

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE SÃO PAULO-FATEC/SP
CURSO MATERIAIS

**MEMBRANAS DE QUITOSANA COM PARTÍCULAS DE BIOVIDRO
PARA TRATAMENTO DE ULCERAÇÕES – UM PROJETO PILOTO**

LUCAS RODRIGUES DOS SANTOS

São Paulo
Dezembro 2013

LUCAS RODRIGUES DOS SANTOS

**MEMBRANAS DE QUITOSANA COM PARTÍCULAS DE
BIOVIDRO PARA TRATAMENTO DE ULCERAÇÕES – UM PROJETO
PILOTO**

**Trabalho de Conclusão de curso apresentado como exigência para a obtenção
do grau de Tecnólogo em Materiais Cerâmicos do curso de Tecnologia em
Materiais da Faculdade de Tecnologia de São Paulo.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Kelmy Macário de Faria Daguano

**FACULDADE DE TECNOLOGIA DE SÃO PAULO
SÃO PAULO - 2013**

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos biológicos.....	3
2.1.1. Úlceras	3
2.1.2. Processo de cicatrização	3
2.1.3. Colágeno tipo I.....	6
2.2. Curativos	6
2.2.1. Curativos baseados em polímeros.....	7
2.3. Quitina e Quitosana	8
2.3.1. Aspectos biológicos da quitosana	9
2.3.2. Aplicações da quitosana	10
2.4. Biovidros e Vitrocerâmicas bioativas	11
2.4.1. Mecanismos de bioatividade e efeito da composição do vidro.....	12
2.4.2. Biosilicato®.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Materiais.....	16
3.2. Preparo das membranas de quitosana pura.....	16
3.2.1. Preparo das Membranas de Quitosana com adição do vidro Bioglass 45S5.....	17
3.2.2. Preparo das membranas de quitosana com adição de Biosilicato modificado	18
3.2.3. Reticulação das membranas com hidróxido de sódio	18
3.3. Caracterização das membranas	19
3.3.1. Grau de intumescimento	19
3.3.2. Análise Morfológica das membranas	19
3.3.3. Caracterização físico-química das membranas	19
3.3.4. Determinação da resistência à tração e módulo de elasticidade.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Membranas de Quitosana e Bioglass 45S5.....	21
4.1.1. Grau de intumescimento	21
4.1.2. Morfologia das membranas	23
4.1.3. Composição das membranas – microATR-FTIR.....	25

4.2. Membranas de Quitosana e Biosilicato.....	31
4.2.1. Grau de intumescimento	31
4.2.2. Morfologia das membranas.....	33
4.2.2.1. Esteremicroscopia	33
4.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	35
4.2.3. Composição das membranas – microATR-FTIR.....	39
4.2.4. Módulo de elasticidade e Resistência à Tração.....	43
5. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Edna Rodrigues Silva, por todo seu amor, e por apoiar, acreditar, e estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a. Dr^a. Juliana Kelmy Macário de Faria Daguano, minha orientadora, que acreditou no meu potencial, deu suporte em tudo que precisei, e me ensina a ser uma pessoa cada vez melhor e mais dedicada.

A Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Malmonge, por ter ensinado e auxiliado muito a parte experimental do trabalho.

Aos professores Vanessa e Davinson, que deram suporte e auxílio naquilo que eu precisei.

A turma de materiais da FATEC-SP, que foi a melhor turma que convivi, a união da turma entre os últimos semestres foi demais, aprendi muito e foi muito legal estar junto com essa turma durante todos estes anos.

A UFABC, por ter me deixado utilizar seus equipamentos, e ter feito toda a parte experimental.

Ao Lamav/UFSCAR, por todo o suporte técnico e por fornecimento de materiais, sem isto não teria nem iniciado este trabalho.

Ao meu amor Michelle Naomi Sheguti, que com seu companheirismo, compreensão, carinho e amor que me ajudaram muito a suportar toda a pressão existente durante este período.

RESUMO

Em busca de um melhor tratamento ocasionado por ulcerações na pele, o ramo dos biomateriais vem buscando novos materiais com maior eficiência no tratamento das ulcerações cutâneas. O objetivo deste trabalho foi realizar um projeto piloto para o desenvolvimento de um biomaterial compósito de matriz quitosana com partículas dispersas de biovidro, Bioglass 45S5 ou Biosilicato, visando à aplicação em tratamento de ulcerações cutâneas. Assim, pretendeu-se verificar se a concentração de solução de quitosana, a concentração de partículas de Bioglass 45S5 e de Biosilicato, ou se o tipo de partícula de biovidro, processada por fusão, iriam interferir nas propriedades finais das membranas. Após a obtenção de membranas de quitosana (5 e 2,5% m/v) com adições de 10 e 50%(m/m) de Bioglass 45S5 ou 40 e 60% (m/m) de Biosilicato foram realizadas diferentes caracterizações. A etapa de caracterização consistiu na análise de composição química por espectroscopia no infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR), nas análises morfológicas e estruturais com o estereomicroscópio e o microscópio eletrônico de varredura (MEV), no grau de intumescimento, e na análise de resistência mecânica por ensaio de tração, todos os ensaios foram feitos nos laboratórios da Universidade Federal do ABC (UFABC). Os resultados mostraram que a elevada concentração de partículas de biovidro na membrana de quitosana interferiu negativamente na capacidade de absorção de água e também nos resultados do módulo de elasticidade e de resistência à tração. Isto pode ter ocorrido devido à formação de aglomerados e a baixa ligação química do vidro com a quitosana. Ainda, os biovidros testados reagiram mais rápido que o esperado, formando a hidroxiapatita em sua superfície durante a etapa de processamento. Baseado nas análises e nos resultados obtidos ficou evidenciado a necessidade de melhorias nas etapas de processamento do compósito para que futuramente este material esteja preparado para as aplicações pretendidas.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

No Brasil há um número elevado de pessoas com úlceras, que têm a sua qualidade de vida interferida devido a este problema¹. Os tipos mais comuns registrados de lesões ulceradas são as venosas, arteriais, hipertensivas, de pressões e neurotróficas¹. Na busca de curativos que sejam interativos (i.e., que participam do controle ambiental e favorecendo a restauração dos tecidos) e bioativos² (i.e., que estimulam diretamente as substâncias ou reações de cascata da cicatrização), há opção de um novo tipo de tratamento alternativo baseado em um compósito com matriz de biopolímero de quitosana reforçado com partículas de vidros (Bioglass 45S5®) e de vitrocerâmicas (Biosilicato®).

A utilização de matrizes biopoliméricas, é de particular interesse, devido às características da membrana de quitosana por ser biodegradável, biocompatível, biodisponível e de terem taxas de liberação controlada de drogas^{3,4}.

O Bioglass 45S5® foi o primeiro vidro bioativo do sistema quaternário ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$) desenvolvido. E ele reage com o ambiente fisiológico, quando implantado degrada-se lentamente e a dissolução de seus produtos tem a capacidade de estimular as células progenitoras dos osteoblastos^{5,6}, e também de interagir com o tecido conjuntivo^{7,8}.

A utilização de reforços de Biosilicato® são de grande interesse no ramo dos biomateriais, além do elevado índice de bioatividade ($I_b > 8$), estudos demonstraram melhores propriedades mecânicas, alto grau de cristalinidade (próximo de 100%), possui módulo de elasticidade mais próximo ao do osso cortical, na forma particulada não exhibe arestas cortantes, e na forma monolítica é mais tenaz e possui melhor usinabilidade⁷.

O objetivo deste trabalho foi realizar um projeto piloto para o desenvolvimento de um biomaterial compósito de matriz quitosana com partículas dispersas de biovidro, Bioglass 45S5® ou Biosilicato®, visando a aplicação em tratamento de ulcerações cutâneas. Como uma alternativa mais econômica e de fácil obtenção aos trabalhos atuais de compósitos com vidros

sol-gel^{4,5}, foram adotados biovidros obtidos por fusão. Assim, pretendeu-se verificar se a concentração de solução de quitosana, a concentração de partículas de Bioglass 45S5 e de Biosilicato, ou se o tipo de partícula de biovidro, processada por fusão, iriam interferir nas propriedades finais das membranas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos biológicos

2.1.1. Úlceras

Segundo o Ministério da Saúde, úlceras são definidas como interrupções na solução de continuidade aguda ou crônica do tecido cutâneo-mucoso ou alterações na estrutura anatômica e/ou função fisiológica dos tecidos afetados¹. Os tipos mais comuns registrados de lesões ulceradas são as venosas, arteriais, hipertensivas, de pressões e neurotróficas¹.

2.1.2. Processo de cicatrização

O processo de cicatrização de úlceras é composto de três fases (inflamação, proliferação, remodelação) que tem um dinamismo de sobreposição entre elas^{9,10} (Figuras 2.1 e 2.2).

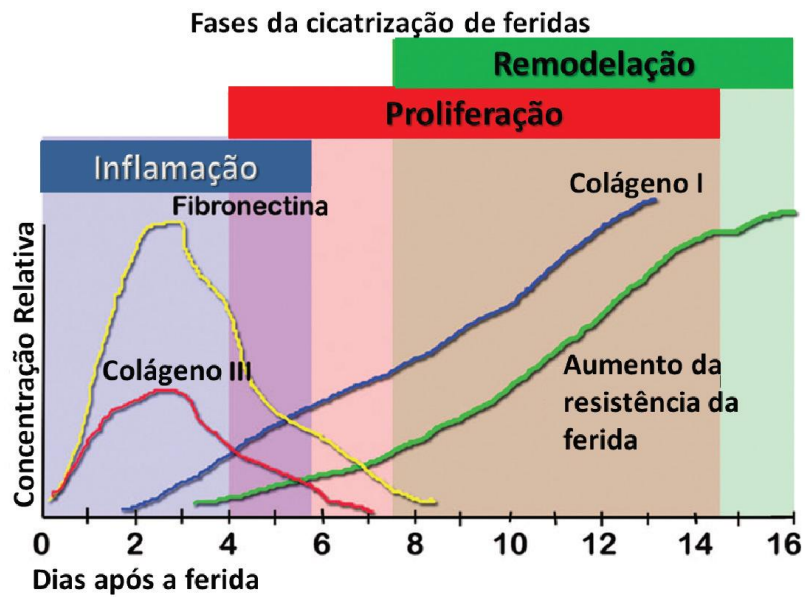


Figura 2.1: Fases da cicatrização e os componentes de deposição para a matriz cicatricial em um determinado período de tempo¹¹.

