribuídas. Em geral, a reação de acetilação aparentemente gera amostras de membranas porosas mais regulares e menos porosas, já que nesse caso, a reação de acetilação diminui a afinidade da amostra com água, provocando seu encolhimento e compactação.

A análise da calcificação promovida em membranas densas naturais e acetiladas evidenciou a influência da reação de acetilação das membranas em sua calcificação. Através da **Fig. 33** é possível perceber que a calcificação ocorre com maior intensidade em membranas densas acetiladas do que em membranas naturais submetidas às mesmas condições. O mesmo pode ser percebido a olho nu, já que as amostras de quitosana acetilada se apresentam mais esbranquiçadas após os ensaios de calcificação.

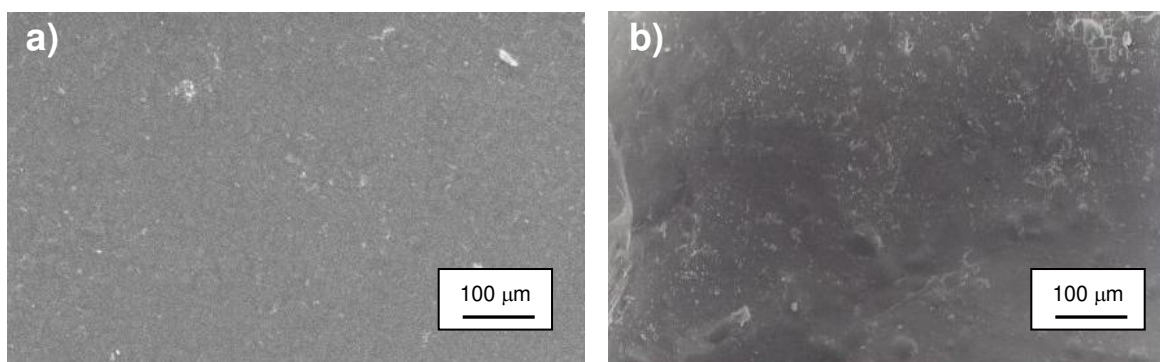


Figura 31: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas densas de quitosana (a) natural e (b) acetilada.

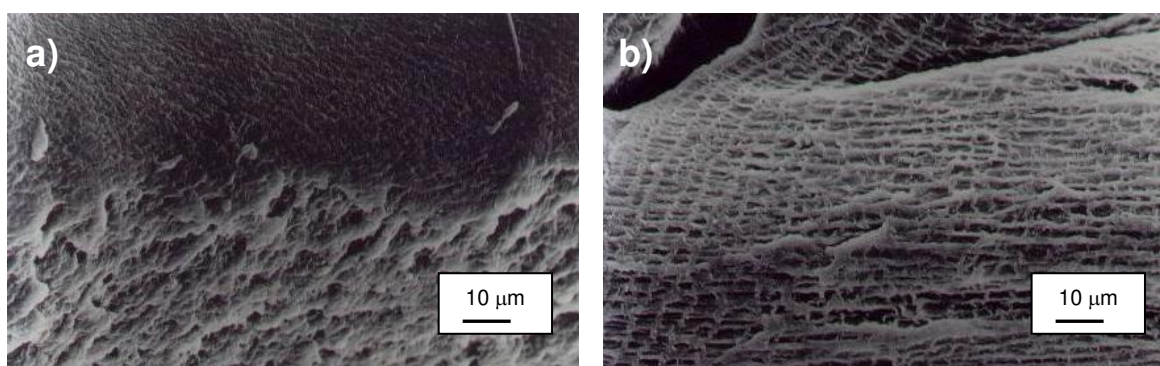


Figura 32: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas porosas de quitosana (a) natural e (b) acetilada.

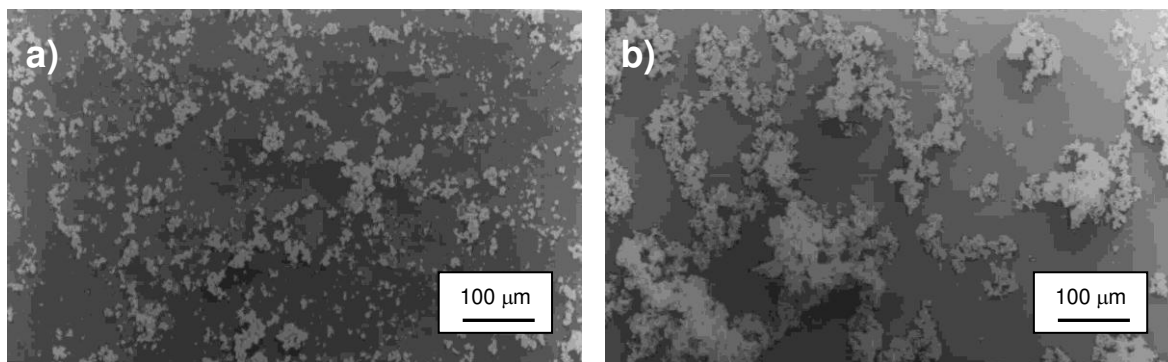


Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas densas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,4 em SBF.

No caso de amostras porosas, a acetilação também induziu uma maior intensidade de deposição. A **Fig. 34b** mostra em maior aumento as características esferulíticas dos depósitos de fosfato de cálcio. Tal característica pode ser observada também em todos os depósitos de cálcio observados.

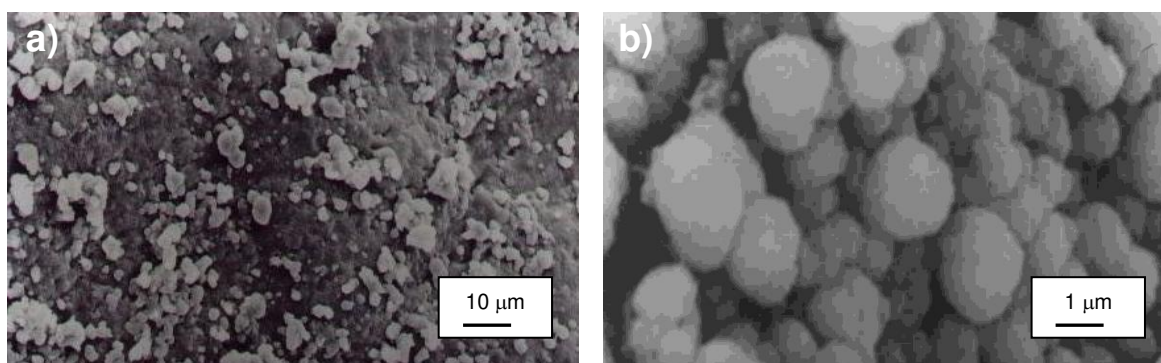


Figura 34: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas porosas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,4 em SBF.

Através das **Fig. 35** e **36**, pôde-se perceber que a deposição ocorrida em SBF a pH de 7,8 segue a mesma tendência da calcificação observada em SBF de pH 7,4, porém com a diferença de que nesse caso, ela ocorre de forma menos

intensa. Na ausência de substratos, a deposição de compostos de cálcio ocorre de maneira mais intensa com o aumento do pH. No entanto, o que ocorreu aqui foi justamente o contrário, com a observação de maior deposição para amostras submetidas ao tratamento por soluções calcificantes com menor valor de pH. Tal fato pode ser explicado pela influência do substrato no processo de deposição, o qual provavelmente proporciona uma condição mais favorável de deposição nessa condição de pH.

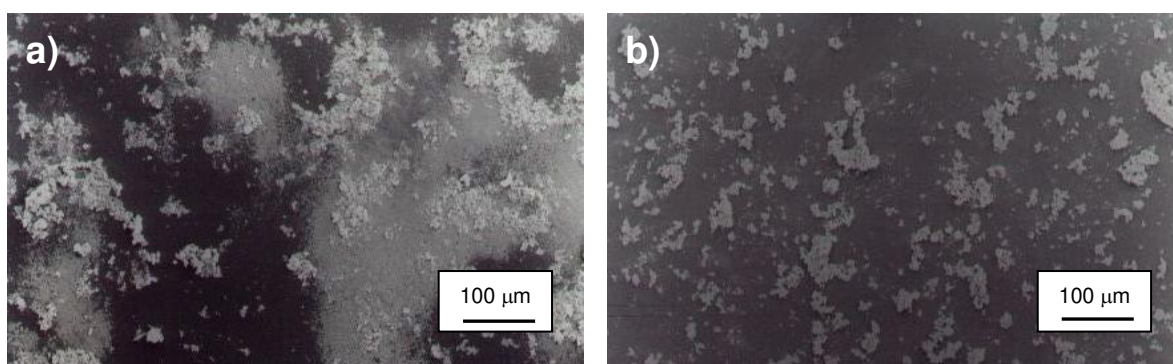


Figura 35: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas densas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,8 em SBF.

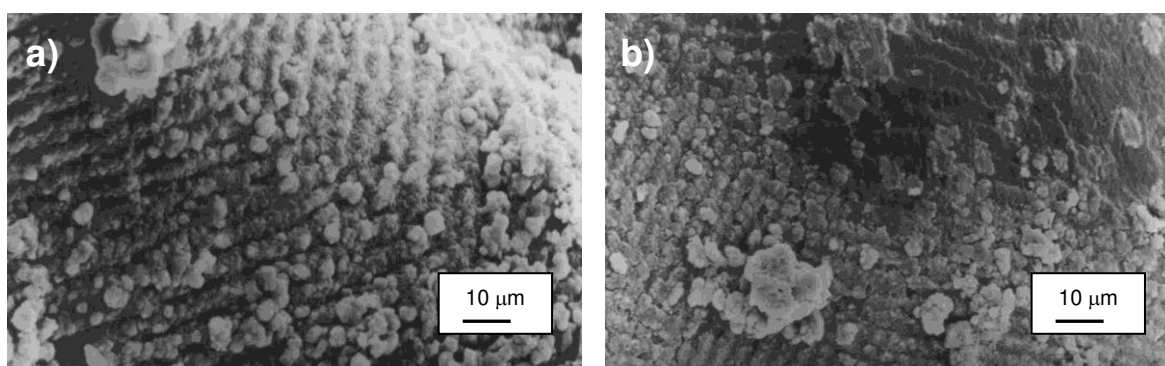


Figura 36: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas porosas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,8 em SBF.

As **Figs. 37 e 38** mostram micrografias relativas aos ensaios de calcificação em solução SBF sem íons fosfato. Em ambos os casos, tanto para membranas densas como para membranas porosas, não é possível observar deposição de cálcio sobre as amostras naturais. Entretanto, é possível visualizar a presença de pequenos aglomerados nas membranas acetiladas. Tais aglomerados também apresentam formas esferulíticas e têm certa quantidade de cálcio em sua composição atômica, como pôde ser confirmado nas análises de EDS.

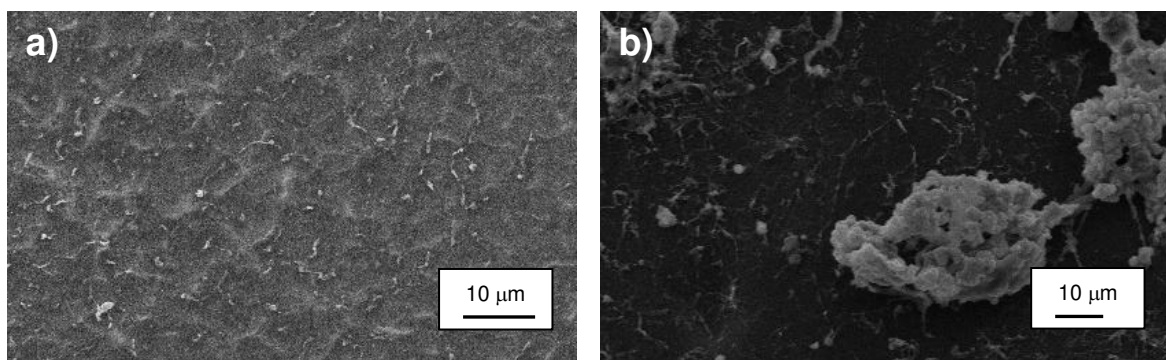


Figura 37: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas densas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,4 em SBF sem íons fosfato.

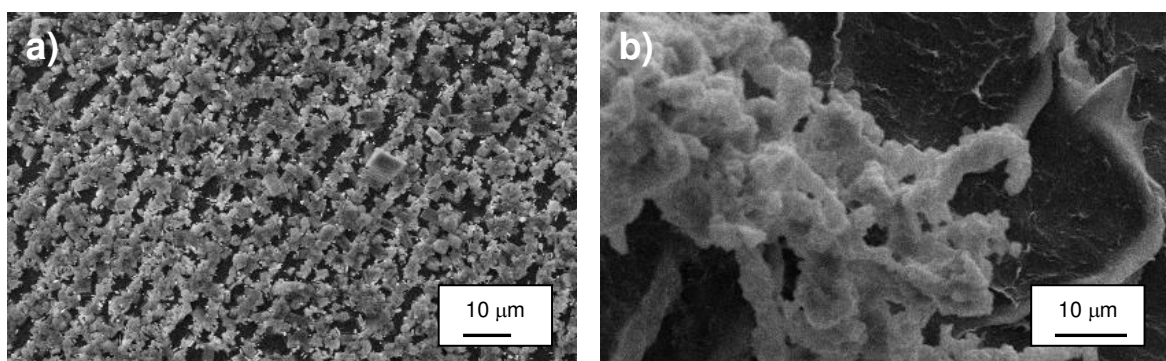


Figura 38: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas porosas de quitosana (a) natural e (b) acetilada, calcificadas a pH 7,4 em SBF sem íons fosfato.

Através da **Fig. 39** é possível visualizar que praticamente não há diferenças significativas entre a deposição ocorrida em membranas porosas acetiladas com excesso de cálcio e de fósforo, respectivamente.

A **Fig. 36a** mostra que a calcificação promovida principalmente sobre membranas porosas ocorre com boa aderência dos depósitos ao substrato (vide regiões onde a calcificação se inicia sobre a membrana).

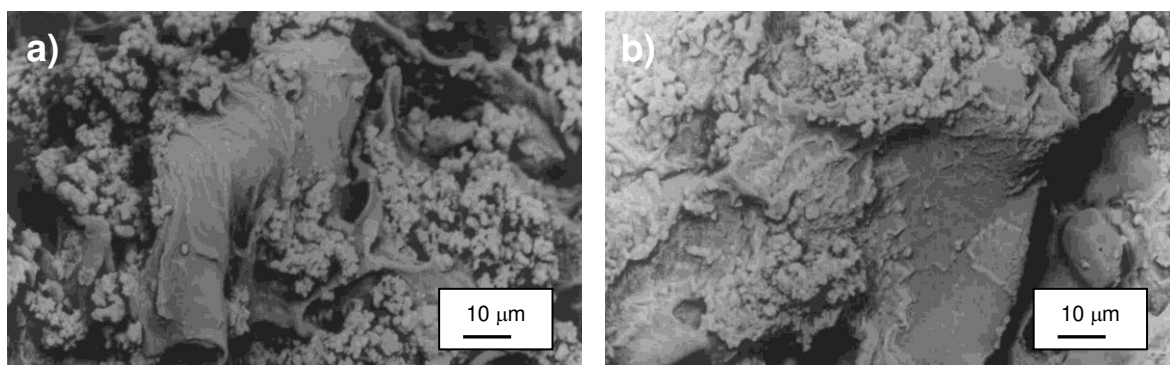


Figura 39: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas porosas de quitosana acetilada, calcificadas a pH 7,4 em SBF (a) com excesso de íons cálcio e (b) com excesso de íons fósforo.

As análises de EDS ilustradas na **Tabela 12** também mostram resultados interessantes. A relação Ca:P obtida na análise de membranas densas acetiladas submetidas à solução calcificante de pH 7,4 e 7,8, apresentou valores bem diferentes (Ca:P por volta de 1,20) do valor da relação na solução inicialmente preparada (Ca:P = 2,5). Em contrapartida, a análise de partículas pequenas da membrana densa acetilada, em solução de pH 7,4 mostra um valor bem mais alto (Ca:P = 2,05) que o obtido em aglomerados. Esse comportamento evidencia que os depósitos inicialmente se formam com altos valores da relação Ca:P e conforme ocorre o aumento desses depósitos, essa relação cai. Já as membranas densas naturais, em ambos os valores de pH estudados, apresentaram um valor mais alto da relação Ca:P, se comparadas com as membranas acetiladas, o que mais uma vez mostra a influência da matriz acetilada no fenômeno de calcificação.

Tabela 12: Determinação por EDS da relação Ca:P dos depósitos formados sobre membranas de quitosana.

Solução calcificante	Amostra	% atômica cálcio	% atômica fósforo	Relação Ca:P
SBF	Densa natural pH 7,4	51,29	24,37	2,10
	Densa acetilada pH 7,4	51,81	42,84	1,21
	Porosa natural pH 7,4	44,68	21,55	2,07
	Porosa acetilada pH 7,4	43,4	20,33	2,13
	Densa natural pH 7,8	62,46	30,71	2,03
	Densa acetilada pH 7,8	51,18	43,27	1,19
	Porosa natural pH 7,8	55,07	26,03	2,12
	Porosa acetilada pH 7,8	39,05	15,93	2,45
SBF com excesso de íons P	Porosa acetilada pH 7,8	49,97	24,4	2,05
SBF com excesso de íons Ca	Porosa acetilada pH 7,8	43,85	12,93	3,39

É possível perceber também que a calcificação de membranas porosas, em solução com excesso de fósforo ocorreu de maneira semelhante à observada em membranas porosas tratadas com solução calcificante sem excessos, já que a relação Ca:P em ambos os casos apresenta valores parecidos. Já a membrana

porosa tratada com excesso de cálcio sofre grande deposição desse elemento (Ca:P = 3,84), justamente devido a sua presença em excesso.

A **Fig. 40** confirma a ausência de compostos de cálcio em membranas de quitosana submetidas ao tratamento em SBF sem íons fosfato, observado nas **Figs. 37a** e **38a**. Nesse caso só foi possível observar a presença de bandas relacionadas presença de NaCl, que não foi eliminado durante a lavagem cuidadosa da membrana. Este resultado aparentemente contesta os resultados obtidos por fluorescência de raios-X, onde em tempos de apenas 12 horas de tratamento em solução de SBF sem íons fosfato foi possível obter mapas do elemento cálcio sobre membranas de quitosana.

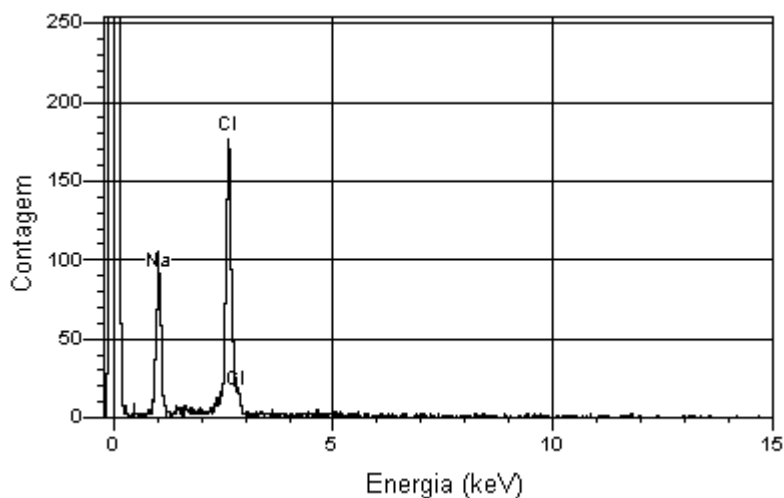


Figura 40: Composição atômica observada nas amostras de quitosana natural submetidas a ensaio de calcificação com SBF sem íons fosfato.

Isto pode ser explicado pelo fato de a técnica de fluorescência de raios-X por luz síncrotron possibilitar uma análise em nível muito maior de detalhes que o EDS, sendo possível naquele caso, detectar a presença de elementos em concentrações muito reduzidas, que não podem ser detectadas no EDS. As análises de microscopia de força atômica também confirmam a pequena extensão de deposição de carbonatos de cálcio sobre membranas de quitosana natural, uma vez que não foi possível observar diferenças entre os mapas topográficos das

membranas naturais calcificadas com carbonato de cálcio e os daquelas não submetidas aos ensaios de calcificação.

A **Fig. 41** mostra os espectros de EDS para as amostras acetiladas submetidas aos ensaios de calcificação em SBF sem íons fosfato. Nesse caso, foi possível perceber a presença de átomos de cálcio nos depósitos observados, provavelmente sob a forma de carbonatos.

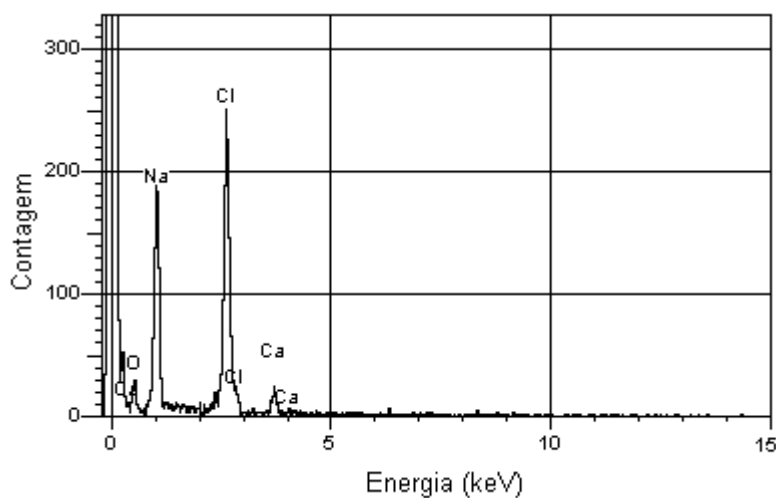


Figura 41: Composição atômica observada nas amostras de quitosana acetilada submetidas a ensaio de calcificação com SBF sem íons fosfato.

5.4 Calcificação quimicamente induzida

No fenômeno da biomineralização, precipitados inorgânicos são formados sob a influência de uma matriz orgânica. Este controle envolve o controle da concentração local dos precipitantes, a presença de superfícies ou grupos de nucleação e a presença de inibidores na solução, que podem se ligar a faces específicas do material em crescimento. Além disso, o tamanho, a forma e a orientação das partículas são controlados pela matriz, possibilitando um controle

muito mais efetivo da morfologia e distribuição das partículas, se comparado aos métodos de deposição e mistura sol-gel convencionais. Uma hipótese importante admite que tal controle seja exercido principalmente através da junção de redes epitaxiais entre a matriz protéica ou de polissacarídeos e o mineral¹⁴⁸.

O crescimento de cristais é tradicionalmente dividido em dois estágios: nucleação e crescimento. Durante o crescimento, a energia do cristal ou aglomerado de cristais decresce continuamente. Já durante a nucleação, o alto valor da relação superfície – volume significa que o aglomerado de cristais é cada vez mais estável que a solução vizinha.

Conforme as partículas vão se tornando mais finas, forças coloidais passam a ganhar importância, tornando-se assim mais difícil de se evitar a aglomeração. No entanto, a presença de uma macromolécula (presente na matriz) que atue como uma superfície ligante pode estabilizar cristais pequenos que normalmente são metaestáveis¹⁴⁹.

Uma superfície orgânica pode atuar de diversas formas na promoção de deposição mineral: fisorção de íons e pequenos precipitados, orientação de redes cristalinas, deposição preferencial e nucleação heterogênea, sendo este último o fenômeno menos estudado e menos conhecido. A deposição orientada de um mineral sobre uma superfície é também atribuída à nucleação heterogênea, mas não apenas a ela; em alguns casos pode ser observado que as forças envolvidas na fisorção de partículas coloidais são suficientes para causar a estabilização da fase mineral e a orientação dos cristais.

As amostras de quitosana (inicialmente imersas em solução de CaCl_2 2M) não puderam ser testadas em suspensão de NaHCO_3 2M, pois nesse caso as membranas solubilizaram durante o experimento. Esse fato pode ser explicado já que o íon HCO_3^- em equilíbrio com água libera íons H^+ , o que acidifica o meio, promovendo a protonação dos grupos amino da quitosana e, por consequência, sua solubilização.

As **Figs. 42 e 43** mostram as micrografias obtidas através de microscopia óptica com luz polarizada. A morfologia dos precipitados formados sobre as

membranas de quitosana é bem diferente daquela observada nos precipitados obtidos na ausência da matriz orgânica. A presença da matriz de quitosana claramente induz a formação de uma fase inorgânica de tamanho e orientação diferentes. A diferença no tamanho dos grãos pode ser observada em ambas as figuras. No entanto, os grãos de fosfato apresentam-se maiores que os grãos de carbonato, mostrando o forte efeito biomimético da quitosana sobre a deposição de fosfato de cálcio.

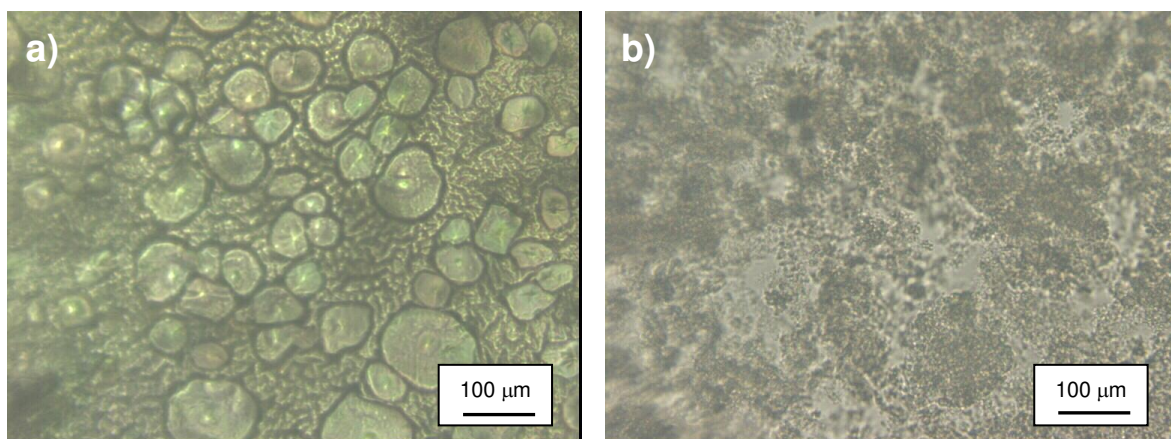


Figura 42: Depósitos de fosfato de cálcio obtidos através de ensaios rápidos de calcificação (a) na presença de substrato de quitosana e (b) na ausência do substrato de quitosana. Aumento de 20 vezes.

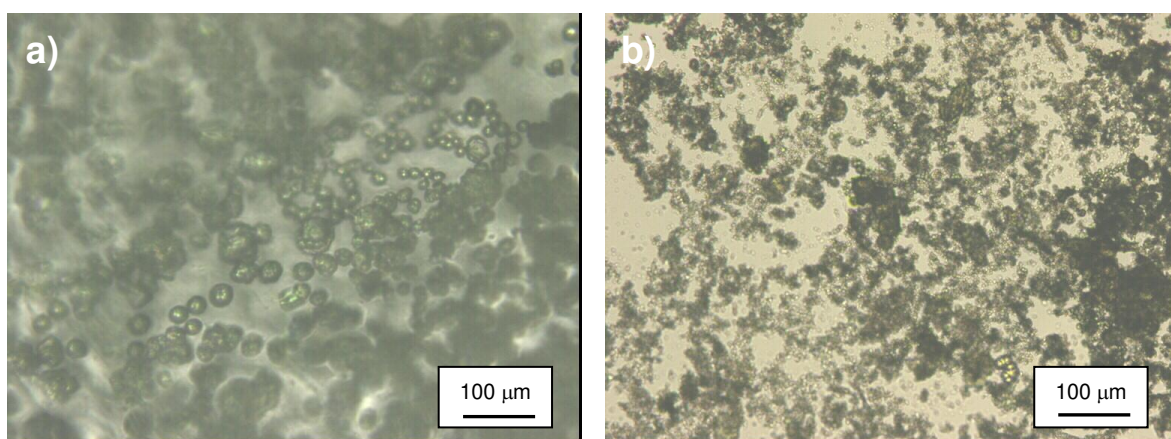


Figura 43: Depósitos de carbonato de cálcio obtidos através de ensaios rápidos de calcificação (a) na presença de substrato de quitosana e (b) na ausência do substrato de quitosana. Aumento de 20 vezes.

A birrefringência observada nos grãos formados sobre as membranas de quitosana mostra a orientação apresentada pelos precipitados, que nesse caso são anisotrópicos. Desse modo, as micrografias dos depósitos obtidos na ausência do substrato de quitosana apresentam pequenos grãos de menos orientados. Esse fato elucida a influência da matriz no processo de mineralização.

Em geral, a calcificação bloqueia alguns grupos químicos, inicialmente presentes na superfície das membranas. Por exemplo, a absorção de luz infravermelha, atribuída aos grupamentos amino ou carboxila, não fica evidente após a calcificação de membranas naturais e acetiladas, respectivamente, como pode ser visto nas **Figs. 44 e 45**.

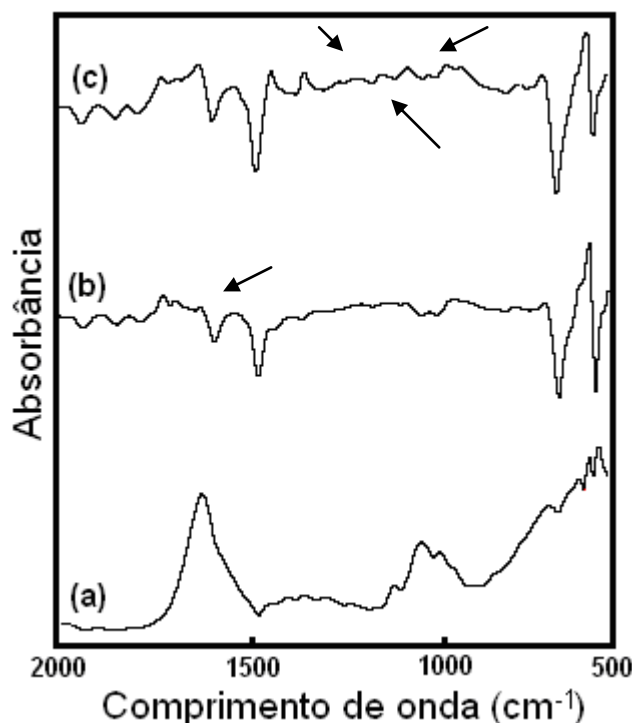


Figura 44: Espectroscopia de infravermelho de (a) quitosana natural (b) quitosana natural tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de Na_2CO_3 e (c) quitosana natural tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de K_2HPO_4 .

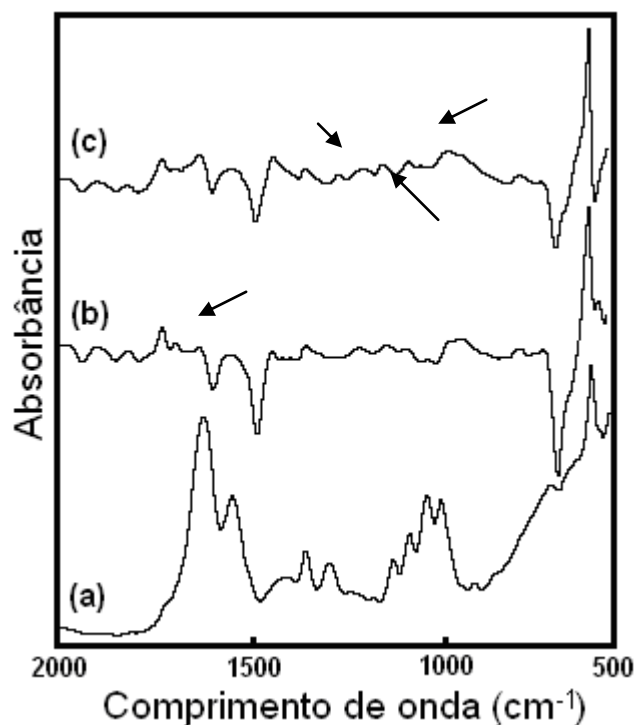


Figura 45: Espectroscopia de infravermelho de (a) quitosana acetilada (b) quitosana acetilada tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de Na_2CO_3 e (c) quitosana acetilada tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de K_2HPO_4 .

Nas amostras calcificadas, pôde-se perceber através das **Figs. 44c e 45c** a presença de absorções típicas de fosfato (como os encontrados em fosfato de cálcio amorfo): presença de fosfato de cálcio com a larga banda entre 1200 e 1000 cm^{-1} devido à deformação anti-simétrica do grupo PO_3^{-2} e ao estiramento do grupo PO_4^{-3} ($\nu\text{P-O}$)¹⁵⁰. Entre 800 e 900 cm^{-1} há uma banda similar a do ortofosfato de cálcio dibásico que pode ser devido ao estiramento de P-O-Ca ¹⁵⁰. E, em fosfatos pouco cristalizados há também sinais em 1125 e 1110 cm^{-1} . A literatura¹⁵¹ diz que o espectro de infravermelho de fosfatos de cálcio amorfos (Amorphous calcium phosphates – ACPs) apresenta bandas largas e disformes de absorção, conforme as observadas nesse trabalho. Tal característica é esperada para materiais

amorfos, pois os íons não estão sujeitos a distorções regulares que estes sofreriam se estivessem num retículo cristalino. Todavia, uma leve estrutura nas bandas de fosfato pode ser vista entre 1250 e 890 cm^{-1} . Os sinais ν_3 e ν_4 de PO_4 ocorrem em 1085 e 555 cm^{-1} .

Nas amostras ilustradas nas **Figs. 44b** e **45b**, pode-se notar uma contribuição atribuída ao estiramento assimétrico de CO_3^{-2} , próximo a 1500 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} e em 875 cm^{-1} , características de compostos de carbonato de cálcio.

Em todos os espectros observados, praticamente não se pode notar a presença de bandas correspondentes a quitosana. Esse fato pode ser explicado pela limitação da técnica de FTIR-ATR. Como a análise de infravermelho com cristal de germânio é um método de análise de superfície, as respostas obtidas correspondem à calcificação promovida sobre a superfície da membrana, e que nos casos observados se apresentou muito similar tanto para quitosana natural e acetilada.

As **Figs. 46** e **47** mostram os difratogramas de raios-X das amostras de quitosana submetidas aos ensaios rápidos de calcificação.

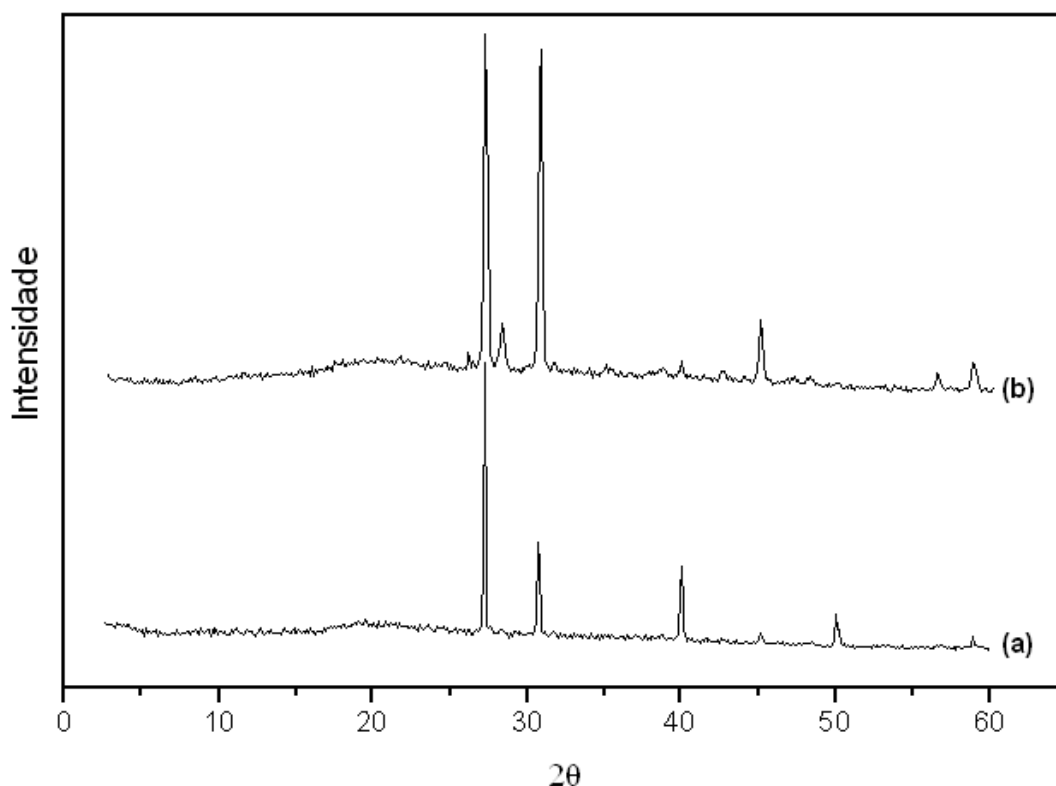


Figura 46: Difratogramas de raios-X de membranas de quitosana natural (a) tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de Na_2CO_3 e (b) tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de K_2HPO_4 .

A análise destes difratogramas confirma a cristalinidade dos precipitados formados sobre as membranas. Esse resultado difere dos resultados obtidos para depósitos formados em SBF^{129,152}, onde todos os depósitos são pouco cristalinos, assim como a maioria das apatitas biológicas encontradas na natureza. Um fato interessante é que a amostra que apresentou características de menor cristalinidade é aquela que contemplou a formação de fosfatos de cálcio sobre a membrana de quitosana acetilada.

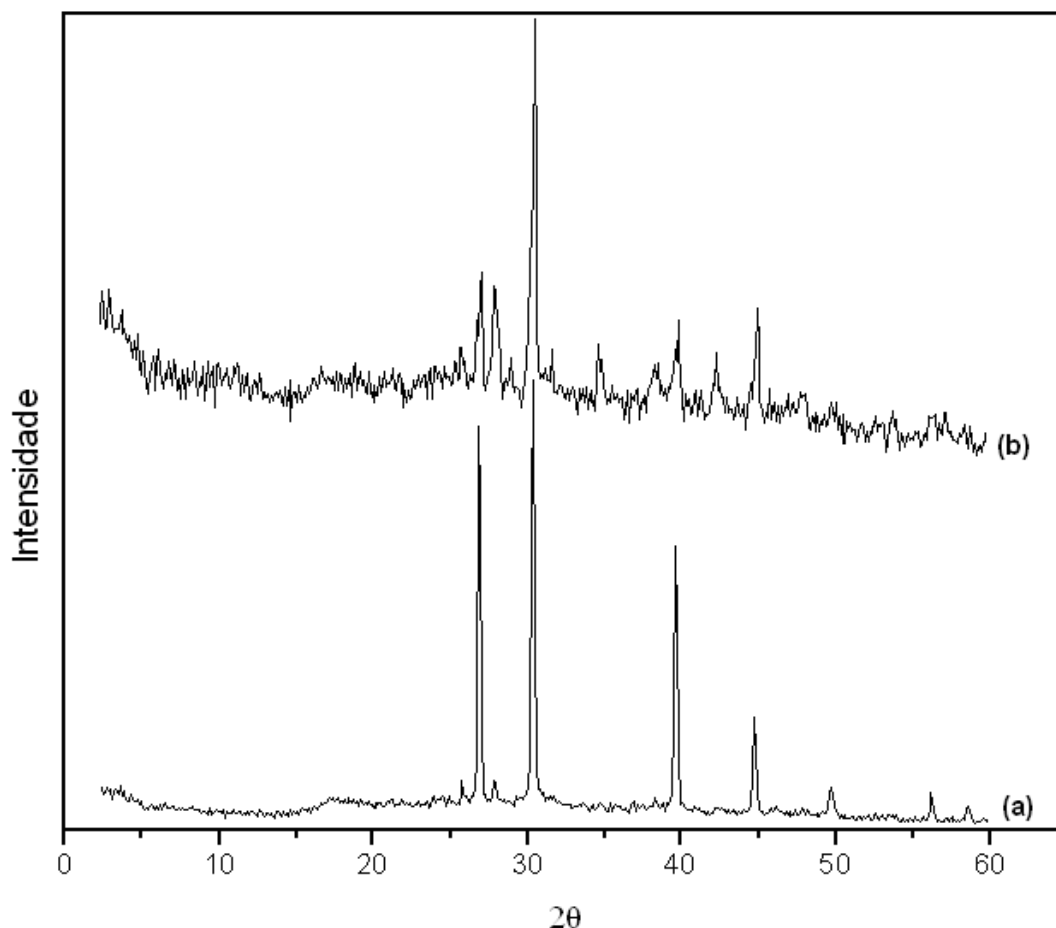


Figura 47: Difratomogramas de raios-X de membranas de quitosana acetilada (a) tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de Na_2CO_3 e (b) tratada com solução 2M de CaCl_2 e imediatamente imersa em solução 2M de K_2HPO_4 .

As **Figs. 46a** e **47a** mostram os difratogramas de raios-X de membrana de quitosana natural e acetilada, respectivamente, submetidas à deposição de carbonato de cálcio. Em ambos os casos, os difratogramas destes sólidos estão de acordo com a referência JCPDS¹⁵³ (número 01-0628 e 01-0837 para quitosana natural e 01-0628 e 01-1032 para quitosana acetilada). Na amostra de quitosana acetilada, a intensidade dos picos é aparentemente maior em comparação com os picos observados na quitosana natural. Esse fato pode ser explicado pelo efeito

biomimético da quitosana acetilada, que corresponde a uma espécie de quitina sintética, que é encontrada associada ao carbonato de cálcio na natureza.

Por outro lado, as **Figs. 46b e 47b** ilustram a deposição de fosfatos de cálcio em quitosana natural e acetilada, que estão de acordo com a referência JCPDS (número 20-0024 para quitosana natural e 03-0604 para quitosana acetilada).

A quitosana acetilada parece induzir deposição mais organizada de compostos de carbonato de cálcio em sua estrutura, já que o difratograma relativo à análise da amostra de quitosana acetilada e calcificada com fosfatos de cálcio apresentou estruturas mais amorfas. Esse fato é interessante, pois pode ser indício da atividade natural da quitosana acetilada na forma de quitina sintética moldada e que nos ensaios realizados mostrou ter maior afinidade na deposição organizada de carbonatos que de fosfatos de cálcio, fato esse observado na natureza, já que a quitina se encontra majoritariamente presente em conchas e carapaças de crustáceos, associada a compostos como o carbonato de cálcio.

Os difratogramas apresentados podem ser utilizados para fornecer informações sobre a morfologia dos cristais; é possível correlacionar a largura dos picos com o tamanho dos planos cristalográficos perpendiculares. Isso pode ser feito através da equação de Scherrer¹⁵⁴, mostrada na **Eq. 4**:

$$X_s = \frac{0,9\lambda}{FWHM \cdot \cos(\theta)} \quad (4)$$

onde X_s corresponde ao tamanho do crystal em nm, λ é o comprimento de onda da radiação incidente em nm, FWHM (Full Width at Half Maximum) é a largura do pico a meia altura em radianos e θ é ângulo do pico.

Aplicando a equação de Scherrer às curvas apresentadas nas **Figs. 46 e 47**, uma estimativa do tamanho dos cristais pode ser obtida, como mostrado na **Tabela 13**.

Tabela 13: Tamanho de cristal dos precipitados de cálcio em substratos de quitosana, obtidos através de experimentos de calcificação quimicamente induzida.

Substrato	Θ [°]	FWHM [°]	Cos(Θ)	Xs – Tamanho do cristal (nm)
Quitosana natural – carbonato de cálcio	28.5730	0.0853	0.8782	106
	28.6455	0.0853	0.8776	106
Quitosana natural – fosfato de cálcio	28.4227	0.2099	0.8795	43
	28.4948	0.2099	0.8789	43
Quitosana acetilada – carbonato de cálcio	28.4207	0.1112	0.8795	81
	28.4928	0.1112	0.8789	81
Quitosana acetilada – fosfato de cálcio	28.6597	0.2979	0.8775	34
	28.7324	0.2979	0.8769	34

As amostras submetidas à deposição de fosfatos de cálcio apresentaram tamanhos de cristal menor que aqueles observados para os cristais de carbonato de cálcio. Além disso, os depósitos de fosfato e carbonato em filmes de quitosana acetilada apresentaram cristais menores, se comparados aos depósitos observados em filmes de quitosana natural.

Essa observação é resultado da influência da matriz de quitosana acetilada no mecanismo de deposição de compostos de cálcio, levando a uma deposição mais lenta e ordenada, como visto nos estudos sobre o processo inicial de calcificação.

A **Tabela 14** indica algumas diferenças no raio de giro de entidades que espalham raios-X em cada membrana, utilizando a técnica SAXS.

Tabela 14: Raio de giro de amostras de quitosana.

Substrato	α	Rg (Å)	Diferença em relação ao Rg de (a) - %	> q	qxRg
Quitosana acetilada	-1,18949	1,89	-	0,49906	0,94
Quitosana natural	-0,96358	1,70	-	0,49906	0,85
Quitosana natural – carbonato de cálcio	-1,22272	1,92	12,6	0,49906	0,96
Quitosana natural – fosfato de cálcio	-1,1071	1,82	7,19	0,49906	0,91

Quanto maior o raio de giro observado, maiores são os cristais. Assim, o R_g encontrado para membranas após o processo de calcificação, principalmente para carbonatos, pode indicar que as espécies resultantes a partir de quitosana e íons em solução são maiores. Este resultado confirma as análises de tamanho de cristal, e a primeira vista, contesta as análises de microscopia óptica. Esta aparente incoerência pode ser explicada se as imagens vistas nas micrografias forem consideradas como agregados de cristais. Isto pode ser entendido se grandes quantidades de cristais de fosfato forem produzidas, permitindo que tais cristais se agreguem como será discutido a seguir sob um ponto de vista termodinâmico.

As análises de SAXS podem ainda indicar que a interação entre as espécies em solução ocorre em menor escala para carbonatos e em maior escala para fosfatos. Este fato está alinhado com a idéia de que estas interações são as causas de todas as alterações dimensionais e macroscópicas observadas nas membranas de quitosana, principalmente se for considerado que íons fosfatos são maiores que íons carbonato.

Os resultados desta seção mostram que mesmo em condições onde a precipitação espontânea pode ocorrer, como nos experimentos de precipitação rápida quimicamente induzida, existe uma influência significativa da matriz na deposição. Nos resultados apresentados aqui, isto pode ser observado tanto na morfologia dos depósitos, como em seu tamanho e orientação. **A Fig. 42** mostra grãos maiores e mais bem orientados (birrefringentes) nos depósitos obtidos na presença de quitosana. Outra constatação importante com respeito à influência da matriz é a diferença observada entre a quitosana natural e acetilada: a presença de grupos químicos expostos diferentes faz com que a influência da matriz seja diferente na formação de fosfatos e carbonatos, como visto anteriormente nos estudos de calcificação de 7 dias. Entretanto, de maneira interessante, este tipo de influência pode ser observado em um experimento rápido de precipitação, que leva muito menos tempo (30 minutos em média contra 7 dias dos ensaios de calcificação em SBF). Os precipitados formados espontaneamente na ausência de quitosana (nucleação homogênea) apresentam grãos menores e muito menos birrefringentes, o que denota uma menor orientação.

A termodinâmica da nucleação apresenta várias revisões na literatura e é sabido que, assumindo-se formas esféricas para os núcleos, a energia livre de formação do núcleo crítico segue a relação, mostrada na **Eq. 5**¹⁴⁵:

$$\Delta G_{heterogêneo} = \Delta G_{homogêneo} \cdot \Gamma(\theta) \quad (5)$$

onde $\Gamma(\theta)$ é apenas uma função do ângulo de contato entre o núcleo esférico e o substrato. Este conceito é muito importante, mostrando que a energia necessária para a nucleação heterogênea depende da interação entre depósito e matriz.

De um ponto de vista cinético, a matriz pode causar a diminuição da energia de ativação para a nucleação, diminuindo a barreira energética para a formação espontânea de uma fase sólida a partir de uma solução supersaturada. Sabe-se que o obstáculo cinético pode ser suficiente para contrabalancear a força motriz termodinâmica favorável à precipitação, resultando em soluções que permanecem metaestáveis sem a presença de nenhuma mudança de fase durante longos períodos de tempo.

De maneira complementar, a nucleação só é viável a um tamanho crítico de aglomerado, r^* , definido como sendo o raio no qual a mudança da energia livre (de excesso) da rede para um único núcleo, $\Delta G_{(r)}$, é máxima. A barreira energética associada à nucleação homogênea (ΔG^*) se relaciona com as quantidades energéticas previamente mencionadas através da **Eq. 6**:

$$\Delta G^* = 16\pi \frac{\gamma_{SL}^3 \nu^2}{3k^2 T^2 \ln^2(S)} \quad (6)$$

onde γ_{SL} é energia interfacial sólido – líquido (J/m^2), ν é o volume molecular (m^3/mol), k é a constante de Boltzmann, S é a supersaturação e T é a temperatura (K)¹⁵⁵.

Assim, através da diminuição da energia interfacial ou do aumento da supersaturação do meio (ou seja, através da diminuição dos valores de K_{PS}), a energia de ativação para nucleação pode ser diminuída. Dessa maneira, torna-se lógico dizer que as superfícies que proporcionam interfaces mais viáveis à formação de depósitos poderiam induzir um efeito mais rápido, que poderia ser notado até mesmo em experimentos de calcificação quimicamente induzida, como os apresentados aqui. A supersaturação pode ser controlada através da composição da solução vizinha à superfície e a energia interfacial pode ser diminuída pela presença de esuperfícies orgânicas no local de nucleação. As

macromoléculas podem agir de forma primária, como limites regionais, onde íons são transportados para produzir regiões supersaturadas.

Acredita-se que, pelo fato de as ligações químicas na superfície de núcleos minerais serem principalmente iônicas, a interface inorgânica deve conter áreas com alta energia local, onde interações eletrostáticas, interações dipolares ou ligações de hidrogênio podem ocorrer durante a nucleação. Como exemplo, a formação de minerais ósseos sobre fibras de colágeno é atribuída a sítios ácidos¹⁵⁶. Por outro lado, uma capacidade de ligação excessiva pode ser negativa para a deposição. Mann¹⁵⁷ cita três aspectos que influenciam o processo de interação e identificação entre as fases orgânica e inorgânica: acúmulo eletrostático (efeito ionotrópico), correspondência estrutural (epitaxial) e demanda estereoquímica.

O efeito ionotrópico é a explicação mais provável para o fato de que algumas macromoléculas ligam íons cálcio em estequiometrias que geralmente excedem o número de sítios de ligação aniônica no substrato¹⁵⁷. Além disso, o acúmulo de uma dada carga na superfície (aniônica) poderia se iniciar por ligações primárias de ânions, gerando uma esfera de coordenação catiônica associada de maneira menos intensa que, por sua vez, atrai uma esfera de coordenação catiônica secundária. A alta capacidade e a baixa afinidade de ligação são críticas para o controle da nucleação: uma matriz com alta afinidade por cálcio poderia provavelmente inibir a nucleação, já que o forte efeito de ligação tornaria o íon inativo. Por outro lado, a alta capacidade é necessária para a promoção de um número local de íons suficiente para superar o tamanho crítico do núcleo.

A quitosana natural mostrou ser um bom substrato para a deposição em condições ricas em fósforo, já que os difratogramas de raios-X nesse caso mostraram uma fase mais cristalina. Esse fato expressa a capacidade da matriz de influenciar a orientação dos depósitos. As análises de FTIR-ATR confirmam as diferenças químicas entre a deposição de cálcio em filmes de quitosana e

mostram que até mesmo em condições pobres em fósforo, a matriz é capaz de influenciar a deposição.

O crescimento somente irá ocorrer se a energia liberada na ligação dos íons no seio da fase sólida (ΔG^*) superar a energia necessária à formação da nova interface (ΔG_v). Um parâmetro muito importante para a execução desse tipo de análise é o tamanho crítico do núcleo. Partículas maiores que esse tamanho apresentam tendência ao crescimento e as partículas menores do que esse tamanho tendem a re-dissolver. Além disso, a formação de núcleos requer saturações maiores que aquelas presentes durante o crescimento do depósito.

Nielsen¹⁵⁸ revisou a cinética de crescimento de cristais para o caso de sais, e disponibilizou regras que podem ser utilizadas na estimativa de taxas em muitos sistemas. O maior fator limitante nas taxas de crescimento de cristais, no caso de sais contendo diferentes cátions é a perda de água por parte dos cátions hidratados. No presente estudo, essa observação faz referência ao cátion de cálcio. A maioria dos sais segue uma dependência quadrática entre a taxa de crescimento e a supersaturação (concentração do sal/concentração de saturação).

Em situações onde o crescimento é controlado pela cinética de interface, a taxa de crescimento é dependente da supersaturação, mas não da razão entre os dois íons. Por outro lado, a difusão é controlada, a taxa é dependente da quantidade do íon menos concentrado. Sistemas com carbonato de cálcio mostram que o pareamento iônico não é importante, mas afeta a taxa de crescimento¹⁵⁹.

A morfologia dos depósitos é diferente para fosfatos e carbonatos. Membranas de quitosana natural provavelmente apresentam uma condição de crescimento para fosfatos mais facilitada que para carbonatos. Esse fato pode ser entendido através da comparação entre os valores das constantes de solubilidade para o carbonato de cálcio ($K_{PS} = 3,36 \times 10^{-9}$) e fosfato de cálcio ($K_{PS} = 2,07 \times 10^{-33}$)¹⁶⁰. De um aspecto termodinâmico, os valores de K_{PS} podem se relacionar com o (ΔG^*) sob a forma de um logaritmo. Então, valores menores de K_{PS} , em módulo, retornam valores menores de (ΔG^*).

Finalmente, é possível concluir que, em condições aproximadamente constantes de energia interfacial sólido – líquido e de volume molecular, fosfatos de cálcio apresentam uma maior tendência para a formação de cristais maiores, como observado as **Figs. 42 e 43**.

A interpretação a partir de um ponto de vista termodinâmico pode sugerir duas possibilidades: (1) a matriz proporciona uma melhor interação com carbonatos; em outras palavras, $0 < \Gamma(\theta)_{\text{carbonato}} < 1,0$ e $\Gamma(\theta)_{\text{carbonato}} < \Gamma(\theta)_{\text{fosfato}}$. Esse fato poderia permitir uma nucleação heterogênea com um número maior de núcleos, provavelmente de menor dimensão; (2) outra possibilidade é que a membrana natural induz um maior tamanho de nucleação crítica para fosfatos do que para carbonatos. Isto poderia privilegiar o crescimento dos núcleos através da incorporação de íons da solução para o seio do núcleo inorgânico pré-formado, ao invés da geração de mais núcleos.

Os experimentos de calcificação quimicamente induzida não contemplaram fenômenos difusionais, já que nesse caso específico a deposição ocorreu de maneira rápida.

6. DISCUSSÃO FINAL

Como citado no início deste trabalho, diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo têm promovido o crescimento dos estudos e aplicações de biopolímeros no contexto médico e tecnológico atual. O estudo de polímeros como celulose, colágeno, alginato, látex, quitina, entre outros, encontra-se em diferentes estágios de avanço, mas todos estes materiais são conhecidos e aplicados pelo homem. Na última década, principalmente, a quitosana despontou como importante material para fazer parte desta lista, por reunir características interessantes, como ser derivado de um material de grande disponibilidade na crosta terrestre e apresentar propriedades químicas úteis graças à reatividade de seus grupos amino.

Dessa forma, as metodologias de produção e purificação desse material, bem como o amplo estudo de suas aplicações, vêm crescendo em ritmo acelerado. Como enfatizado nesse trabalho, uma área importante na qual a quitosana ganha cada vez mais espaço é a área médica.

É possível encontrar hoje, na literatura, estudos em fase final de testes para produtos médicos, como bandagens para ferimentos e queimaduras, veículos de liberação controlada de fármacos, entre outros. No entanto, pouco se conhece sobre o comportamento desse material em aplicações como biomaterial para implantes internos, definitivos ou provisórios. Aqui se insere o presente trabalho. Visando caracterizar o comportamento de filmes de quitosana expostos à soluções de composições próximas as do soro humano, foram então realizados três diferentes testes com o intuito de se caracterizar um importante fenômeno que ocorre em biomateriais implantados: a calcificação.

Buscando aplicar o aprendizado obtido com a observação de fenômenos naturais como a formação de conchas e corais, foram utilizados primordialmente dois substratos quimicamente diferentes: a quitosana natural e a quitosana acetilada. Esse fato se justifica, pois na natureza é comum se encontrar compostos de quitina e quitosana (quitina com alto grau de desacetilação)

associados a compostos de cálcio. Além disso, foram utilizadas em alguns testes duas morfologias diferentes, ou seja, foram testadas duas formas diferentes de substratos de quitosana: membranas porosas e membranas densas. O intuito dessa comparação foi a verificação da influência de parâmetros como a presença de poros e irregularidades no processo de ancoragem de cálcio. Por fim, foram testadas diferentes soluções calcificantes, entre elas soluções que depositavam fosfato de cálcio ou carbonato de cálcio. Dessa vez, o objetivo do estudo consistia na verificação da influência do substrato na formação de diferentes tipos de compostos de cálcio, também associados à quitina e quitosana na natureza.

Os estudos sobre os estágios iniciais de deposição demonstram que no início do processo (30 minutos), ocorre a formação de núcleos aleatoriamente distribuídos, sobre os dois tipos de substrato submetidos à deposição de carbonato e fosfato de cálcio. No entanto, as análises de cristalinidade mostram que o tratamento de membranas de quitosana acetilada com soluções que depositam fosfato de cálcio leva ao aparecimento de um pico referente à presença de fosfato com certa cristalinidade.

Em ensaios de deposição quimicamente induzida, pôde-se perceber exatamente o contrário, ou seja, a deposição de fosfatos de cálcio sobre membranas de quitosana acetilada ocorreu de forma menos organizada. Isto pôde ser visto já que o difratograma de raios-X desta amostra apresentou um espectro mais ruidoso e com picos menos definidos se comparados aos espectros de amostras de quitosana natural calcificada com carbonato e fosfato de cálcio ou até mesmo se for comparado ao espectro obtido com amostra de quitosana acetilada calcificada com carbonato.

Tal aparente incoerência na verdade é um forte indício sobre o efeito biomimético, que aparentemente é mais pronunciado no caso de membranas acetiladas no processo inicial de calcificação. Como os resultados de XRF demonstram, o crescimento de cristais de cálcio no caso de membranas acetiladas ocorre de maneira mais lenta, se comparado ao crescimento observado em membranas naturais. Após um período de 12 horas de deposição já foi

possível observar, para o caso de membranas naturais, que os depósitos de cálcio formaram uma camada mais homogênea de recobrimento, enquanto que as amostras de quitosana acetilada ainda apresentavam núcleos espalhados. Ao mesmo tempo, a indução por parte da matriz, de uma calcificação mais lenta, leva à formação de depósitos aparentemente mais cristalinos (como visto nas análises de XRD nos ensaios iniciais de calcificação), devido, provavelmente à maior interação entre o substrato acetilado e os íons em solução. Termodinamicamente, a deposição é favorável tanto no caso de membranas naturais como no caso de membranas acetiladas. No entanto, a cinética de deposição inicial em membranas acetiladas parece ser mais lenta, provavelmente devido à influência do substrato que comanda uma deposição mais organizada em estágios iniciais.

Já em estágios onde a nucleação deixa de ser o mecanismo predominante e a deposição passa a ocorrer através do crescimento dos núcleos, a deposição de fosfatos de cálcio em membranas acetiladas ocorre de maneira mais amorfa, com difratogramas mais próximos do que se obtém em apatitas naturais. Sugere-se que nesse estágio a influência da matriz sofra cada vez mais a interferência dos depósitos vizinhos e que, desse modo, obtenha-se difratogramas de compostos pouco organizados. Esse fato explica a presença de picos poucos cristalinos em membranas de quitosana acetilada em estágios avançados de calcificação, mas coloca em dúvida o que ocorre com membranas naturais e com as membranas acetiladas submetidas à deposição de carbonato de cálcio, já que em ambos os casos é possível observar picos cristalinos de compostos de cálcio em amostras submetidas aos ensaios de calcificação quimicamente induzida. Uma hipótese sugerida para o caso das membranas naturais seria a de que em processos de calcificação inicial, a presença de um grupo amino altamente reativo e eletronegativo apresentaria maior afinidade pela deposição de cátions de cálcio se comparados aos terminais acetil presentes na quitosana acetilada. Dessa forma, a nucleação ocorreria de forma mais rápida no caso de membranas naturais. Entretanto, após o estágio de nucleação, a alta eletronegatividade dos terminais amino da quitosana natural, pode ainda exercer influência sobre os depósitos a serem formados, orientando os cristais formados durante o estágio de

crescimento. Isto provavelmente não ocorre no caso de membranas acetiladas, já que os grupos acetil são menos reativos e eletronegativos que os grupos amino, ficando cobertos pela camada de depósitos de cálcio.

Por fim, a deposição de carbonato de cálcio sobre membranas acetiladas, mesmo no estágio de crescimento, pode ainda estar sob influência do efeito biomimético deste substrato, já que os íons carbonato teoricamente exercem menor interferência em seus vizinhos se comparados aos íons fosfato, além de apresentarem menor dimensão iônica.

Através da análise da relação Ca:P observada nos depósitos obtidos através de ensaios em soluções de fluido corpóreo simulado, pôde-se novamente notar a influência da natureza do substrato no processo de deposição. Membranas densas de quitosana acetilada apresentaram aglomerados com relação Ca:P bem diferente daquela presente na proporção atômica da solução. Em contrapartida, a análise de pequenas partículas com o objetivo de se analisar as características de depósitos em processos iniciais de formação mostrou que nesse caso a relação Ca:P é diferente da observada em aglomerados). Tal fato reforça a evidência de que os compostos de cálcio depositados sobre este substrato são influenciados de forma diferente pela matriz, dependendo do estágio em que se encontra a calcificação.

Os depósitos observados sobre membranas naturais de quitosana apresentaram maiores relações Ca:P. No entanto, essa relação não apresentou variações consideráveis quando tomadas partículas de tamanhos diferentes, mostrando que o processo de calcificação em membranas naturais é mais uniforme.

Um fato interessante a ser notado é que tanto para substratos naturais como para substratos acetilados a relação Ca:P se mostrou diferente na comparação entre membranas densas e porosas. Em todos os casos, as membranas porosas apresentaram relação Ca:P mais alta. Este fato provavelmente ocorre porque membranas porosas apresentam maior área de contato com a solução calcificante e, por consequência, maior exposição dos

grupos químicos presentes em suas cadeias. Esta maior exposição, aliada ao fato de que a porosidade e a irregularidade observadas nas membranas porosas podem favorecer a presença de sítios de ancoragem de cálcio, faz com que tais relações Ca:P apresentem valor maior, justamente devido a maior interação entre íons cálcio e substrato.

Os testes realizados em soluções de SBF sem íons fosfato mostram que a deposição de carbonatos de cálcio ocorreu sobre membranas de quitosana acetilada, mas não pôde ser visível em substratos naturais. Esse fato também é observado na natureza, onde materiais como carapaças de invertebrados e conchas são compostos por quitina e carbonato de cálcio. Apesar de ter sido observado aqui que a deposição de fosfato de cálcio também ocorre sobre os substratos acetilados que mimetizam a quitina, a deposição de carbonatos de cálcio aparentemente é mais controlada pela matriz, produzindo compostos organizados como os que podem ser obtidos na natureza.

Com as observações presentes nesse trabalho, é possível dizer que o processo de biomineralização da quitosana é fortemente dependente do grau de acetilação dos grupos amino do monômero, sendo que para casos de extrema acetilação (quitina), o mecanismo de calcificação difere em todos os estágios do que pode ser observado em substratos desacetilados (quitosana). Parâmetros como a porosidade e a irregularidade do substrato são fundamentais, uma vez que o estágio de nucleação é fortemente dependente dos sítios de ancoragem termodinamicamente favoráveis.

No caso particular de ensaios de calcificação heterogênea, a massa molecular da quitosana utilizada não entra como parâmetro fundamental, uma vez que na forma de membranas, o tamanho das cadeias não é decisivo, já que a exposição de grupos químicos ocorrerá da mesma forma para cadeias longas e curtas. Foi tomado apenas o cuidado de se utilizar quitosana comercial de características bem próximas para evitar qualquer variabilidade nos experimentos decorrente dos processos de obtenção dos substratos. Estudos neste mesmo

laboratório determinaram valores de massa molecular ao redor de 65.000 daltons¹²⁸ para a quitosana comercial utilizada aqui.

Os testes de citotoxicidade mostram que a quitosana, na forma de membranas pode ser aplicada sem causar reações adversas em tecidos celulares, ou seja, mesmo após o processo de fabricação das membranas, o material não se mostra citotóxico. Tal confirmação é importante, pois garante que o substrato pode passar pelo processo de moldagem sem que os tratamentos ácido e básico ao qual é submetido alterem a biocompatibilidade do composto.

7. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É possível sintetizar os frutos deste trabalho, concluindo-se que:

- A quitosana na forma de solução aquosa em meio levemente ácido é altamente moldável e podem ser obtidos substratos em diversos formatos de acordo com a aplicação visada;
- A reação de acetilação heterogênea é viável sobre substratos de quitosana, produzindo um composto de propriedades próximas às observadas na quitina;
- O mecanismo geral de calcificação em substratos de quitosana parece seguir os estágios de nucleação e crescimento e existe uma forte dependência desse mecanismo com o grau de acetilação;
- A presença de sítios de ancoragem de cálcio e a exposição destes sítios influenciam na característica dos depósitos obtidos;
- Os substratos de quitosana acetilada apresentaram maior afinidade com a deposição de carbonatos de cálcio, confirmando o comportamento da quitina observado na natureza;
- Ensaios de calcificação quimicamente induzida podem ser utilizados para observar de maneira simples e rápida a influência do substrato na formação de depósitos de cálcio.