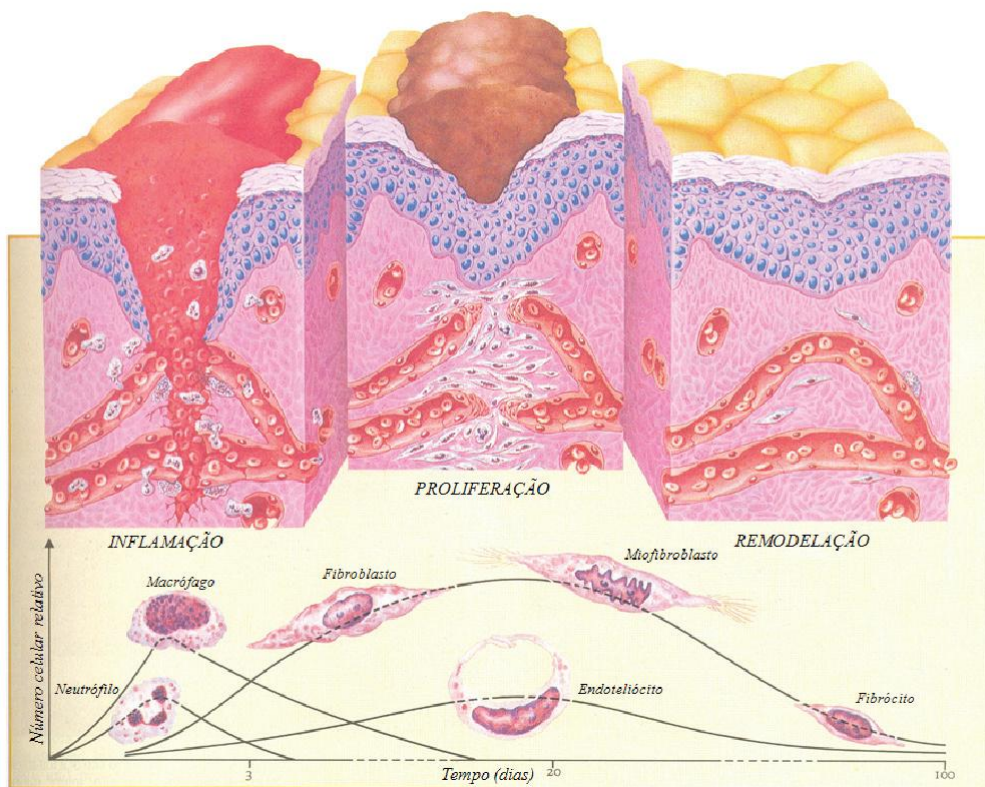


Figura 2.2: Representação das três fases de cicatrização com os números de células relativos em cada etapa¹².

No processo de cicatrização, a fase inflamatória se inicia imediatamente após a lesão. O endotélio e as plaquetas estimulam a cascata de coagulação. O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de

reservatórios protéicos para a síntese de toxinas. A resposta inflamatória se inicia com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular promovendo a migração de neutrófilos para a ferida¹³.

Neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, aderem à parede do endotélio mediante a ligação com as selectinas (receptores de membranas), produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos¹¹.

Macrófagos secretam citocinas e fatores de crescimento, contribuem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular¹¹, fundamentais para a fase proliferativa.

Na fase proliferativa é formado o tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células desta fase. Os fibroblastos encontram-se dispersos no tecido conectivo em todo o corpo e secreta matriz extracelular não rígida rica em colágeno tipo I e/ou III, que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado¹⁴. Também produzem células do tecido conjuntivo denominado fibronectina que ajuda as células do organismo em desenvolvimento a chegarem ao seu destino¹⁵.

Os fibroblastos são estimulados a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos. Os miofibroblastos possuem características semelhantes tanto às dos fibroblastos como às das células musculares lisas, sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas e são abundantes em áreas de cicatrização de lesões^{15,16}.

A fase de maturação e remodelamento tem como característica mais importante a deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno tipo III é produzido inicialmente sendo mais fino que o colágeno tipo I presente na pele, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno tipo III é reabsorvido por um colágeno (tipo I) mais espesso e com orientação mais organizada ao longo das linhas de tensão, isto é refletido com um aumento da força tênsil da ferida¹³.

2.1.3. Colágeno tipo I

É o tipo mais comum e está presente no tecido conjuntivo, osso, dentina e cemento¹⁵. Pertence à classe formadora de fibrilas, com estrutura semelhante a uma corda com pouca ou nenhuma interrupção. Após ser secretada para o espaço extracelular essas moléculas de colágeno se reúnem em polímeros de ordem maior, denominado fibrilas de colágeno¹⁴, que formam os ossos, dentinas, tendões, derme, etc¹⁶. Na Tabela 2.1 estão apresentadas as características dos colágenos tipo I e III¹⁵.

Tabela 2.1: Características dos tipos de colágenos tipos I e III¹⁵.

Colágeno	Células sintetizadoras	Função	Localização no corpo
Tipo I	Fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, cementoblasto	Resiste à tensão	Derme, tendão, cápsulas de órgãos, osso, dentina, cimento
Tipo III	Fibroblasto, célula reticular, célula do músculo liso, hepatócito	Forma o esqueleto estrutural do baço, fígado, nodos linfáticos, músculo liso, tecido adiposo	Sistema linfático, baço, fígado, sistema cardiovascular, pulmão, pele

2.2. Curativos

A utilização dos curativos tem a finalidade de estimular o processo de cicatrização² que tem como principal objetivo a cura da ferida⁸ ou reparação tissular¹⁰. Os tipos de curativos mais utilizados para o tratamento de lesões ulceradas são os curativos com gaze umedecida em solução fisiológica, hidrocolóides, polímeros, uréia, filme transparente, alginato de cálcio, carvão ativado, sulfadiazina de prata, papaína, ácidos graxos essenciais, óleo mineral, bota gessada, talas, hidrogel, collagenase, bota de unna e mepitel^{1,2}.

Acreditava-se que para tratar as feridas, elas deveriam permanecer secas, mas com o passar do tempo demonstrou-se que o meio úmido favorece as condições fisiológicas para a cicatrização¹⁷.

2.2.1. Curativos baseados em polímeros

Os curativos baseados em polímeros promovem um desbridamento autolítico, isto é, utiliza enzimas do próprio corpo para a destruição do tecido desvitalizado mantendo o meio úmido e favorecendo a ação das enzimas no leito da ferida sobre a necrose, porém é considerado um tratamento lento¹⁸.

O curativo polimérico mais utilizado no tratamento de lesões ulcerativas é composto de poliuretano (Figura 2.3), que tem a capacidade de absorver e controlar os líquidos produzidos pela ferida e também de manter o meio úmido, podendo ser encontrado com íons de prata para o controle de infecção e também podendo ser utilizado para recobrir outro meio tópico¹.



Figura 2.3: Filme polimérico¹.

O filme transparente (Figura 2.4) é constituído por uma membrana de poliuretano coberta com um adesivo hipoalérgico, possui propriedades de ser semipermeável e não absorvente¹, assim proporcionando o meio úmido e favorecendo a cicatrização^{1,18}. Como se trata de um filme transparente, é possível monitorar a ferida, realizando menos trocas de curativos², porém, não é recomendado para feridas que liberam muito líquido (exsudativa)¹.



Figura 2.4: Filme transparente aplicado sobre uma úlcera por pressão¹⁰.

2.3. Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueletos de crustáceos, insetos, etc¹⁹, e sua presença também ocorre em nematóides e na parede celular de fungos e leveduras^{20, 21}. A quitina é um polissacarídeo, sendo o segundo mais abundante encontrado na natureza, a ocorrência de quitina só perde para a de celulose^{22, 23}. A quitina é um polímero linear cujas cadeias são constituídas por unidades N-acetil-D-glicosamina unidas por ligações $\beta(1-4)$ ^{24,25}, possuindo uma estrutura altamente cristalina e organizada^{19,22}, sendo insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem uma baixa reatividade química, sendo a insolubilidade da quitina um fator limitante na sua utilização²⁶. A estrutura química da quitina é representada na Figura 2.5.

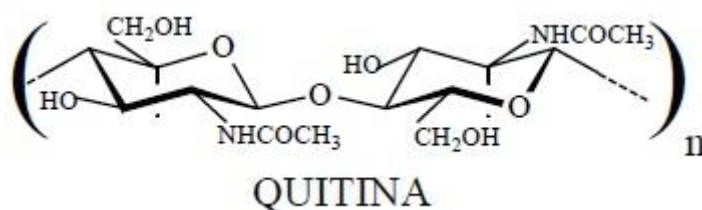


Figura 2.5: Estrutura química da quitina, onde “n” representa o grau médio de polimerização²³.

A Quitosana é um copolímero linear constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, onde predomina a unidade de repetição D-

glicosamina^{20,22}, como demonstrado na Figura 2.6. A quitosana é obtida principalmente através da desacetilação da quitina em meio alcalino^{19,22,23}.

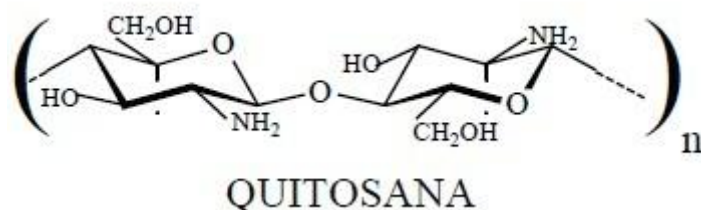


Figura 2.6: Estrutura química da quitosana, onde “n” representa o grau médio de polimerização²³.

De acordo com o grau de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar a fração molar de unidades de N-acetil-D-glicosamina da quitina/quitosana^{20,22}, pode-se modificar diversas propriedades da quitosana, tais como físico-química, solubilidade, pKa e viscosidade²⁷.

A quitosana tem alta hidrofiliabilidade, devido ao grande número de hidroxilas e grupos de amino presentes na rede polimérica¹⁹, permitindo assim, sua utilização na forma de micropartículas, géis e membranas^{19,20} e com variados tipos de aplicações, tais como liberação controlada de drogas, bandagens, géis injetáveis, etc²⁸.

2.3.1. Aspectos biológicos da quitosana

A quitosana possui como principais características a biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade^{19,22}. A quitosana também apresenta características de ser bacteriostática e fungostática, característica que inibe o crescimento de fungos e bactérias^{20,22}. Estudos também demonstram em quitosana de maior massa molecular, atividades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e em massas moleculares menores, entre bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*)²⁰.

Estudos demonstram que a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima, tornando-a biodegradável^{20,22}. A cristalinidade é um parâmetro que influencia a hidrólise da quitosana na

lisozima, quanto maior o nível de cristalinidade da quitosana, menor será a sua taxa de degradação²².

A quitosana é considerada um poderoso agente homeostático possuindo efeitos coagulantes^{20,22}, devido ao seu maior poder de agregação plaquetária e aos eritrócitos^{29,30}.

A quitosana tem sido utilizada para a aceleração da cicatrização^{20,22} de feridas dérmicas e inibição da fibroplasia, mostrando uma aptidão biológica de estimular a proliferação celular e a deposição organizada e ordenada, estimulando assim a formação do tecido conjuntivo^{22,31}.

Estudos em animais demonstram um efeito analgésico da quitosana^{19,20}, que reduzia a dor e protegia a superfície da ferida^{32,33}.

Há estudos sobre o potencial osteogênico da quitosana²², isto ocorreu devido à quitosana possuir como unidade monomérica principal, a D-glicosamina. A glicosamina tem sido avaliada como agente terapêutico desde 1969. A glicosamina está diretamente ou indiretamente relacionada com o papel na formação de superfícies articulares, tendões, peles, ossos, ligamentos, unhas, etc^{19,34}.

2.3.2. Aplicações da quitosana

O desenvolvimento de novas aplicações para a quitosana está diretamente relacionado ao fato de ser obtida por fontes renováveis, e apresentar características de ser atóxica, biodegradável, biocompatível e de ter interação com diversas substâncias²³. Outro ponto relevante, é o desenvolvimento de estratégias de produção de quitosana combinada com outros materiais, na obtenção de compósitos¹⁹.

Os principais campos de atuação de aplicação da quitosana são os tratamentos de água residuais e efluentes industriais, áreas de medicina, farmácia, biotecnologia, agricultura²³. Um destaque é a capacidade da quitosana para a liberação controladas de drogas principalmente de fármacos,

e também a atividades antiácidas e anti-úlceras, que previne a administração de medicamentos via oral^{23,35}.

A gama de versatilidades de aplicações da quitosana está relacionada com seus empregos em formatos variados, tais como na forma de implantes, esponjas, filmes, grânulos, xerogéis, micro e nanopartículas^{22,36}.