Sugere-se para a realização de trabalhos futuros na área:

- Realização de testes *in vivo* de substratos de quitosana, através do implante de pequenos cortes de filmes de quitosana na região lombar de ratos e posterior análise do processo de calcificação.
- Testes de possíveis tratamentos de válvulas cardíacas comerciais de pericárdio bovino com quitosana, visando aumentar a biocompatibilidade e diminuir a citotoxicidade do material.
- Testes dinâmicos do mecanismo de calcificação sobre membranas de quitosana aplicadas como biomateriais para a produção de válvulas cardíacas e bombas de circulação extracorpórea.
- Estudos para a fabricação de cimentos ósseos injetáveis a base de quitosana natural ou acetilada, aproveitando as propriedades biomiméticas destes materiais.
- Exploração de outras aplicações de quitosana acetilada, aproveitando as propriedades mecânicas conferidas pela calcificação.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Dobrzáński, L.A. Materials design as a fundamental aim of materials engineering. *Rudy Met. Niezelaz.*, **50**, p.296-311 (2005);
- [2] Dobrzáński, L.A. Significance of materials science for the future development of societies. *J. Mater. Process. Tech.*, **175**, p.133-145 (2006);
- [3] Olivier, V., Faucheux, N., Hardouin, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov. Today*, **9**, p.803-811 (2004);
- [4] Grant, J.A., Bishop, N.E., Gotzen, N., Sprecher, C., Honl, M., Morlock, M.M. Artificial composite bone as a model of human trabecular bone: The implant–bone interface. *J. Biomech*, Em processo de Impressão.
- [5] Griffith, G.L. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **961**, p.83-95 (2002);
- [6] Beppu, M.M., Santana, C.C. In vitro biomineralization of chitosan. *Key Eng. Mater.*, **192**, p.31-34 (2001);
- [7] B.D. Ratner in Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, California, p.1 (1996);
- [8] Okoshi, T., Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Morishima, M., Terada, R., Koyanagi, H. in: Gabbay, S., Frater, R.W.M., *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprotheses*, Silent Partners, Austin, p.13 (1994);

- [9] Bernacca, G.M., Mackay, T.G., Wheatley, D.J. in: Gabbay, S., Frater, R.W.M., *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprostheses*, Silent Partners, Austin, p.25 (1994);
- [10] Mavrilas D., Apostolaki A., Kapolos J., Koutsoukos P.G., Melachrinou M., Zolota V., Dougenis D. Development of bioprosthetic heart valve calcification in vitro and in animal models: morphology and composition. *J. Cryst. Growth*, **205**, p.554-562 (1999);
- [11] Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration. *Polym. Eng. Sci.*, **59**, p.897-901 (1988);
- [12] Ravi Kumar, M.N.V. A Review of Chitin and Chitosan Applications, *Reac. Funct. Polym.*, **46**, p.1-27 (2001);
- [13] Muzzarelli, R.A.A. Human Enzymatic Activities Related to the Therapeutic administration of Chitin Derivatives, *Cell Mol. Life Sci.*, **53**, p.131-140 (1997);
- [14] Burkatovskaya, M., Tegos, G.P., Swietlik, E., Demidova, T.N., Castano A.P., Hamblin, M.R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*, **27**, p.157-164 (2006);
- [15] Roberts, G.A.F. *Chitin Chemistry*; The Macmillan Press, Hampshire, p.138 (1992);
- [16] Markey, M.L., Bowman, M.L., Bergamine, M.V.W. *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, p.713 (1989);
- [17] Prabakaran, M., Mano, J.F. Chitosan-based Particles as Controlled Drug Delivery Systems, *Drug deliv.*, **12**, p.41-57 (2005);

- [18] Zhang, R.Y., Ma, P.X. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering, *Macromol. Biosci*, **4**, p.100-111 (2004);
- [19] Rodríguez, M.S., Albertengo, L.E. Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **69**, p.2057-2062 (2005);
- [20] Benesch, J., Tengvall, P. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*, **23**, p.2561-2568 (2002);
- [21] Vieira, R.S., Beppu, M.M. Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres. *Water Res.*, **40**, p.1726-1734 (2006);
- [22] Vieira, R.S., Beppu, M.M. Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions. *Colloid. Surface. A*, **279**, p.196-207 (2006);
- [23] Williams, D.F. The science and applications of biomaterials. *Int. J. Mater. Prod. Tec.*, **10**, p.360-377 (1995);
- [24] Williams, D.F., *Definitions in biomaterial. Proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials*, Elsevier, Chester (1987);
- [25] Vogler, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid interface*. **74**, p.69-117 (1998);
- [26] Codaro, E.N., Guastaldi, A.C. *Uma introdução aos biomateriais*. Informativo CFO, p.5 (1998);
- [27] Vesely, I. The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability, *Cardiovasc. Pathol.*, **12**, p.277-286 (2003);

- [28] Silver, F., Doillon, C. *Biocompatibility: interactions and implantable materials*. VCH, New York (1989);
- [29] Scifinder Scholar 2004.2 Edition. Pesquisa realizada em 30/08/2006;
- [30] Reis, R.L., Weiner, S. *Learning from nature how to design new implantable biomaterials: from biomineralization fundamentals to biomimetic materials and processing routes.*, Kluwer Academic Publishers, New York (2004);
- [31] Song, J., Saiz, E., Bertozzi, C.R. A New Approach to Mineralization of Biocompatible Hydrogel Scaffolds: An Efficient Process toward 3-Dimensional Bonelike Composites. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, p.1236-1243 (2003);
- [32] Song, J., Malathong, V., Bertozzi, C.R. Mineralization of synthetic polymer scaffolds: A bottom-up approach for the development of artificial bone. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, p.3366-3372 (2005);
- [33] Sanchez, C., Arribart, H., Guille M.M.G. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat. Mater.*, **4**, p.277-288 (2005);
- [34] Black, J., Hastings, G. *Handbook of biomaterials properties*. Chapman & Hall, London (1998);
- [35] Gao, H. Application of fracture mechanics concepts to hierarchical biomechanics of bone and bone-like materials. *Int. J. Fract.*, **138**, p.101-137 (2006);
- [36] Nudelman, F., Gotliv, B.A., Addadi, L., Weiner, S. Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.*, **153**, p.176-187 (2006);

- [37] Chen, H., Clarkson, B.H., Sun, K., Mansfield, J.F. Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel. *J. Colloid Interf. Sci.*, **288**, p.97-103 (2005);
- [38] Lian, B., Stein, G.S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **3**, p.269-305 (1992);
- [39] Meyer, U., Kruse-Losler, B., Wiesmann H.P., Principles of bone formation driven by biophysical forces in craniofacial surgery. *Brit. J. Oral Max. Surg.*, **44**, p.289-295 (2006);
- [40] Kannan, S., Lemos, A.F., Ferreira, J.M.F., Synthesis and mechanical performance of biological-like hydroxyapatites. *Chem. Mater.*, **18**, p.2181-2186 (2006);
- [41] Wei, J., Liu, C.S., Hong, H., Yuan, Y., Chen, F.P. Study on biodegradable scaffold of self-hardening bone-like apatite. *Chin. J. Inorg. Chem.*, **22**, p.765-770 (2006);
- [42] Green, D., Walsh, D., Mann, S., Oreffo, R.O.C., The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone*, **30**, p.810-815 (2002);
- [43] Krings, M., Kanellopoulou, D., Mavrilas, D., Glasmacher, B. In vitro pH-controlled calcification of biological heart valve prostheses. *Materialwiss. werkst.*, **37**, p.432-435 (2006);
- [44] Kopolos, J., Mavrilas, D., Missirlis, Y., Koutsoukos, P.G. Model experimental system for investigation of heart valve calcification in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, **38**, p.183-190 (1997);

- [45] Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, **12**, p.155–63 (1991);
- [46] Lowenstam, H. A., Weiner, S. *On Biomineralization*, Oxford University Press, Oxford (1989);
- [47] Fleisch, H. in: Nancollas, G. H., *Biological Mineralization and Demineralization*; Springer-Verlag: Berlin, p.233 (1982);
- [48] Bianco, P. in: Bonucci, E., *Calcification in Biological Systems*, CRC Press, Boca Raton (1992);
- [49] Fritz, M., Belcher, A.M., Radmacher, M., Walters, D.A., Hansma, P.K., Stucky, G.D., Morse, D.E., Mann, S. Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates. *Nature*, **371**, p.49-51 (1994);
- [50] Jackson, A.P., Vincent, J.F.V., Turner, R.M.J. Comparison of nacre with other ceramic composites. *Mater. Sci.*, **25**, p.3173-3178 (1990);
- [51] Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tratado de fisiologia médica*, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro (2002);
- [52] Eishi, K., Ishibashi-Ueda, H., Nakano, K., Kosakai, Y., Sasako, Y., Kobayashi, J., Yutani, C. Calcific degeneration of bioprosthetic aortic valves in patients receiving steroid therapy. *J. Heart Valve Dis.*, **5**, p.668-672 (1996);
- [53] Grabenwöger, M., Sider, J., Fitzal, F., Zelenka, C., Windberger, U., Grimm, M., Moritz, A., Böck, P., Wolner, E. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann. Thorac. Surg.*, **62**, p.772-777 (1996);

- [54] Schoen, F.J., Harasaki, H., Kim, K.M., Anderson, C., Levy, R.J. Biomaterial associated calcification: pathology, mechanism and strategies for prevention. *Biomed. Mater. Res.*, **22**, p.11-36 (1988);
- [55] Jorge-Herrero, E., Gutierrez, M.P., Castillo-Olivares, J.L., Calcification of soft tissue employed in the construction of heart valve prostheses: study of different chemical treatments. *Biomaterials*, **12**, p.249-252 (1991);
- [56] Pathak, Y., Schoen, F.J., Levy, R.J. in: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, California, p.272 (1996);
- [57] Chen, K.H., Cheng, W.T., Li, M.-J., Lin, S.-Y. Corneal calcification: chemical composition of calcified deposit. *Graef. Arch. Clin. Exp.*, **244**, p.407-410 (2006);
- [58] Gilinskaya, L.G., Grigorieva, T.N., Okuneva, G.N., Vlasov, Y.A. Investigation of pathogenic mineralization on human heart valves. *J. Struct. Chem.*, **44**, p.622-631 (2003);
- [59] Zhai, Y., Cui, F.Z., Recombinant human-like collagen directed growth of hydroxyapatite nanocrystals. *J. Cryst. Growth*, **291**, p.202-206 (2006);
- [60] Deiwick, M., Glasmacher, B., Baba, H.A., Roeder, N., Reul, H., von Bally, G., Scheld, H.H. In vitro testing of bioprostheses: Influence of mechanical stresses and lipids on calcification. *Ann. Thorac. Surg.*, **66**, p.206-211 (1998);
- [61] Schoen, F.J. Cardiac valve prostheses: review of clinical status and contemporary biomaterials issues. *J Biomed Mater Res*, **21**, p. 91-117 (1987);

- [62] Dabagh, M., Abdekhodaie, M.J., Khorasani, M.T. Effects of polydimethylsiloxane grafting on the calcification, physical properties, and biocompatibility of polyurethane in a heart valve. *J. Appl. Polym. Sci.*, **98**, p.758-766 (2005);
- [63] Bernacca, G.M., Mackay, T.G., Wilkinson, R., Wheatley, D.J. Calcification and fatigue failure in a polyurethane heart valve. *Biomaterials*, **16**, p.279-285 (1995);
- [64] Freemont, A.J. *The histology of mineralised tissues*. In: Huskins DWL, *Calcified tissue*. Macmillan Press, Londres, p.21-40 (1989);
- [65] Lou, X., Munro, S., Wang, S. Release characteristics of porous pHEMA hydrogels. *Biomaterials*, **25**, p.5071-81 (2004);
- [66] Lou, X., van Coppenhagen, C. Mechanical characteristics of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels cross-linked with various difunctional compounds. *Polym. Intern.*, **50**, p.319-25 (2001);
- [67] Patai, K., Berényi, M., Sipos, M., Noszál, B. Characterization of calcified deposits on contraceptive intrauterine devices. *Contraception*, **58**, p.305-308 (1998);
- [68] Mattová, J., Boháčová, E., Murgasová, Z., Kadlec, R., Forgác, F., Klobusická, E., Durcanský, D. Opacification of hydrophilic MemoryLens U940A intraocular lenses: Analysis of 2 explanted lenses. *J. Cataract Refr. Surg.*, **30**, p.1934-1939 (2004);
- [69] Vyavahare, N.R., Chen, W., Joshi, R.R., Lee, C., Hirsch, D., Levy, J., Schoen, F.J., Levy, R.J. Current Progress in Anticalcification for Bioprosthetic and Polymeric Heart Valves. *Cardiovasc. Pathol.*, **6**, p.219-229 (1997);

- [70] Mann, S., Heywood, B.R. Crystal engineering at interfaces. *Chem. Brit.*, **7**, p.698-712 (1989);
- [71] Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L., Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusc shell macromolecules. *Science*, **271**, p.67-69 (1996);
- [72] Ochiai, E.-J. Principles in bioinorganic chemistry, *J. Chem. Educ.*, **55**, p.631-633 (1978);
- [73] Giles, R., Manne, S., Mann, S., Morse, D.E., Stucky G.D., Hansma, P.K., Inorganic overgrowth of aragonite on molluscan nacre examined by atomic force microscopy. *Biol. Bull.*, **188**, p.8-15 (1995);
- [74] Weiner, S., Addadi, L. Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.*, **7**, p.689-702 (1997);
- [75] Jamieson, J.C. Phase equilibrium in the system calcite-aragonite. *J. Chem. Phys.*, **21**, p.1385-1390 (1953);
- [76] Kitano, Y., The behaviour of various inorganic ions in the separation of calcium carbonate from a bicarbonate solution. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **35**, p.1973-1980 (1962);
- [77] Titiloye, J.O., Parker, C.S., Mann, S. Atomistic simulation of calcite surfaces and the influence of growth additives on their morphology. *J. Cryst. Growth*, **131**, p.533-545 (1993);
- [78] Kitano, Y., Kanamori, N., Tokuyama, A. Effects of organic matter on solubilities and cristal formo f carbonates. *The Zoologist*, **9**, p.681-688 (1969);
- [79] Ando, J., Tricalcium phosphate and its variation. *Buul. Chem. Soc. Japan*, **31**, p.196-201 (1958);

- [80] Regí, M.V., -Calbet, J.M.G. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Ch.*, **32**, p.1-31 (2004);
- [81] van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Kuypers, W., Blok-van Hoek, C.J., Daems, W.T. Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biomaterials*, **6**, p.246-251 (1985);
- [82] Ripamonti, U., Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animals models. *Biomaterials*, **17**, p.31-35 (1996);
- [83] de Groot, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*, **47**, p.47-50 (1980);
- [84] Nordstrom, E.G., Karlsson, K.H. Carbonate-doped hydroxyapatite. *J. Mater. Sci-Mater. M.*, **1**, p.182-184 (1990);
- [85] Hench, L.L., Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, **74**, p.1487-1510 (1991);
- [86] Le Geros, R.Z., *Calcium phosphates in oral biology and medicine*. São Francisco, Meyers (1991);
- [87] Kunta, P.N., Sfeir, C., Lee, D., Olton, D., Choi, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomat.*, **1**, p.65-83 (2005);
- [88] Dutton, G.G.S. in: Mark, H.F., Bikales, N.M., Overbeger, C.G., Menges, G., Kroschwitz, J.I. *Encyclopedie of polymer science and engineering*. Wiley, New York (1986);
- [89] Rudall, K.M., Kenchington, W. The chitin system. *Biol. Rev.*, **40**, p.597-636 (1973);

- [90] Blackwell, J. In: Walton, A.G., Blackwell, J. *Biopolymers*. Academic Press, New York (1973);
- [91] Rudall, K.M. Chitin and its association with other molecules. *J. Polym. Sci. Pol. Lett.* **28**, p.83–102 (1969);
- [92] Atkins, E.D.T. Conformation in polysaccharides and complex carbohydrates. *J. Biosci.*, **8**, p.375–87 (1985);
- [93] Rudall, K.M. In: Hepburn, H.R. *The insect integument*. Elsevier Scientific, Amsterdam (1976);
- [94] Persson JE, Domard A, Chanzy H. Single crystals of α -chitin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**, p.221–4 (1991);
- [95] Helbert, W., Sugiyama, J. High-resolution electron microscopy on cellulose II and α -chitin single crystals. *Cellulose*, **5**, p.113–22 (1998);
- [96] Ruiz-Herrera, J., Sing, V.O., Van der Woude, W.J., Bartnicki-Garcia, S. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, p.2706–10 (1975);
- [97] Bartnicki-Garcia, S., Persson, J., Chanzy, H. An electron microscope and electron diffraction study of the effect of calcofluor and congo red on the biosynthesis of chitin in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, p.6–15 (1994);
- [98] Sakamoto, J., Sugiyama, J., Kimura, S., Imai, T., Itoh, T., Watanabe, T., Kobayashi, S. Artificial chitin spherulites composed of single crystalline ribbons of α -chitin via enzymatic polymerization. *Macromolecules*, **33**, p.4155–60 (2000);

- [99] Gaill, F., Persson, J., Sugiyama, P., Vuong, R., Chanzy, H. The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms. *J. Struct. Biol.*, **109**, p.116–28 (1992);
- [100] Dweltz, N.E., Colvin, J.R., McInnes, A.G. Studies on chitin (b-(1-4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers from the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitin from X-ray diffraction and electron microscope observations. *Can. J. Chem.* **46**, p.1513–21 (1968);
- [101] Datta, P.K., Basu, P.S., Datta, T.K. Isolation and characterization of *Vicia faba* lectin affinity purified on chitin column. *Prep. Biochem.* **14**, p.373–87 (1984);
- [102] Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **35**, p.126–39 (2004);
- [103] Songkroah, C., Nakbanpote, W., Thiravetyan, P. Recovery of silver–thiosulfate complexes with chitin. *Process Biochem.* **39**, p.1553–9 (2004);
- [104] VandeVord, P.J., Matthew, H.W., DeSilva, S.P., Mayton, L., Wu, B., Wooley, P.H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, p.58 (2002);
- [105] Athanasiou, K.A., Shah, A.R., Hernandez, R.J., LeBaron, R.G.. Basic science of articular cartilage repair. *Clin. Sports Méd.*, **20**, p.223 (2001);
- [106] Madhally, S.V., Matthew, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **20**, p.1133 (1999);
- [107] Muzzarelli, R.A.A. in: Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., Kroschwitz, J.I. *Encyclopedia of polymer science and engineering*. Wiley, New York (1986);

- [108] Madhavan, P., Nair, K.G.R. Utilization of prawn waste. Isolation of chitin and its conversion to chitosan, *Fishery Tech.*, **11**, p.50 (1974);
- [109] Kumar, M.N. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, p. 1 (2000);
- [110] Hirano, S., Ohe, Y., Ono, H. Seletive N-acylation of chitosan. *Carbohydr. Res.*, **47**, p.315-320 (1976);
- [111] Hirano, S., Noishiki, Y., The blood compatibility of chitosan and *N*-acylchitosan. *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, p.413-417 (1985);
- [112] Chandy, T., Sharma, C.P. Effects of lipoproteins on protein/platelet interaction on polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, p.1085 (1991);
- [113] Zhu, A.P., Ming, Z., Jian, S. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft. *Appl. Surf. Sci.*, 241, p.485 (2005);
- [114] Gamzazade, A.I., Nashibov, S.M., Rogozhin, S.V. Study of lipoprotein sorption by some sulfoderivatives of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, **34**, p.381 (1997);
- [115] Lee, K.Y., Ga, W.S., Park, W.H., Blood compatibility and biodegradability of partially *N*-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials*, **16**, p.1211-1216 (1995);
- [116] Solomons, T. W. G. *Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York (1996);
- [117] Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., Davis S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **51**, p.81-96 (2001);

- [118] Lima, A.M.F. *Matrizes porosas de quitosana*. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos (2002);
- [119] Nauss, J.L., Thompson, J.L., Nagyvary, J.J. The binding of micellar lipids to chitosan. *Lipids*, **18**, p.246-7 (1983);
- [120] Amiji, M.M. Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialysis, *Biomaterials*, **16**, p.593-599 (1995);
- [121] Liu, H., Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. *Acta Biomat.*, **2**, p.557-565 (2006);
- [122] Dang, J.M., Leong, K.W., Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **58**, p.487-499 (2006);
- [123] Aimin, C., Chunlin, H., Juliang, B., Tinyin, Z., Zhichao, D. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin. Orthop.*, **47**, p.366-239 (1999);
- [124] Hu, S.G., Jou, C.H., Yang, M.C. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. *Biomaterials*, **24**, p.2685-93 (2003);
- [125] Buranapanitkit, B., Srinilta, V., Ingvinga, N., Oungbho, K., Geater, A., Ovatlarnporn, C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin Orthop.*, **52**, p.424-244 (2004);

- [126] Hu, Q., Li, B., Wang, M., Shen, J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, **25**, p.779-85 (2004);
- [127] Xia, W., Liu, W., Cui, L., Liu, Y., Zhong, W., Liu, D., Wu, J., Chua, K., Cao, Y. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan–gelatin complex scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, **71B**, p.373-80 (2004);
- [128] Beppu, M.M. *Estudo da calcificação in vitro de quitosana*. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas – Brasil (1991);
- [129] Raymond, L., Morin, F.G., Marchessault, R.H., Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state. *Carbohydr. Res.*, **246**, p.331-336 (1993);
- [130] Billmeyer, F.W. *Textbook of Polymer Science*, John Wiley & Sons, Cingapura (1984);
- [131] Freeman, W.J. in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Kroschwitz, J.I., John Wiley & Sons, New York (1985);
- [132] Koenig, J.L., Kormos, D. Quantitative infrared spectroscopy measurements of mixtures without external calibration. *Appl. Spectrosc*, **33**, p.349-350 (1979);
- [133] Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, p.721-734 (1990);
- [134] Zhang, S., Gonsalves, K.E. Synthesis of calcium carbonate-chitosan composites via biomimetic processing. *J. Appl. Polym. Sci*, **56**, p.687-695 (1995);

- [135] Sanchez, H.J., Perez, C.A., Grenon, M. SRXRF analysis with spatial resolution of dental calculus, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **19**, p.211-218 (2000);
- [136] He, F., van Espen, P.J. General approach for quantitative energy dispersive X-ray fluorescence analysis based on fundamental parameters. *Anal. Chem.*, **63**, p.2237-2244 (1991);
- [137] Perez, C.A., Radtke, M., Sanchez, H.S., Tolentino, H., Neuenschwander, R. T., Barg, W., Rubio, M., Bueno, M.I.S., Raimundo, I.M., Rohwedder, J.J.R. Synchrotron radiation X-ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiment, *X-Ray Spectrom.*, **28**, p.320-326 (1999);
- [138] Benasconi, G., Tajani, A. Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2, International Atomic Energy Agency, Vienna (1996);
- [138] Pereira, E.R., Perez, C.A., Poppi, R.J., Arruda, M.A.Z. Metals distribution and investigation of L'vov platform surface using principal component analysis, multi-way principal component analysis, micro synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy after the determination of Al in a milk slurry sample. *Spectrochim Acta B*, **57**, p.1259-1276 (2002);
- [139] Kestenbch, H.J., Filho, W.J.B. *Microscopia Eletrônica: transmissão e varredura*. A.B.M., São Paulo (1994);
- [140] Bockris, J.O.M., Khan, S.U.M. *Surface Electrochemistry*, Plenum Press, Nova York (1993);
- [141] Feigin, L. A., Svergun, D. I. *Structure Analysis by Small Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum Press, New York (1987);

- [142] Svergun, D. I., Koch, M. H. J. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr. Opin Struc Biol.*, **12**, p.654-660 (2002);
- [143] Linder, P., Zemb, T. *X-Ray and Light Scattering: Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems*. Elsevier Science Publisser, New York (1991);
- [144] Glatter, O., Kratky, O. *Small Angle X-Ray Scattering*. Academic Press, Londres, (1982);
- [145] Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, **42**, p.3569-3580 (2001);
- [146] Utracki, L.A., *Polymer Alloys and Blends – Thermodynamics and Rheology*, Hanser Publishers, Munich, p.29-52 (1989);
- [147] Calvert, P., Rieke, P. Biomimetic mineralization in and on polymers. *Chem Mater*, **8**, p.1715–1727 (1996);
- [148] Saito, H., Ogawa, K. High-resolution solid state ^{13}C NMR study of chitosan and its salts with acids. *Macromolecules*, **20**, p.2424-30 (1987);
- [149] Keller, A., Hikosaka, M., Rastogi, S., Toda, A., Barham, P.J., Goldbeck-Wood, G. An approach to the formation and growth of new phases with application to polymer crystallization: effect of finite size, metastability and ostwald's rule of stages., *J. Mater. Sci.*, **29**, p.2579-2604 (1994);
- [150] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley, New York (1978);

- [151] Nyquist, R.A., Kagel, R.O. *Infrared Spectra of Inorganic Compounds*, Academic Press, New York (1971);
- [152] Elliott, J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier Science, Netherlands (1994);
- [153] JCPDS File No.9-432. Powder Diffraction File (inorganic phases), International Centre for Diffraction Data, Newton Square, PA, USA (2006);
- [154] Cullity, B.D. *Elements of X-ray Diffraction*, Addison-Wesley, Reading (1956);
- [155] Nancollas, G.H. The growth of crystals in solution. *Adv. Col. Interface Sci*, **10** p. 215-252 (1979);
- [156] S. Weiner, W. Traub, Bone structure – from angstroms to microns, *FASEB J.* **6**, p. 879-885 (1992);
- [157] Mann, S. Molecular Recognition in Biomineralization., *Nature*, **332**, p.119-124 (1988);
- [158] Nielsen, A.E. Electrolyte crystal growth mechanisms., *J. Cryst. Growth*, **67**, p. 289-310 (1984);
- [159] Nielsen, A.E., Toft, J.M. Electrolyte crystal growth kinetics. *J. Cryst. Growth*, **67**, p.278-288 (1984);
- [160] Lide, D.R. *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, New York (2004).

1. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- Artigos completos publicados em periódicos

1. Aimoli, C. G.; Nogueira, G. M.; Nascimento, L. S.; Baceti, A.; Leirner, A. A.; Maizato, M. J. S.; Higa, O. Z.; Polakiewicz, B.; Pitombo, R. N. M.; Beppu, M. M., Lyophilized Bovine Pericardium Treated With a Phenethylamine-Diepoxide as an Alternative to Preventing Calcification of Cardiovascular Bioprosthesis: Preliminary Calcification Results. *Artificial Organs*, 2007.
2. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M., Precipitation of calcium phosphate and calcium carbonate induced over chitosan membranes: a quick method to evaluate the influence of polymeric matrices in heterogeneous calcification. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2006.
3. Aimoli, C. G.; Torres, M. A.; Beppu, M. M. Investigations into the early stages of in vitro calcification on chitosan films. *Materials science & engineering. C, Biomimetic materials, sensors and systems*, 2005.
4. Beppu, M. M.; Torres, M. A.; Aimoli, C. G.; Goulart, G. A. S.; Santana, C. C. In vitro mineralization on chitosan using solutions with excess of calcium and phosphate ions. *Materials Research Society symposia proceedings*, 2005.
5. Torres, M. A.; Aimoli, C. G.; Beppu, M. M.; Frejlich, J. Chitosan membrane with patterned surface obtained through solution drying. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005.
6. Beppu, M. M.; Aimoli, C. G. Influence of Acetylation on In Vitro Chitosan Membrane Biomaterialization. *Key Engineering Materials*, 2004.

- Resumos publicados em anais de congressos

1. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M.; Rodas, A. C. D.; Higa, Z., Citotoxicidade in vitro de quitosana moldada na forma de membrana. In: IV Simpósio Ibero-Americano de Quitina, 2007, Natal - RN.
2. Lima, D. O.; Silva, M. P.; Silva, C. C.; Beppu, M. M.; Aimoli, C. G., Influence of Chitosan on Calcium Phosphates obtained by Co-precipitation. In: Word Polymer Congress - 41^o International Symposium on Macromolecules, 2006, Rio de Janeiro - RJ.
3. Aimoli, C. G.; Pacheco, R. B.; Beppu, M. M., Influência de soluções calcificantes em membranas de quitosana: uma investigação através da técnica SAXS. In: 15a RAU Reunião Anual de Usuários do LNLS, 2005, Campinas - SP.
4. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M., Investigação dos Mecanismos de Calcificação In Vitro de Membranas de Quitosana. In: XII Congresso Interno de Iniciação Científica, 2004, Campinas - SP.
5. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M.; Torres, M. A., Investigation on initial calcification process on chitosan membranes. In: 7th World Biomaterials Congress, 2004, Sydney - Austrália.
6. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M.; Torres, M. A., Elemental-composition studies of chitosan films by X-ray fluorescence. In: 14a RAU Reunião Anual de Usuários do LNLS, 2003, Campinas - SP.
7. Aimoli, C. G.; Beppu, M. M., Obtenção de Quitosana Alquilada e Caracterização de sua Capacidade de Calcificação In Vitro. In: XI Congresso Interno de Iniciação Científica, 2003, Campinas - SP.
8. Torres, M. A.; Aimoli, C. G.; Beppu, M. M.; Santana, C. C., Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme on Chitosan Membranes. In: 2 SBPMat, 2003, Rio de Janeiro - RJ.

- Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. Nogueira, G. M. ; Aimoli, C. G. ; Nascimento, L. S. ; Beppu, M. M. . In vitro calcification of silk fibroin gel. In: Word Polymer Congress - 41^o International Symposium on Macromolecules, 2006, Rio de Janeiro, 2006.
2. Beppu, M. M. ; Aimoli, C. G. . Self-organized chitosan membrane shaped through Marangoni effect. In: International Symposium on Metastable, Mechanically Alloyed and Nanocrystalline Materials, 2003, Foz do Iguaçu, 2003.

- Participação em eventos

- 2007 IV Simpósio Ibero-Americano de Quitina, Hotel Imirá, Natal.
- 2006 IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Hotel Glória, Caxambu.
- 2006 World Polymer Congress - 41^o International Symposium on Macromolecules, Hotel Windsor, Rio de Janeiro.
- 2004 III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Centro de Convenções da UNICAMP, Campinas.
- 2004 XII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, Ginásio Multidisciplinar da Unicamp, Campinas.
- 2004 14^a RAU - Reunião Anual de Usuários do LNLS, Campus do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas.
- 2004 Fórum DNA Brasil, Grande Hotel, Campos do Jordão.
- 2003 7^o Congresso Brasileiro de Polímeros, Hotel Mercury, Belo Horizonte.
- 2003 XI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, Ginásio Multidisciplinar da Unicamp, Campinas.

- Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. Aimoli, C. G. ; Nascimento, L. S. ; Nogueira, G. M. ; Beppu, M. M. . Teste de Calcificação in vitro de Pericárdio Bovino Modificado e Membranas de Fibroína de Seda. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006, Caxambú, 2006.
2. Aimoli, C. G. ; Beppu, M. M. . Deposição de Compostos de Cálcio sobre Membranas e Quitosana. In: Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2004, Campinas, 2004.
3. Aimoli, C. G. ; Beppu, M. M. . Obtenção de Pseudo-Quitina Moldada Através da Acetilação de Corpos de Quitosana. In: 7 Congresso Brasileiro de Polímeros, 2003, Belo Horizonte, 2003.

Lyophilized Bovine Pericardium Treated With a Phenethylamine-Diepoxy as an Alternative to Preventing Calcification of Cardiovascular Bioprosthesis: Preliminary Calcification Results

*Cassiano G. Aimoli, *Grínia M. Nogueira, †Leandro S. Nascimento, ‡André Baceti, §Adolfo A. Leirner, §Marina J.S. Maizato, ¶Olga Z. Higa, ‡Bronislaw Polakiewicz, ‡Ronaldo N.M. Pitombo, and *Marisa M. Beppu

**Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas; †Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas; ‡Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; §Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração (InCor) HC-FMUSP; and ¶Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN, São Paulo, Brazil*

Abstract: This study investigated the calcification process that occurred on chemically treated bovine pericardium substrata through tests with simulated body fluid solutions. The use of bovine pericardium bioprosthetic valves in heart valve surgery has a significant drawback due to the calcification processes. Thus, many routes such as chemical treatments in the substratum or the adoption of systemic therapies are considered in the literature with the intention to inhibit or to decelerate this process. The presented treatment using the two different phenethylamine-diepoxy solutions showed no effects on calcification experiments as

showed by the tests. However, the lyophilized bovine pericardium samples, treated with both solutions, did not show any detectable phosphate deposits. The lyophilization of bovine pericardium before chemical treatments with cross-link agents as epoxy compounds may be an alternative to the conventional calcification prevention methods, but further investigations are recommended to check if the same behavior is found in all lyophilized systems. **Key Words:** Calcification—Freeze-drying—Heart valves—Pericardium—Lyophilization—Simulated body fluid.

Tissue valves have been used since the early 1960s when aortic valves obtained from human cadavers were transplanted to other individuals (homograft). Today, glutaraldehyde-preserved bovine pericardial bioprosthetic valves are used widely (1).

Calcification plays a major role in the failure of bioprosthetic and other material heart valve substitutes. The aim of our research was to study the effect of lyophilization on biological tissues from a biomaterials developing perspective.

Calcification, defined as the formation of calcium phosphate or other calcium compounds, is an important subject for researchers. There is a need to understand better how mineralization occurs, as it may be desired in some uses, such as in osteogenic implants or, conversely, it may need to be avoided, for cardiac valves (1). Calcification is known as the primary cause of failure in both pericardial and porcine bioprostheses (2–4). The exact mechanism of calcium anchorage on bioprostheses is not known, but it has been shown to be related to the stress–strain pattern applied to the valve leaflets during flexion (5).

Various antimineralization methods have been investigated to overcome the high rate of clinical failure of glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. For most of those, stable binding to the fixed tissue is vital for long-term efficacy, because the treated valve will often be stored after treatment for

doi:10.1111/j.1525-1594.2007.00376.x

Received January 2007.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Marisa Masumi Beppu, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, CP6066 CEP13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: beppu@feq.unicamp.br

months, sometimes years (6). All known anticalcification treatments are empirical or based on chemical treatments related to phosphate contents or to calcium metabolism. Unfortunately, no treatment has proven to be successful in preventing calcification (7).

Some researchers (8–10), using *in vivo* models, observed that biomaterials cross-linked with epoxide compounds showed less calcification in comparison with those fixed with glutaraldehyde (11). Other potential properties of epoxy compound fixation, including preservation of natural mechanical properties, induction of nonthrombogenic surfaces, and reduction of antigenicity and immunogenicity, have also been reported (12–15).

In this study, the use of phenethylamine-diepoxide treatment was inspired by the idea of using a bifunctional epoxide that, besides cross-linking the tissue through their amino and sulfhydryl groups, also increases the quantity of apolar, noncharged groups of pericardium.

Lyophilization or freeze-drying is a multistage operation that stabilizes biomaterials through the four main operations: freezing, sublimation or primary drying, desorption stage or secondary drying, and finally storage.

The tissue structure, size, and shape are fixed after freezing, as are the sublimation and properties of the dried material. This immobilization caused by the freezing step prevents the migration of nonvolatile molecules on the drying boundary, resulting in retention of form, and large surface area of lyophilized tissue.

The *in situ* deposition is a synthetic process that can avoid the use of a large amount of surfactant, as employed by the alternative deposition process. Surfactants are necessary to keep particles, such as aggregates of salts, in suspension. The *in situ* deposition allows total control of a polymeric matrix on the inorganic deposits formation and this control extends to the size and orientation of the deposit (16).

In situ deposition is an alternative to avoid usual difficulty found in sol-gel processes such as particle aggregation. In these so-called biomimetic processes, the inorganic phase is obtained under an organic matrix control, which regulates the shape, size, and orientation of deposits and hence determines the structural and mechanical characteristics of the final material.

The use of *in vitro* calcification experiments presents some advantages, compared to the conventional *in vivo* experiments. Besides being a cheaper and faster method, the *in vitro* calcification results are more reproducible, being less influenced by variabil-

ity of experimental conditions observed in tests with living organisms. This type of experiment is widely used in tests of materials for the production of cardiac valves, where it is possible to carry through conjugated experiments of calcification process and fatigue of the material (17); furthermore, deposition kinetic data may also be obtained (18).

There are basically two theories about matrix influences in mineralization: (i) deposition depends on the matrix chemical nature (19); and (ii) *in vivo* calcification (as osteoconduction) is mainly dependent on the micromechanics of surface rather than the chemistry (20).

This laboratory has been studying the calcification processes over biomaterials since 1997. One of our targets has been to explore the use of simulated body fluid (SBF) and other calcium solutions aiming to understand the calcification mechanisms (21,22).

MATERIALS AND METHODS

The bovine pericardium tissue was placed in Petri dishes, frozen at -70°C for 4 h, and then lyophilized for 24 h at 140 mTorr pressure and condenser temperature at -90°C (TDS 00209-A model, FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA)

Pericardium samples were provided by the Heart Institute at the University of São Paulo and the chemical treatments were performed at Pharmaceutical Science School of the University of São Paulo. All reagents used were of analytical grade.

The analysis of the influence of different chemical treatments on bovine pericardium calcification was performed by soaking the samples in SBF and then characterizing by using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectrometry (EDS). This technique allows the qualitative and quantitative analysis of calcification deposits, at elementary level, by using X-ray emission from samples after electron beam excitation.

SEM/EDS analysis

To evaluate the characteristics of calcium phosphate after immersion in calcification solution, SEM/EDS analysis was conducted with secondary electron images of a scanning electron microscope (LEO 440i, Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK) at 10 kV of accelerating voltages and EDS at 600 kV of accelerating voltage with 20 pA of current density.

The chemically treated pericardium samples were lyophilized phenethylamine-diepoxide, nonlyophilized phenethylamine-diepoxide, nonlyophilized phenethylamine-diepoxide-acetone, and lyophilized phenethylamine-diepoxide-acetone. The phenethylamine-

diepoxide-acetone treatment is the same as that of phenethylamine-diepoxide, but diluted in acetone.

In both procedures, an epoxide was derived from the reaction between phenethylamine and epichlorohydrin. In the first case, the reagents were placed in Petri dishes during 24 h; the epoxide was mixed to a phosphate buffer (73%) and water (27%) solution and then spread over the pericardium. In the second procedure, the reagents were placed to react in a Petri dish for 24 h, which already contained the pericardium soaked in a phosphate buffer solution of 0.05 M (73%) and acetone (27%) solution.

Ion concentration of conventional 1× SBF was (in mM): 142.0 Na⁺, 5.0 K⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.5 Mg²⁺, 148.8 Cl⁻, 4.2 HCO₃⁻, 1.0 HPO₄²⁻, and 0.5 SO₄²⁻, using "Tris" buffer. Calcification solutions were prepared by adding 25 mL of each of the following solutions: 2.74 M NaCl, 0.06 M KCl, 0.03 M MgCl₂, 0.0895 M NaHCO₃, 0.02 M K₂HPO₄, 0.01 M Na₂SO₄, 0.05 M CaCl₂, and 62.5 mL of 0.4 M "Tris" [(CH₂OH)₃CNH₂] solution to a 500 mL volumetric flask, which was then filled with Milli-Q water (Milli-Q filter system, Millipore, Molsheim, France). The pH was adjusted to 7.4 by adding 0.36 M HCl solution.

Experiments were performed as follows: the substrates (2 × 1 cm² bovine pericardium membrane pieces) were soaked in the 1× SBF solution for 7 days, changing the solutions for fresh ones in intervals of 2 days. Similar procedure using an SBF solution with 50% higher salt concentration (1.5× SBF) was used to accelerate the calcification process. The experiments were carried out in polyethylene flasks at 36.5 ± 1°C (using a Shaking Water Bath-Line Orbit [Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, IL, USA] at 50 rpm agitation).

SEM was used to analyze the morphology of bovine pericardium samples. The samples were taken from the calcification solutions, gently washed with Milli-Q water and freeze-dried for observation. Then, they were cut into small pieces and coated with gold to improve the samples' electron conductivity.

RESULTS

The micrographs obtained by SEM technique were analyzed in order to investigate the anticalcification effect of chemical and physical treatments on bovine pericardium samples. None of these samples showed calcium phosphate deposits after carrying out calcification tests on SBF solution with 1× the concentration of ions found in human serum (1× SBF). The observed morphologies were similar before and after calcification tests. However, when submitted to calcification tests on SBF solution with higher ions con-

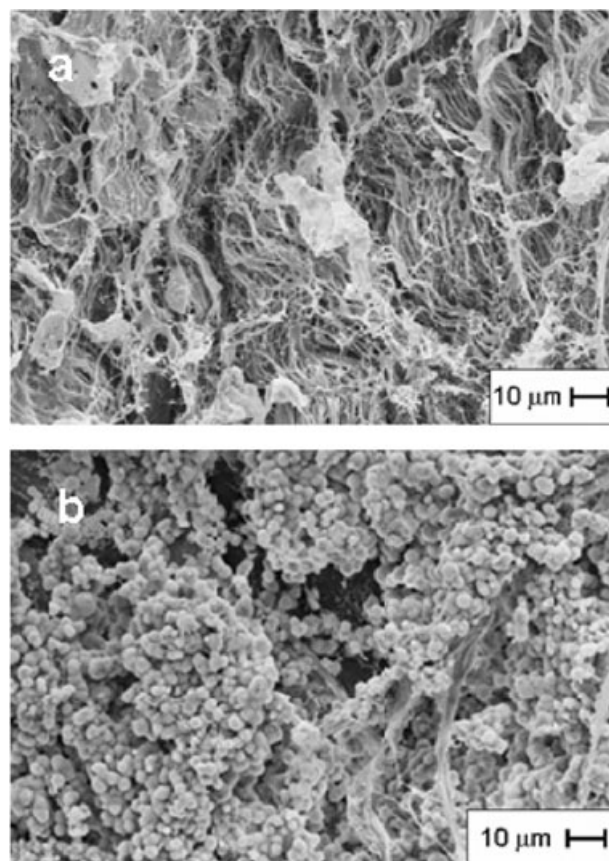


FIG. 1. SEM micrographs of nonlyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxide after calcification test in (a) 1× SBF and (b) 1.5× SBF.

centration (1.5× SBF), some of the analyzed samples presented with calcium phosphate deposits.

Figure 1 exhibits the micrographs of nonlyophilized bovine pericardium sample treated with phenethylamine-diepoxide after calcification tests in SBF solution with the different ions concentration. Spherical calcium phosphate deposits can be observed in Fig. 1b, which corresponds to the tests carried out in 1.5× SBF. The EDS profile, shown in Fig. 2a, confirmed the presence of calcium deposits on this sample. The typical EDS of noncalcified samples is shown in Fig. 2b, where the absence of calcium peaks can be noticed.

In contrast to nonlyophilized bovine pericardium samples, the lyophilized ones may present an anticalcification effect, because calcium deposits were not detected. Figure 3 depicts the micrographs for the lyophilized samples where no deposits are present.

The micrographs of nonlyophilized bovine pericardium samples treated with phenethylamine-diepoxide-acetone are presented in Fig. 4. Calcium phosphate deposits can be observed in Fig. 4b and

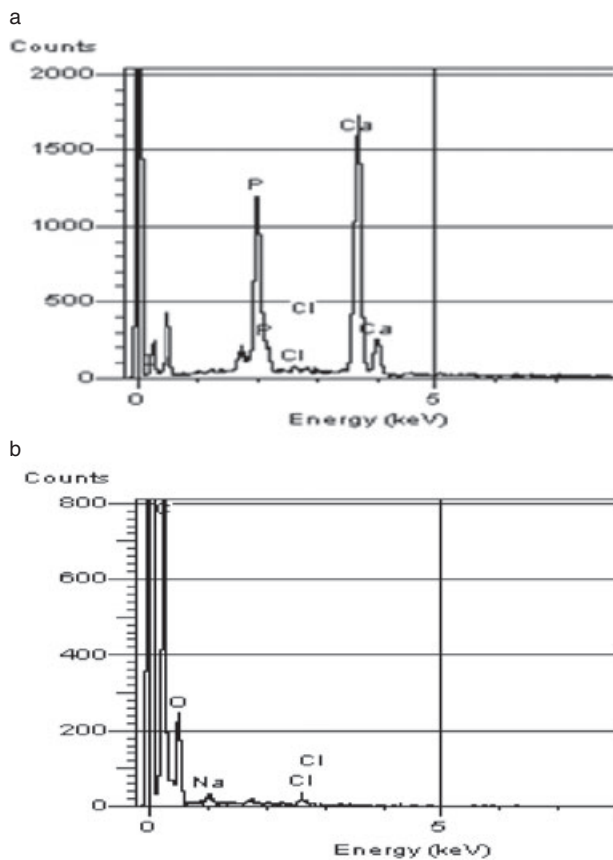


FIG. 2. (a) EDS spectrum for nonlyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxy after calcification test in $1.5\times$ SBF. (b) Typical EDS spectrum for noncalcified samples after contact with SBF.

the EDS profile confirming the deposited components is shown in Fig. 5. Apparently, the lower epoxide concentration used in this treatment did not change the calcification results, despite the micrographs of these samples showing fewer calcium deposits compared with those treated with concentrated epoxide solution (phenethylamine-diepoxy treatment). The micrographs of the lyophilized samples (Fig. 6) showed that no calcium deposits are present.

DISCUSSION

Calcification test in SBF is a well-known way to analyze the activity of a substrate to induce “in vitro” calcification. Although no calcification was seen in $1\times$ SBF, in our results, it is possible that the phenomenon would be observed with longer immersion time. However, accelerated calcification tests (using $1.5\times$ SBF) were used in our studies to avoid effects from microbiological contamination that can occur in

longer “in vitro” study that would be required to continue tests with $1\times$ SBF.

Despite its limitations, the immersion in SBF is a technique that is widely used to check the influence that some organic matrices can present on calcification, as it is better than using only physiological salt solutions. It is important to stress that these tests can be applied to disqualify some samples, however, it is not enough to assure that a material has really no tendency to calcify. In order to do that, more specific tests, including tests with simultaneous mechanical stress on samples, presence of proteins and other biological agents in solution, and exploration of sample microrugosity should be done, rather than applying saline solution tests.

In the present study, the cross-link of bovine pericardium with epoxide derivatives has been studied as an alternative to the conventional glutaraldehyde treatment because they can improve the anticalcification effect (11–15). From our results, it is possible to infer that the lyophilization associated with the epoxide treatment is a potential route of bovine peri-

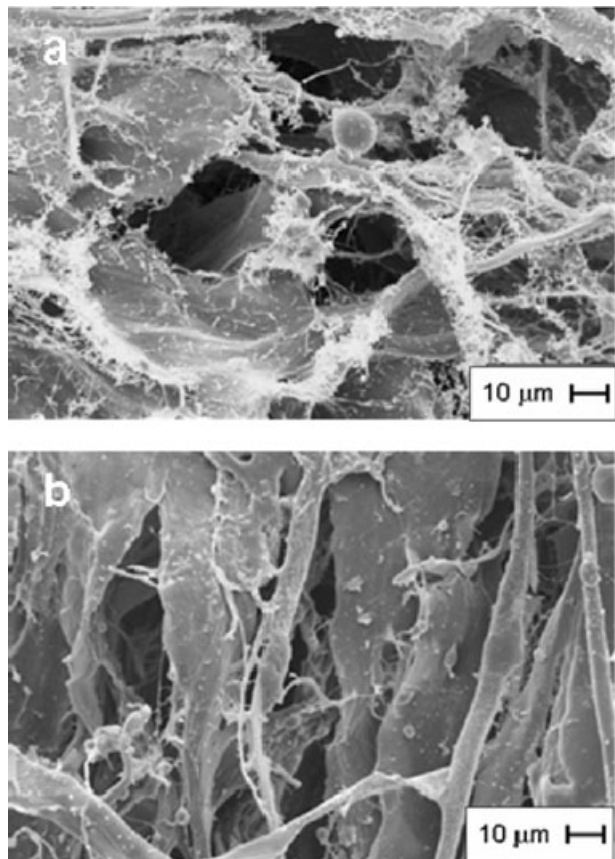


FIG. 3. SEM micrographs of lyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxy after calcification test in (a) $1\times$ SBF and (b) $1.5\times$ SBF.

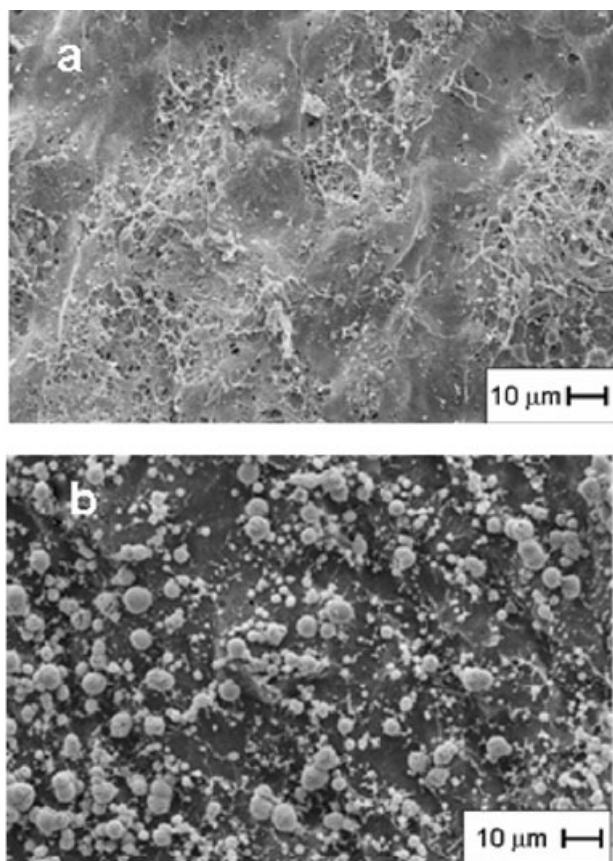


FIG. 4. SEM micrographs of nonlyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxy-acetone after calcification test in (a) 1× SBF and (b) 1.5× SBF.

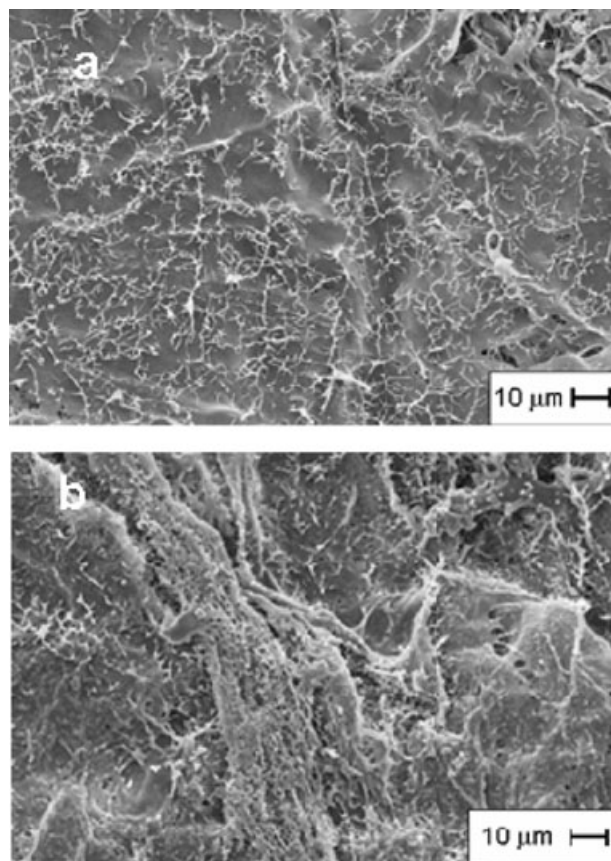


FIG. 6. SEM micrographs of lyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxy-acetone after calcification test in (a) 1× SBF and (b) 1.5× SBF.

cardium bioprosthetic heart valves preparation. This hypothesis is sustained by the fact that nonlyophilized samples showed calcium phosphate deposits, in contrast with the lyophilized ones. Besides the benefits related to calcification, the lyophilization can

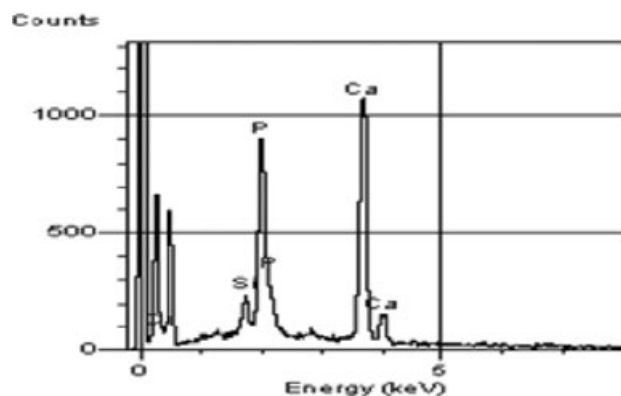


FIG. 5. EDS spectrum for nonlyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoxy-acetone after calcification test in 1.5× SBF.

potentially promote less cytotoxicity and residual aldehydes in glutaraldehyde-treated bovine pericardium (23). This is a field of study with many potential applications.

These results can be specific to this system and the chemical treatments that were used. Further studies applying larger number of replicates and chemical routes should be performed to check if the effect of lyophilization would be the same in all systems.

CONCLUSIONS

The presented treatment using the two different phenethylamine-diepoxy solutions showed no effects on calcification experiments as showed by the tests. However, the lyophilized bovine pericardium samples, treated with both solutions, did not show any detectable phosphate deposits. The lyophilization of bovine pericardium before chemical treatments with cross-link agents such as epoxy compounds may be an alternative to the conventional calcification pre-

vention methods, but further investigations are recommended to check if the same behavior is found in all lyophilized systems.

Acknowledgment: The authors are grateful to FAPESP—The State of São Paulo Research Foundation, for the financial support.

REFERENCES

1. Pathak Y, Shoen FJ, Levy RJ. Pathologic calcification of biomaterials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, eds. *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, CA: Academic Press, 1996;272–81.
2. Valente M, Minarini M, Ius P, et al. Durability of glutaraldehyde-fixed pericardial valve prostheses: clinical and animal experimental studies. *J Heart Valve Dis* 1992;1:216–24.
3. Schoen FJ, Collins JJ, Cohn LH. Long-term failure rate and morphologic correlations in porcine bioprosthetic heart valves. *Am J Cardiol* 1983;51:957–64.
4. Grabenwöger M, Grimm M, Eybl E, et al. New aspects of the degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:14–21.
5. Deiwick M, Glasmacher B, Baba HA, et al. In vitro testing of bioprostheses: influence of mechanical stresses and lipids on calcification. *Ann Thorac Surg* 1998;66:206–11.
6. Girardot M, Girardot J, Torriani, M. Alpha-aminooleic acid (AOA) anticalcification effect on glutaraldehyde-fixed heart valves: shelf-life studies. In: Gabbay S, Frater RWM, eds. *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprostheses*. Austin, TX: Silent Partners, 1994;41–52.
7. Gabbay S, Chuback J, Khavarian C, Donahoo J, Oyarzum R, Scoma R. In vitro and animal evaluation with the Biocor No-react anticalcification treatment for bioprostheses (new concept in calcification treatment). In: Gabbay S, Frater RWM, eds. *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprostheses*. Austin, TX: Silent Partners, 1994;73–91.
8. Okoshi T, Noishiki Y, Tomizawa Y, et al. A new bioprosthetic cardiac valve with reduced calcification. *ASAIO Trans* 1990; 36:M411–4.
9. Imamura E, Sawatani O, Koyanagi H, Noishiki Y, Miyata T. Epoxy compounds as a new crosslinking agent for porcine aortic leaflets: subcutaneous implant studies in rats. *J Cardiac Surg* 1989;4:50–7.
10. Xi T, Ma J, Tian W, Lei X, Long S, Xi B. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1241–51.
11. Noishiki Y, Sung H, Hata C, et al. Cross-linking characteristics of a porcine heart valve bioprosthesis fixed with epoxy compound. In: Gabbay S, Frater RWM, eds. *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprostheses*. Austin, TX: Silent Partners, 1994;13–24.
12. Lohre J, Baclig L, Sagartz J, Guida S, Thyagarajan K, Tu R. Evaluation of two epoxy ether compounds for biocompatible potential. *Artif Organs* 1992;16:630–3.
13. Alferiev IS, Connolly JM, Levy RJ. A novel mercapto-bisphosphonate as an efficient anticalcification agent for bioprosthetic tissues. *J Organomet Chem* 2005;690:2543–47.
14. Tomizawa Y, Noishiki Y, Okoshi T, Koyanagi H. Development of a small-caliber vascular graft with anti-thrombogenicity induced by extreme hydrophilicity. *ASAIO Trans* 1988;34:644–50.
15. Lohre JM, Baclig L, Wickham E, et al. Evaluation of epoxy ether treated arterial grafts for mutagenic potential. *ASAIO J* 1993;39:106–13.
16. Calvert P, Rieke P. Biomimetic mineralization in and on polymers. *Chem Mater* 1996;8:1715–27.
17. Bernacca GM, Mackay TG, Wheatley DJ. In vitro function and durability of a polyurethane heart valve: material considerations. *J Heart Valve Dis* 1996;5:538–42.
18. Mavrilas D, Apostolaki A, Kaposos J, et al. Development of bioprosthetic heart valve calcification in vitro and in animal models: morphology and composition. *J Crystal Growth* 1999; 205:554–62.
19. Kokubo T, Ito S, Huang ZT, et al. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res* 1990;24:331–43.
20. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:391–401.
21. Aimoli CG, Beppu MM. Precipitation of calcium phosphate and calcium carbonate induced over chitosan membranes: a quick method to evaluate the influence of polymeric matrices in heterogeneous calcification. *Col Surf B* 2006;53:15–22.
22. Aimoli CG, Torres MA, Beppu MM. Investigations into the early stages of “in vitro” calcification on chitosan films. *Mat Sci Eng C* 2006;26:78–86.
23. Maizato MJS, Higa OZ, Mathor MB, et al. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. *Artif Organs* 2003;27: 692–94.

Precipitation of calcium phosphate and calcium carbonate induced over chitosan membranes: A quick method to evaluate the influence of polymeric matrices in heterogeneous calcification

Cassiano Gomes Aimoli, Marisa Masumi Beppu*

Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, CP6066 CEP13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 31 March 2006; received in revised form 30 June 2006; accepted 20 July 2006

Available online 27 July 2006

Abstract

Precipitation of calcium compounds (phosphate and carbonate) was performed on chitosan porous and dense membranes. In order to observe the influence of acetyl groups on the nature of formed precipitates, some chitosan membranes were acetylated in methanol solution before undergoing calcification. Calcification experiments were performed more quickly than using SBF. In this method, a faster precipitation is induced by soaking the membranes in calcium chloride solutions and, in sequence, immersing the same membranes into sodium phosphate or carbonate solutions. This procedure induced the formation of calcium compound precipitates on membrane surfaces, which were analysed through optical microscopy, X-ray diffraction (XRD), Fourier-transformed infrared spectroscopy with attenuated total reflection apparatus (FTIR-ATR) and small angle X-ray scattering (SAXS). The results indicated the biomimetic influence of the organic matrix on morphology, organization and composition of precipitates. The acetyl group induced the formation of organized calcium carbonate better than phosphate, which may correlate with the fact that these two compounds are commonly found together in nature in structures like shells and nacre.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chitin/chitosan; Calcification; Biomimetic process

1. Introduction

Calcification, defined as the formation of calcium phosphate or other calcium compounds, is a phenomenon that has many reasons to be an important subject for researchers. From a biomaterial point-of-view, there is a need to better understand how to control mineralization as it may be desired in some uses, such as in osteogenic implants or, conversely, it may need to be avoided, as in the cases (as for cardiac valves) where it is the major reason for medical device failure [1].

For material scientists, *in situ* deposition is an alternative to avoid usual difficulty found in sol–gel processes such as particle aggregation. In these so-called biomimetic processes, the inorganic phase is obtained under an organic matrix control, which regulates the shape, size and orientation of deposits and hence determines the structural and mechanical characteristics of the final material.

Thus, the knowledge of the possible influence of the matrix in the deposition process of calcium compounds is required for screening new biomaterials, both for the development of osteogenic prostheses, or for the development of new cardiac valve materials.

The interest in chitosan may be measured by the exponential growth in the number of scientific articles related to its characterization and uses that has occurred over the last few years. Part of the attention that is being directed to chitosan is attributed to its renewable, biodegradable and biocompatible character. It also presents good versatility as it can be shaped in several forms, besides presenting amino and hydroxyl groups that can be easily reacted and functionalized [2].

This laboratory has been studying the potential of chitosan as a biomaterial and for bioseparation processes since 1997. One of our targets has been to explore chitosan as an organic matrix to produce composites through biomimetic processes.

In the present investigation our recently published results regarding the mechanisms of *in vitro* calcification of chitosan, extracted from crab shells [3], are expanded. Previously, porous chitosan membranes underwent an *in vitro* calcification process

* Corresponding author. Tel.: +55 19 37883893; fax: +55 19 3788 3922.
E-mail address: beppu@feq.unicamp.br (M.M. Beppu).

and it was seen that pH and composition of calcification solution influenced the composition and morphology of calcification deposits.

The use of *in vitro* calcification experiments presents some advantages, compared to the conventional *in vivo* experiments. Besides being a cheaper and faster method, the *in vitro* calcification results are more reproducible, being less influenced by variability of experimental conditions observed in tests with living organisms. This type of experiment is widely used in tests of matrices for the production of cardiac valves, where it is possible to carry through conjugated experiments of calcification process and fatigue of the material [4]; furthermore deposition kinetic data may also be obtained [5]. Osteogenic prostheses development also requires knowledge about the matrix behaviour, related to its trend of calcification. However, for the accomplishment of preliminary studies on the possible influence of the matrix in the calcification process, *in vitro* experiments may become too complex.

There are basically two theories about matrix influences in mineralization: (1) deposition depends on the matrix chemical nature [6] and (2) *in vivo* calcification (as osteo-conduction) is mainly dependent on the micro-mechanics of surface rather than the chemistry [7].

In our previous study, the substrates were the same; thus it was clear that the chemical interaction is a very important factor of *in vitro* deposition, since composition and pH of fluid used for calcification interfered in deposit characteristics.

In another investigation from our laboratory the acetylation of already-moulded chitosan membranes was proposed, producing a “pseudo-chitin”, to be used in calcification. It is believed that the deacetylation degree directly affects the mechanism of chitosan matrices calcification. In fact, this affirmation is one of the basis of this study, in which the chemical alteration of the matrix, achieved by the acetylation of exposed amino groups in the chitosan chain, is proposed. Such an alteration has the objective of reducing the degree of deacetylation of the matrix to values close to 0, resulting in a substratum with characteristics very similar to the chitin itself; that is the raw material for chitosan attainment. This inverse process appears as a viable route that allows the moulding of chitosan dissolved in weakly acid mediums before the acetylation reaction, since the direct use of chitin is impracticable due to its insolubility. The acetylation, thus, occurs with the intention of mimicking the natural calcification process observed in shells of crustaceans, in which the calcium composite deposition occurs under the direct influence of the chitin matrix.

The acetylated chitosan was submitted to mineralization by soaking the membranes in simulated body fluids (SBF) with $1\times$ and $1.5\times$ the concentration of ions found in human serum, for 7 days at 36.5°C . Morphological characterization and compositional analyses showed that acetyl groups induced calcification, forming deposits that present a Ca:P ratio that was different from those formed on pristine chitosan [8].

In the present study, a quicker way to evaluate the biomimetic influence of a polymeric matrix is proposed. Instead of using SBF's, the precipitation of calcium compounds is induced on membrane surfaces through soaking them in calcium chloride

solutions and, in sequence, transferring the membranes into sodium phosphate or sodium carbonate solutions. The proposed procedure takes less than 1 h and requires relatively simple characterization methods, while the conventional *in vitro* experiments in SBF take about 1 week to demonstrate reliable results and the observation of deposition in the early stages of calcification requires techniques with more analytical definition (such as X-ray fluorescence). The formed precipitates are compared to those that would be produced in the same concentration conditions and in the absence of polymeric matrices. Chitosan was chosen as the substrate for the accomplishment of the tests because this is a promising material for application as a biomaterial. Previous assays of *in vitro* calcification of this material indicate its significant influence on the process of calcium composite deposition.

2. Experimental

Chitosan extracted from crab shells (Sigma, St. Louis, MO—product number C 3646, minimum of 85% deacetylated chitin) was used. All other reagents were of analytical grade and Milli-Q ultrapure water was used in all solutions.

Porous and dense chitosan membranes were prepared by casting and coagulation, as described elsewhere [9].

Some membranes were chemically modified by immersion of their pieces (weighing *ca.* 0.2 g) into a solution containing 0.3 mL of acetic anhydride (Vetec, p.a.) and 49.7 mL of methanol (Ecibra, p.a., ACS). The membranes were kept under stirring for 24 h to reach a high degree of acetylation. The samples were then taken from the reactional solution and exhaustively washed and stored in Milli-Q water at 4°C .

After this process, the membranes presented a reduction in area and solubility in acidic solutions.

In vitro precipitation of calcium compounds was performed using the following procedure: membrane pieces of *ca.* 2 and 6 cm^2 of area were immersed in 2 M CaCl_2 solution during 15 min to saturate the membranes with calcium ions. The excess of solution that could be present within membrane pores was removed from membrane surfaces using a filter paper. Afterwards, the membranes were immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 and K_2HPO_4 solutions or NaHCO_3 suspension for 20 min, at a room temperature of approximately 20°C . The samples were then, carefully washed with Milli-Q water, placed on Petri dishes and kept for 24 h at 4°C . For infrared analyses, the membranes were placed between glass plates so that they did not wrinkle during the drying process and remained flat.

Wet dense membranes were supported on microscope slides and were observed using a Leica optical microscope (DMLM model) with polarising filter. The samples were observed during short time periods to prevent the samples from drying due to the lamp heat.

For crystallographic investigation, X-ray diffraction was performed using the X'Pert PW3050 Philips equipment; 40 KW, Cu $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406 \times 10^{-10}\text{ m}$), 2θ degrees. Software (PC-APD Version 4.0, Xpert HighScore Version 1.0 and MS Origin 5.0) were used to analyse the spectra. The samples were prepared by carefully washing the dense membranes to extract the

excess of ions from solution and allowing them to dry at room temperature, in a dessicator, using a mold that prevented it from any handling.

Infrared spectra of natural and acetylated films, before and after immersion in calcium solutions, were obtained using a Nicolet Protegé FTIR-ATR equipment. Germanium crystal was used as the attenuated reflection element.

Finally, small angle X-ray scattering (SAXS) was used to evaluate the changes that were caused in chitosan polymeric network when it came into contact with calcification solutions.

For this, the Guinier law was used; $I(q) = A \times e^{-\frac{q^2}{3} R_g^2}$, where I is the intensity of scattered X-ray, q the wavelength, A a constant and R_g is the radius of gyration.

The scattering event involves interference from waves emanating from two points in the particle separated by a distance $r = 1/q$. Thus, the probability of constructive interference involves the probability that given a point lying in an average particle, one finds a second point also in the average particle at a distance $r = 1/q$. For an isotropic system one consider first average any starting point in a particle and, secondly, average any direction for the vector r . This leads to a double summation that is identical to the determination of the moment of inertia for a particle. When the electron density is used as the weighing rather than the mass density, this moment of inertia is called the radius of gyration of the particle. For a system of dispersed shaped and sized particles, the radius of gyration reflects a second moment of the distribution of the shape and size about the mean.

In other words, the R_g can be found from the linear coefficient of $\ln I$ versus q^2 graph. In order to verify if the R_g value found is correct, the condition $R_g \times q_{\max} < 1$ must be fulfilled.

It is expected that the size of the entities that scatter X-ray (usually the atom nucleus) can become different if different chemical interactions are taking place.

SAXS measurements were performed at Sincrotron Light National Laboratory in Campinas, São Paulo, Brazil.

3. Results

Chitosan samples (initially immersed in 2 M CaCl_2 solution) could not be tested in 2 M NaHCO_3 suspension, as the membranes dissolved during the experiments. This fact can be explained since HCO_3^- ion in equilibrium with water releases H^+ that increases the acidity of solution, promoting chitosan amino group protonation and, therefore, its solubilization.

Figs. 1 and 2 present the micrographs obtained from optical microscopy under polarized light. The morphology of precipitates formed over chitosan membranes was very different from those observed on precipitates obtained without the presence of an organic matrix.

The presence of chitosan matrix clearly induced the formation of an inorganic phase which is different in size and orientation. The difference in the size of grains can be observed in both figures, however, phosphate grains (Fig. 1a) were bigger than carbonates (Fig. 2a), which shows the stronger biomimetic

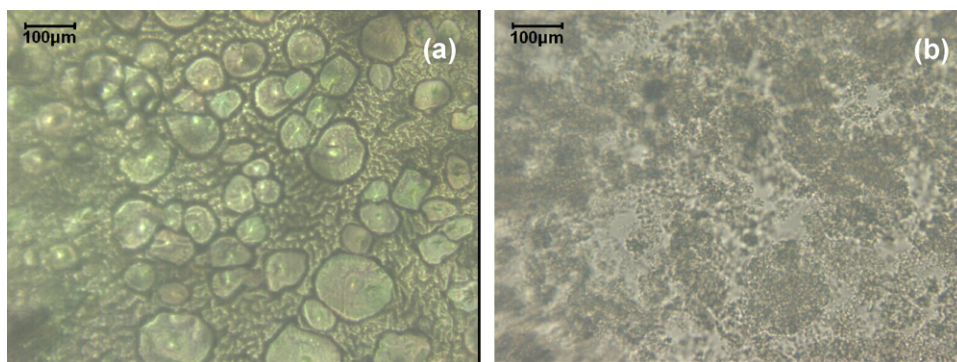


Fig. 1. Calcium phosphate deposits obtained through quick calcification experiments, magnified 20× (a) in the presence of pristine chitosan substract (b) without chitosan substract.

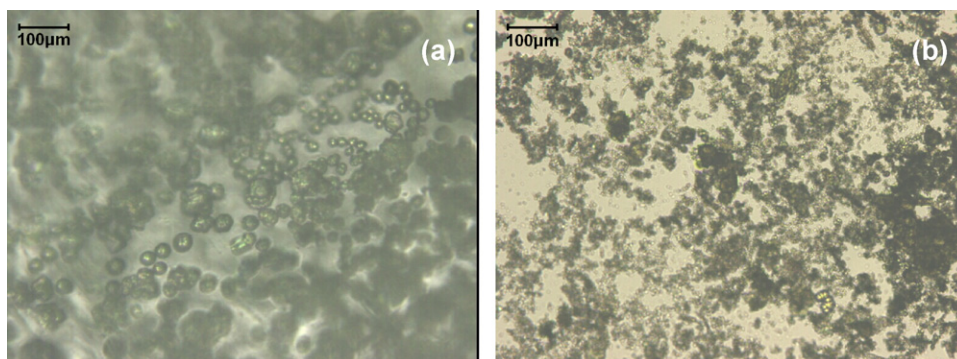


Fig. 2. Calcium carbonate deposits obtained through quick calcification experiments, magnified 20× (a) in presence of pristine chitosan substract (b) without chitosan substract.