2.4. Biovidros e Vitrocerâmicas bioativas

O primeiro vidro bioativo foi desenvolvido por Hench e este foi denominado Bioglass 45S5. A sua composição é baseada no sistema SiO_2 - CaO - P_2O_5 - Na_2O e possui três formas microestruturais (amorfo, parcialmente cristalino, e totalmente cristalino³⁷). O Bioglass 45S5® reage com o ambiente fisiológico, quando implantado, o vidro degrada lentamente e a dissolução de seus produtos estimulam as células progenitoras dos osteoblastos^{5,6}, fenômeno chamado de osteoindução. O Bioglass 45S5® também tem a capacidade de interagir com o tecido conjuntivo^{7,8}.

Entretanto, os vidros bioativos possuem baixa resistência à tração e módulo de elasticidade moderadamente elevado, quando comparado aos ossos corticais, o que pode significar que não pode ser implantado individualmente quando há necessidade de cargas cíclicas. Portanto, são mais utilizados em torno do tecido hospedeiro, porém, podem ser incorporados em estruturas compostas, na forma de membranas e scaffolds, para uma melhora em suas propriedades mecânicas e em uma aceleração para a formação da apatita após sua implantação⁵.

Por sua vez, as vitrocerâmicas bioativas são de grande interesse no ramo da biomedicina, visto que estes materiais podem ser obtidos em formas altamente complexas, e possuem microestruturas refinadas com pouco ou nenhum poro residual que resulta em propriedades mecânicas melhoradas no produto final. Porém, requer um bom conhecimento sobre nucleação e mecanismos de crescimento das fases cristalinas³⁷. Existem variados tipos de vitrocerâmicas baseados em composições semelhantes ao do Bioglass 45S5®, porém elas têm teores muito baixos em óxidos alcalinos. Alguns exemplos de

vitrocerâmicas são: Ceravital; Cerabone A/W; Imaplant-L1; Bioverit; Biosilicato®.

2.4.1. Mecanismos de bioatividade e efeito da composição do vidro

Como dito, o Bioglass 45S5® é um vidro do sistema quaternário (Na_2O - CaO - P_2O_5 - SiO_2) e sua composição é mostrada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Composição do Bioglass 45S5 em porcentagem molar e porcentagem em massa ⁵ .				
Composição	SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5
Mol%	45,13	24,35	26,91	2,60
Massa%	45,00	24,50	24,50	6,00

O teor de sílica está em níveis baixos em comparação aos vidros de janela e os recipientes de vidros. O teor de cálcio e sódio são altos, isto faz com que diminua a sua temperatura de fusão, mas auxilia em sua dissolução. Na degradação, devido aos altos teores de íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos, o pH na solução aumenta. O aumento do pH pode ocasionar a saída dos íons de cálcio e fósforo, que estão naturalmente presentes na solução do fluido corporal. O fósforo e o cálcio também são liberados no ambiente fisiológico pelo vidro. Acompanhado com o aumento do pH, isto induz a formação de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do vidro, que é quimicamente semelhante a parte inorgânica do osso.

Para esta avaliação, os testes *in vitro* servem para simular o comportamento das reações superficiais que ocorrem *in vivo*, ou seja, a formação de camada de Hidroxiapatita na superfície do material (isto é, demonstrar a capacidade do material de ser bioativo). A solução utilizada nos testes *in vitro* é de fluido corporal simulado (SBF) corrigida, que é acelular, livres de proteínas e apresenta um pH de 7,4⁷.

O mecanismo para a dissolução e ligação óssea para um vidro bioativo proposto por Hench é um processo com vários estágios e que tem as seguintes etapas^{38,39}:

1. Troca iônica dos cátions metálicos alcalinos (Na^+ e Ca^{2+}) com H^+ do fluido corporal.
2. Perda da sílica solúvel, deixando ligações Si-OH.
3. Condensação e repolimerização das ligações Si-OH para a criação de uma ligação de rica sílica.
4. Migração dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} dos grupos presentes nos vidros e a partir dos fluidos corporais, forma-se uma camada de fosfato de cálcio amorfo que cresce na superfície da camada rica em sílica.
5. Cristalização da camada amorfa por incorporação de OH^- e CO_3^{2-} da solução, para a formação do HCA.

Após a formação do HCA cristalino, os passos seguintes foram propostos por Hench³⁸ para ocorrerem:

6. Frações biológicas absorvidas em camadas de HCA.
7. Ação dos macrófagos.
8. Ligação (fixação) das células estaminais.
9. Diferenciação das células estaminais.
10. Produção da matriz
11. Cristalização da matriz.

Um diagrama do sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ é mostrado Figura 2.7³⁸. Neste diagrama, todas as composições apresentam um teor de 6% em peso dos íons fosfato. Todas as composições encontradas na região A possuem ligação com o tecido ósseo. Vidros que estiverem na região B apresentam características bioinertes e sua implantação resultaria em uma camada fibrosa no tecido cicatricial. Este é um resultado da rede sílica ser muito densa e resistente a reação com o fluido corporal. Vidros na região C degradam-se rapidamente (< 30 dias) devido ao teor de sílica ser muito baixo e o teor de soda ser demasiadamente elevado que leva a uma rede quebradiça. A região D contém composições tão baixas de sílica, que uma rede vítrea não pode ser formada. Vidros dentro da região E, aderem fortemente com o tecido conectivo, bem

como a parte inorgânica do osso (tecido ósseo). A composição do Bioglass 45S5® fica entre as regiões A e E.

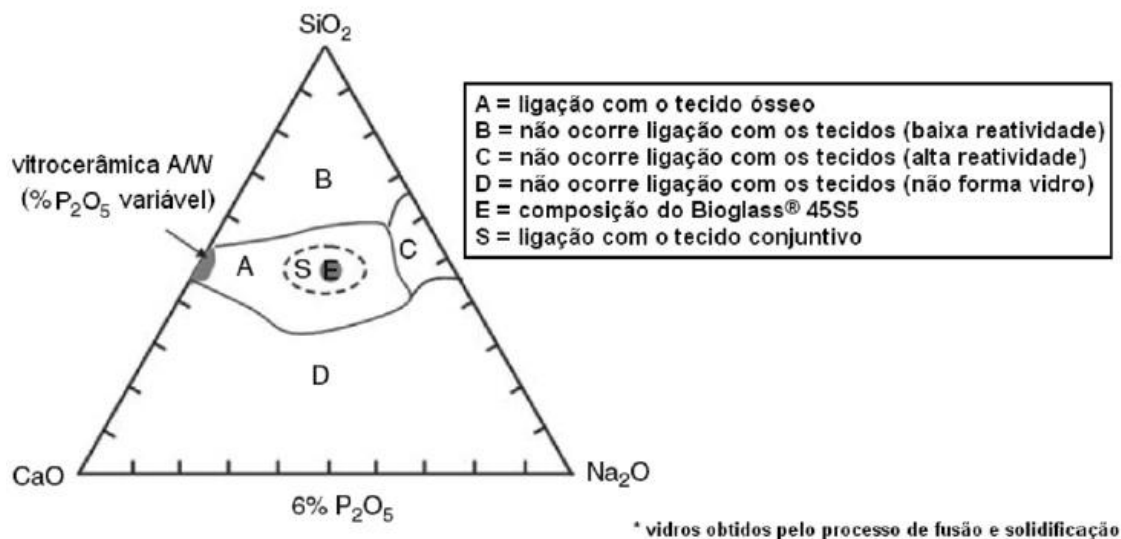


Figura 2.7: Diagrama ternário SiO₂-CaO-Na₂O mostrando a relação existente entre composição e índice de bioatividade⁷.

A razão por trás de a composição afetar a taxa de dissolução nos fluidos corporais é devido à conectividade das redes de silicato. Uma rede altamente ligada contendo uma grande proporção de ligações de oxigênios pontantes (tetraedros de sílica ligados covalentemente uns aos outros através de ligações tetraédricas de sílica -O-Si-O) é resistente no fluido corporal. Altas conectividades são criadas devido aos altos teores de sílica, tal que vidros com mais de 60% de moles de sílica não são bioativos. A conectividade da rede (Número de ligações de oxigênios pontantes por átomos de silício) do Bioglass 45S5® é de aproximadamente 2, fazendo com que a estrutura do vidro seja susceptível a degradação⁵.

2.4.2. Biosilicato®

Em busca de vitrocerâmicas com melhores propriedades mecânicas, elevado índice de bioatividade ($I_b > 8$), e alto grau de cristalinidade (próximo de 100%), uma vitrocerâmica particulada altamente bioativa foi desenvolvida no

decorrer do mestrado de Ravagani⁴⁰, sendo então denominada como Biosilicato.

O Biosilicato apresenta propriedades distintas em relação outros biovidros, na forma particulada não exibe arestas cortantes, e na forma monolítica, é mais tenaz e possui melhor usinabilidade e seu módulo de elasticidade está próxima do osso cortical⁷. A Tabela 2.3^{7,41} apresenta um comparativo das propriedades e do índice de bioatividade do Biosilicato® em relação ao Bioglass 45S5® e outras vitrocerâmicas.

Tabela 2.3: Propriedades mecânicas e índice de bioatividade do Biosilicato®, do Bioglass 45S5® e de outras vitrocerâmicas⁷.

Biocerâmicas	Bioglass® 45S5	Bioglass® 52S4.6	Cerabone® A/W	Ceravital®	Bioverit® I	HA _s	Biolox® Forte	Biosilicato® (monolítico)
Índice de bioatividade (I _b)	12,5	10,5	6	5,6	I _b < 8	3,1	0	I _b > 8
Resistência à flexão (MPa)	40	40	215	100-150	140-180	50-200	466	120-210
Resistência à compressão (MPa)	?	?	1080	500	500	500-100	4400	?
Módulo de elasticidade (GPa)	60	60	120	100-160	70-90	80-110	380	70-80
Estrutura	fase vítrea	fase vítrea	β-CaSiO ₃ (¹)apatita fase vítrea	(¹)apatita fase vítrea	(¹)flogopita (¹)apatita fase vítrea	(²)apatita	α-Al ₂ O ₃	1N2C3S
Usinabilidade	baixa	baixa	baixa	baixa	boa	baixa	baixa	média

?: dado não encontrado na literatura. Cerabone® A/W: vitrocerâmica / β-CaSiO₃; beta-wollastonita / (¹): composição não definida. Ceravital®: vitrocerâmica / (¹): composição não definida. Bioverit® I: vitrocerâmica / (¹): composição não definida. HA_s: hidroxiapatita sintética / (²): (Ca)₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Biosilicato®: vitrocerâmica com cristalinidade próxima a 100%. 1N2C3S: silicato de sódio e cálcio (1N = sódio; 2C = cálcio; 3S = silício)

Originalmente, o Biosilicato particulado foi desenvolvido para o tratamento de hipersensibilidade dentinária, tendo excelentes resultados nos testes *in vitro* e *in vivo*⁷.

Novas frentes de pesquisas estão sendo desenvolvidas com o Biosilicato a partir dos trabalhos realizados por Moura Neto⁴², que na oportunidade avaliou *in vitro* o seu efeito sobre vários parâmetros da osteogênese. Em função dos resultados obtidos em seus trabalhos, observou-se a possibilidade para que o Biosilicato fosse conformado como matrizes macroporosas para a aplicação da engenharia de tecidos (scaffolds). Para que a regeneração do tecido ósseo possa ser bem sucedida, ela deve reunir algumas características, como ser biocompatível, promover adesão celular, ligação com o tecido ósseo e estimular osteogênese, atuar como um guia para o crescimento ósseo, ser

bioabsorvível no organismo, possuir taxa de degradação controlável, apresentar propriedades mecânicas compatíveis com o local implantado.