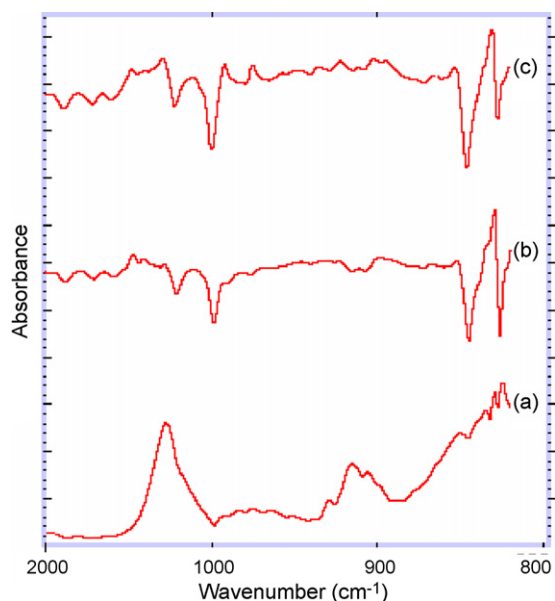


Fig. 3. FTIR spectra of: (a) pristine chitosan, (b) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution and (c) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution.

influence of chitosan upon phosphate formation. The birefringence observed in the grains formed over the membranes shows the orientation that precipitates exhibit. Following the same idea, Figs. 1b and 2b present less oriented and small grains. This fact stresses the existence of the influence of the matrix on the process of mineralization (Figs. 1 and 2).

The differences observed by comparing Figs. 3a and 4a are attributed to the chemical modifications due to chitosan acetylation reaction and have been reported previously [3].

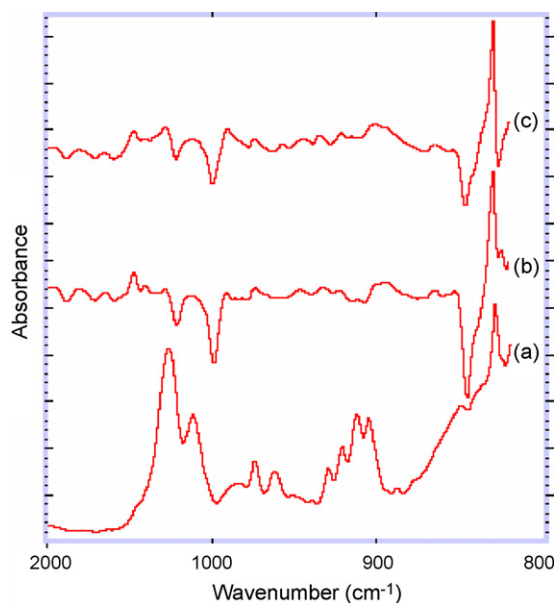


Fig. 4. FT-IR spectra of: (a) acetylated chitosan, (b) acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution and (c) acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution.

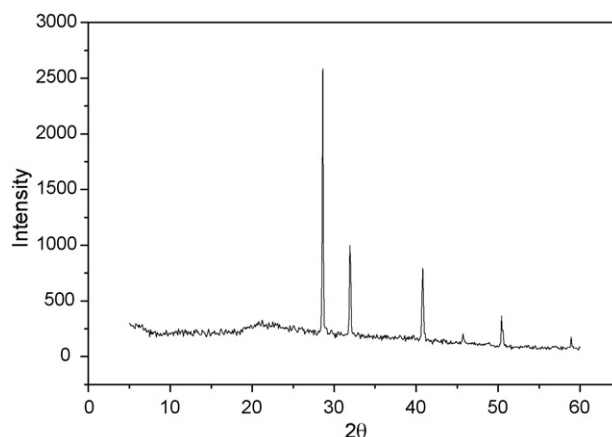


Fig. 5. X-ray diffractogram for pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution.

In general, calcification blocked some groups that were initially found on the membrane surface: absorption due to amino or carbonate groups, for example, are not evident anymore. Typical absorptions of phosphate can be found in Figs. 3c and 4c: large bands between 1200 and 1000 cm^{-1} due to anti-symmetrical deformation of PO_3 group and PO_4^{3-} stretch at (ν - PO) [10]. Peaks between 800 and 900 cm^{-1} where P-O-Ca stretch [11] and HPO_4^{2-} band (862 cm^{-1}) could be seen. Amorphous calcium phosphates (ACPs) present FTIR spectra with large and badly formed absorption bands [12], which can be observed in this study. Such a characteristic is expected for amorphous materials; therefore ions are not exposed to the regular distortions that they would suffer if they were in a crystalline reticulum. Figs. 3b and 4b establish the additional contribution due to the CO_3^{2-} asymmetric stretch, of around 1500, 1700 and 875 cm^{-1} , characterized for calcium carbonate composites.

X-ray diffractograms are depicted in Figs. 5–8, which confirm the crystallinity of the precipitates formed over chitosan membranes. This fact is different for deposits formed in SBF shown in the literature [13,14], where all deposits are poorly crystalline, as are the majority of biological apatite found in nature. However, the less crystalline sample with more noise

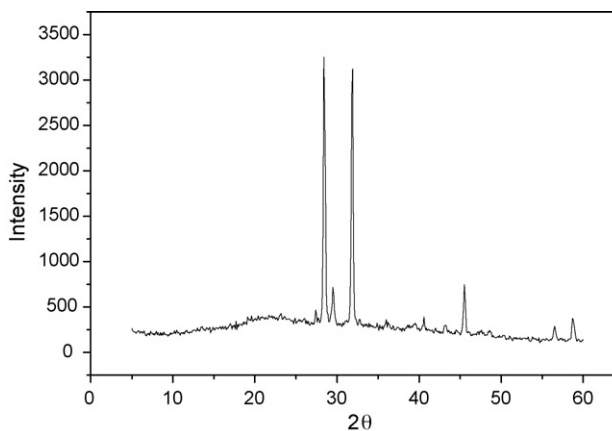


Fig. 6. X-ray diffractogram for pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution.

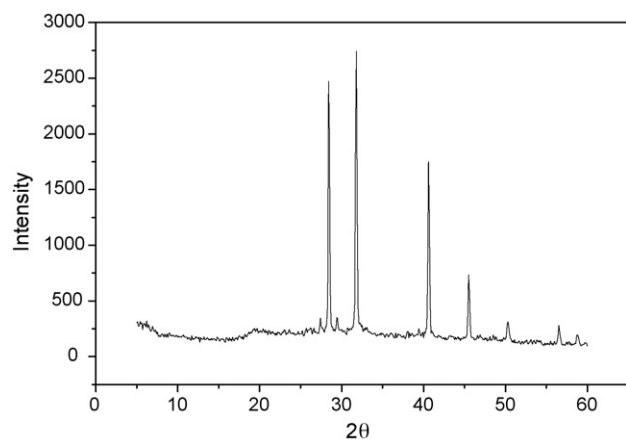


Fig. 7. X-ray diffractogram for acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution.

than normal, is the one regarding the formation of phosphate over acetylated chitosan.

Figs. 5 and 7 show the X-ray diffraction patterns of solids formed in pristine chitosan and chitosan treated with acetic anhydride, respectively. In both cases, the diffraction patterns of these solids were in accordance with those found in JCPDS card [15] (number 01-0628 and 01-0837 for pristine chitosan and 01-0628 and 01-1032 for acetylated chitosan). For acetylated chitosan, peak intensity is apparently higher in comparison to the peaks observed for pristine chitosan. This fact can be explained by the biomimetic effect of acetylated chitosan, which works as a “pseudo-chitin” and that is found associated with calcium carbonate in nature.

On the other hand, Figs. 6 and 8 illustrate the deposition of calcium phosphate on pristine and acetylated chitosan, which are in accordance with those present in JCPDS card (number 20-0024 for pristine chitosan and 03-0604 for acetylated chitosan).

Diffractograms can be better explored to provide information on crystal morphology: it is possible to correlate peaks width to the size of crystallographic perpendicular plans. This can be carried out using the Scherrer [16] equation; $X_s = \frac{0.9\lambda}{\text{FWHM} \times \cos(\theta)}$, where X_s corresponds to the crystal size [nm], λ the wavelength

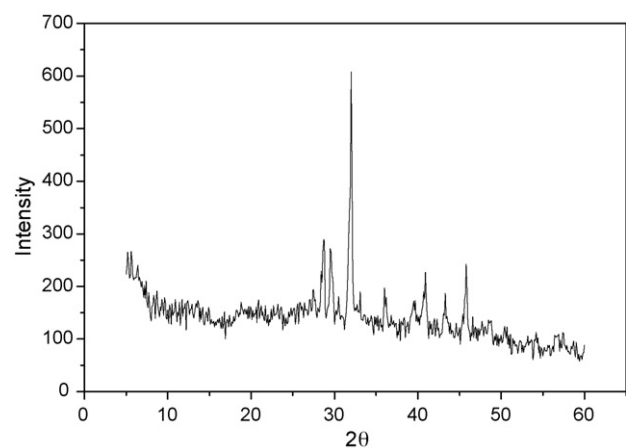


Fig. 8. X-ray diffractogram for acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution.

Table 1

Crystal size of precipitated calcium compounds in (a) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution, (b) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution, (c) acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution and (d) acetylated chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution

Pos. ($2\theta^\circ$)	FWHM ($2\theta^\circ$)	Cos (Pos.)	X_s (nm)
(a)			
28.573	0.0853	0.8782	106
28.6455	0.0853	0.8776	106
(b)			
28.4227	0.2099	0.8795	43
28.4948	0.2099	0.8789	43
(c)			
28.4207	0.1112	0.8795	81
28.4928	0.1112	0.8789	81
(d)			
28.6597	0.2979	0.8775	34
28.7324	0.2979	0.8769	34

of incident radiation [nm], FWHM [rad] (full width at half maximum) the peak width at half of the total peak height, and θ [°] it is the peak angle.

Applying the Scherrer equation to the patterns presented in Figs. 5–8, an estimation of the size of crystals can be calculated, as shown in Table 1. Samples that underwent calcium phosphate deposition presented crystal sizes that were smaller than those observed for crystals of calcium carbonate. Moreover, the carbonate and phosphates deposits on acetylated chitosan films presented lower sizes, when compared to deposits observed on pristine chitosan films. That finding is a result of the greater influence of the acetylated chitosan matrix on the calcium compound deposition mechanism, leading to a slower and more organized deposition, as seen in earlier experiments in this laboratory [3].

Table 2 indicates some differences in the R_g of entities that are scattering X-rays in each membrane, using the SAXS technique. The larger the R_g that is observed, the larger agglomerates are. Hence, the R_g found for membranes after calcification, mainly for carbonates, may indicate that the species resulting from chitosan and ions in solution are larger. This result confirms the crystal size analyses and, at a first sight, contests the optical microscope analyses. This apparent incoherence can be explained if the images seen in micrographs are considered as

Table 2

Radius of gyration of (a) acetylated chitosan, (b) pristine chitosan, (c) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M Na_2CO_3 solution and (d) pristine chitosan treated with 2 M CaCl_2 solution and immediately immersed in 2 M K_2HPO_4 solution

α	R_g ($\text{\AA}$)	Percent difference of (a) R_g	$>q$	$q_x R_g$	
(a)	−1.18949	1.889039	–	0.49906	0.942744
(b)	−0.96358	1.700218	–	0.49906	0.848511
(c)	−1.22272	1.915244	12.6	0.49906	0.955822
(d)	−1.1071	1.822443	7.19	0.49906	0.909509

aggregates of primary carbon compound crystals. This can be understood if greater amounts of phosphate crystals are produced, allowing them to aggregate, as will be discussed later, from a thermodynamic point-of-view. SAXS may also indicate that the interaction between species from solutions occurs loosely for carbonates and strongly for phosphates. This aligns with the idea that these interactions are the causes for all dimensional and macroscopic changes that were observed on chitosan membranes, mainly when considering that phosphate ions are bigger than carbonate ions.

The differences in the influences observed for each type of buffer may probably be explained by changes in the solvation layers of chitosan chains. Since the counter ions were the same (Na^+ or Cl^-), acetate ions may probably increase the interaction of chitosan chains with water, inducing the observed swelling, while poly-ionic phosphate ions, may expulse water molecules from the hydration sphere, increasing chain–chain interaction, possibly intermediated by phosphate ions. Some studies in the literature report polyphosphates as good coagulant agents for chitosan solutions [17]. The same cannot be observed for carbonates.

4. Discussion

In biomineralization, inorganic precipitates are formed under the full control of an organic matrix. This control comprises the manipulation of the local concentration of the precipitants, the presence of nucleating surfaces or groups and the presence of inhibitors in solution, which can bind to specific faces of the growing material. Thus, particle shape, size and orientation are regulated by the matrix, allowing a much greater control of particle morphology and distribution than would the conventional sol–gel blending and deposition methods. It was initially thought that this control was mainly exercised through lattice-matching epitaxy between the protein or polysaccharide matrix and the mineral [18].

As the particles become finer, colloidal forces become relatively more important and it becomes more difficult to avoid agglomeration. However, the presence of a surface-binding macromolecule (on matrix) may stabilize small crystals that would normally be metastable [19].

Crystal growth is traditionally divided into two stages: nucleation and growth. During growth, the energy of crystal or cluster decreases continuously. During nucleation, the high surface-to-volume ratio means that the cluster is increasingly more stable than the surrounding solution.

An organic surface may play many roles in promoting mineral deposition: physisorption of ions and small precipitates, orientation of crystal lattices, preferential deposition and heterogeneous nucleation. The latter phenomenon is the least studied and least understood. The oriented deposition of a mineral on a surface is often accredited to heterogeneous nucleation, but this may not be so; some cases show that the forces involved in physisorption of colloidal particles are sufficient to cause stabilization of mineral phase and orientation of crystals.

Our results show that even in conditions where spontaneous precipitation can occur, as in these quickly induced precipita-

tions, there is a significant influence of matrix in the deposition. In our case, this can be observed in deposit morphology, size and orientation. Fig. 1 shows bigger size grains and better-oriented (birefringent) deposits where chitosan was present. Another remarkable finding regarding matrix influence is the difference between acetylated and natural chitosan: the difference in exposed chemical groups makes the influence to be different for phosphate and carbonate formation (this has already been seen in calcifications in simulated body fluids). However, interestingly, this influence can be seen in a faster precipitation experiment that takes much less time (35 min versus 7 days) than the experiments under SBF. The precipitates formed spontaneously (homogeneous nucleation) present smaller grains and much less birefringence, which denotes lower orientation.

Nucleation thermodynamics has been reviewed many times in the literature and it is known that, assuming a hypothetical spherical-cap shape for nuclei, the free energy for formation of critical nucleus follows this relationship [20]: $\Delta G_{\text{heterogeneous}} = \Delta G_{\text{homogeneous}} \cdot \Gamma(\theta)$, where $\Gamma(\theta)$ is only a function of the contact angle between the spherical cap nucleus and the substrate. This concept is very important since it shows that the energy required for heterogeneous nucleation depends on the interaction between deposit and matrix.

From the kinetics point-of-view, the matrix can lower the nucleation activation energy, decreasing the energetic barrier to the spontaneous formation of a solid phase from a supersaturated solution. It is known that this kinetic constraint may be enough to counterbalance the thermodynamical driving force favourable to precipitation, resulting in solutions that remain metastable without presenting any phase change during long periods of time.

In addition, nucleation is only viable at a critical cluster size, r^* , defined as the radius at which the net (excess) free energy change for a single nucleus, $\Delta G_{(r)}$, is maximum. The associated energy barrier to homogeneous nucleation (ΔG^*) is related to the previously mentioned energetic quantities by the equation: $(\Delta G^*) = 16\pi (\gamma_{\text{SL}})^3 v^2 / [3k^2 T^2 \ln^2 S]$, where γ_{SL} is the solid–liquid interfacial energy (J/m^2), v the molecular volume (m^3/mol), k the Boltzmann constant, S the supersaturation, and T is the temperature (K) [21].

Thus, by lowering the interfacial energy or increasing the supersaturation of the medium (i.e. lowering the K_{ps} values), the activation energy for nucleation can be decreased. It is then logical to say that surfaces that make an interface more viable to formation would induce a faster effect that would be noticeable even in quicker calcification experiments, like the one used in our tests.

Supersaturation can then be controlled by the surface-near surrounding solution composition and interfacial energy can be lowered by the presence of organic surfaces at the nucleation site. These macromolecules can act primarily as spatial boundaries where ions are transported to produce supersaturated regions.

It is believed that, because the chemical bonding at the surface of mineral nuclei is primarily ionic, the organic interface must contain areas with high local energy, where electrostatic, dipolar or hydrogen bonding interactions can take place during

nucleation. As an example, the bone minerals formed on collagen fibrils have been attributed to acid sites [22].

Excessive binding capacity may be, on the other hand, negative for deposition. Mann cites three aspects that influence the interaction and recognition process between organic and inorganic phases: electrostatic accumulation (ionotropic effect), structural correspondence (epitaxy) and stereochemical requirement.

The ionotropic effect is the more feasible explanation for the fact that some macromolecules [23] bind calcium ions in stoichiometries often exceeding the number of potential anionic binding sites on the substrate. Thus, the accumulation of a charge at surface (anionic) sites would begin by primary anion-binding, generating a loosely associated cation-coordination sphere that, in turn, attracts a secondary cation-coordination sphere. High capacity and low binding affinity are critical for controlling nucleation: a matrix with high calcium affinity would probably inhibit nucleation as the strong binding effect would cause the ion to become inactive. On the other hand, high capacity is needed to provide a local sufficient number of ions to overcome the critical nucleus size.

Chitosan demonstrated to be a good substrate for deposition in the P-rich condition, as X-ray diffractograms show a more crystalline phase, as reported previously in the literature [8]. This fact stresses the capacity of matrix to influence on deposit orientation. FTIR analyses confirm the chemical differences between the calcium deposition on chitosan films and show that even in P-poor conditions, the matrix is capable to influence the deposition.

Growth will only occur if the energy released to bind ions in the bulk of solid (ΔG^*) overcomes the energy needed to form a new interface (ΔG_v).

A very important parameter for this analysis is the critical nucleus size. Particles larger than this tend to grow and the ones smaller than this tend to re-dissolve. Furthermore, nucleus formation requires higher saturations than in deposit growth.

With regard to concentration effect, considering the high concentration of ions, the process might not be limited by diffusional effects. Diffusional effects are usually present in dilute systems.

Nielsen [24] has reviewed the crystal growth kinetics of salts providing rules that can be used to estimate rates in many systems. The major limit factor for crystal growing rates for salts containing different cations is the loss of water of hydration from cations. In our case, we are referring to the same calcium cation. Most salts follow a square-law dependence of rate on supersaturation (salt-concentration/saturation concentration).

In situations where growth is controlled by interface kinetics, the rate is dependent on supersaturation, but not on the ratio of the two ions. On the other hand, if diffusion is under control, the rate is dependent on the ratio of the most dilute ion. Calcium carbonate systems have shown that ion pairing is not important, but that affects the growth rate [25].

The morphology of deposits is different for phosphate and carbonate tests. Natural chitosan membranes probably present an easier growing condition for phosphate when compared to the carbonate situation. This fact can be understood by the comparison between the values of solubility constants, for

calcium carbonate ($K_{ps} = 3.36 \times 10^{-9}$) and calcium phosphate ($K_{ps} = 2.07 \times 10^{-33}$) [26]. From the thermodynamic aspect, the values of K_{ps} may be related to the (ΔG^*) under the form of the Neperian logarithm. Therefore, lower values of K_{ps} , in module, return lesser values of (ΔG^*). Finally, it is possible to conclude that, in approximately constant conditions of solid-liquid interfacial energy and molecular volume, calcium phosphates present a greater trend towards bigger crystal formation, as observed in Figs. 1 and 2.

The interpretation from the thermodynamical point-of-view may suggest two possibilities: (1) the matrix provides a much better carbonates interaction; in other words, $0 < \Gamma(\theta)_{\text{carbonate}} < 1.0$ and lower $\Gamma(\theta)_{\text{carbonate}} < \Gamma(\theta)_{\text{phosphate}}$. This would allow heterogeneous nucleation with a larger number of nuclei with probably lower size dimensions; (2) another possibility is that natural membranes induce the critical nucleation size larger for phosphates than for carbonates. This would privilege the growth of nuclei through the incorporation of ions from solution to the bulk of pre-formed inorganic nuclei, rather than the generation of more of them.

In our case, diffusional effects were considered not to be a barrier, since the experiments were fast. We observed that the deposit sphere size indicated a better growth of deposits over natural rather than over acetylated membranes. Furthermore, SAXS analyses demonstrated the effect of the polymeric matrices on calcium deposit formation.

The use of SBF continues to be important for testing the bioactivity of surfaces; however, the use of a quicker method, as presented in this study, may still provide information on the biomimetic influence on surfaces of precipitates formation, but in a faster manner.

5. Conclusion

The quick method of calcification presented in this study provides information on how precipitates can be influenced by certain polymeric matrices in the heterogeneous nucleation process. The results for natural and acetylated chitosan on calcium phosphate and carbonates were in accordance with the theory of crystal nucleation and growth and agreed with previous results from the literature.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPESP for financial support and LNLS (Brazilian National Synchrotron Laboratory) for SAXS analyses.

References

- [1] Y. Pathak, F.J. Shoen, R.J. Levy, in: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen (Eds.), *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, California, 1996, p. 272.
- [2] P.A. Sandford, in: G. Skjaek-Braek, et al. (Eds.), *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, New York, 1989, p. 51.
- [3] C.G. Aimoli, M.A. Torres, M.M. Beppu, *Mater. Sci. Eng. C* 26 (2006) 78.
- [4] G.M. Bernacca, T.G. Mackay, D.J. Wheatley, *New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprostheses*, first ed., Silent Partners, Austin, 1994.

- [5] D. Mavrilas, A. Apostolaki, J. Kapos, P.G. Koutsoukos, M. Melachrinou, V. Zolota, D. Dougenis, *J. Cryst. Growth* 205 (1999) 554.
- [6] T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 331.
- [7] J.E. Davies, Mechanisms of endosseous integration, in: Conference, 1st COLAOB, Belo-Horizonte, Brazil, 1998.
- [8] M.M. Beppu, C.G. Aimoli, *Key Eng. Mater.* 254–252 (2004) 311.
- [9] M.M. Beppu, Estudo da calcificação in vitro de quitosana. PhD Thesis. Unicamp Brazil (1999).
- [10] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley, New York, 1978.
- [11] R.A. Nyquist, R.O. Kagel, *Infrared Spectra of Inorganic Compounds*, Academic Press, New York, 1971.
- [12] J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier Science, Netherlands, 1994.
- [13] L. Raymond, F.G. Morin, R.H. Marchessault, *Sep. Sci. Technol.* 33 (1998) 517.
- [14] P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, K. de Groot, *Biomaterials* 14 (1993) 963.
- [15] JCPDS File No.9-432. Powder Diffraction File (inorganic phases), International Centre for Diffraction Data, Newton Square, PA, USA.
- [16] B.D. Cullity, *Elements of X-ray Diffraction*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1956.
- [17] J.A. Ko, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 165.
- [18] P. Calvert, P. Rieke, *Chem. Mater.* 8 (1996) 1715.
- [19] A. Keller, M. Hikosaka, S. Rastogi, A. Toda, P.J. Barham, G. Goldbeck-Wood, *J. Mater. Sci.* 29 (1994) 2579.
- [20] L.A. Utracki, *Polymer Alloys and Blends—Thermodynamics and Rheology*, Hansen Publishers, Munich, 1989, p. 29.
- [21] G.H. Nancollas, *Adv. Col. Interface Sci.* 10 (1979) 215.
- [22] S. Weiner, W. Traub, *FASEB J.* 6 (1992) 879.
- [23] S. Mann, *Nature* 332 (1988) 119.
- [24] A.E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* 67 (1984) 289.
- [25] A.E. Nielsen, J.M.J. Toft, *J. Cryst. Growth* 67 (1984) 278.
- [26] D.R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th ed., CRC Press, New York, 2004.

Investigations into the early stages of “in vitro” calcification on chitosan films

Cassiano G. Aimoli, Marco A. Torres, Marisa M. Beppu *

School of Chemical Engineering, Unicamp, CP 6066 CEP 13084-852 Campinas, Brazil

Received 21 November 2004; received in revised form 1 June 2005; accepted 13 June 2005

Available online 8 August 2005

Abstract

This work investigated the mechanisms involved in the “in vitro” calcification of chitosan films. The calcification process on chitosan films is a phenomenon that has not been sufficiently studied, despite its importance in the understanding of many natural processes, such as bone and shell formation. Three different techniques were used in the present investigation: X-ray fluorescence (XRF), atomic force microscopy (AFM) and X-ray diffraction (XRD). Natural and acetylated chitosan films were used as substrates for calcification. The experiments were carried out by immersing chitosan membranes in simulated body fluid (SBF) or in a modified version of SBF, prepared without phosphate ions, during 30 min, 3 or 12 h. Calcium maps obtained by XRF showed that the initial calcium distribution on the chitosan surface was influenced by the acetylation treatment of chitosan films. AFM indicated the distribution pattern of calcium compound deposits at different times, obtained by film surface morphological analysis. The results suggest that the calcification mechanism is nucleation on membranes followed by the crystal growth of calcium compounds. AFM showed that the deposit formation is a function of immersion time: the deposits became more homogeneous and covered the surface more evenly with longer immersion times. XRD showed that the acetylated membranes produced more organized calcium deposits.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chitosan; SBF; Calcification; X-ray fluorescence (XRF); AFM

1. Introduction

Calcification is a natural process that occurs during many situations in the human body, for instance, after a bone is fractured. The natural calcification process may be reproduced and investigated in laboratory on biomaterials such as chitosan. Calcification of biomaterials may be accomplished by “in situ” deposition. The studies of “in situ” deposition on biomaterials are of wide interest in many scientific and technological fields. In the materials field, they lead to develop more resistant and functional composites [1]. In the medical field, they help the understanding of the natural formation of bones and teeth and permit the obtention of osteogenic implants and prostheses for orthopedic correc-

tion [2], as well as aiding in the development of new structures for tissue engineering [3]. On the other hand, bioprotheses usually fail due to misplaced calcification. The detailed knowledge of the biomineralization processes may help to avoid pathological calcification and, consequently, the failure of medical implants.

The “in situ” deposition is a synthetic process that can avoid the use of a large amount of surfactant, as employed by the alternative deposition process. Surfactants are necessary to keep particles, such as aggregates of salts, in suspension. The “in situ” deposition allows total control of a polymeric matrix on the inorganic deposits formation and this control extends to the size and orientation of the deposit [4].

Chitosan is produced by the deacetylation of chitin in alkaline solution. Chitosan is constituted by β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcN, D-unit) and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcAc, A-

* Corresponding author.

E-mail address: beppu@feq.unicamp.br (M.M. Beppu).

Table 1
Ion concentration in conventional SBF and SBF without phosphate ions

	pH	Na	K	Ca	Mg	Cl	HCO ₃	HPO ₄	SO ₄
Serum	7.4	142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	7.4	142.5	5.0	2.5	1.5	178.0	4.5	1.0	0.5
SBF without phosphate	7.4	142.5	4.0	2.5	1.5	178.0	4.5	0	0.5

unit). The structure, β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose, is the most abundant aminopolysaccharide present in glycoproteins, cellular walls, etc. [5].

The free amino groups in chitosan are responsible for its solubility and polycationic nature in acidic solutions. An important advantage of chitosan is the possibility of promoting chemical modifications through its amino group. Other characteristics include: hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability, antibacterial action, affinity for proteins and lipids [6]. Chitosan may promote calcification to form composites due to its poly-ionic nature. Few authors have studied chitosan as a substrate to study calcification and not much is known about the mechanisms and related phenomena [7].

In the present work, the nature of calcium deposits, mostly phosphates and carbonates, was characterized during the early stages of the “in situ” deposition process in order to better understand the influence of SBF composition (with or without phosphate) on the “in vitro” calcification phenomenon over pristine and acetylated chitosan films [8]. SBF was used without phosphate to calcify acetylated chitosan films in order to obtain calcium carbonate deposition [9] and to mimic the natural phenomena that occur in nacre formation. Nacre is made of calcium carbonate, 95% mass, protein and chitin. Its organic phase includes well-oriented aragonite, which presents interesting mechanical properties. In addition, the studies with normal SBF on pristine chitosan films were performed to under-

stand the formation of calcium phosphates and, hence, to understand the natural calcification processes of bones, teeth and osteogenic prostheses in live organisms.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan from crab shells (85% deacetylated, nominal value) was supplied by Sigma. All other reagents were analytical grade and Milli-Q water was used to produce all solutions.

The 2.5% chitosan and 3% acetic acid (mass) solution was prepared and filtered through a Millipore system to remove all suspension material. Dense chitosan membranes, which we have called films, were prepared by casting the acid chitosan solution on Petri dishes, followed by solvent evaporation at 60 °C, for 5 h, until a constant mass was reached. The membranes were then allowed to cool to room temperature (25 °C). The resulting films were then immersed in 1.0 M NaOH solution for 24 h and were exhaustively washed with Milli-Q water to completely remove the excess of NaOH. All films were stored in Milli-Q water at 7 °C. The approximately 0.15 mm-thick films were homogeneous, transparent, flat and resistant to handling. Some chitosan films were acetylated with a solution of acetic anhydride and methanol (0.05% v/v), under agitation, for 24 h at 20 °C, following the procedure mentioned by previous investigators [10]. The acetylated films were washed and stored in water at 7 °C. Acetylated membranes were similar to chitin in their resistance to handling, with the additional advantage of being shaped as films. The degree of chitosan deacetylation was determined by potentiometric titration. For this method, a known

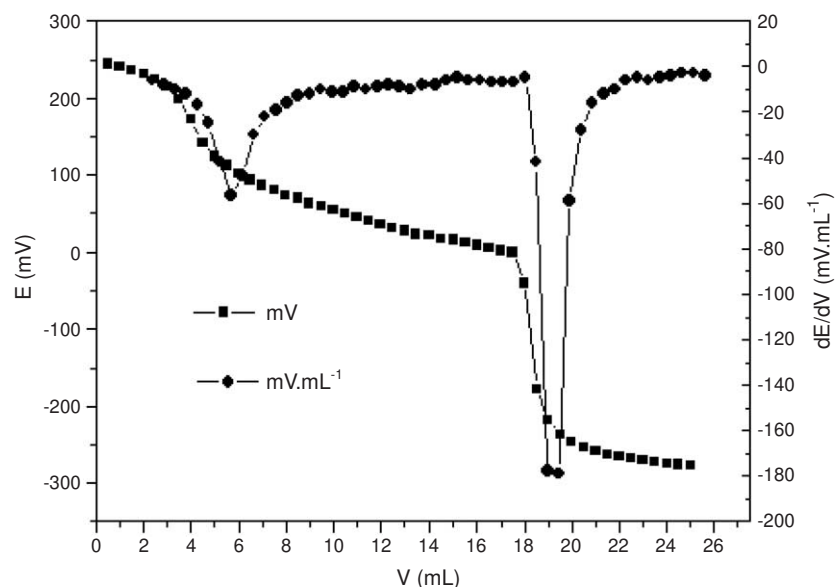


Fig. 1. Potentiometric titration of pristine chitosan.

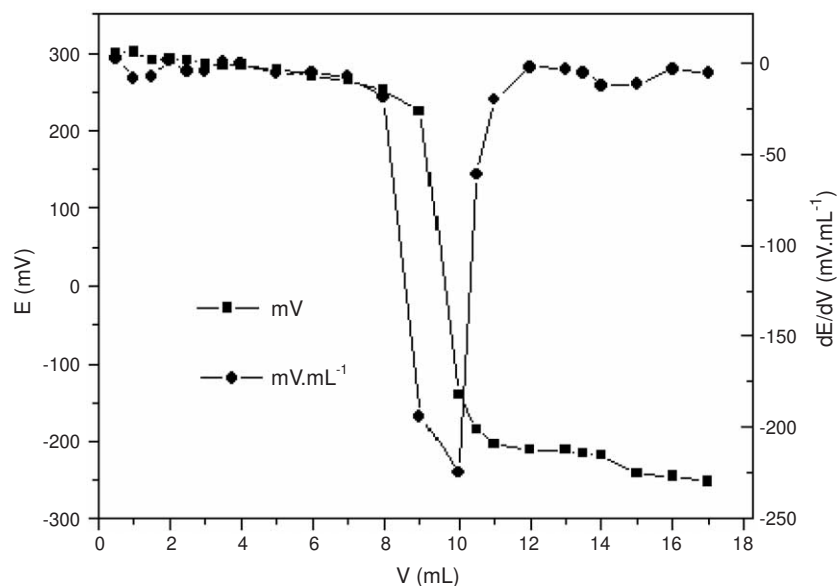


Fig. 2. Potentiometric titration of acetylated chitosan.

amount of HCl solution (0.02 equiv. g/l) is added, in excess, into a solution containing a known quantity of chitosan (natural or chemically treated), allowing enough time to charge all protonable groups (such as amino groups). In sequence, the resulting solution is then titrated using a 0.01 equiv. g/l solution of NaOH. A titration curve is obtained and, through the inflections of this curve, it is possible to determine the amount of amino groups. The percentage of amino groups is calculated using the Eq. (1):

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161}{W_2} * 100 \quad (1)$$

where M_{NaOH} is the molarity of the NaOH solution (mol/L), V_1 and V_2 are, respectively, the volumes of NaOH used to

neutralize the excess of HCl and the sample of protonated chitosan (L), 161 is the molecular weight of the monomer unit of chitosan and W_2 is the mass of the sample in the dry state taken for titration (g) [11].

Infrared spectra of natural and acetylated film surfaces were obtained using a Nicolet Protegé FTIR-ATR equipment. Germanium crystal was used as the attenuated reflection element.

Puncture resistance and an elongation test (resistance to perforation) was performed on wet chitosan films using FTMS 101 C method 2065 1-82 "Puncture resistance and elongation test (1/8 in. radius probe method)". A universal test machine (Emic) — MEU-001 and a digital thickness measurer (resolution of 0.01 mm) ME-003 were used. To

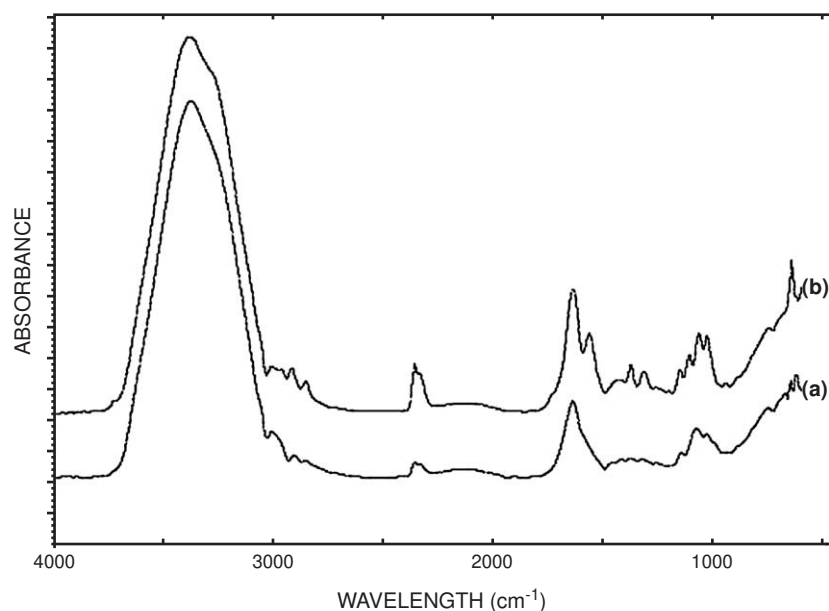


Fig. 3. Typical chitosan and acetylated chitosan FTIR-ATR spectrum.

Table 2
FTIR absorbance for chitosan films during acetylation

Time of acetylation reaction (min)	Reference peak (1420 cm ⁻¹)	Characteristic peak (1320 cm ⁻¹)	1420 cm ⁻¹ /1320 cm ⁻¹ ratio
60	0.015	0.020	1.333
2	0.010	0.011	1.100
31	0.034	0.039	1.147

perform the test, the pieces of natural and acetylated films were taken from water, and the excess water drained and the test was executed immediately. 5 mm/min was the speed used.

Conventional SBF was prepared by mixing the solutions of NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, K₂HPO₄ and Na₂SO₄ salts using “Tris” buffer [12]. The final solution presented an ion concentration, as depicted in Table 1. A modified SBF without phosphate ions was obtained by not adding the recommended K₂HPO₄ amount.

“In vitro” calcification experiments were performed by immersing pieces of natural and treated chitosan in simulated body fluid, with and without phosphate ions, for 30 min, 3 or 12 h [12]. The experiments were carried out at 36.5±2 °C using a Shaking Water Bath-Line Orbit (50 rpm agitation). The samples were then gently washed to remove SBF solution from their surface before drying at room temperature. In the drying process, the membranes were attached onto a special apparatus composed of double rings, in order to keep both surfaces in contact with air and maintain the film flatness. The dried samples were stored in plastic bottles for further analysis. The early stages of “in vitro” calcification were studied using three techniques: X-ray fluorescence (chemical analysis) and atomic force microscopy (morphological analysis) were used for chemical and morphological mappings, respectively, and X-ray diffraction was performed to observe the differences in the deposits’ crystallinity.

2.2. XRF technique

Micro X-ray fluorescence using, synchrotron radiation (μ SRXRF), is a non-destructive technique for the performance of multi-elemental analysis. Intrinsic characteristics of synchrotron radiation allowed the use of spectrochemical analyses on a micrometric scale, to map trace elements with high efficiency and for short times [13]. Determination of elemental calcium distribution on chitosan films was performed using the specific sensibility of the μ SRXRF technique developed by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) in Campinas. The electron energy inside the storage ring is 1.37 GeV with a dipole magnetic field of 1.65 T, which produces a critical photon energy of 2.08 keV. The synchrotron radiation source for

the XRF beamline is the D09B (15°) bending magnet of the storage ring [14]. The sample was positioned in the image plain within an accuracy of 0.5 μ m with a 3 axis (x,y,z) remote-controlled stage. A video microscope (magnification 500×) was used to position the sample precisely in the beam. The measurements were performed in standard geometry (45°+45°), by exciting with a white beam and using orthogonal slits (300 × 300 μ m). In this way, pixels of 300 × 300 μ m were obtained whilst maintaining a high flux of photons on the sample. The fluorescence spectrum was recorded with a Si(Li) detector of 165 eV FWHM at 5.9 keV in an air atmosphere, positioned at 90° to the incident direction. To determine the chemical elements in the chitosan samples, K α -line of Ca (3.691 keV) was used. All the spectra were analyzed using the Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS) package, which is a conventional program for spectrum analysis [15].

2.3. Morphological observation

Atomic force microscopy (AFM) is a powerful tool for measurements of topographical morphology. The technique has advantages over scanning electron microscopy (SEM), since it is able to capture morphological details. Morphology of calcified membranes was obtained using the Autoprobe cp, Park Scient Instrument, using the non-contact technique. The I.P. version 2.0 software was used to analyze the data.

2.4. XRD technique

X-ray diffraction is a common technique for the study of material structure. The X-ray incident beam can be partially absorbed, dispersed or transmitted without modification. Diffraction results from the interaction among electrons present in the material. Diffracted X-rays interfere with each other and as a result the diffraction standard varies with the dispersed angle. The change in the scattered and diffracted X-rays with the incidence angle provides information regarding the electronic intensity distribution, as well as the structure of the material [16]. All X-ray diffractograms were obtained with natural and acetylated samples undergoing calcification. The structural differences in the composites, caused by acetylation, could be analyzed. The measurements were performed at the

Table 3
Mechanical test results for natural and acetylated chitosan films (results from five replicates)

Membrane	Film width (μ m)	resistance to puncture (MPa)	Elongation (mm)
natural (<i>n</i> =5)	145±24	3.0±1.0	52.6±7.0
acetylated (<i>n</i> =5)	189±10	2.9±0.8	38.4±8.3

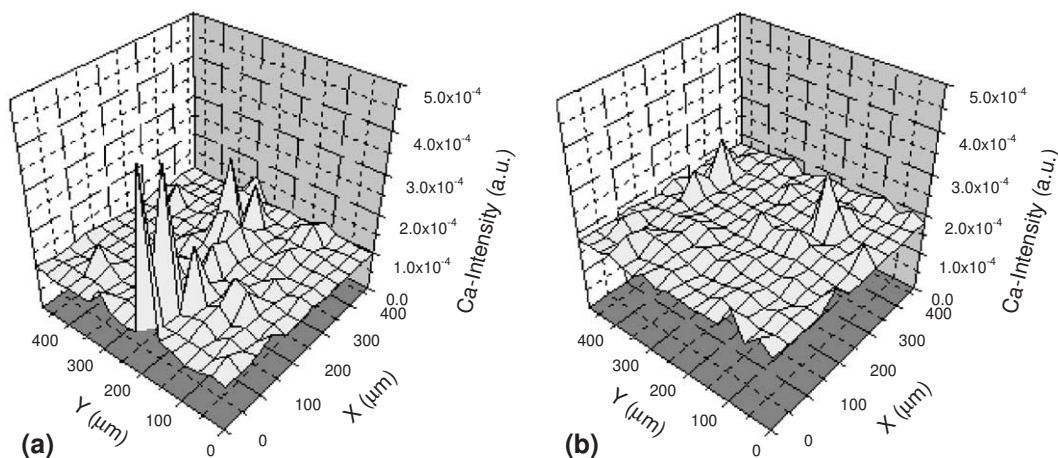


Fig. 4. Calcium distribution on natural chitosan film immersed in SBF for (a) 30 min and (b) 12 h.

Mechanical Engineering School-Unicamp, using a Rigato X-ray diffractometer.

3. Results and discussion

The nitrogen atom, present in the chitosan structure, is a nucleophile with a special attraction to positive centers due to its two unbound electrons. The acetylation reaction between the *N*-acetyl groups present in acetic anhydride and the amino groups of chitosan is based on bimolecular nucleophile substitution (SN2-bonds); this mechanism has been reported previously [17].

The natural membranes (Fig. 1) were seen to be soluble in 0.02 M HCl, during potentiometric titration experiments. The deacetylation degree determined for natural membrane using the inflection point shown by the derivative curve, dE/dV , was 81%.

Fig. 2 demonstrates that the acetylation process converts the amino groups present in chitosan chains to *N*-acetyl groups. Therefore, the NaOH used during neutralization was totally consumed just to neutralize the HCl present in the system, indicating that the acetylation reaction was almost

complete. Consequently, the protonation of amino groups on the chitosan surface and the solubilization of the membrane were not possible.

A typical infrared spectrum of chitosan is shown in Fig. 3. The absorption intensities at 1420 and 1320 cm^{-1} [18] represent, respectively, a reference peak and a peak that is characteristic of $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ and $-\text{CO}$ groups. The ratio of these peaks demonstrates the extension of the acetylation reaction on the chitosan amino groups. Table 2 depicts some values for this ratio depending on the time of reaction, indicating that extensive *N*-acetylation occurs even during short times of acetylation.

After acetylation, dense membranes possessed changed mechanical resistance, although they were still flexible. The mechanical tests used are depicted in Table 3 and allow us to compare the properties of natural and acetylated films: the elongation of films changed probably as a reflection of the structural affinity to water, making the acetylated chitosan less pliable.

The acetylated membranes shrank and their solubility decreased due to the blockage of the amino groups. Their properties were observed to be similar to those of chitin. Chitin is known to be a completely acetylated chitosan that

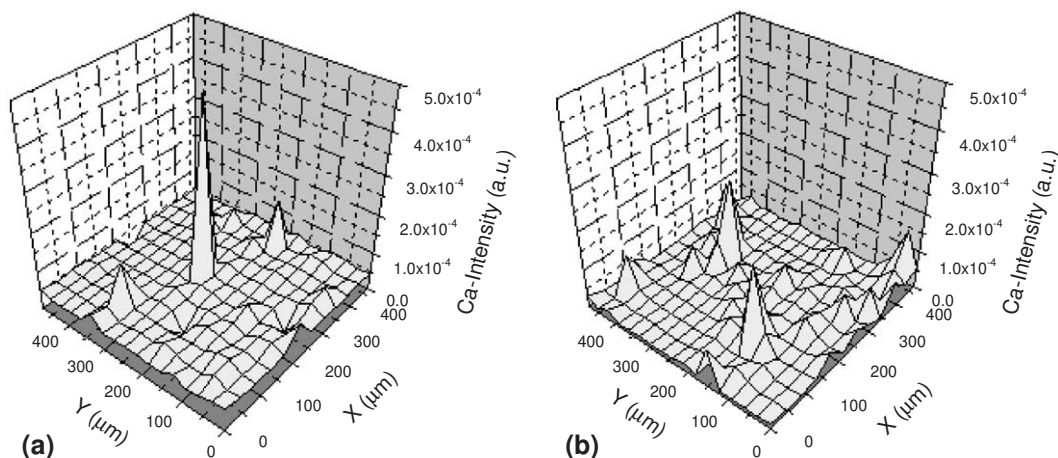


Fig. 5. Calcium distribution on acetylated chitosan film immersed in SBF for (a) 30 min and (b) 12 h.

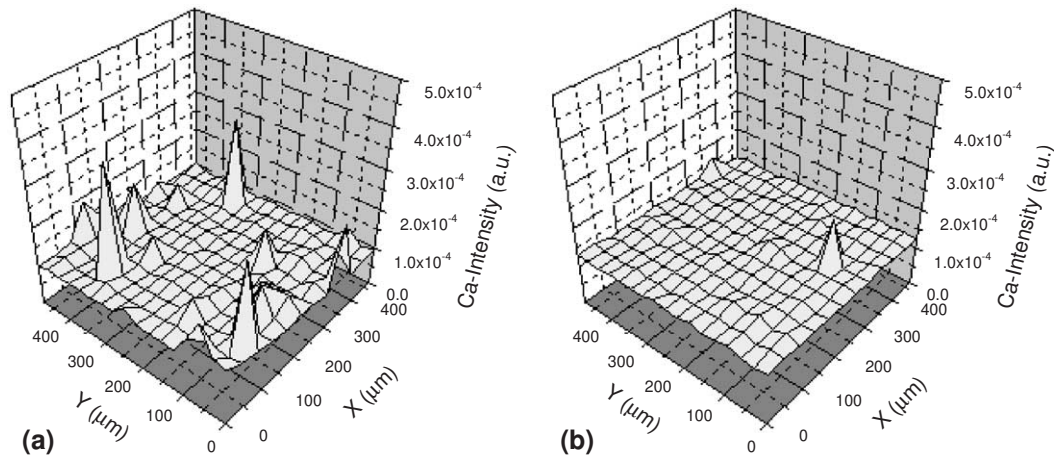


Fig. 6. Calcium distribution on natural chitosan film immersed in SBF (without phosphate ion) for (a) 30 min e (b) 12 h.

is insoluble in water, while chitosan is soluble in acidic solutions [19]. Thus, the acetylation of chitosan led to a “pseudo-chitin” with a specific shape.

The measurements performed at the Synchrontron Light National Laboratory in order to analyze the samples by X-ray microfluorescence were used to elaborate the maps of elements with atomic numbers of higher than 14. This method can be used, essentially, as a qualitative technique; this limitation occurs mainly due to the weakening in the intensity of the beamline that can interfere in the quantitative analysis. The beamline intensity decreases with time due to the decline of electrons in the accelerator, which requires periodically new charges of electrons.

The spatial distribution of Ca, or calcium maps, showed the presence of calcium deposits in the form of small nuclei (represented by calcium concentration peaks) on natural and acetylated membrane. Figs. 4 and 5 present calcium maps for natural chitosan films immersed in SBF solution with phosphate ion. Mapping of phosphorus (P) was not performed by XRF since this is considered to be a light element that is not analyzed accurately by this technique. However, the Ca:P ratio has been previously investigated and reported for this

condition using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) coupled with scanning electron microscopy (SEM) analyses [20]; results indicated that the deposits were mostly calcium phosphates (apatites). Figs. 6 and 7 present the calcium maps for the membranes treated in SBF solution without phosphate ion. Probably, in this case, the deposits are mostly composed by calcium carbonates, as no phosphate ions are present in the SBF and since calcium chloride (another calcium salt possibility) has a very high solubility in water.

The punctual presence of calcium in the maps suggests that the mechanisms of calcium deposition required a stage of nucleation. The peaks of calcium are not evenly spread over the surface after treatment with calcium solution during 30 min. Nucleation could still be responsible for deposit formation at this stage. On the other hand, the results show peaks of calcium with an even distribution on the whole membrane after treatment with calcium solution for 12 h. This may indicate that the deposits have grown enough to provide a better surface coverage at this stage. The mapping also indicated the presence of other chemical elements such as iron. The calcium distribution profile, along time, did not differ significantly when the type of membrane (natural or

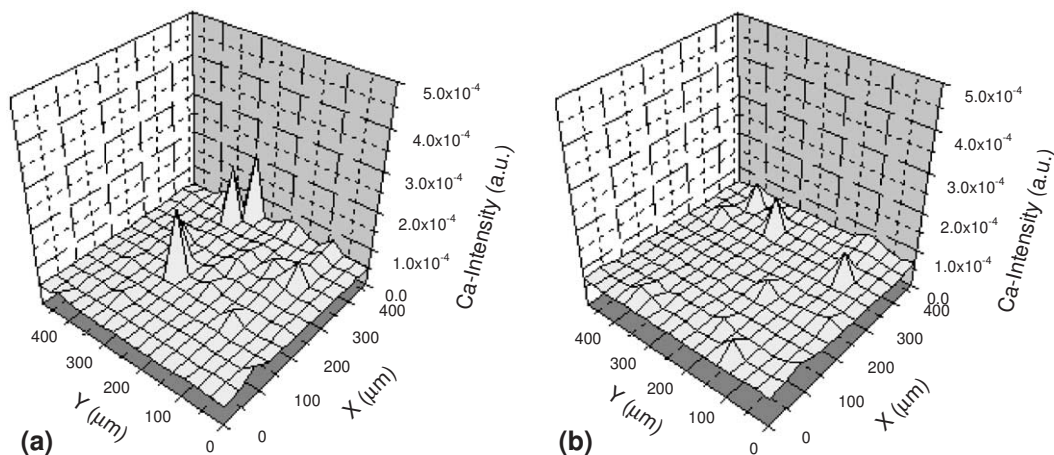


Fig. 7. Calcium distribution on acetylated chitosan film immersed in SBF (without phosphate ion) for (a) 30 min e (b) 12 h.

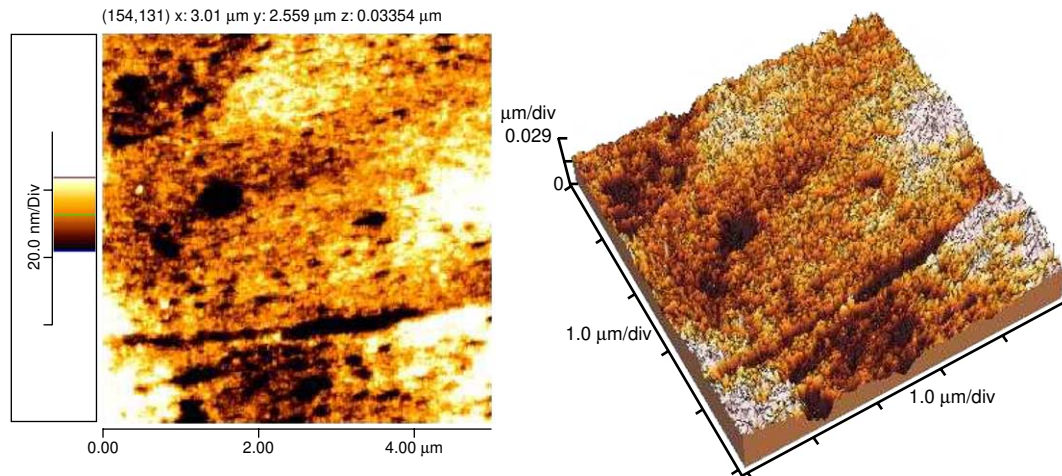


Fig. 8. Natural chitosan in simulated body fluid for 30 min. Surface generated by AFM.

acetylated) or SBF (conventional or without phosphate ion) was changed, although, the calcium counter-ion deposits probably varied with SBF type.

Figs. 8 and 9 depict the AFM images of natural and acetylated films after 30 min of calcification and present morphologies similar to those found for natural and acetylated films before immersion in SBF. The film morphology was studied at different times of treatment. After treatment with SBF for 30 min, both films (natural and acetylated) presented deposits of calcium on their surfaces, as determined by X-ray fluorescence. However, at this time, no morphological change was detected by AFM. Figs. 10 and 11 depict natural and acetylated films after treatment in SBF solution for 12 h. The figures show that the microscope pointer dragged the material. The results were the same when observed at larger amplitudes. The results indicate the presence of significant amounts of calcium deposits on natural and acetylated chitosan films calcified using SBF solution for 12 h. In this case, the surface presented irregular topography. The AFM pointer tip frequently touched the deposits, indicating that 12 h is enough to promote the intense and homogeneous deposition over the entire film surface.

Polymeric matrices can induce the deposition of soluble salts on their surfaces that would otherwise remain in solution. Thermodynamics may explain the phenomenon, through phase equilibrium. The nucleation and growth — NG, and the spinodal decomposition — SD, are two mechanisms by which the equilibrium is attained [21].

Atomic force microscopy confirmed the results obtained by X-ray fluorescence. The deposition mechanism is probably characterized firstly by nucleation. There is no evidence of spinodal decomposition, since the nuclei are not evenly spread over surfaces in the early stages of deposition. The calcification after treatment, using the calcium solution for 30 min, was incipient and in the form of small nuclei. On the other hand, the samples treated with calcium solutions for 12 h showed intense and homogeneous calcification, demonstrating a process of deposit growth.

The X-ray diffraction analyses indicated different calcium compound crystallinity on the surfaces of natural and acetylated chitosan films. This is shown in Figs. 12-b and 13-b that exhibit better-defined halos for deposits formed over acetylated films than for natural films. For comparison, Figs. 12-a and 13-a depicts the diffractograms

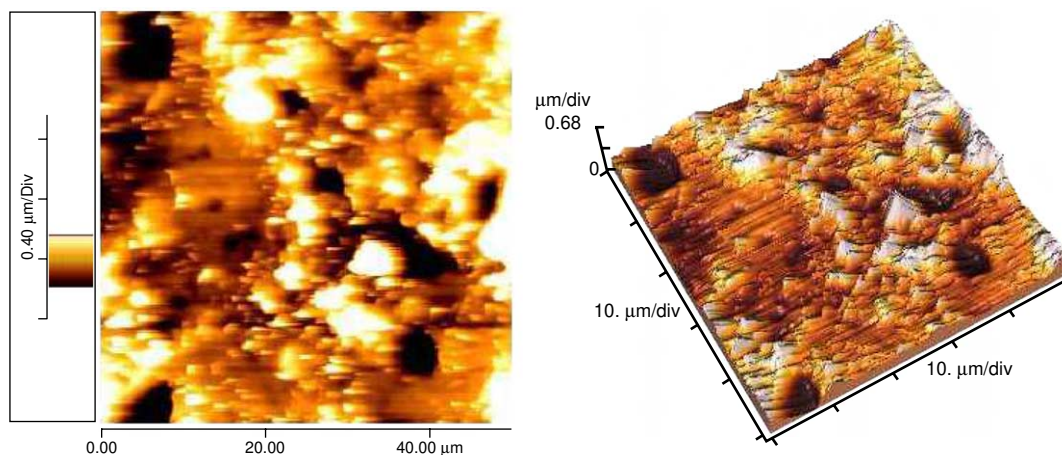


Fig. 9. Acetylated chitosan in simulated body fluid for 30 min. Surface generated by AFM.

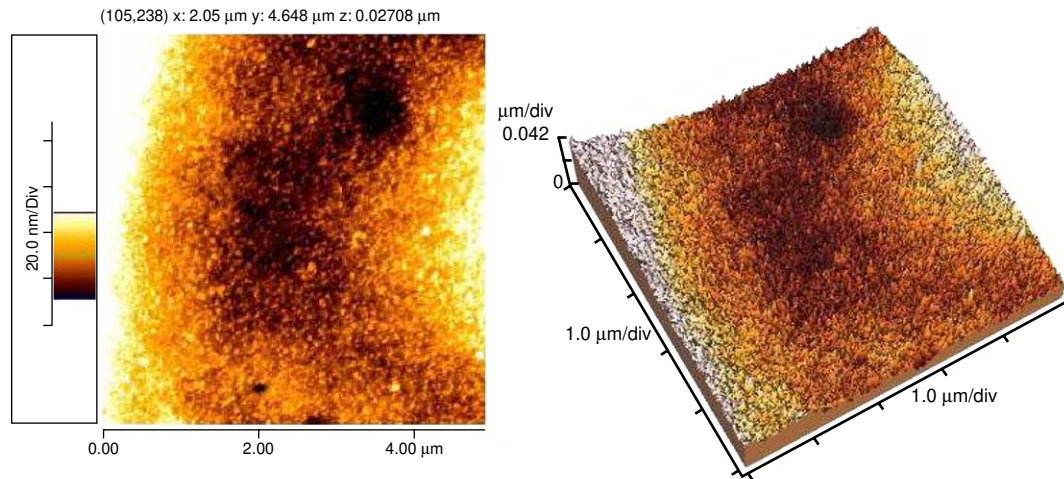


Fig. 10. Natural chitosan in simulated body fluid for 12 h. Surface generated by AFM.

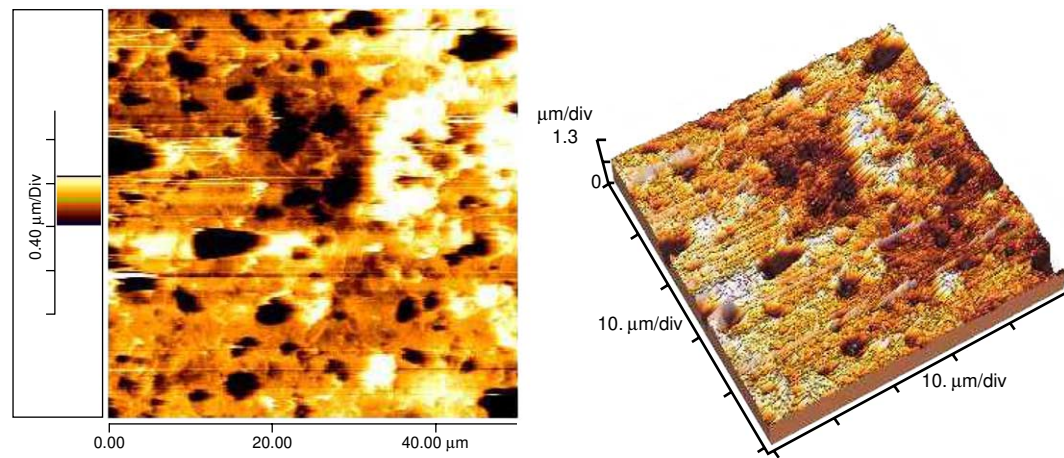


Fig. 11. Acetylated chitosan in simulated body fluid for 12 h. Surface generated by AFM.

of natural and acetylated chitosan before calcification in SBF solution.

Natural chitosan usually presents signals at $2\theta = 10.4^\circ$, 19.6° and 21.4° , which correspond to the reflections of the (200), (020) and (220 and 202) planes [22,23]. The literature postulates that water molecules are weakly bonded to chitosan chains in direction (010) and that when samples are thermally treated, in addition to the reduction of (020) reflection, a new peak at 15.1° appears. The peak at (020) depends on the water content and tends to decrease in dried samples. The diffractogram (Fig. 13-a) shows a decrease in the (020) peak, reflecting the pronounced hydrophobicity of sample besides the formation of a reflection at about 27° as new chemical groups are inserted in chitosan and the distance between chains increases. Fig. 12-b, although covered by calcification, does not show any significant orientation of deposits. In contrast, Fig. 13-b presents reflections at 26° and 31° , typical of amorphous apatites with a minimum of orientation at 002 and 141,122 and 300 planes.

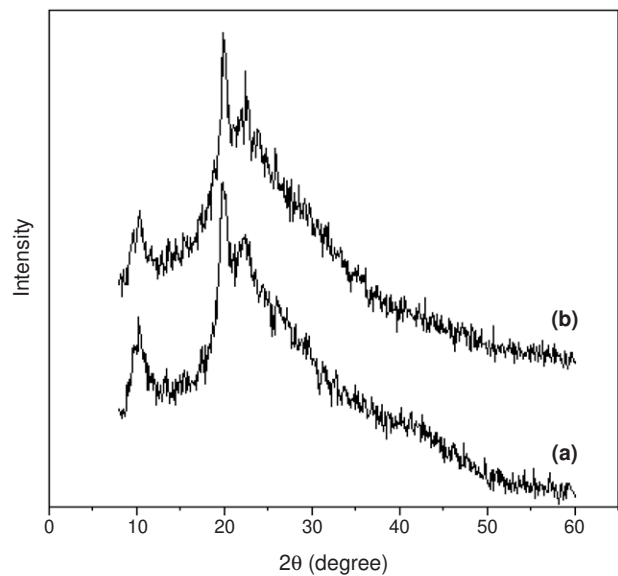


Fig. 12. X-Ray patterns for (a) pristine chitosan and (b) pristine chitosan in simulated body fluid for 12 h.

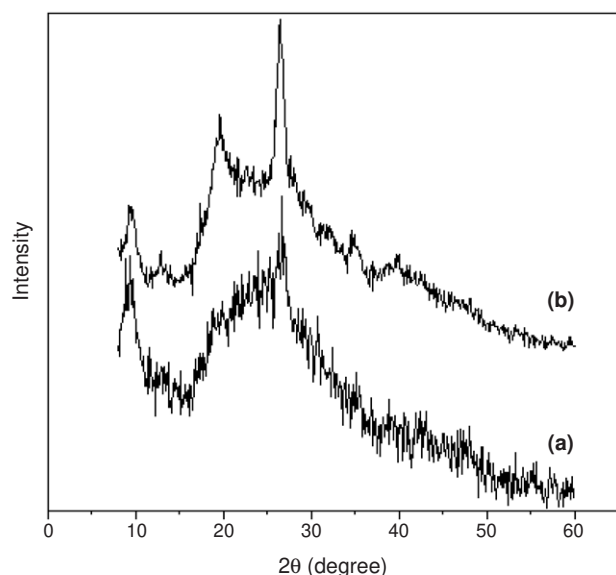


Fig. 13. X-Ray patterns for (a) acetylated chitosan and (b) acetylated chitosan in simulated body fluid for 12 h.

The crystallinity results suggest that the deposition of calcium composites on acetylated chitosan films was influenced more by the acetylated substrate.

4. Conclusion

The chemical and morphological analyses performed suggest that nucleation and growth is the mechanism by which calcium compounds deposit on chitosan films. The morphological analyses and calcium maps did not show significant differences between natural and acetylated films, nor between the SBF with and without phosphate ion. The deposition mechanism was probably the same for both substrates, natural and acetylated, varying just the counterion for calcium to produce calcium carbonate and calcium phosphate, depending on the SBF employed. The acetylated chitosan diffractogram films show the presence of more crystalline and organized deposits, which better reproduces natural processes and may reflect a more intense biomimetic influence.

Acknowledgements

The authors thank: FAPESP and CNPq for financial support; Dr. Monica Cotta for AFM analyses and LNLS staff for XRF technical support.

References

- [1] Y. Pathak, F.J. Shoen, R.J. Levy, in: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds.), *Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, California, 1996, p. 272.
- [2] M.M. Beppu, C.C. Santana, *Key Eng. Mater.* 192 (1) (2000) 31.
- [3] L. Zhao, J. Chang, *J. Mater. Sci., Mater. Med.* 15 (5) (2004) 625.
- [4] P. Calvert, P. Rieke, *Chem. Mater.* 8 (8) (1996) 1715.
- [5] L.E. Lillo, B. Matsumiro, *Carbohydr. Polym.* 34 (4) (1997) 397.
- [6] R.A.A. Muzzarelli, *Carbohydr. Polym.* 29 (4) (1996) 309.
- [7] L. Furlan, V.T. deFavere, M.C.M. Laranjeira, *Polymer* 37 (5) (1996) 843.
- [8] S. Mann, *J. Mater. Chem.* 5 (7) (1995) 935.
- [9] S. Zhang, K.E. Gonsalvez, *J. Appl. Polym. Sci.* 56 (1995) 687.
- [10] S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Carbohydr. Res.* 47 (1995) 315.
- [11] L. Raymond, F.G. Morin, R.H. Marchessault, *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 331.
- [12] Y. Yokogawa, J.P. Reyes, M.R. Mucalo, M. Toriyama, Y. Kawamoto, T. Suzuki, K. Nishizawa, F. Nagata, T. Kamayama, *J. Mater. Sci., Mater. Med.* 8 (7) (1997) 407.
- [13] M.J. Anjos, R.C. Barroso, C.A. Perez, D. Braz, S. Moreira, K.R.H.C. Dias, R.T. Lopes, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 213 (2004) 569.
- [14] C.A. Perez, M. Radtke, H.J. Sanchez, H. Tolentino, R.T. Neuenschwander, W. Barg, M. Rubio, M.I.S. Bueno, I.M. Raimundo, J.J.R. Rohwedder, *X-ray Spectrom.* 28 (5) (1999) 320.
- [15] G. Benasconi, A. Tajani, *Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2*, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1996.
- [16] L.E. Alexander, *X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science*, Wiley-Interscience, New York, 1969, p. 125.
- [17] G.T.W. Solomons, *Organic Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1996, p. 652.
- [18] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguelles-Monal, J. Desbrières, M. Rinaudo, *Polymer* 42 (2001) 3569.
- [19] H. Sashiwa, Y. Shigemasa, *Carbohydr. Polym.* 39 (2) (1999) 127.
- [20] M.M. Beppu, C.G. Aimoli, *Key Eng. Mater.* 254 (2) (2004) 311.
- [21] L.A. Utracki, *Polymer Alloys and Blends — Thermodynamics and Rheology*, Hansen Publishers, Munich, 1989, p. 29.
- [22] H. Saito, R. Tabeta, K. Ogawa, *Macromolecules* 20 (1987) 2424.
- [23] K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, T. Watanabe, *Macromolecules* 17 (1984) 973.

In vitro mineralization on chitosan using solutions with excess of calcium and phosphate ions

Marisa Masumi Beppu,^{a)} Marco Antonio Torres, Cassiano Gomes Aimoli, Gilberto Alexandre Soares Goulart, and Cesar Costapinto Santana
Faculdade de Engenharia Química, Unicamp CP6066 CEP13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil

(Received 1 April 2005; accepted 6 July 2005)

Pseudo-simulated body fluids (SBFs) were used in in vitro experiments to promote chitosan porous membrane calcification. Common SBFs, which had concentrations of phosphate or calcium ions doubled, were so named because they do not replicate, by rigor, a genuine body fluid ion concentration. The objective of using such calcification fluids was to study the influence of phosphate and calcium excess in solution on mineralization deposit characteristics. SEM-EDS analyses showed that morphology and composition of deposits varies depending on which ion (phosphate or calcium) is in excess; x-ray diffractograms show that deposits are poorly crystalline (like biological apatites) but still show better crystallinity in deposits generated from P-rich SBF. This result, added to previous ones [such as those reported by Beppu and Santana *Mater. Res.* **5**, 47 (2002)] where a difference in the interconnectivity of the inorganic and organic (matrix) phases was stressed, suggests different deposition processes for each situation.

I. INTRODUCTION

Calcification or mineralization, defined as the formation of calcium phosphate or other calcium compounds, is a phenomenon that is a prominent subject for researchers for many reasons. From the biomaterials point of view, there is a need to better understand how to control mineralization because this may be useful for some processes, as in osteogenic implants, or conversely, completely undesired in others as it is the major reason for many medical device failures, as in cardiac devices.² For material scientists, in situ deposition is an alternative to avoid the usual difficulties found in sol-gel processes, such as particle aggregation. In these state-of-the-art and so-called biomimetic processes, the inorganic phase is obtained under an organic matrix control, which regulates the shape, size, and orientation of deposits and hence determines the structural and mechanical characteristics of the final material.

Interest in chitosan can be measured by the exponential growth of the number of scientific articles related to its characterization and uses that has occurred during the last five years. Part of the attention that has been directed

toward chitosan is attributed to its renewable, biodegradable, and biocompatible character. It also presents good versatility, as it can be shaped into several forms and has amino and hydroxyl groups that can be easily reacted and functionalized.³

Our laboratory has been studying the potential of chitosan as a biomaterial and for bioseparation processes since 1997. Our main field of exploration with chitosan has been as an organic matrix to produce composites using biomimetic processes.