Em 2009, Crovace, em seu trabalho de mestrado⁴³, desenvolveu estruturas macroporosas altamente bioativas a partir de sua sinterização na presença de diferentes agentes porogênicos. Pelo fato de poder controlar a composição e estrutura do material, incluindo porosidade e morfologia dos poros há uma grande vantagem para um bom desempenho na engenharia de tecidos.

O Biosilicato tem uma gama de aplicações não só na engenharia de tecidos, mas também em outros ramos dos biomateriais⁷, e há ainda muita pesquisa que poderá ser desenvolvida para cada vez mais haver aplicações deste material na área de biomateriais, sendo uma delas o desenvolvimento de compósitos com quitosana para aplicação em úlceras cutâneas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a obtenção das membranas, foram utilizados como reagentes a quitosana em pó (Polymar), vidro bioativo Bioglass 45S5, vidro bioativo Biosilicato modificado (informações sobre sua composição e estrutura química estão em processo de patente), ácido acético (CH_3COOH - Vetec) e hidróxido de sódio (NaOH - Vetec).

3.2. Preparo das membranas de quitosana pura

Soluções de quitosana de 2,5% e 5,0% (m/v) foram preparadas pela dissolução do pó do polímero comercial correspondendo a 2,5 g e 5,0 g, respectivamente, em 100ml de solução de ácido acético 3%. Dessa forma, solução de ácido acético 3% foi colocada em frasco Schott, sob agitação magnética constante a 400 rpm, e aos poucos o pó de quitosana foi adicionado, permanecendo assim por um período de 24 horas, como mostra

Figura 3.1. Após este período, as soluções foram filtradas em malha de 42 μm para a retirada das impurezas.

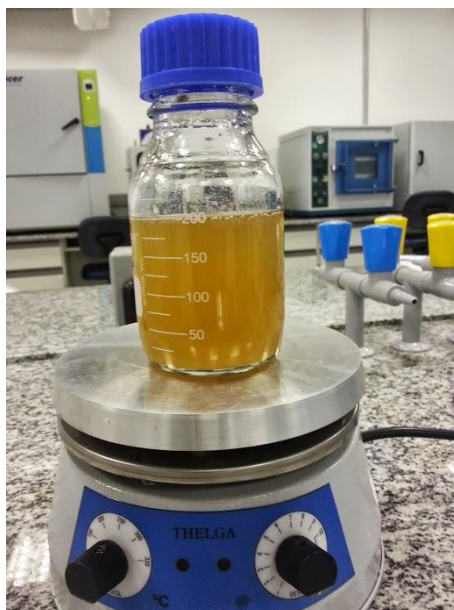


Figura 3.1: Preparo de solução de quitosana.

Para a obtenção das membranas, o filtrado obtido foi vertido em placas de Petri, sendo mantidos secando em estufa a temperatura de 40 °C por 24h.

3.2.1. Preparo das Membranas de Quitosana com adição do vidro Bioglass 45S5

Para a obtenção das membranas de QUI-Bioglass 45S5 foi utilizada solução com 5% (m/v) de quitosana, preparadas conforme o procedimento descrito anteriormente. Após o preparo das soluções, 0,15 g e 1,5 g de Bioglass 45S5 em pó com tamanho médio da partícula menor que 42 μm foram adicionados. Esta quantidade de vidro corresponde a aproximadamente 10% e 50% (m/m) da massa total da membrana, respectivamente. A solução de quitosana com Bioglass 45S5 foi mantida sob agitação magnética constante de 400 rpm por período de 24h, sendo mantidos secando em estufa a temperatura de 40 °C por 24h.

3.2.2. Preparo das membranas de quitosana com adição de Biosilicato modificado

Para a obtenção das membranas de QUI-Biosilicato foi utilizada solução com 2,5% (m/v) de quitosana, preparadas conforme o procedimento descrito anteriormente. Nestas membranas, 0,5 g e 1,0 g de Biosilicato em pó com tamanho médio da partícula menor que 42 μm foram adicionados. Esta quantidade de vidro corresponde a aproximadamente 40% e 60% (m/m) da massa total da membrana, respectivamente. A solução de quitosana com Biosilicato foi mantida sob agitação magnética constante de 400 rpm por período de 24h, sendo mantidos secando em estufa a temperatura de 40 °C por 24h.

As membranas de QUI-Biosilicato obtidas estão representadas na Figura 3.2.



Figura 3.2: Membranas de QUI-Biosilicato após etapa de secagem.

3.2.3. Reticulação das membranas com hidróxido de sódio

Para aumentar a resistência das membranas, foi promovida a sua reticulação (i.e., formação de ligações cruzadas) pela solução de hidróxido de sódio. As membranas compósito QUI-Bioglass 45S5 e QUI-Biosilicato, após secagem, foram imersas em solução de hidróxido de sódio 1M, para obter a

reticulação. Em seguida, foram lavadas abundantemente com água destilada para a neutralização das amostras.

3.3. Caracterização das membranas

3.3.1. Grau de intumescimento

O grau de intumescimento das membranas de quitosana e quitosana incorporadas com partículas de vidro foi avaliado pela a imersão das mesmas em água destilada. Houve a imersão das amostras por um período de 1 semana em água destilada, em seguida estas amostras foram retiradas e foram pesadas em uma balança analítica, marca Shimadzu modelo AUY220, sempre removendo o excesso de água. Para obter-se uma média, cinco amostras de cada tipo de membrana foram pesadas.

O grau de intumescimento foi calculado de acordo com a equação 1:

$$I(\%) = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad (1)$$

Onde: I = Grau de intumescimento, Ms = Massa da amostra seca, Mu = massa da amostra intumescida pela água.

3.3.2. Análise Morfológica das membranas

A observação morfológica das membranas foi feita com estereomicroscópio, marca Physis mod. SZ40. As membranas de QUI-Biosilicato também foram observadas com microscópio eletrônico de varredura compacto (MEV), marca JEOL JSM-6010LA, da Central Experimental Multiusuário da UFABC. Para a análise por MEV, as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 24h e recobertas com ouro.

3.3.3. Caracterização físico-química das membranas

Para analisar a composição das membranas foi utilizada a técnica de espectroscopia no infravermelho com modo de microscopia e reflectância total

atenuada (micro ATR-FTIR). A análise micro ATR-FTIR foi feita de acordo com as normas ASTM F2103-11 e com o equipamento microespectrômetro 610-IR, marca Varian-Agilent, da Central Experimental Multiusuário da UFABC.

As membranas foram colocadas diretamente sobre o cristal e pressionadas uniformemente, de modo que todas as membranas recebessem a mesma pressão. Os espectros foram obtidos no modo absorbância na faixa de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com resolução de 1 cm^{-1} . Foram feitos vários espectros de várias regiões das membranas, para a obtenção de dados mais precisos.

3.3.4. Determinação da resistência à tração e módulo de elasticidade

Para as amostras de QUI-Biosilicato foram determinados a resistência à tração e o módulo de elasticidade, sendo utilizado Máquina de Ensaio Universal (marca EMIC modelo DL10000), com taxa de carregamento de 1 mm/min e célula de carga de 5 kN , Figura 3.3. As análises e os corpos de provas para o ensaio de resistência à tração foram feitas de acordo com a norma ASTM D882-12.

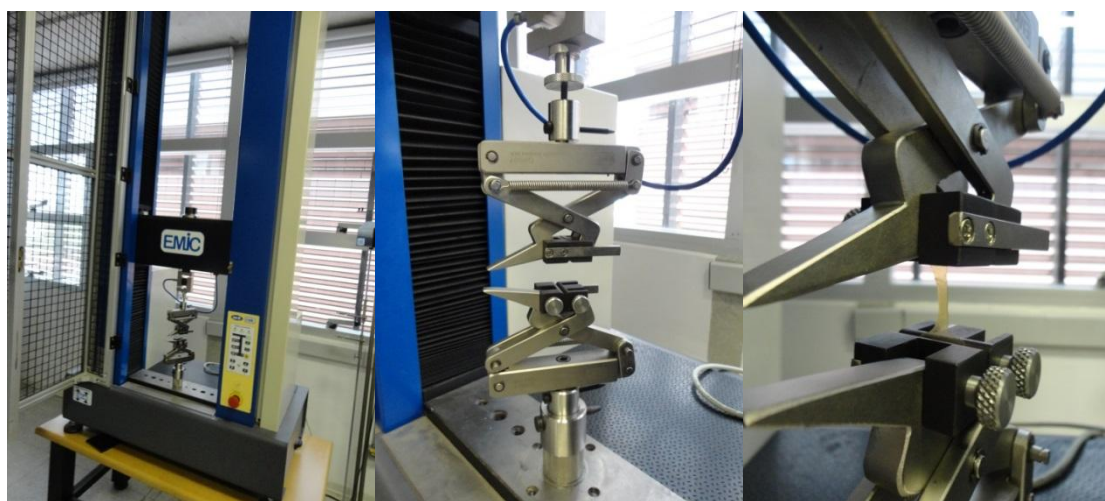


Figura 3.3: Máquina de Ensaio Universal utilizada para determinação das propriedades mecânicas. Detalhe para a célula de carga e amostra durante o ensaio.

Os corpos-de-prova foram obtidos por uma etapa de estampagem, obtendo corpos-de-prova como mostra a Figura 3.4. Neste estudo, foram ensaiadas dez amostras de cada tipo de membrana.



Figura 3.4: Corpos-de-prova utilizados em ensaio de tração: (a) quitosana pura, (b) QUI-Biosilicato 40 %(m/m), (c) QUI-Biosilicato 60 %(m/m).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Membranas de Quitosana e Bioglass 45S5

4.1.1. Grau de intumescimento

A tabela 4.1 apresenta os valores das massas (secas e úmidas) e o grau de intumescimento (%) das membranas de quitosana 5% (m/v) pura, e das membranas de quitosana 5% (m/v) com concentrações de 10 e 50% (m/m) de partículas de Bioglass 45S5.

Tabela 4.1: medidas das massas e do grau de intumescimento						
	Membrana de quitosana 5%(p/v) pura		Membrana de quitosana 5%(p/v) com 10 %(m/m) de Bioglass 45S5		Membrana de quitosana 5%(p/v) com 50 %(m/m) de Bioglass 45S5	
Amostra	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)
1	0,1414	0,0556	0,0900	0,0366	0,0525	0,0236
2	0,1106	0,0442	0,0590	0,0226	0,0833	0,0361
3	0,0902	0,0350	0,0656	0,0264	0,0786	0,0372
4	0,0550	0,0212	0,0568	0,0215	0,0596	0,0261
5	0,0366	0,0141	0,0445	0,0185	0,0999	0,0455
Média	0,09	0,03	0,06	0,025	0,07	0,034
Desvio padrão	±0,04	±0,02	±0,02	±0,007	±0,02	±0,008
grau de intumescimento (%)	155,03		151,51		121,90	

A Figura 4.1 apresenta um comparativo dos valores do grau de intumescimento (%) em relação à porcentagem de partículas de Bioglass 45S5 dispersas na membrana de quitosana 5% (m/v).

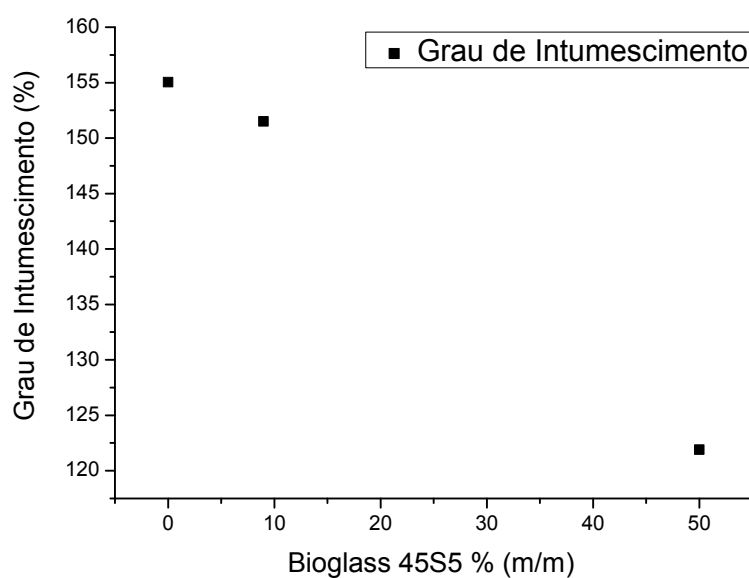


Figura 4.1: Grau de intumescimento (%) das membranas de QUI-Bioglass 45S5.

As ligações covalentes dos grupos aminos (NH) predominam na quitosana, estas ligações geram sítios de alta polaridade, favorecendo assim a absorção das moléculas de água nestes sítios. Essa característica associada ao grupo acetamido gera um elevado grau de afinidade e retenção da água⁴⁴. Estudos demonstram que uma maior absorção de água está em quitosanas reticuladas⁴⁵. A habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para este biomaterial, pois permite a absorção de fluidos corpóreos e transferência de metabolitos e nutrientes⁴⁶. Uma elevada taxa de absorção de água traz consequências indesejáveis como, por exemplo, a redução da estabilidade estrutural do polímero. Ou seja, a presença constante de umidade na estrutura da quitosana provoca intumescimento da matriz e consequentemente a degradação das fibras e destacamento do filme, além da aceleração da degradação por ataque de microrganismos⁴⁷. Por este motivo é necessária a análise do grau intumescimento.

A hidrofiliabilidade da quitosana se dá em função dos seus grupos desacetilados, que associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam uma forte afinidade por moléculas polares. Esses grupos possuem grande influência sobre o montante de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no filme interfere com a água absorvida⁴⁴.

Analisando a Figura 4.1 nota-se que quanto maior a concentração de partículas de biovidro na membrana de quitosana, menor será o grau de intumescimento (%) da amostra, demonstrando que as concentrações de partículas interferem na absorção de líquidos.

4.1.2. Morfologia das membranas

A morfologia das membranas de quitosana 5% (m/v) e das membranas de quitosana 5% (m/v) com concentrações de 10 e 50% (m/m) de partículas de Bioglass 45S5 foi observada com o estereomicroscópio e a superfície destas membranas são mostradas na Figura 4.2.

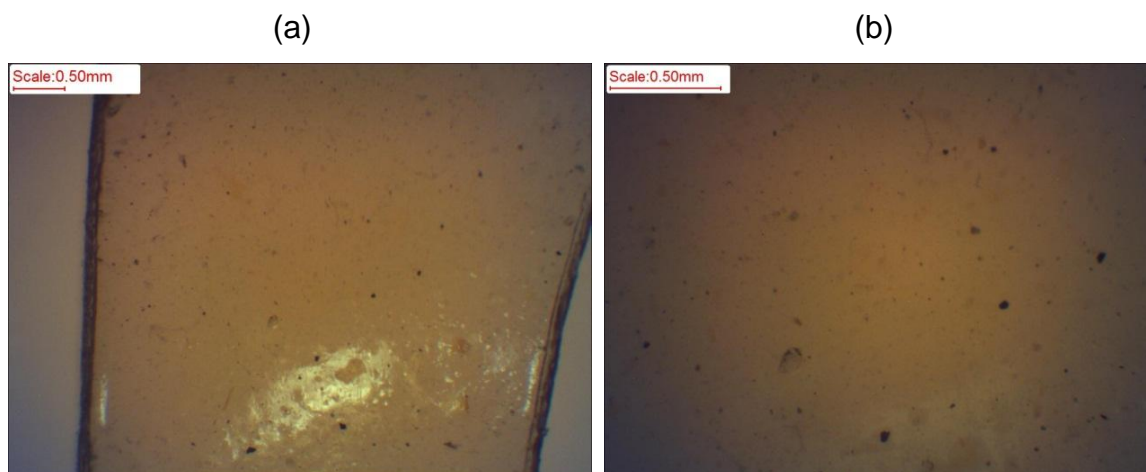


Figura 4.2: Membranas de quitosana pura 5%(m/v). Aumentos de (a) 2x e (b) 4,5x.

Pela Figura 4.2 nota-se a presença de impurezas e precipitados nas membranas de quitosana 5%(m/v), isto pode ter ocorrido devido uma ineficácia da etapa de filtragem ou de partículas de impurezas menores que 42 μm terem se aglomerado na solução.

As membranas de quitosana 5% (m/v) com concentrações de 10% e 50%(m/m) de partículas de Bioglass 45S5 podem ser observadas nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente.

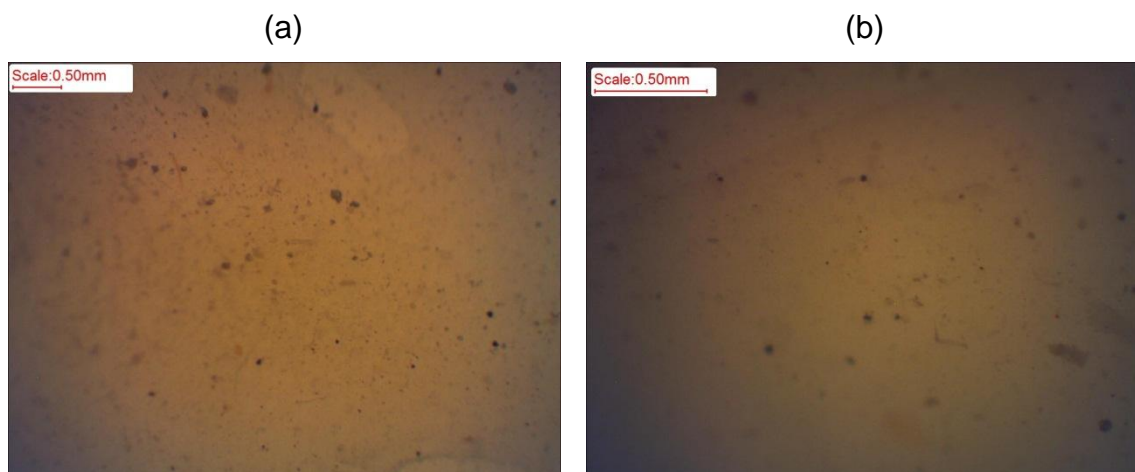


Figura 4.3: Membranas de quitosana com partículas de Bioglass 45S5 10%(m/m). Aumentos de (a) 2x e (b) 4,5x.

Assim como as membranas de quitosana pura, as membranas com 10% de Bioglass 45S5 apresentaram impurezas e precipitados em sua superfície. Ainda, as partículas de vidro não estão bastante nítidas nos aumentos

observados, sendo a morfologia destas membranas similares às membranas puras.

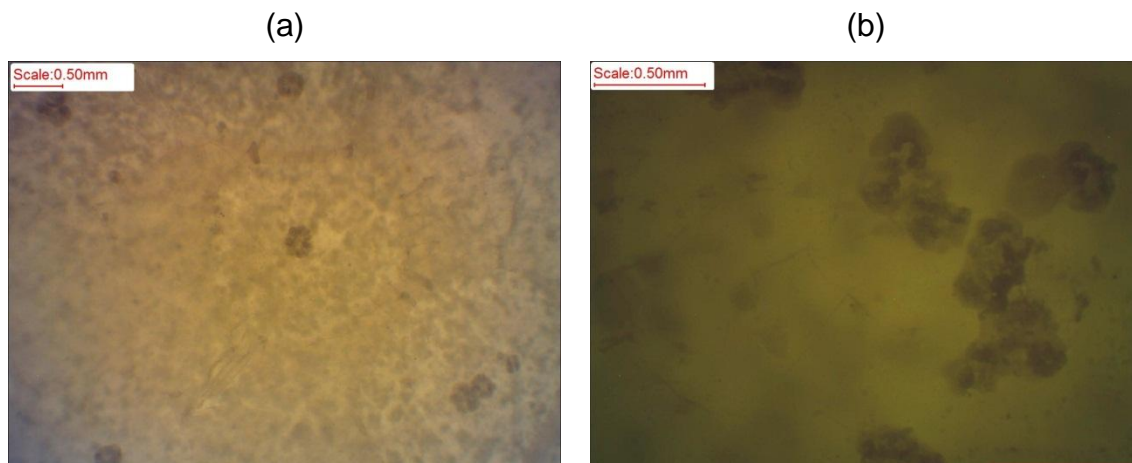


Figura 4.4: Membranas de quitosana com partículas de Bioglass 45S5 50%(m/m). Aumentos de (a) 2x e (b) 4,5x.

Observando as imagens da Figura 4.4, é possível observar que as partículas de Bioglass 45S5 ficaram bastante aglomeradas na matriz de quitosana 5%(m/v). Isto mostra que uma matriz de quitosana com concentração de 5% (p/v) não permite a boa dispersão de maiores quantidades de vidro, tal como a proporção de 50% (m/m). Possivelmente, isto ocorre devido à baixa interação das partículas de quitosana e de vidro obtido pelo processo de fusão, o qual apresenta poucas ligações $-OH$ livres em sua superfície, necessárias para a união destas partículas e formação efetiva do compósito. Além disso, estudos indicam que a presença de aglomerados reduz as propriedades mecânicas de um compósito⁴⁸, porém não foram feitos ensaios mecânicos para estas amostras.

4.1.3. Composição das membranas – microATR-FTIR

A Tabela 4.2 mostra os valores dos espectros característicos da quitosana⁴⁹. Foi observado que todos os espectros de FTIR das membranas

(com ou sem partículas) exibiam as bandas de absorbância características da região do infravermelho da quitosana.

Tabela 4.2: Bandas de absorção no FTIR-ATR para membranas de quitosana ⁴⁹ .	
Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3300	Deformação axial de O-H e N-H do grupo NH ₂
2920 e 2880	Deformação axial de C-H de grupo CH ₂ e CH ₃
1640	Deformação axial de C=O (amida I)
1593	Deformação angular N-H do grupo NH ₂ (amida II)
1420 e 1323	Deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico
1380	Deformação angular do C-H e CH ₃
1150, 1074 e 1031	Deformação axial do C=O da ligação de éter

A Figura 4.5 mostra os espectros de FTIR medidos do pó de quitosana comercial utilizada para a obtenção das membranas.