In the present study, we expanded recently published results on the mechanisms of in vitro calcification of chitosan extracted from crab shells.⁴ Previously, we mentioned that porous chitosan membranes undergo an in vitro calcification process and that the pH and composition of calcification influence the composition and morphology of calcification deposits.

There are basically two theories about matrix influences in mineralization: (i) deposition depends on the matrix chemical nature⁵ and (ii) in vivo calcification (such as osteoconduction) is mainly dependent on the micromechanics of surface rather than the chemistry.⁶

In our previous study, the substrates were the same; thus it was clear that chemical interaction is a very important factor of in vitro deposition, as the composition and pH of fluid used for calcification interfered in deposit characteristics.

^{a)} Address all correspondence to this author.
e-mail: beppu@feq.unicamp.br
DOI: 10.1557/JMR.2005.0410

In the present study, we continue the investigation on the chemical influence of calcification solutions, focusing on calcium-rich and phosphate-rich pseudo-simulated body fluid (SBF) solutions, proposing mechanisms for both situations.

II. EXPERIMENTAL

Chitosan extracted from crab shells (Sigma, St. Louis, MO; product number C3646, minimum of 85% deacetylated chitin) was used. All other reagents were of analytical grade, and Milli-Q ultrapure water was used in solutions.

Chitosan was dissolved in a 3% (w/w) acetic acid/Milli-Q water solution, and the gel was kept at 4 °C for 1 wk. After filtration through a Millipore glass filter, approximately 32 g of the 2.5% (w/w) chitosan solution was spread over a Petri dish (dimensions: internal diameter = 10.6 cm, external diameter = 11.2 cm, height = 2.0 cm). The dish was kept at 60 °C until a reduction of 50% in its initial weight was obtained. The membranes were then immersed in a NaOH solution (1 M), during 24 h for neutralization, followed by rinsing and storage in water at 4 °C. Dense films of chitosan were also obtained. They were prepared similarly, by placing the dishes with chitosan solutions in a preheated oven at 60 °C, for approximately 8 h, until a constant mass was reached. These films were produced only for characterization by AFM (atomic force microscopy) as these techniques required a very planar surface.

The Petri dishes containing the dried chitosan membrane were then immersed in 1.0 M NaOH solution for coagulation for 24 h. The coagulation process is a step wherein the protonated amino groups are neutralized by a basic solution, turning chitosan insoluble in water and, hence, promoting the precipitation of polymer and giving dimensional stability to chitosan in the shape in which it is molded.

The porous membrane was a white, opaque film $\sim 2.0 \pm 0.3$ mm thick, and the transparent dense membrane was ca. 0.5 mm thick.

Calcification solutions were prepared by adding volumes described in Table I of solutions of 2.74 M NaCl, 0.06 M KCl, 0.03 M MgCl₂, 0.0895 M NaHCO₃, 0.02 M K₂HPO₄, 0.01 M Na₂SO₄, and 0.05 M CaCl₂, in this

TABLE I. Preparation of SBF.

Salt (supplier)	Salt solution concentration (M)	Volume used for	
		1.0× SBF (ml)	1.5× SBF (ml)
NaCl (Sigma/Merck)	2.74	12.5	18.75
KCl (Merck)	0.06	12.5	18.75
CaCl ₂ (Merck)	0.05	12.5	18.75
MgCl ₂ (Merck)	0.03	12.5	18.75
NaHCO ₃ (Chemco)	0.0895	12.5	18.75
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.02	12.5	18.75
Na ₂ SO ₄ (Ecibra)	0.01	12.5	18.75
“TRIS” ^a (Nuclear/Merck)	0.4	31.25	31.25
HCl (Merck)	0.36	29 (pH 7.2) ^b	31.25 (pH 7.2) ^c
Final SBF volume		250	250

^a(CH₂OH)₃CNH₂.

^b25 ml (pH = 7.8); 27.5 ml (pH = 7.4); 27.5 ml for Ca-SBF (pH = 7.5), and 28 ml for P-SBF (pH = 7.5).

^c26.5 ml (pH = 7.8); 28 ml (pH = 7.4); 29 ml for Ca-SBF (pH = 7.4), and 30 ml for P-SBF (pH = 7.4).

order, to a 250-ml volumetric flask, that already contained the correspondent amount of 0.4 M “TRIS” [(CH₂OH)₃CNH₂] solution and about 90% of the corresponding amount of 0.36 M HCl solution. This procedure guaranteed that the pH of solution was initially kept low to avoid turbidity formation, which would mean precipitation mainly during the addition of calcium salt solution. The pH fine adjustment was the last step, by adding 0.36 M HCl until the total quantity as shown in Table I were obtained. The rest of the volume was made up with Milli-Q water.⁷ Phosphate-rich or calcium-rich SBFs were obtained by doubling the quantity of the respective salts, K₂HPO₄ or CaCl₂ (Table I). HCl was added dropwise to achieve the desired pH. The final appearance of SBF (normal and modified) was a transparent solution. All salt solutions were used fresh and were made on the same day of their use.

The final concentrations of SBF solutions are shown in Table II.

In vitro experiments were done as follows: the substrates (2 × 1 cm² chitosan membrane pieces) were soaked in a solution (pH set at 7.4 or 7.8) that simulated 1× (for 2 days) and 1.5× (for 5 days) the salt concentration of body fluids (plasma) during 7 days. The 1.5× solution was renewed on days 4 and 6. The solutions were kept under slight agitation using a thermostatic bath

TABLE II. Concentration of ions in calcification solutions (in mM).

	pH	Na	K	Ca	Mg	Cl	HCO ₃	HPO ₄	SO ₄
Serum	7.4	142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	27.0	1.0	0.5
1× SBF	7.8 or 7.4	142.5	5.0	2.5	1.5	178.0	4.5	1.0	0.5
1.5× SBF	7.8 or 7.4	213.7	7.5	3.75	2.25	267.0	6.7	1.5	0.75
P-rich	7.8	213.7	10.5	3.75	2.25	267.0	6.7	3.0	0.75
Ca-rich	7.8	213.7	7.5	7.5	2.25	274.5	6.7	1.5	0.75

set at 36.5 °C. This was done on the basis of the idea that the first days are the most important for the induction of the first deposits. Afterward, the use of a more concentrated solution would induce a more rapid calcification.

For calcium-rich SBF tests, the substrates were first soaked in calcium-rich 1× SBF for 2 days and then in calcium-rich 1.5× SBF for 5 days, while for phosphate-rich SBF tests, the substrates were first soaked in phosphate-rich 1× SBF for 2 days and then in phosphate-rich 1.5× SBF for 5 days.

Calcified samples had their composition and morphology analyzed by microscopy (scanning electron microscopy; JEOL JXA-840A electron probe microanalyzer; JEOL, Tokyo, Japan) and energy dispersive spectroscopy (EDS).

To prepare the samples for EDS analyses, substrates were gently washed with Milli-Q water three times, fractured under lower temperatures, and freeze-dried. The pieces were coated with carbon by evaporation to allow their observation under electron beam and quantification of Ca and P elements. Although EDS presents about 5% inaccuracy, we used it as an instrument for “in situ” analysis, as it allowed us to chemically characterize the deposits that were actually being seen under SEM. Analyses were repeated to maximize their reliability.

For crystallographic studies, x-ray diffraction was performed using Philips X’Pert PW3050 (Almelo, The

Netherlands) equipment, using 40 kW, Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), 2 θ degrees. Software programs PC-APD version 4.0 and MS origin 5.0 were used to analyze the spectra. Finally, the amount of protonatable (amino) groups was measured for each specimen, using potentiometric titration.⁸ In this method, a known amount of HCl solution (0.02 equiv-g/l) is added, in excess, into a solution containing a known quantity of chitosan, allowing enough time to protonate all available group (such as amino groups). In sequence, the resulting solution is then titrated using 0.01 equiv-g/l solution of NaOH. A titration curve was obtained and analyzed.

Atomic force microscopy (AFM) was used for measurements of topographical morphology of chitosan-dense membranes after contact with conventional SBF after 12 h. The technique has advantages over scanning electron microscopy (SEM), in that it is able to capture morphological details. An Autoprobe CP (Park Scientific Instruments, Santa Barbara, CA) was used, employing the noncontact technique. IP version 2.0 software was used to analyze the data.

III. RESULTS

On chitosan membranes, calcification could be observed after a 7-day period in solutions with pH = 7.4 or 7.8.

The morphology of deposits on chitosan membranes was very different from those observed on precipitates

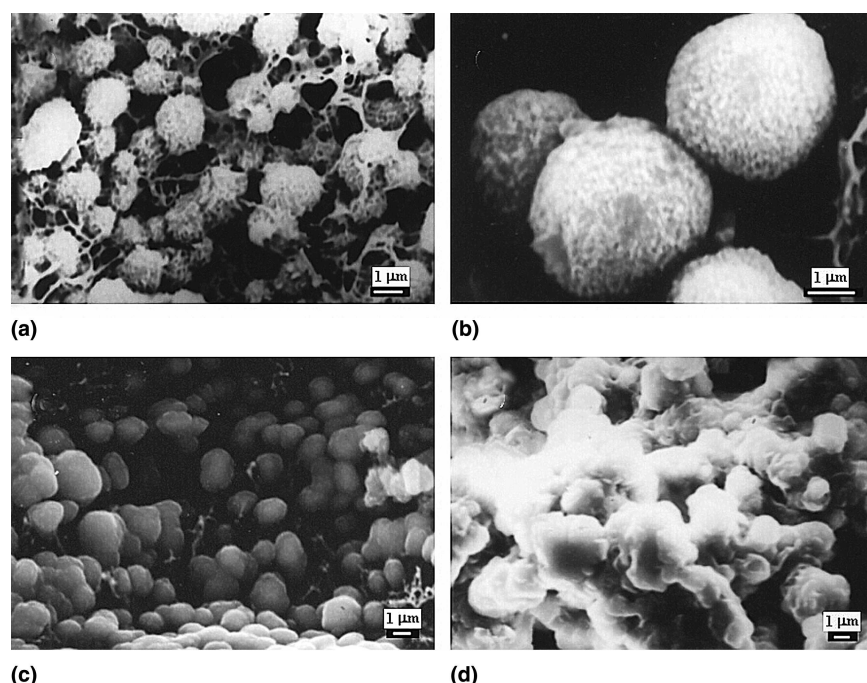


FIG. 1. Scanning electron micrographs of surfaces of porous chitosan membranes (a) calcified at pH 7.8 with excess of phosphate ions; (b) calcified at pH 7.8 with excess of calcium ions; (c) calcified at pH 7.8; and (d) precipitates formed in SBF solution in the absence of a chitosan substrate in the solution at pH 7.8. Bars correspond to 1 μm .

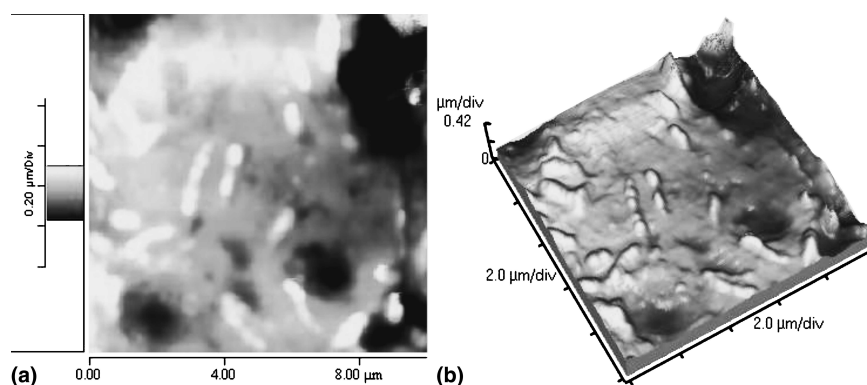


FIG. 2. Surface observed by AFM on chitosan film surface after 12 h of contact with SBF.

TABLE III. Ca:P molar ratios of deposits (obtained at pH 7.8) determined by EDS (average of 10 values).

Specimen	Ca:P molar ratio
Sol-gel precipitate	2.01
Porous membrane	1.67
Porous membrane with calcium ion excess	1.73
Porous membrane with phosphate ion excess	1.46

TABLE IV. Percentage of protonable groups (amino groups) available in porous chitosan membranes pre- and post-calcification.

Specimen	% of protonable groups
Before calcification	85.1
After calcification at pH = 7.8	40.3
After calcification with calcium ion excess	36.5
After calcification with phosphate ion excess	31.5

formed in SBF solution in the absence of a chitosan substrate in the solution, without the presence of an organic matrix. The former presented sphere-shaped deposits, also observed by other authors,⁹ while the latter did not have a well-defined shape. This fact stresses the existence of influence by matrix on the process of mineralization (Fig. 1).

The deposits formed under calcium ion excess presented a large spherical shape (~4 μm diameter) with poor interconnectivity, while those formed under phosphate ion excess presented a more irregular shape, a smaller size, and a better interconnection with the matrix.

Figure 2 depicts chitosan dense membranes after treatment in SBF solution for 12 h. The surface presented irregular topography, in contrast to pristine membranes, indicating the presence of significant amounts of deposits on membranes, using SBF solution for 12 h. This result indicated the early stages of calcification, showing that 12 h is enough to promote nucleation of deposits over the film surface.

From the x-ray (EDS) microprobe (used with SEM), the average curve of at least 10 measurements produced

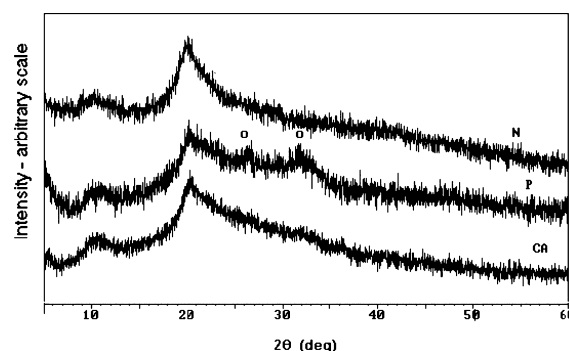


FIG. 3. X-ray diffractograms of porous chitosan membranes after calcification: N, normal salt concentration in calcification solution; P, phosphate ion excess in calcification solution; CA, calcium ion excess in calcification solution. The circle marks show the reflections at 26° and 31° found in poorly crystalline apatites.

the values depicted in Table II. The Ca:P ratios are very close to those found in apatites (Table III). The Ca:P ratios were very diverse in the excess of calcium or phosphate ion. This indicates that the deposition occurs in different manners, because different chemical species are present in the solution used for the calcification process.

Potentiometric titration results (Table IV) show that, after calcification, protonatable group quantity is sensitively decreased, which means that this process turns protonatable groups, such as amino groups, unavailable. With higher phosphate ion concentrations, this blockage is more intense, which may be associated with the higher interaction of the matrix with deposits.

X-ray diffractograms are depicted in Fig. 3. They show that all deposits are poorly crystalline, similarly to the majority of biological apatites found in nature. All diffractograms are sensitively more noisy than normal, because the porous membrane surfaces are rough. Quantitative determination of crystallinity was not performed on XRD data. Quantitative analysis would be suitable for samples where compositions are well defined (how much surface is covered by deposits and how much only exhibits chitosan). In XRD technique, the counts of x-ray

detection that form the intensity axis depend on the crystallinity and also on the quantity of this material, if it is within a mixture. The surface of calcified chitosan can be interpreted as a mixture of chitosan and deposits and hence, quantitative data regarding crystallinity is difficult to achieve. All comparisons were qualitative; the samples in Fig. 3 exhibit different patterns for diffractograms.

Natural chitosan usually presents signals at $2\theta = 10.4^\circ$, 19.6° , and 21.4° , which correspond to the reflections of the (200), (020), and (220 and 202) planes.^{10,11} The literature postulates that water molecules are weakly bonded to chitosan chains in the (010) direction and that, when samples are thermally treated, in addition to the reduction of the (020) reflection, a new peak at 15.1° appears. The peak at (020) depends on the water content and tends to decrease in dried samples. The diffractogram in Fig. 3(a) shows absence of the (020) peak, reflecting the effective free-drying process that the sample underwent. Figure 3(c) shows that, although the sample is covered by calcification, the diffractogram does not show any significant orientation of samples treated in Ca rich-SBF. In contrast, Fig. 3(b), at a higher phosphate ion concentration, presents reflections at 26° and 31° , typical of amorphous apatites with a minimum of orientation at 002, 141, 122, and 300 planes.

Crystallinity results suggest two different sources: the higher intensity of calcification under these conditions or the higher crystallinity of deposits under the same conditions.

In our case, the SBF used had a carbonate concentration that was slightly higher than conventional SBF (4.8 versus 4.2 mM). Some studies^{12,13} have pointed out that apatite obtained from conventional SBF is different to that of bone apatite in composition and structure, due to the higher Cl^- and lower HCO_3^- concentrations of SBF compared to blood plasma. Apatite, similar to bone, was obtained just when the HCO_3^- concentration was equal to that in human blood plasma by controlling the ambient CO_2 partial pressure. Due to this observation, many authors have produced new kinds of SBF to increase the potential of SBFs to biomimic the formation of bone apatite. Oyane et al.¹⁴ have used many experimental techniques to improve SBFs. In our case, we decided to use the SBF of Mucalo et al.⁷ According to Bayraktar and Tas,¹⁵ biological apatites mainly differ from the synthetically produced calcium hydroxyapatites in carbonate ion content, which is expressively lower in the latter. SBF may be considered to biomimic apatite formation, by increasing the carbonate contents of SBF. The low levels of carbonate ions in blood are suitable for very long aging processes, but not for bench and quicker processes. Some authors¹⁵ have incorporated carbonate ions intentionally in the deposits from SBF to better biomimic bone hydroxyapatites. In our case, even knowing that the deposits comprised poorly crystalline calcium com-

pounds, the morphology and composition of the obtained inorganic phase is not a rigorous replication of apatites found in bone.

IV. DISCUSSION

Calcification under excess of calcium or phosphate ions produced different deposits regarding morphology (interconnectivity with matrix) and composition. This indicates that deposition occurs in diverse manners for both cases. We will now discuss the key elements that support this statement.

A. Mineralization

In biomineralization, inorganic precipitates are formed under the full control of an organic matrix. This control comprises the manipulation of the local concentration of the precipitants, the presence of nucleating surfaces or groups, and the presence of inhibitors in solution, which can bind to specific faces of the growing material. Thus, particle shape, size, and orientation are regulated by the matrix, allowing a much greater control of particle morphology and distribution than would conventional sol-gel blending and deposition methods. It was initially thought that this control was mainly exercised through lattice-matching epitaxy between the protein or polysaccharide matrix and the mineral.¹⁶

As particles become finer, colloidal forces become relatively more important, and it becomes more difficult to avoid agglomeration. However, the presence of a surface-binding macromolecule (on matrix) may stabilize small crystals that would normally be metastable.¹⁷

Crystal growth is traditionally divided into two stages: nucleation and growth. During growth, the energy of crystal or cluster decreases continuously. During nucleation, and the high surface-to-volume ratio, the cluster becomes increasingly more stable than the surrounding solution.

B. Nucleation

In our case, because the matrix is the same for both pseudo-SBFs, all observed differences are probably due to differences in solution composition as a primary cause.

An organic surface may play many roles in promoting mineral deposition: physisorption of ions and small precipitates, orientation of crystal lattices, preferential deposition, and heterogeneous nucleation. The latter is the least studied and least understood. The oriented deposition of a mineral on a surface is often accredited to heterogeneous nucleation, but this may not be so. Some cases have shown that the forces involved in physisorption of colloidal particles are sufficient to cause stabilization of the mineral phase and orientation of crystals.

It is not surprising that most mineralization studies prioritize the use of lower pH condition to evaluate the matrix influence. The difficulty in distinguishing whether the effect of the organic matrix comes from the ability to promote heterogeneous nucleation or from the ability to orient growth of homogeneously formed nuclei, justifies higher pH avoidance.

Our results show that even in conditions where spontaneous precipitation can occur (pH 7.8), there is a significant influence of matrix in the deposition. In our case, this can be observed in deposit morphology and composition. Figure 1 shows well-defined shape (sphere-like) for deposits where chitosan was present. These ball-like particles were constituted by substructures like crystallites. This kind of structure has already been reported in the literature. Liu et al.¹⁸ reported it as apatite, Landi et al.¹⁹ reported them as Mg- and CO₃-substituted apatites. It is interesting to note that needle-like apatite is one of the main components of natural bone and teeth, while plaque-like calcium carbonate is the main constituent of shells. Many authors have obtained similar structures synthetically and most of the situations where these similar structures occur involved a mechanism of nucleation that should be controlled. Hence, the substrate and the supersaturated environment played key roles.²⁰

Another remarkable finding on matrix influence is demonstrated by Ca:P ratios: in serum as well as in the simulated body fluids, the Ca:P ratio is 2.5. The precipitates formed spontaneously (homogeneous nucleation) present a Ca:P ratio of nearly 2. However, deposits formed on chitosan show values close to those found in apatites (1.5–1.7).⁷

Nucleation thermodynamics has been reviewed many times in the literature and it is known that, assuming a hypothetical spherical-cap shape for nuclei, the free energy for formation of critical nucleus follows the relationship given in Eq. (1),¹⁶ where $\Gamma(\theta)$ is only a function of the contact angle between the spherical cap nucleus and the substrate. This concept is very important, as it shows that the energy required for heterogeneous nucleation depends on the interaction between deposit and matrix

$$\Delta G_{\text{heterogeneous}} = \Delta G_{\text{homogeneous}} \cdot \Gamma(\theta) \quad (1)$$

The matrix can lower the nucleation activation energy, decreasing the energetic barrier to the spontaneous formation of a solid phase from a supersaturated solution. It is known that this kinetic constraint may be enough to counterbalance the thermodynamic driving force favorable to precipitation, resulting in solutions that remain metastable without presenting any phase change during long periods of time.

In addition, nucleation is only viable at a critical cluster size, which is directly proportional to the ratio (ΔG_S)/(ΔG_B). The activation energy for nucleation (ΔG_N) is

related to the previously mentioned energetic quantities by Eqs. (2) and (3), where k is the Boltzmann constant, T the temperature, and S is the relative supersaturation of the medium

$$\Delta G_N = \frac{16\pi(\Delta G_S)^3}{3(\Delta G_B)^2} \quad (2)$$

$$\Delta G_B = kT \ln S \quad (3)$$

This means that, by lowering the interfacial energy or increasing the supersaturation of the medium, the activation energy for nucleation can be decreased. It is then logical to say that higher pH values would promote quicker calcification due to the fact that calcium compounds are poorly soluble in water solutions when alkalinity increases.

Supersaturation can also be controlled by the surface-near surrounding solution composition and interfacial energy can be lowered by the presence of organic surfaces at the nucleation site. These macromolecules can act primarily as spatial boundaries where ions are transported to produce supersaturated regions.

In this study, the organic surfaces used for both calcium-rich and phosphate-rich experiments were the same, and were prepared in the same manner, however, the supersaturation conditions were different for both cases (Table IV).

It is known that the solubility of calcium compounds usually plays an important role in systems where deposits are formed within a solution. The significance of the calcium and phosphate ion concentration has been known for many years. Solubility diagrams, such as those drawn by Brown²¹ and his related U.S. patent, show the behavior of calcium phosphate phases in multicomponent systems. Aoba and others²² also refer to the effect of calcium and/or phosphate concentration on the formation of biological apatites and their regeneration in dental caries. Both studies show that the change in calcium and phosphate amount in the system, leads to a specific equilibrium with diverse composition. In our case, it would be expected for the P-rich SFB to produce an equilibrium point that is different from Ca-rich SBF. Further refinement of stoichiometry and solubility parameters will be essential for evaluating the driving force

TABLE V. Theoretical maximum concentration (in M) of a precipitate with specific Ca:P ratio formed in P-rich and Ca-rich SBF.

	[Ca ²⁺]/[HPO ₄ ²⁻]	Theoretical maximum concentration (in M) of a precipitate with	
		Ca:P = 1.67	Ca:P = 1.73 and 1.46 (Table II)
P-rich SBF	3.75/3.0	2.2	2.2
Ca-rich SBF	7.5/1.5	1.5	1.5

for mineralization (or demineralization) in the fluid environment, however, a rapid assessment of SBF values are valuable for our analyses. According to Brown, the stability region for hydroxyapatite includes compositions that have Ca:P ratios between 1.5 and 1.67. Calcium-deficient hydroxyapatite forms a stable invariant point with CaHPO_4 and a metastable invariant point with $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. There is still much controversy about the dissolution of hydroxyapatite in water. According to Christoffersen,²³ the dissolution of hydroxyapatite in water produces a [P] concentration of about 0.4×10^{-4} M; hence, it is clear that SBF is remarkably supersaturated for hydroxyapatite, and much more for P-rich SBF, if simple stoichiometry is taken into account. Theoretically, hydroxyapatite has a lower solubility in water than any other calcium phosphates; in other words, it is the most stable calcium phosphate in aqueous solutions.²⁴ Because the carbonate ion is present, it is expected that carbonated apatite formation would be viable. As a reference, calcium carbonate (CaCO_3) solubility at 20 °C in water is 0.066 mM and $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ is 0.0039 mM,²⁵ which also indicates the high supersaturation for calcium compounds in the SBFs used.

For heterogeneous nucleation, it is believed that, because the chemical bonding at the surface of mineral nuclei is primarily ionic, the organic interface must contain areas with high local energy, where electrostatic, dipolar, or hydrogen bonding interactions can take place during nucleation. As an example, the bone minerals formed on collagen fibrils have been attributed to acid sites.²⁶

Other substrates have had their nucleating ability in SBF investigated. Silica, for example, has functional silanol groups ($-\text{Si}-\text{OH}$), some of which are dissociated into negatively charged units ($-\text{Si}-\text{O}-$) at around pH = 7. These negatively charged groups played important roles as nucleating groups.^{27,28} According to these studies, when nucleation is controlled, needle-like apatite forms, organized in clusters, producing results that are very similar to chitosan substrates results regarding morphology and composition. In our case, at pH 7.8, chitosan has the majority of its amino groups present in the non-protonated form, not presenting many charged groups. However, the chitosan amino groups have some potential for interactions with the ions in solution through the pair of electrons disposed by nitrogen present in these groups that can become a nucleophilic center attracting some cations as calcium, probably acting similarly as the negatively charged SiO groups of silica and thus becoming nucleating centers. This interaction has been described many times in the literature.^{29,30} These groups should in that case present a favorable preorientation and spatial arrangement to become local binding sites on the matrix.

Excessive binding capacity, on the other hand, may be negative for deposition. Mann cites three aspects that

influence the interaction and recognition process between organic and inorganic phases: electrostatic accumulation (ionotropic effect), structural correspondence (epitaxy), and stereochemical requirement.³¹

The ionotropic effect is the most feasible explanation for the fact that some macromolecules¹⁶ bind calcium ions in stoichiometries, often exceeding the number of potential anionic binding sites on the substrate. In this concept, the accumulation of a charge at surface (anionic) sites would begin by primary anion binding, generating a loosely associated cation-coordination sphere that, in turn, attracts a secondary cation-coordination sphere. High capacity and low binding affinity are critical for controlling nucleation: a matrix with high calcium affinity would probably inhibit nucleation, since the strong binding effect would cause the ion to become inactive. On the other hand, a high capacity is needed to provide local sufficient number of ions to overcome the critical nucleus size.

Chitosan showed to be a good substrate for deposition in the P-rich condition because x-ray diffractograms demonstrate a more crystalline phase. This fact stresses the influence of matrix in deposit orientation.

C. Growth

Growth will only happen if the energy released to bind ions in the bulk of solid (ΔG_B) overcomes the energy needed to form a new interface (ΔG_S).

A very important parameter for this analysis is the critical nucleus size. Particles larger than this size tend to grow, and those smaller than this size tend to redissolve. In addition, nucleus formation requires higher saturations than for deposit growth.

With respect to the concentration effect, and taking into consideration the high concentration of ions in pseudo-SBF (1.5× SBF), this process might not be limited by diffusional effects. Diffusional effects are usually present in dilute systems.

Nielsen³² has reviewed the crystal growth kinetics of salts and drew up rules that may be used to estimate rates in many systems. The major limit factor for crystal growth rates for salts containing different cations, is the loss of water of hydration from cations. In our case, we are talking about the same calcium cation. Most salts follow a square-law dependence of rate on supersaturation (salt concentration/saturation concentration).

In situations where growth is controlled by interface kinetics, the rate is dependent on supersaturation but not on the ratio of the two ions. On the other hand, if diffusion is under control, the rate is dependent on the ratio of the most dilute ion. Calcium carbonate systems have shown that ion pairing is not important but that it does affect the growth rate.³³

As seen in Fig. 1, the deposition on chitosan in the

excess of phosphate ions allows the occurrence of a process that results in a great interconnectivity between the organic and inorganic phases, presenting a lower particle size and larger number of nucleates. In contrast, the calcium-rich solution produced a lower number of larger spherical deposits.

The morphology of deposits shows that the P-rich solution presented a condition that allowed easier nucleation when compared to a Ca-rich situation. Considering the hypothesis that the critical nucleation size is the same for both situations, this fact may be supported by the finding that the nucleation activation energy can be lowered by a higher supersaturation level. The activation energy for P-rich solution was smaller because the supersaturation level was higher. This would have promoted a larger number of deposited nuclei. If we take the maximum concentrations of a precipitate with a Ca:P ratio of 1.67 (or those shown in Table II) that can be formed from Ca-rich and P-rich SBF (Table IV), the value in the latter condition is higher, indicating the supersaturation. However, the observation that Ca-rich solutions without the presence of chitosan demonstrated quicker spontaneous nucleation implies that the P-rich solution would be more metastable than the Ca-rich one.

This interpretation, from a thermodynamic point-of-view, raises two possibilities: (i) that the P-rich deposit has a much better interaction with the matrix than the Ca-rich deposits, i.e., $0 < \Gamma(\theta)_{\text{P-rich}} < 1.0$ and lower $\Gamma(\theta)_{\text{P-rich}} < \Gamma(\theta)_{\text{Ca-rich}}$. This would allow heterogeneous nucleation with higher interconnectivity; (ii) another possibility is that the Ca-rich condition has a larger critical nucleation size than in the P-rich case. This would privilege the growth of nuclei through the incorporation of ions from solution to the bulk of the preformed inorganic nuclei, rather than the generation of more nuclei.

In our case, if the diffusional effect were important for crystal growth, the size would be dependent on the ratio of the most dilute ion, which would be phosphate in both cases, and with a lower rate in the case of the Ca-rich solution. We can see that the deposit sphere size indicates a better growth of the Ca-rich deposit than the P-rich deposit.

Kokubo³⁴ reported that the control of the apatite formed on silica is directly related to Ca:P ratio in the fluid. The author discusses that this is probably due to the fact that the Ca:P ratio varies especially close to the frontier of apatite and fluid. At an interface where there is lower quantity of available Ca ($\text{Ca/P} < 1.5$), the author found a more granulated geometry, while in excess of Ca, a more flaked morphology in precipitates was observed. This morphology is not in agreement with those found in the present study; however, these authors suggest that the Ca:P ratio of calcification fluid is a very important factor when the diffusional effect is present and that the saturation concentration is very important for the determina-

tion of the nucleation/growth process and, eventually, the morphology and composition of formed phases.

There are basically two theories regarding matrix influences in mineralization: (i) deposition depends on the matrix chemical nature (Kokubo⁵) and (ii) in vivo calcification (such as osteoconduction) is mainly dependent on the micromechanics of the surface rather than the chemistry (Davies⁶).

In the present study, we may observe that as since the substrates were the same, the chemical interaction clearly becomes a very important factor in in vitro deposition, because the calcification solution composition and the pH of the fluid used for experiments interfered in deposit characteristics.

V. CONCLUSION

The calcification in varying P and Ca concentrations in solution demonstrated results that were in accordance with the theory of crystal nucleation and growth. Phosphate-rich pseudo-SBF presented a higher supersaturation level and showed the formation of a better-oriented inorganic phase, which was well-connected to the matrix surface. Calcium-rich pseudo-SBF provided conditions for the formation of large spherical deposits, where more intense growth was observed rather than nucleation.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank CNPq and FAPESP for financial support.