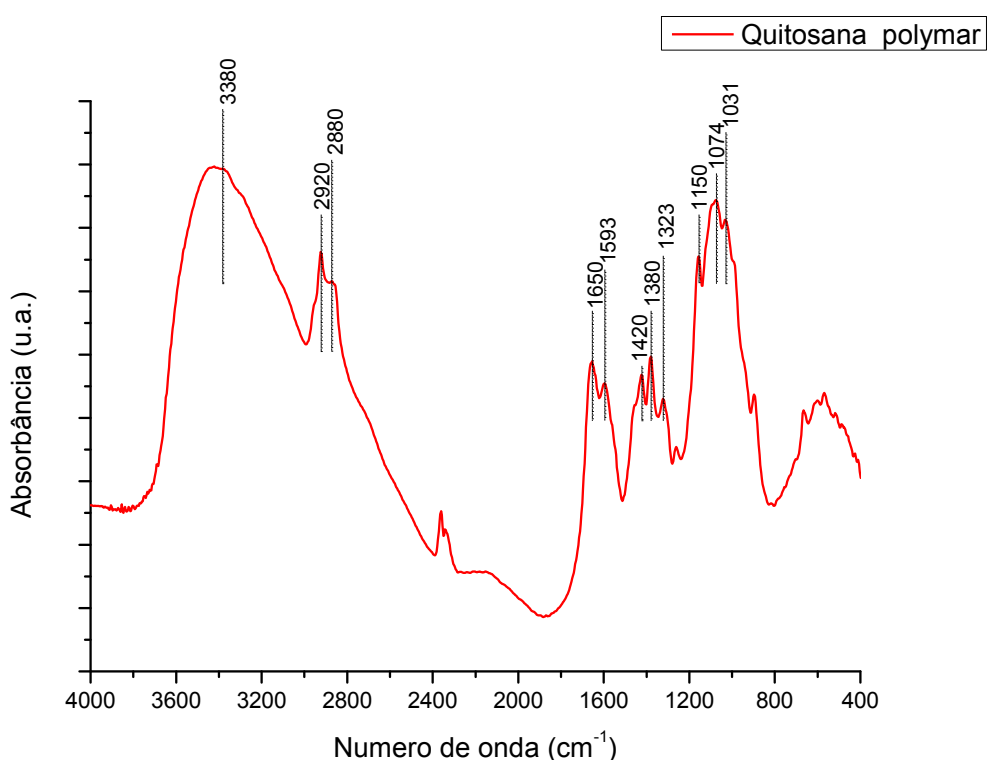


Figura 4.5: Espectros de absorbância característicos do pó de quitosana. Amostra da pastilha de quitosana com KBr.

Na Figura 4.6 são mostrados os espectros de FTIR-ATR da membrana de quitosana pura 5% (m/v).

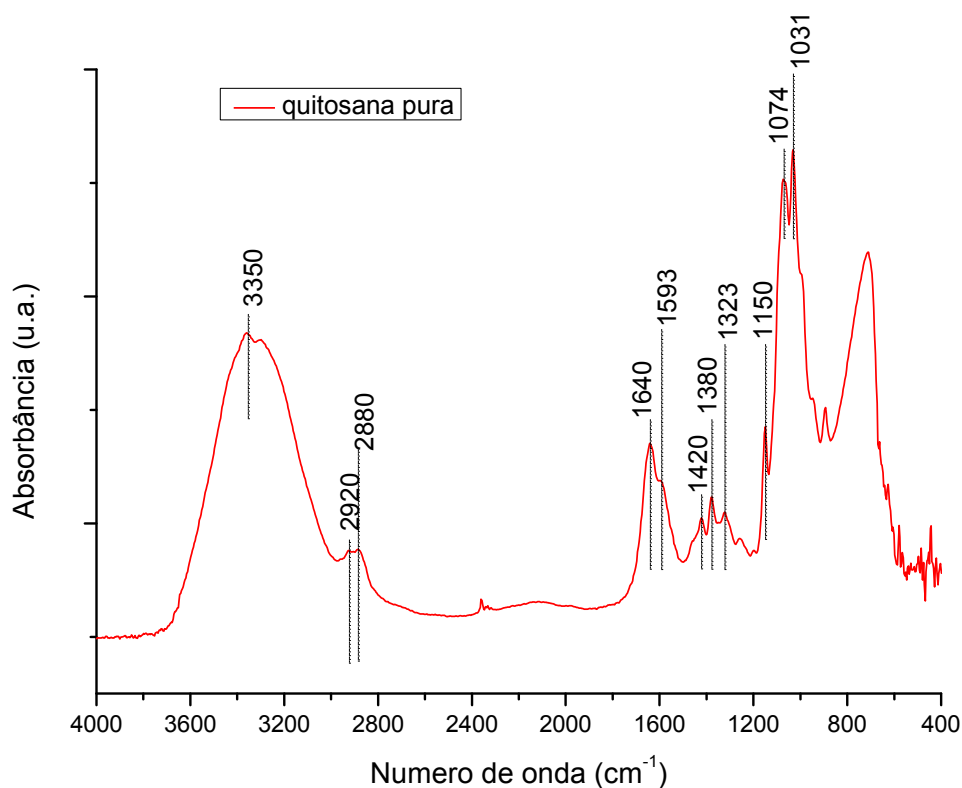


Figura 4.6: Espectros FTIR-ATR das membranas de quitosana pura 5% (m/v).

Quando comparados os espectros da membrana de quitosana pura (Figura 4.6) com o pó de quitosana comercial (Figura 4.5), observa-se que há uma pequena variação nas intensidades nos espectros das bandas nas regiões entre 3600 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , e na região da banda de 1640 cm^{-1} . Isto se deve ao fato de que todas as membranas de quitosana tiveram em algum momento contato com moléculas de água, desde para obter plasticidade⁴, para facilitar a sua utilização no equipamento, ou até alguma molécula de água que entrou em contato com as membranas através do ambiente. E estas moléculas de água influenciam no comprimento de onda nestas regiões^{50,51}. Outra observação é que houve um aumento na intensidade da banda 2350 cm^{-1} , relacionada à presença da molécula de CO_2 ⁵⁰, o que poderia ter sido ocasionado pela presença de CO_2 da atmosfera absorvida pelas membranas de quitosana. Uma observação importante é que devido a limitação do equipamento FTIR-micro

ATR analisadas com ponta de germânio, as bandas com comprimentos de ondas menores que 700 cm^{-1} apresentaram ruídos.

Na Figura 4.7 é mostrado o espectro de FTIR-ATR do Bioglass 45s5.

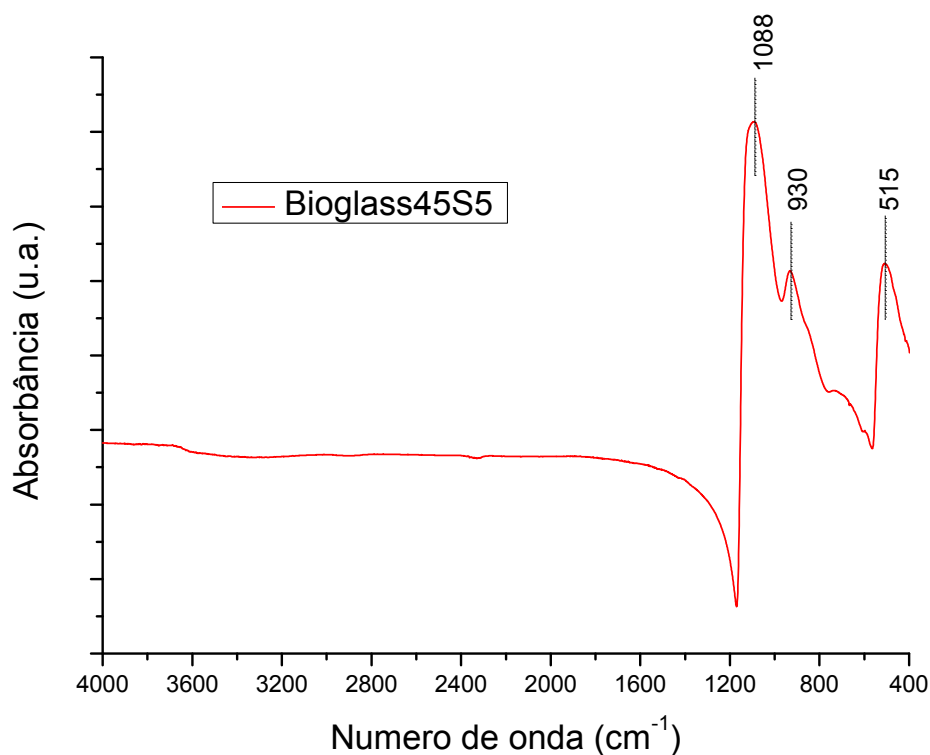


Figura 4.7: Espectro característico de absorbância do Bioglass 45S5.

A Figura 4.8 apresenta os espectros FTIR-ATR normalizados do Bioglass 45S5 e das membranas de quitosana pura e contendo 10 e 50%(m/m) de biovidro.

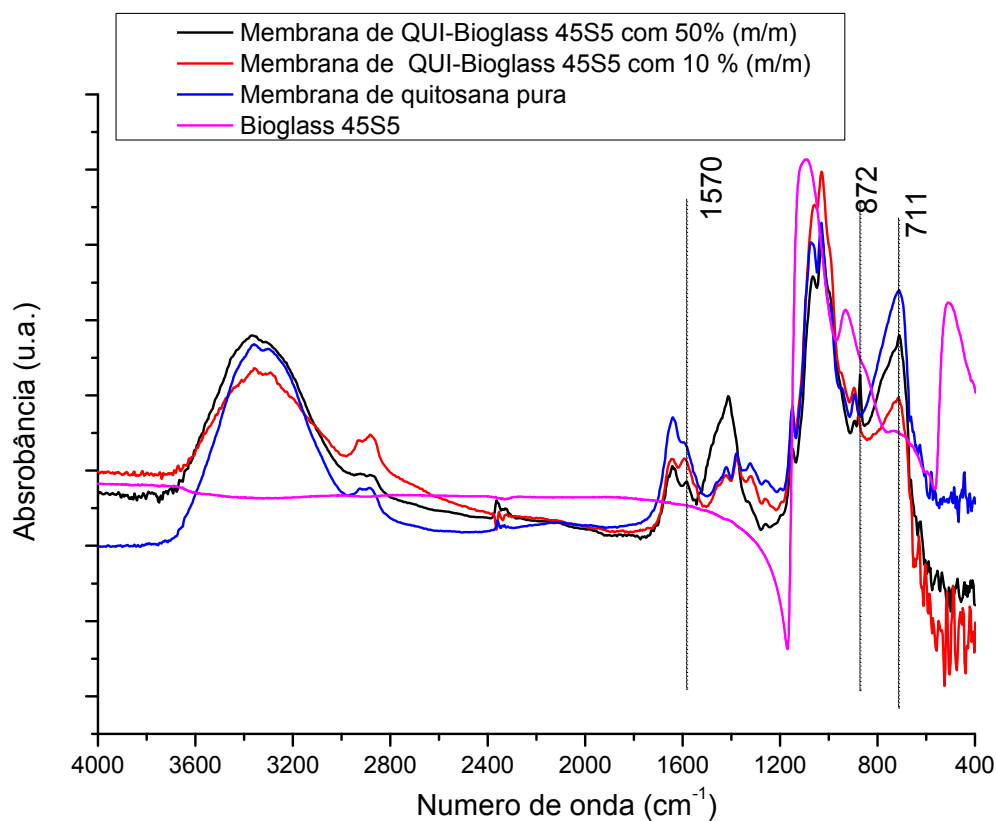


Figura 4.8: Espectros FTIR-ATR do Bioglass 45S5 e das membranas de quitosana 5% (p/v) pura e com 10 e 50%(m/m) de partículas de Bioglass 45S5.

Primeiramente, pode ser observado que nas membranas de quitosana contendo 10 e 50%(m/m) de biovidro (Figura 4.8) não estão evidentes os espectros característicos do bioglass45S5 (figura 4.7).

Para uma melhor observação dos espectros, é mostrada uma ampliação destes na Figura 4.9.

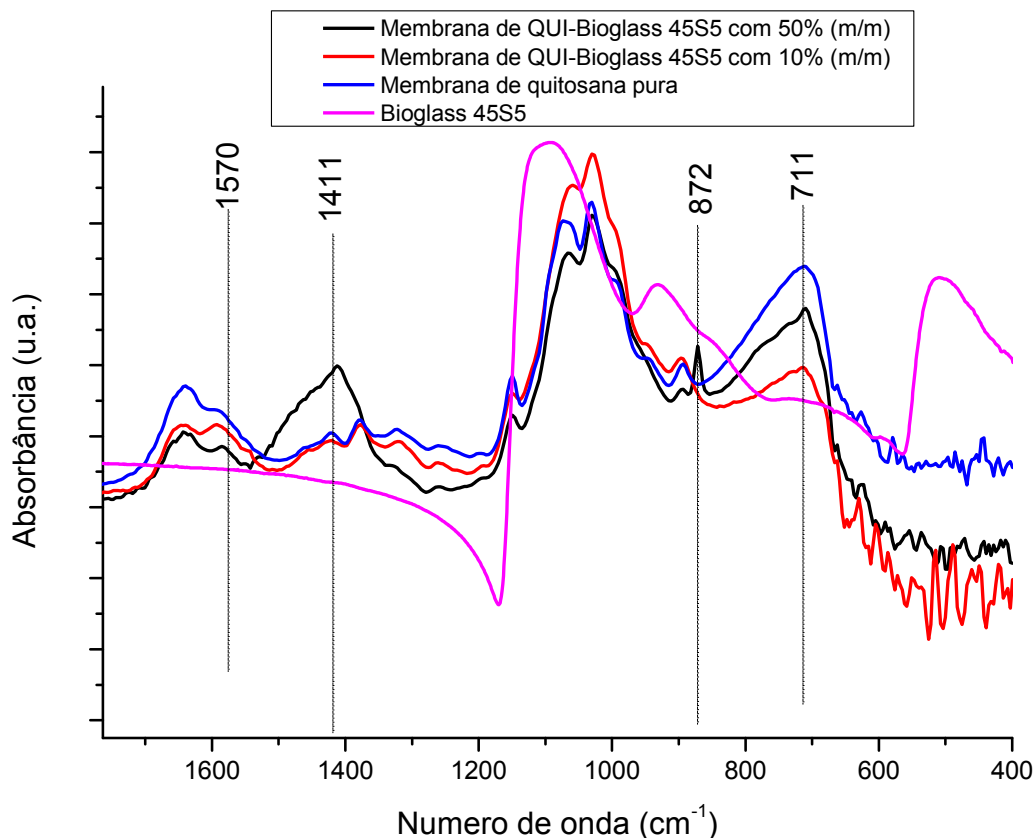


Figura 4.9: Ampliação dos espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} .

Pela Figura 4.9, é observada a presença de picos na região de 1570 cm^{-1} e 872 cm^{-1} nas membranas de quitosana contendo 10 e 50%(m/m) de partículas de Bioglass 45S5. Então, buscou-se na literatura uma resposta para o que seriam estes espectros, uma vez que estes não eram característicos do Bioglass 45S5 e nem da quitosana. Uma hipótese é que estes picos poderiam corresponder à formação de hidroxiapatita carbonatada, oriunda das reações de dissolução e reprecipitação de biovidros imersos em meios aquosos. Na literatura^{53,54,55} foi relatado que estas bandas são representativas das vibrações das moléculas de C=O, na qual é atribuída a formação de carbonatos sobre a superfície do vidro⁵³. No entanto, deve ser verificada a presença de um único pico ou de um duplo pico curto dentro da região de 1570 cm^{-1} . Isto porque um pico individual está relacionado com a presença de um ambiente composto de sílica-sódio, enquanto um duplo pico pode estar relacionado com a presença de sílica-cálcio^{53,54}. Assim, o mecanismo apresentado está correlacionado com o mecanismo de dissolução do Bioglass 45S5 imerso em água, que pode

ocorrer de duas formas, uma dos íons de Na^+ que lixiviam para a solução, ou outra dos íons de cálcio presentes no Bioglass 45S5 que migram para a sua superfície. Daí o resultado da diferença entre os picos dos espectros do carbonato de sódio (NaCO_3) e o pico do espectro do carbonato de cálcio (CaCO_3)⁵⁴. Ainda, na literatura foi encontrado que o espectro de 872 cm^{-1} é normalmente observado em amostras de Bioglass 45S5 que reagiram em pH9 e/ou água deionizada, e está atribuído às vibrações das ligações $\text{CO}^{53,55}$ devido uma maior formação de CaCO_3 ⁵³.

Estas informações nos leva a acreditar que durante a reticulação das membranas com NaOH já está acontecendo a dissolução do vidro, etapa que deveria ocorrer somente quando em contato com os fluidos corpóreos do paciente, mas que está sendo antecipada devido à alta bioatividade do Bioglass 45S5.

Dessa forma, tornou-se interessante adotar para os próximos estudos um vidro que tivesse uma menor taxa de dissolução, sem que houvesse perda da bioatividade, sendo então adotado o Biosilicato.

4.2. Membranas de Quitosana e Biosilicato

4.2.1. Grau de intumescimento

A tabela 4.3 apresenta os valores das massas (secas e úmidas) e o grau de intumescimento (%) das membranas de quitosana pura 2,5% (m/v), e das membranas de quitosana 2,5% (m/v) com concentrações de 40 e 60 % (m/m) de Biosilicato.

Tabela 4.3: medidas das massas e do grau de intumescimento						
	Membrana de quitosana 2,5% (m/v) pura		Membrana de quitosana 2,5% (m/v) com 40%(m/m) de Biosilicato		Membrana de quitosana 2,5% (m/v) com 60%(m/m) de Biosilicato	
Amostra	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)	Massa úmida (gramas)	Massa seca (gramas)
1	0,0107	0,015	0,0351	0,0138	0,0797	0,0379
2	0,0146	0,0073	0,0157	0,0156	0,0515	0,0263
3	0,0214	0,0052	0,0312	0,0243	0,0355	0,0171
4	0,0171	0,0038	0,0289	0,012	0,0413	0,0224
5	0,0386	0,0076	0,0521	0,0074	0,0167	0,0088
Média	0,02	0,008	0,03	0,015	0,04	0,02
Desvio padrão	±0,01	±0,004	±0,01	±0,006	±0,02	±0,01
grau de intumescimento (%)	163,2391		122,9822		99,7333	

A Figura 4.10 apresenta um comparativo dos valores do grau de intumescimento (%) em relação à porcentagem de Biosilicato na membrana de quitosana 2,5% (m/v).

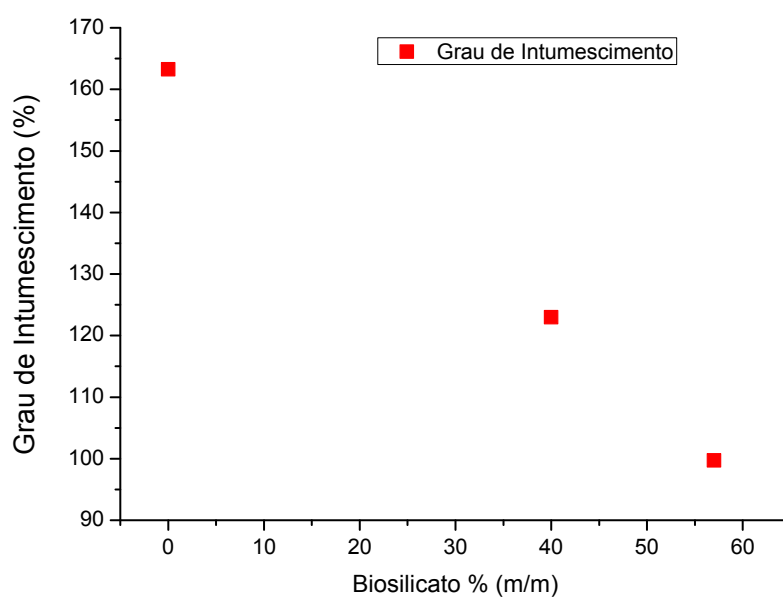


Figura 4.10: Grau de intumescimento (%) em relação à concentração de partículas na membrana de quitosana

Analisando o gráfico da Figura 4.10 é possível notar que quanto maior a concentração de partículas de Biosilicato na membrana de quitosana, menor será o grau de intumescimento (%) da amostra, assim demonstrando que a concentração de partículas interfere na absorção de líquidos. Algo observado na comparação entre as Figuras 4.1 e 4.10 é que a membrana de quitosana pura 2,5% absorveu mais água que a membrana de quitosana pura 5% (m/v) e era esperado um fenômeno inverso nesta comparação. Porém, a presença de partículas de biovidro afetou muito mais o grau de instumescimento das membranas de quitosana 2,5% (m/v).

4.2.2. Morfologia das membranas

A morfologia das membranas de quitosana pura 2,5%(m/v) e das membranas de quitosana 2,5%(m/v) com 40 e 60%(m/m) de partículas de Biosilicato foram observadas por estereomicroscopia e do Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.2.2.1. Esteremicroscopia

A superfície da membrana de quitosana pura 2,5% (m/v) observada pelo esteromicroscópio é mostrada na Figura 4.11.

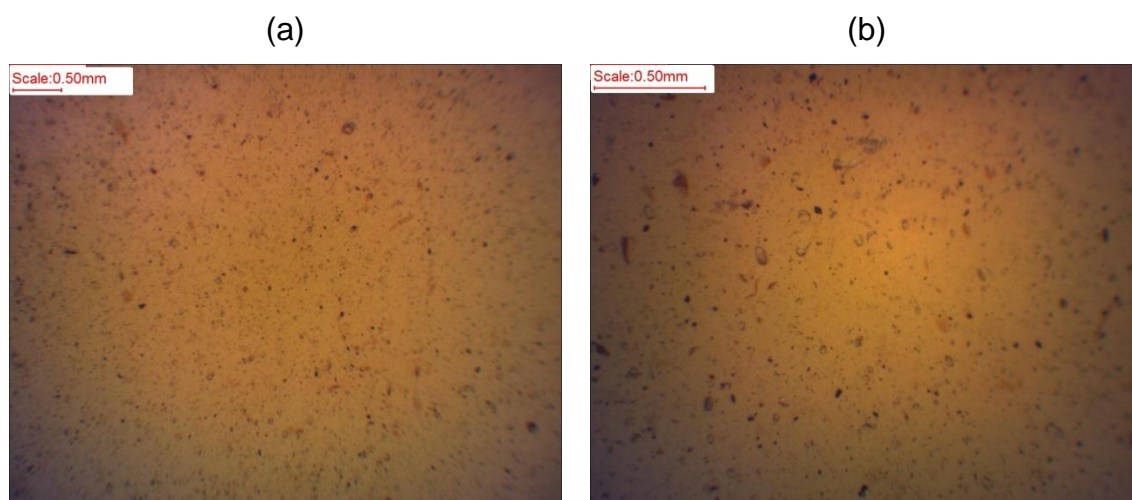


Figura 4.11: Membranas de quitosana pura 2,5%(m/v). Aumentos de (a) 2x e (b) 4,5x.

Analisando as imagens da Figura 4.11, observa-se que a membrana de quitosana 2,5% (m/v) apresentou os mesmos problemas de impurezas e precipitados da membrana de quitosana 5% (m/v), isto pode estar relacionado com: 1) uma má etapa de filtragem; 2) partículas de impurezas menores que $42\text{ }\mu\text{m}$ terem passado na etapa de filtragem e se aglomerado na solução; 3) não ter havido uma boa homogeneização no processo de fabricação da membrana.