REFERENCES

1. M.M. Beppu and C.C. Santana: Influence of calcification solution on in vitro chitosan mineralization. *Mater. Res.* **5**, 47 (2002).
2. Y. Pathak, F.J. Shoen, and R.J. Levy: Pathologic calcification of biomaterials, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, edited by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, and F.J. Schoen (Academic Press, San Diego, CA, 1996), p. 272.
3. P.A. Sandford: Chitosan: commercial uses and potential applications, in *Chitin and Chitosan*, edited by G. Skjaek-Braek. (Elsevier Applied Science, New York, 1989), p. 51.
4. M.M. Beppu and C.C. Santana: Influence of acetylation on in vitro chitosan membrane biomineralization. *Key Eng. Mater.* **31**, 192 (2001).
5. T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 331 (1990).
6. J.E. Davies: Mechanisms of endosseous integration. 1st COLAOB Conference, Belo Horizonte, Brazil, 1998.
7. M.R. Mucalo, M. Toriyama, Y. Yokogawa Y, T. Suzuki, Y. Kawamoto, F. Nagata, and K. Nishizawa: Growth of calcium-phosphate on ion-exchange resins pre-saturated with calcium or

- hydrogenophosphate ions—an SEM/EDX and XPS study. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* **6**, 409 (1995).
8. J. Ren and C. Jiang: Transport phenomena of chitosan membrane in pervaporation of water–ethanol mixture. *Sep. Sci. Technol.* **33**, 517 (1998).
9. G. Golomb and D. Wagner: Development of a new in vitro model for studying implantable polyurethane calcification. *Biomaterials* **12**, 397 (1991).
10. H. Saito, R. Tabeta, and K. Ogawa: High-resolution solid-state ^{13}C NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs conformational-dependent ^{13}C chemical shifts. *Macromolecules* **20**, 2424 (1987).
11. K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, and T. Watanabe: A new polymorph of chitosan. *Macromolecules* **17**, 973 (1984).
12. H.M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and T. Nakamura: Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products. *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 228 (1999).
13. H.M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and T. Nakamura: Composition and structure of apatite formed on organic polymer in simulated body with a high content of carbonate ion. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* **11**, 421 (2000).
14. A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H.M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura: Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 339 (2003).
15. D. Bayraktar and A.C. Tas: Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37 °C in urea-containing synthetic body fluids. *J. Eur. Ceram. Soc.* **19**, 2573 (1999).
16. P. Calvert and P. Rieke: Biomimetic mineralization in and on polymers. *Chem. Mater.* **8**, 1715 (1996).
17. A. Keller, M. Hikosaka, S. Rastogi, A. Toda, P.J. Barham, and G. Goldbeck-Wood: An approach to the formation and growth for new phases with application to polymer crystallization: Effect of finite size, metastability, and Ostwald's rule of stages. *J. Mater. Sci.* **29**, 2579 (1994).
18. X. Liu and C. Ding: Morphology of apatite formed on surface of wollastonite coating soaked in simulate body fluid. *Mater. Lett.* **57**, 652 (2002).
19. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, R. Langenati, M. Sandri, and S. Sprio: Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: Dense and porous scaffold development. *Biomaterials* **26**, 2835 (2005).
20. W. Hölland, V. Rheinberger, and M. Frank: Mechanisms of nucleation and controlled crystallization of needle-like apatite in glass-ceramics of the $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--K}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5$ system. *J. Non-Cryst. Solids* **253**, 170 (1999).
21. P.W. Brown: Phase relationships in the ternary system $\text{CaO--P}_2\text{O}_5\text{--H}_2\text{O}$ at 25 °C. *J. Am. Ceram. Soc.* **75**, 17 (1992).
22. T. Aoba: Solubility properties for human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis.* **10**, 249 (2004).
23. J. Christoffersen, J. Dohrup, and M. Christoffersen: Kinetics of growth and dissolution of calcium hydroxyapatite in suspension with variable calcium to phosphate ratio. *J. Cryst. Growth* **186**, 275 (1998).
24. M.S. Tung: *Calcium Phosphate in Biological and Industrial System* (Kluwer Academic Publishers, Hingham, U.K., 1998), p. 1.
25. *Handbook of Chemistry and Physics*, 2003, edited by David R. Lide (CRC Press, Boca Raton, FL), p. 4.
26. S. Weiner and W. Traub: Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB J.* **6**, 879 (1992).
27. K.H. Karlsson: Bone implants—a challenge to materials science. *Ann. Chir. Gynaecol.* **88**, 226 (1999).
28. H. Takadama, H.M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura: Mechanism of biomineralization of apatite on a sodium silicate glass: TEM-EDEX study in vitro. *Chem. Mater.* **13**, 1108 (2001).
29. M. Rahzi, J. Desbrières, A. Tolaimate, M. Rinaudo, P. Vottero, A. Alagui, and M. El Meray: Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste. *Eur. Polym. J.* **38**, 1523 (2002).
30. T. Tianwei, H. Xiaojing, and D. Weixia: Adsorption behaviour of metal ions imprinted chitosan resin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 191 (2001).
31. S. Mann: Biomineralization and biomimetic materials chemistry. *J. Mater. Chem.* **5**, 935 (1995).
32. A.E. Nielsen: Electrolyte crystal growth mechanisms. *J. Cryst. Growth* **67**, 289 (1984).
33. A.E. Nielsen and J.M.J. Toft: Electrolyte crystal growth kinetics. *J. Cryst. Growth* **67**, 278 (1984).
34. P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, and K. de Groot: Introduction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids on sol-gel prepared silica. *Biomaterials* **14**, 963 (1993).

Brief notes

Chitosan membrane with patterned surface obtained through solution drying

Marco A. Torres^a, Cassiano G. Aimoli^a, Marisa M. Beppu^{a,*}, Jaime Frejlich^b^a School of Chemical Engineering, State University of Campinas, Campinas, CEP 13083-852, Brazil^b Gleb Wataghin Physics Institute, State University of Campinas, Campinas, CEP 13083-970, Brazil

Received 4 March 2005; received in revised form 11 June 2005; accepted 6 July 2005

Available online 26 August 2005

Abstract

Chitosan membranes with self-organized lines on surface were obtained. SEM and laser diffraction techniques showed that structures with peak-valley periods of about $5 \pm 2 \mu\text{m}$ were observed in both porous and dense chitosan membranes. These unique patterns may be of special interest for applications where micro-mechanical interactions are important such as for biomaterials. The procedure used to produce these membranes consisted of casting, drying of a 2.5% chitosan solution, followed by coagulation using 1.0M NaOH solution. The analyses indicate that the drying step is the most important to shape the organized surface pattern. This is in agreement with literature that cites that when layers of polymer solutions undergo solvent evaporation and/or heating from below, the interface can become unstable, generating patterns, depending on the surface tension differences and density effects, fluid motion can be generated and amplified, through the known Marangoni effect.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Interface; Membranes; Transient response; Chitosan; Marangoni effect

1. Introduction

The ability of chitosan to be molded in several kinds of shapes is well known. Many researchers have prepared globules, micro-spheres, membranes and fibers using chitosan [1–7].

Some applications, such as in the biomaterial field require that the polymer present an engineered surface in the level of microns [8]. All phenomena involving attachments of macro-scale species on the surface requires well-defined micro-mechanical characteristics. In some cases the topography of surface is much more relevant for biological response than the chemistry of surface [9].

This fact increases the need of routes that can be used to obtain engineered surfaces. The more common ones are

surface encryption, chemical attack and supra molecular or molecular self-organization [10].

In this work we describe the obtention of self-organized chitosan membranes with periodic line structures at the surface.

2. Experimental

Chitosan was provided by Sigma ($M_w \sim 70,000$ and 85% deacetylated). All other reagents were analytical grade.

Chitosan was dissolved in a 3% (w/w) acetic acid/Milli-Q water solution and the gel was kept at 4 °C during a week. After filtration through Millipore glass filter, approximately 32 g of the 2.5% (w/w) chitosan solution was spread over a Petri dish (dimensions: internal diameter = 10.6 cm, external diameter = 11.2 cm, height = 2.0 cm), kept under vacuum until bubbles comes out of the solution and kept overnight (15 h) at 4 °C.

* Corresponding author at: Department of Thermofluidynamics, DTF-FEQ Unicamp, State University of Campinas, CP 6066 Barao Geraldo, Campinas, CEP 13083-852, Brazil. Tel.: +55 19 3788 3893; fax: +55 19 3788 3922.

E-mail address: beppu@feq.unicamp.br (M.M. Beppu).

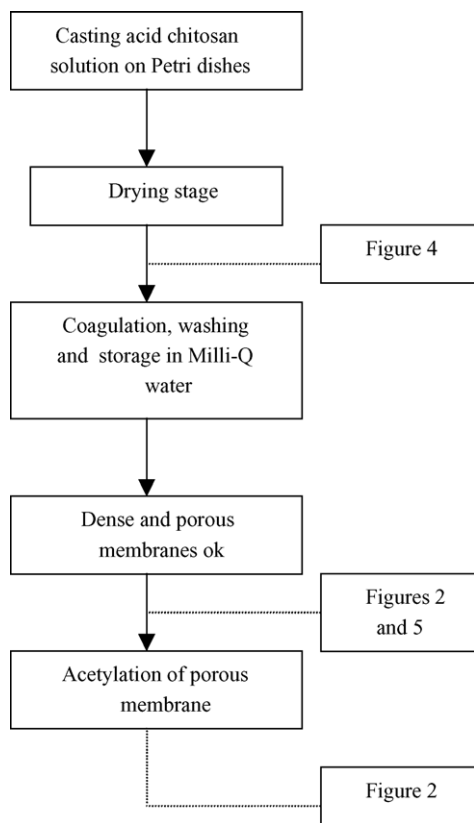


Fig. 1. Scheme showing as chitosan membranes were prepared and when the analyses were performed.

Chitosan membranes were prepared as shown in Fig. 1. The porous ones were prepared by casting acid chitosan solution on Petri dishes followed by solvent evaporation at 60 °C, during 5 h, until the solution reaches half of the initial weight. Dense chitosan membranes, were placed in a pre-heated oven at 60 °C, during approximately 8 h, until constant mass was reached.

In sequence, the Petri dishes containing the dried chitosan membrane were immersed in 1.0 M NaOH solution for coagulation during 24 h. The coagulation process is a step where the protonated amino groups are neutralized by a basic solution turning chitosan insoluble in water and, hence, promoting

the precipitation of polymer and giving dimensional stability to chitosan in the shape in which it is molded. Some chitosan membranes were not neutralized in NaOH solution for future comparisons.

The final appearance of porous membrane was a white, opaque film with ca. 2.0 ± 0.3 mm of thickness and the appearance of dense membranes was transparent, with ca. 0.5 mm of thickness.

In our laboratory, periodic lines on chitosan membrane surface were first observed on acetylated porous membrane, through SEM analysis (Fig. 2).

The acetylation was a treatment done on porous membranes to improve their mechanical resistance. The procedure consisted of immersion of membranes pieces (ca. 0.2 g) in a solution 0.3 ml of acetic anhydride in 49.7 ml of methanol, for 24 h at room temperature.

These porous membranes were freeze dried, coated with carbon and observed using SEM (Jeol JXA 840 scanning electron microscope).

Despite of the procedure of acetylation, observations on non-acetylated chitosan membranes showed the same morphology as the stripes shown in Fig. 2.

In order to verify if the neutralization/coagulation or the drying step is responsible for the patterned surface formation, analyses on dense membranes were performed.

Dense membranes were preferred to do this evaluation as it did not require any step of fixation (as the acetylation), just as the absence of solvent already gives the dimensional stability. Therefore, both dense membranes, just taken after solvent evaporation step or just after immersion in NaOH solution were dried at room temperature for observation by laser diffraction technique.

Fig. 3 depicts the experimental scheme of laser diffraction experiments, a direct 20 mW power He–Ne (633 nm wavelength) Uniphase Class IIIb 1135P laser beam was used. The laser beam was diffracted by an angle “alpha” thus allowing to compute the spatial period “theta” of the pattern at that point in the film by the well-known relation [11] in Eq. (1):

$$\theta = \frac{\lambda}{\sin \alpha} \quad (1)$$

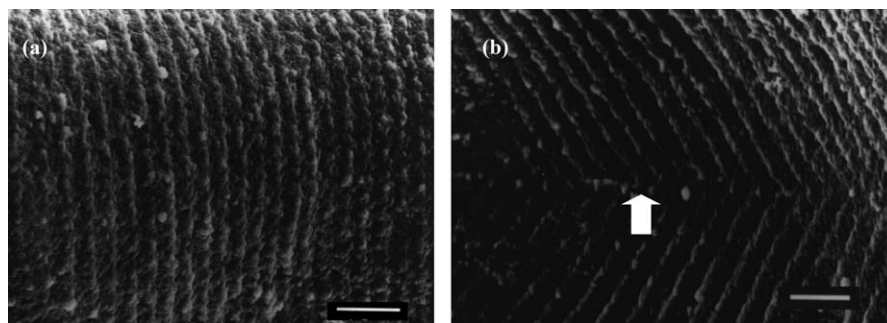


Fig. 2. Scanning electron micrographs of acetylated chitosan membrane surface. Arrow in (b) shows the junction line of two patterned region. Bars correspond to 10 μm.

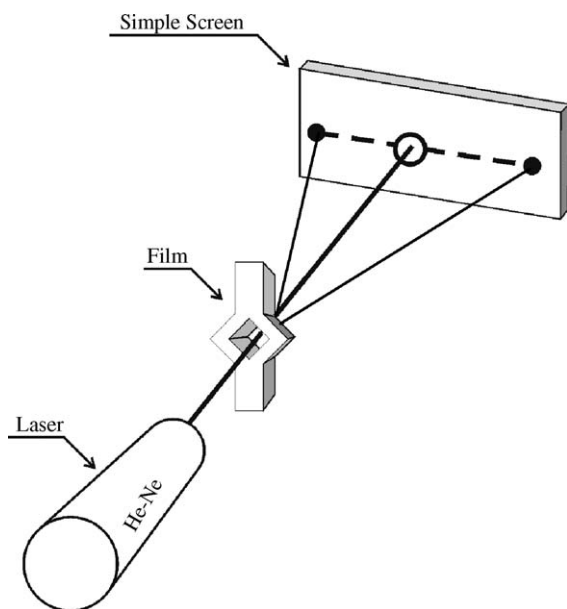


Fig. 3. Schematic representation of laser diffraction system.

where λ is the wavelength of the laser (632.8 nm), α the angle of the beam that was deviated from the incidence direction due to diffraction and θ is the distance between the periodic line structures.

The laser diffraction technique was applied just on dense membranes as it requires that the sample is transparent, which is not the case for porous chitosan membranes.

3. Results and discussion

The resulting solidified surface observed on both dense and porous membranes presented periodic line structures with peak-valley differences of about $5 \pm 2 \mu\text{m}$. The 3D surface profile can be observed in Fig. 2 and this pattern could be seen over very extensive areas on the membrane, always in the air–chitosan solution interface. There are also some regions where a junction of these patterns exists (Fig. 2(b)), creating some interesting “fishbone-like” design.

The diffraction patterns of dense membranes of chitosan observed after solvent evaporation and after coagulation, washing and drying at room temperature are shown in Figs. 4 and 5, respectively.

Both presented two parallel and equidistant satellites. The limits are clearly visible between the satellites. These are about 4 cm distant from the center. Hence, it is possible to calculate, with accuracy, the distance among periodic line structures, which were $7 \mu\text{m}$. This pattern was observed over extensive areas on the membranes, showing that it is a consistent and replicable phenomenon.

This fact allows us to infer that the drying step is probably the most important mass-transfer stage responsible for



Fig. 4. Diffracted pattern of a laser beam as observed at a perpendicular screen placed 50 cm behind the film. The large central spot is the transmitted beam whereas both symmetric smaller lateral spots are the diffracted beams produced by the periodic structure in the film at the point of incidence of the laser beam for dense membranes observed after drying step.

the formation of the pattern observed on chitosan membrane surfaces.

Literature usually explains how such dissipative structures are produced in many fluid–fluid systems.

Local variations in solute or polymer concentration at a fluid–fluid interface would cause a local increase or decrease of interfacial tension and thus, induce additional convection at the interface (so-called interfacial turbulence). When this convection is localized and segmented, it can often generate local flow patterns, leading to convection normal to the interface. Hence, it enhances interphase mass transfer, producing a phenomenon known as Marangoni effect [12,13]. Some diverse forms of phenomena in interphase



Fig. 5. Diffracted pattern of a laser beam in the same conditions above for dense membranes observed after solvent evaporation (drying step) and after coagulation, washing and drying at room temperature steps.

mass transfer were altogether named as Marangoni effect such as film marginal regeneration, localized eruption, kicking, drop pulsation and surface rippling [14].

In theory, these asymmetric films can form periodic structures at the surface after reaching critical values of concentration or temperature gradients. When a film of polymer solution is cast, the solvent evaporates and interfacial concentration gradients are formed. In function of these gradients, density and surface tension effects can induce to superficial flow that can, in turn, cause disturbances. These disturbances can disappear with time if the film is unstable or can be augmented if the film is unstable [15].

In our case, the small variations in the surface concentrations or temperature of the fluid film, caused by coupled heat and mass transfer processes, form the most appropriate explanation to the formation of the stripe-pattern on chitosan films. As shown in all analyses (MEV and laser diffraction), the drying step is the most important to form patterned structures. In this stage, it is very probable to have surface tractions and surface flow that reveals a Marangoni phenomenon for chitosan membranes. Drying could, hence, be a very simple way to produce engineered films for bio-technological application.

Being water and acetic acid the components that are transferred to the air, the unstabilization would occur as in the case showed in Fig. 6, upward flow. When the gradient zones are created, the surface tends to flow from the thinner to the thicker part producing a depression where the material flows off. With a rapid increase in the viscosity as the layer hardens, back flow is not permitted and the parallel-line-structure is created.

Surface tension effects, which consist in mass transfer in the form of movements of portions of the liquid due to changes in surface tension (associated to gradients of solute concentration or temperature), probably were viable in our system. Also, from Fig. 6, once the transferred species

(water and acetic acid) increase the upper phase (phase 1: air) and decreases density in the lower phase (phase 2: chitosan solution): $\rho_{\text{species}} > \rho_{\text{phase 1}}$, $\rho_{\text{species}} < \rho_{\text{phase 2}}$, when the mass transfer is down ward, the upper phase has an unstable density profile and density effects occur just in this phase. Otherwise, when the transfer is upward (our case), the lower phase has an unstable density profile and density effects occur. At the same time, the interphase mass transfer can cause local areas with lower surface tension due to variations in the polymer concentration or temperature. This fact causes an unbalance in the interface which induces additional mass transfer in some areas producing convection upward and downward to the surface. This movement causes the increase or decrease o some areas on the interface, generating the patterned topography in some surfaces, depending also on the viscosity of the solution.

The thermodynamic explanation for this effect is that the system seeks minimization of surface energy spreading the areas of low interfacial tension and reducing areas with high interfacial tension. During water and acetic acid transfer, local fluctuations of concentration and temperature cause interfacial tension gradients. When amplified, these fluctuations lead to a macroscopic interfacial convection.

Marangoni instability or convection is often associated with a temperature gradient and is rated in terms of the Marangoni number, Ma (Eq. (2)), defined as [16]:

$$Ma = -\frac{d\gamma}{dT} \frac{dT}{dz} h^2 \frac{1}{\eta\kappa} \quad (2)$$

The above definition is established in terms of a layer of liquid of depth h , where z is a distance normal to the surface and η and κ are the liquid viscosity and thermal diffusivity, respectively.

The critical Ma value for a system above which instability is found is around 50–100.

As an estimation, considering approximately $d\gamma/dT = 2 \text{ mN/K}$ (10 times more than pure water), $dT/dz = 3 \text{ K/mm}$, $h = 3 \text{ mm}$, $\eta = 5 \text{ N/m}^2 \text{ s}$ and $\kappa = 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ (comparable to most polymer solutions) while the solution is not hard, the calculated Marangoni produces a number of about 75, which is in the rage of the critical Ma numbers. Precise experimental measurements would help to have a more accurate calculation. As chitosan membrane surface hardens with drying, the patterned surface is fixed while $d\gamma/dT$ probably becomes higher. Further shrinkage with drying would reinforce the waved pattern.

In the present case, the higher thermals difference between the Petri dish surface and chitosan–air interface, higher Ma number. This would increase the importance of the step where the chitosan solution is cooled. Depth h also influences positively Ma number. Conversely, higher viscosity and thermal diffusivity would decrease the tendency of a surface to present interface instability.

Hence, as water and acetic acid evaporates ($d\gamma/dT$) (dT/dz)/ κ have to overcome the decrease of h^2/η term.

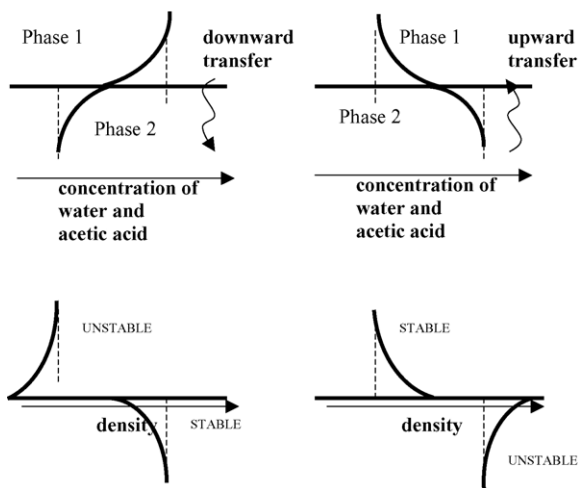


Fig. 6. Instability produced in chitosan–water–acetic acid/air interface.

Many models that are available to predict the occurrence of this phenomenon and also to calculate the size of stripes. These equations usually are obtained by analyses of momentum, heat and mass transfer phenomena, with assumptions and parameters that can not be easily and experimentally measured in our case [17–20].

For example, according to Kaminsky et al. [21], the dimension of pulsation l_0 , which in our case, would be the period of the ripples, is related to the turbulence energy dissipation ε_σ , dynamic viscosity μ and the velocity of fluid motion u_σ , when approximations of independence of energy due to bulk turbulence are taken (Eq. (3)):

$$\varepsilon_\sigma \sim \mu \left(\frac{u_\sigma}{\lambda_0} \right)^2 \quad (3)$$

This expression is a simple way to predict the dimension of periodic lines and more precise estimation of l_0 , would need a better idea of how flow occur within chitosan film, which is not the scope of this work.

The confirmation of viscosity, depth of solution and the temperature gradient importance to generation of the waves can be done to ensure the correct theoretical ranges for this effect in this specific system [22,23], even though, this work already evidence that Marangoni effect can be explored to optimize a route to get micro-mechanically engineered surfaces.

4. Conclusion

Marangoni effect can be explored to be used in preparation routes aiming the production of chitosan membranes and films with sculptured surface. This procedure, after further studies of the adequate ranges of concentration and mass transfer conditions, can be a very inexpensive and simple way to obtain engineered surfaces this biomaterial technological application. In our case this effect began presented during the partial-drying stage.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPESP for financial support.

References

- [1] M.M. Beppu, E.J. Arruda, C.C. Santana, *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 4 (1999) 163–169.
- [2] M.M. Beppu, C.C. Santana, *Key Eng. Mater.* 192 (2001) 31–34.
- [3] M. Gingras, I. Paradis, F. Berthod, *Biomaterials* 24 (2003) 1653–1661.
- [4] K.L. Shantha, D.R.K. Harding, *Carbohydrate Polym.* 48 (2002) 247–253.
- [5] E.B. Denkbaz, E. Kiliçay, C. Birlikseven, E. Öztürk, *React. Funct. Polym.* 50 (2002) 225–232.
- [6] H. Ping, S.S. Davis, L. Illum, *Euro. J. Pharm. Sci.* 4 (1996) 173.
- [7] Y. Wan, K.A.M. Creber, B. Peppley, V.T. Bui, *Polymer* 44 (2003) 1057–1065.
- [8] P. Fratzl, *J. Biomech.* 37 (2004) 1465.
- [9] J.E. Davies, *Bone Engineering*, Em Squared Inc., Canada, 2002.
- [10] A. Lakhtakia, *Mater. Sci. Eng. C* 19 (2002) 427–434.
- [11] F. Jenkins, H. White, *Fundamentals of Optics*, McGraw-Hill Book Co, Singapore, 1981 (Chapter 25).
- [12] L.E. Scriven, C.V. Sternling, *Nature* 187 (1960) 186–188.
- [13] V.G. Levich, *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1962.
- [14] Z.S. Mao, J. Chen, *Chem. Eng. Sci.* 59 (2004) 1815–1828.
- [15] L. Weh, *Mater. Sci. Eng. C* 8 (1999) 463–467.
- [16] W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley and Sons, New York, 1990 (Chapter 10).
- [17] R. Tsekov, H.J. Schulze, B. Radoev, Ph. Lethocart, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 142 (1998) 287–294.
- [18] E.F. Skurygin, V.V. Dil'man, *J. Food Eng.* 43 (2000) 125–131.
- [19] A. Oron, R.J. Deissler, J.C. Duh, *Adv. Space Res.* 16 (1995) 83–86.
- [20] N. Zhang, D.F. Chao, *Int. Commun. Heat Mass Transfer* 26 (1999) 1081–1090.
- [21] V.A. Kaminsky, A.V. Vyaz'min, N.N. Kulov, V.V. Dil'man, *Chem. Eng. Sci.* 53 (1998) 3347–3353.
- [22] A. Guzum-Stoica, M. Kurzeluk, O. Floarea, *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 3813–3816.
- [23] A. Madronero, C. Merino, *Mater. Res. Bull.* 33 (1998) 1503–1515.

Influence of Acetylation on *In Vitro* Chitosan Membrane Biomineralization

Marisa Masumi Beppu¹ and Cassiano Gomes Aimoli²

¹ Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, Campinas SP 13083-970, Brazil, beppu@feq.unicamp.br

² Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, Campinas SP 13083-970, Brazil, c008313@dac.unicamp.br

Keywords: Chitin, chitosan, biomineralization, calcification, acetylation.

Abstract. In a previous work of this research group, we studied the *in vitro* calcification of dense and porous chitosan membranes. Chemical modifications had been promoted, but further investigations were needed to better understand the role of some chemical groups in the process of calcification. In the present study, we proposed the acetylation of the already-molded chitosan membranes, producing a “pseudo-chitin”, to be used in calcification. The acetylated chitosan was submitted to mineralization by soaking the membranes in simulated body fluids (SBF) with 1x and 1.5x the concentration of ions found in human serum, for 7 days at 36.5°C. Morphological characterization was performed using SEM and compositional analyses were done using SEM-EDX and FTIR-ATR techniques. The results showed that acetyl groups induce calcification, forming deposits that present a Ca:P ratio different of those formed on pristine chitosan.

Introduction

Chitosan is recently being appointed in many studies as a promising biomaterial. A sub-area of application that deserves attention is the use of chitosan as organic matrix to produce biocomposites through biomimetic processes.

The biomimetic process is an alternative of ceramic synthesis that avoids usual difficulties found in sol-gel processes such as particle aggregation. In these processes, the inorganic phase is obtained under an organic matrix control, which regulates the shape, size and orientation of deposits and hence determines the structural and mechanical characteristics of the final material [1]. For application of these processes in the biomaterial field, there is still a need to better understand how to control mineralization as it may be wanted in some uses, such as in osteogenic implants, or completely undesired in others, as it is the major reason for some medical device failure, such as in cardiac devices.

This laboratory has been studying chitosan as a potential biomaterial and for bioseparation processes since 1997. Previous studies have appointed that some chemical treatments, such as crosslinking with glutaraldehyde, PAA adsorption, etc, on chitosan changed the way it induces *in vitro* calcification [2-4].

In this work we expanded the investigation, proposing the acetylation of the already-molded chitosan membranes, producing a “pseudo-chitin”, to be used in calcification. This modification was inspired in the fact that chitin, along with calcium carbonate, produces nacre, one of the most resistant biocomposites found in nature. This treatment would allow increasing the n-acetyl groups of organic matrix without losing the moldability of chitosan. The membranes underwent a calcification process and the deposits were analyzed chemical and morphologically.

The results would allow us to compare the differences between a highly acetylated chitosan and a deacetylated chitosan or, in other words, the influence between amino and acetyl groups in biomineralization.

Methods

Dense and porous membranes were obtained by coagulation of an acidic chitosan solution, using a basic solution. These membranes were chemically modified by immersion into a 0.6% methanol-acetic anhydride (v/v) solution for 24h [5]. The membranes were then washed and kept in Milli-Q water at 4°C. After this process, the membranes presented a reduction in area and solubility in acidic solutions. Potentiometric titration and thermal analyses (DSC and TGA) were conducted to check the blockage of amino groups.

In vitro calcification experiments were done as follows: the substrates were soaked in simulated body fluids (SBF) with 1x and 1.5x the concentration of ions found in human serum, during 7 days at 36.5°C. Effects of pH, calcifying medium composition and physical (porosity, permeability) and chemical characteristics of substrates on calcification quality and degree were observed.

Morphological characterization was performed using SEM and compositional analyses were done using SEM-EDX on deposits and FTIR-ATR techniques on chitosan films.

Results and Discussion

It was observed from titration results that acetylation was promoted extensively on chitosan membranes. Potentiometric titration showed that pristine chitosan presented a deacetylation degree of 81% and that 24h-acetylated chitosan (pseudo-chitin) presented a near-zero value for deacetylation.

FTIR-ATR spectra in Fig.1 indicate that the chains on the membrane surface are acetylated within minutes of reaction. The reaction causes a retraction of membranes probably due to the change in solubility.

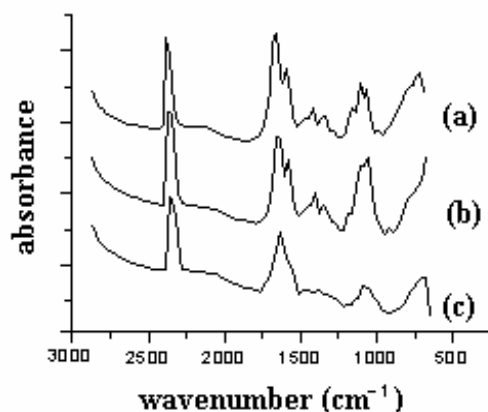


Fig. 1- FTI-ATR spectra of (a) 24-hour-acetylated chitosan (b) 2-min-acetylated chitosan (using 0,03 ml acetic anhydride in methanol) and (c) natural chitosan.

24h-acetylated chitosan (pseudo-chitin) underwent calcification. After a 7-day-period, extensive calcification could be observed and the morphology of deposits was different from those observed on precipitates obtained by sol-gel process, without the presence of an organic matrix.

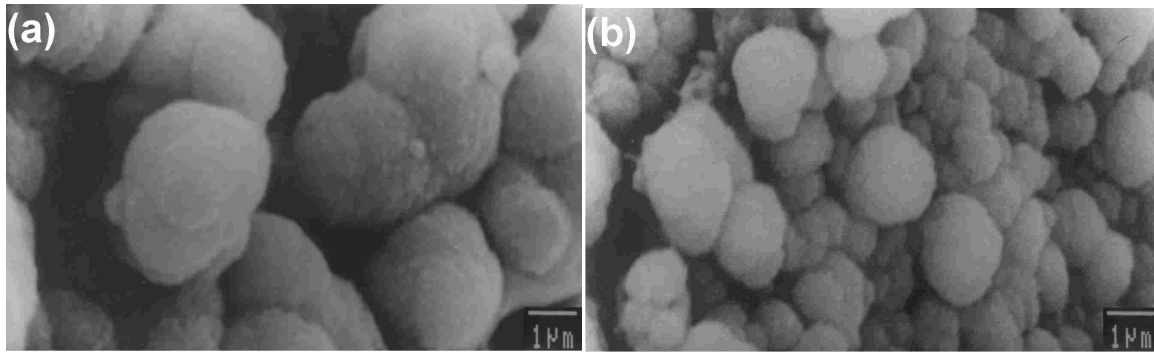


Fig. 2: SEM micrographs of porous acetylated chitosan membranes after calcification at (a) pH 7.4 and (b) pH 7.8.

This fact confirms the influence of matrix on the mineralization process. The pH also influenced the morphology: at lower pH, the sphere-like precipitate units showed to be bigger, which suggests that at pH 7.4, growth would be more favoured than nucleation when compared to pH 7.8 (Fig.2).

The size of calcification clusters showed to be bigger on acetylated than on pristine chitosan. This fact could be clearly observed on dense membranes (Fig. 3).

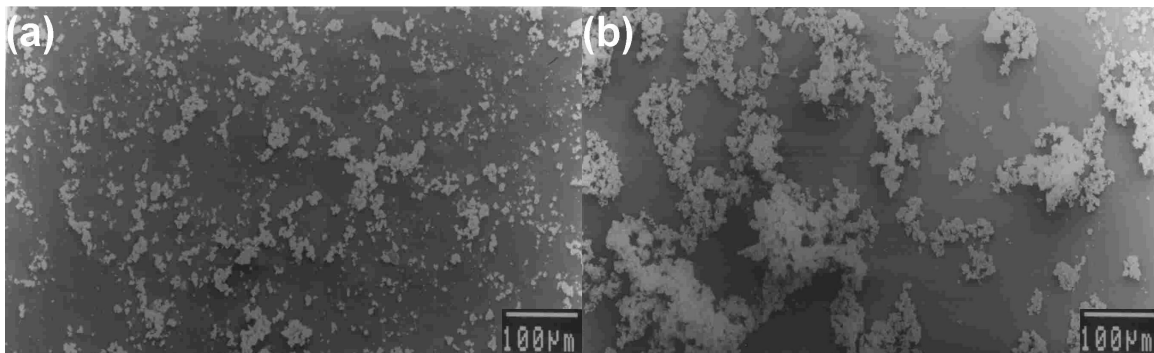


Fig. 3: SEM micrographs of dense chitosan membranes after calcification at pH 7.4 (a) natural and (b) acetylated.

EDX analyses of calcification deposits were conducted and the results are depicted on table 1. The Ca:P ratio showed to be influenced by acetylation only on dense membranes. This fact is associated with the importance of micromechanical characteristic of their surfaces: flat membranes have different influence on calcification when compared to porous membranes with higher surface area.

However, for definition on the mechanisms involved in both kinds of acetylated membranes, further studies are being conducted in this laboratory.

Chemical and morphological analyses showed that the nature and intensity of calcification depended on: 1) porosity and surface irregularities of membranes; 2) acetylation that introduces carboxyl groups that adsorb calcium ion [6] and 3) Composition and pH of fluid used for calcification experiments.

These results show the influence from both chemical and micromechanical characteristics of surface on *in vitro* calcification.

Table 1: Ca:P molar ratios determined by EDX on calcifications formed on chemically modified chitosan membrane samples.

Sample	% calcium atoms	% phosphorus atoms	Description of analysed deposit	Ca:P molar ratio
Dense acetylated membrane pH 7.4	51.72	42.70	cluster	1.21
Dense acetylated membrane pH 7.8	51.62	41.74	cluster	1.24
Dense natural membrane pH 7.4	51.29	24.37	cluster	2.10
Dense natural membrane pH 7.8	62.99	30.64	cluster	2.06
Porous acetylated membrane pH 7.4	29.14	13.10	cluster	2.22
Porous acetylated membrane pH 7.8	48.21	16.96	cluster	2.84
Porous natural membrane pH 7.4	36.66	16.94	cluster	2.16
Porous natural membrane pH 7.8	45.79	19.00	cluster	2.41

Conclusion

Acetylation of chitosan promoted a different kind of *in vitro* calcification when compared to pristine chitosan, mainly on dense membranes. The presence of carboxyl groups may increase the ionotropic effect of groups on substrate surface. However, further investigations shall be done in order to check whether the calcification follows a heterogeneous nucleation process or a homogeneous nucleation followed by surface anchorage. At this point, there is a noticeable influence of membrane micromechanics and solution pH on calcification morphology.

References

- [1] P. Calvert and P. Rieke: Chem. Mater. Vol 8 (1996) p.1715.
- [2] M.M. Beppu and C.C. Santana: Key Eng. Mater. Vol 125-129 (2000). p.34.
- [3] M.M. Beppu and C.C. Santana: Mater. Sci. Vol 5 (2002), p.47.
- [4] M.M. Beppu: *Estudo da calcificação in vitro da quitosana* (PhD thesis – FEQ – State University of Campinas. Brazil 1999)
- [5] S. Hirano et al.: *Industrial Polysaccharides* (Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 1987)
- [6] S. Zhang and K.E. Gonsalves: J. Appl. Polym. Sci. Vol 56 (1995) p.687.