As membranas de quitosana com 40 e 60%(m/m) de partículas de Biosilicato observadas pelo estereomicroscópio podem ser vistas nas Figuras 4.12 e 4.13, respectivamente.

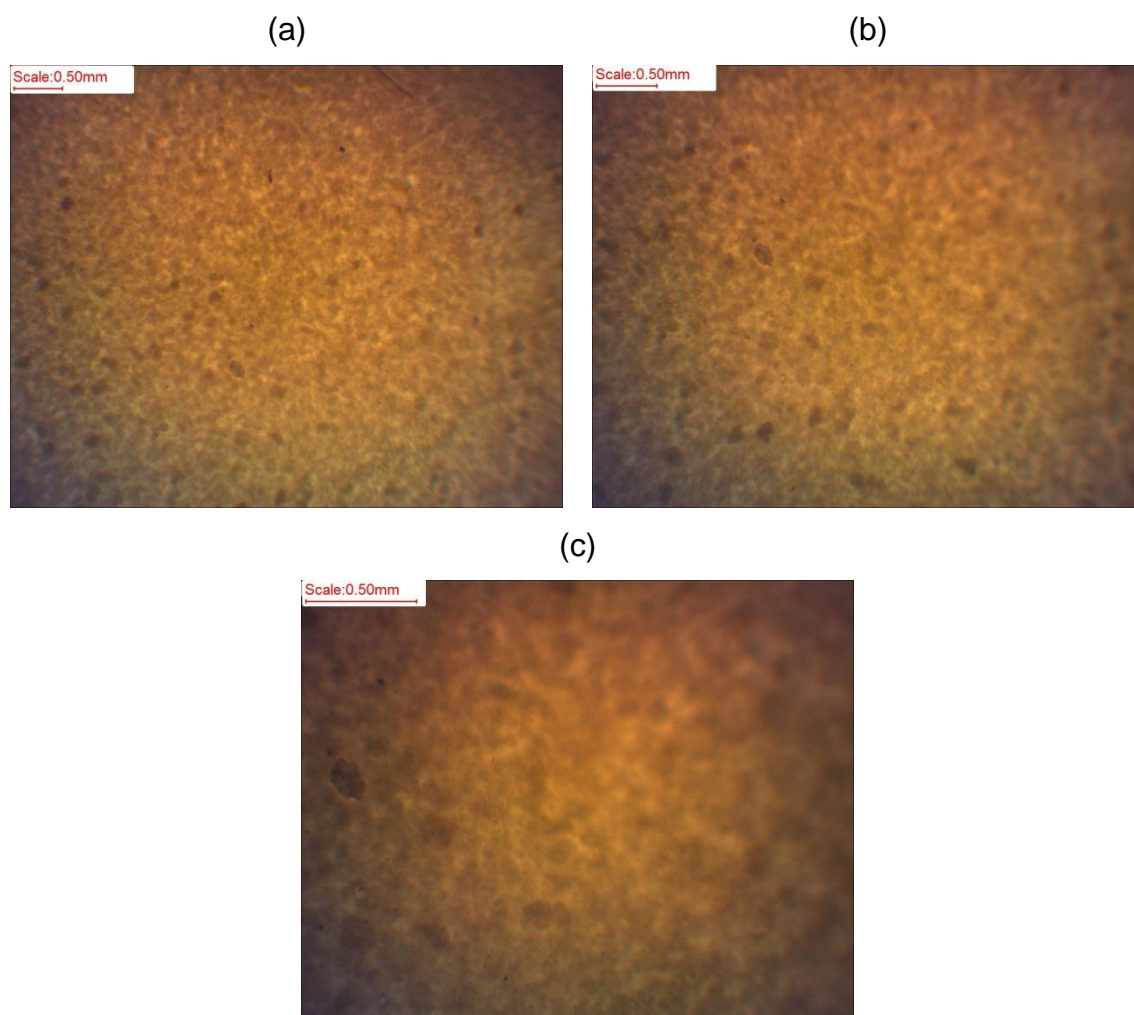


Figura 4.12: Membranas de quitosana 2,5%(m/v) com 40 %(m/m) de partículas de Biosilicato. Aumentos de (a) 2x, (b) 2,5x e (c) 4,5x.

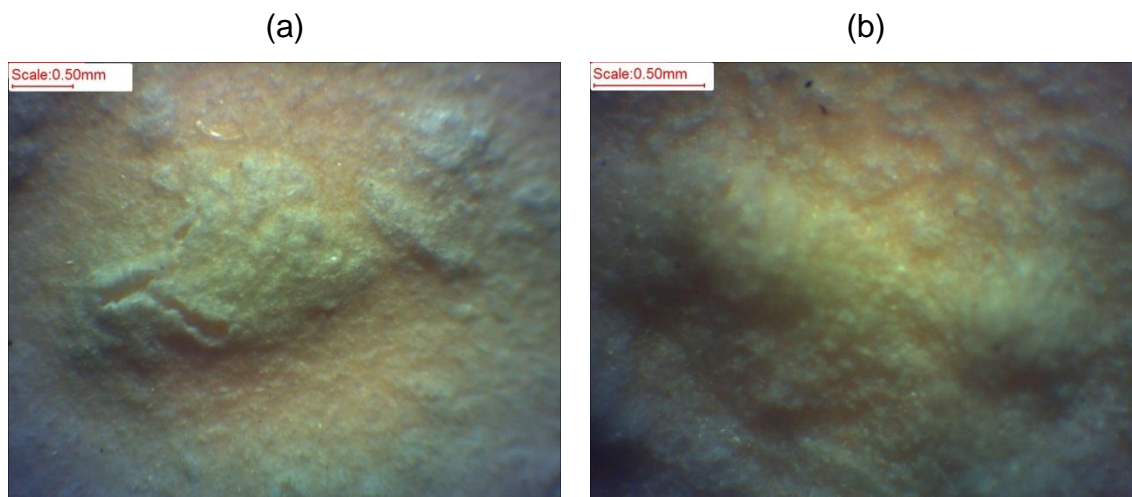


Figura 4.13: Membranas de quitosana 2,5%(m/v) com 60 %(m/m) de partículas de Biosilicato. Aumentos de (a) 2,5x e (b) 4,5x.

Pelas Figuras 4.12 e 4.13, nota-se que as partículas de Biosilicato[®] estão ficando aglomeradas na membrana de quitosana 2,5% (m/v), e que as membranas de quitosana com 60%(m/m) de partículas de Biosilicato apresentam aglomerados de grandes proporções, com aglomerações bem maiores que quando comparados com a quitosana 2,5% (m/v) com 40%(m/m). Estudos indicam que a presença de aglomerados reduz as propriedades mecânicas de um compósito⁴⁸, e os resultados de ensaio mecânico comprovam a redução nestas propriedades das membranas de quitosana com partículas de Biosilicato.

4.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A superfície da membrana de quitosana pura 2,5% (m/v) observada por MEV é mostrada na Figura 4.14.

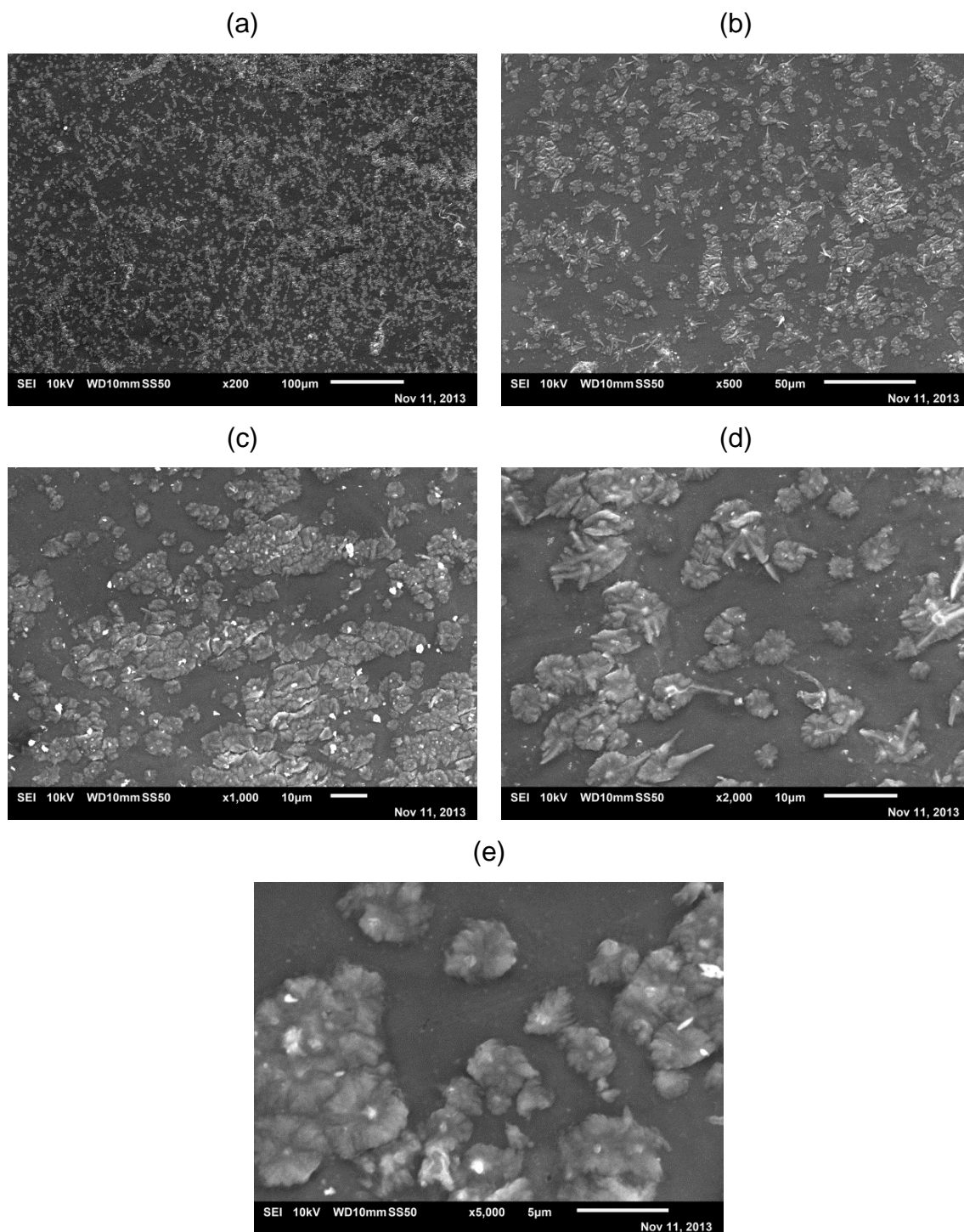


Figura 4.14: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de membranas de quitosana pura 2,5% (m/v). Aumentos: (a) 200x, (b) 500x, (c) 1000x, (d) 2000x (e) 5000x.

Analisando as imagens da Figura 4.14 nota-se que a membrana de quitosana pura 2,5% (m/v) dispõem-se de uma região cristalina com esferulitos (cristalitos) aleatoriamente orientados, separadas por regiões amorfas. Pode ser notado também, que a proporção de esferulitos é maior que a região

amorfa, assim evidenciando que a quitosana possui elevado índice de cristalinidade.

As membranas de quitosana 2,5% (m/v) com 40 e 60%(m/m) de partículas de Biosilicato observadas por MEV são apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16, respectivamente.

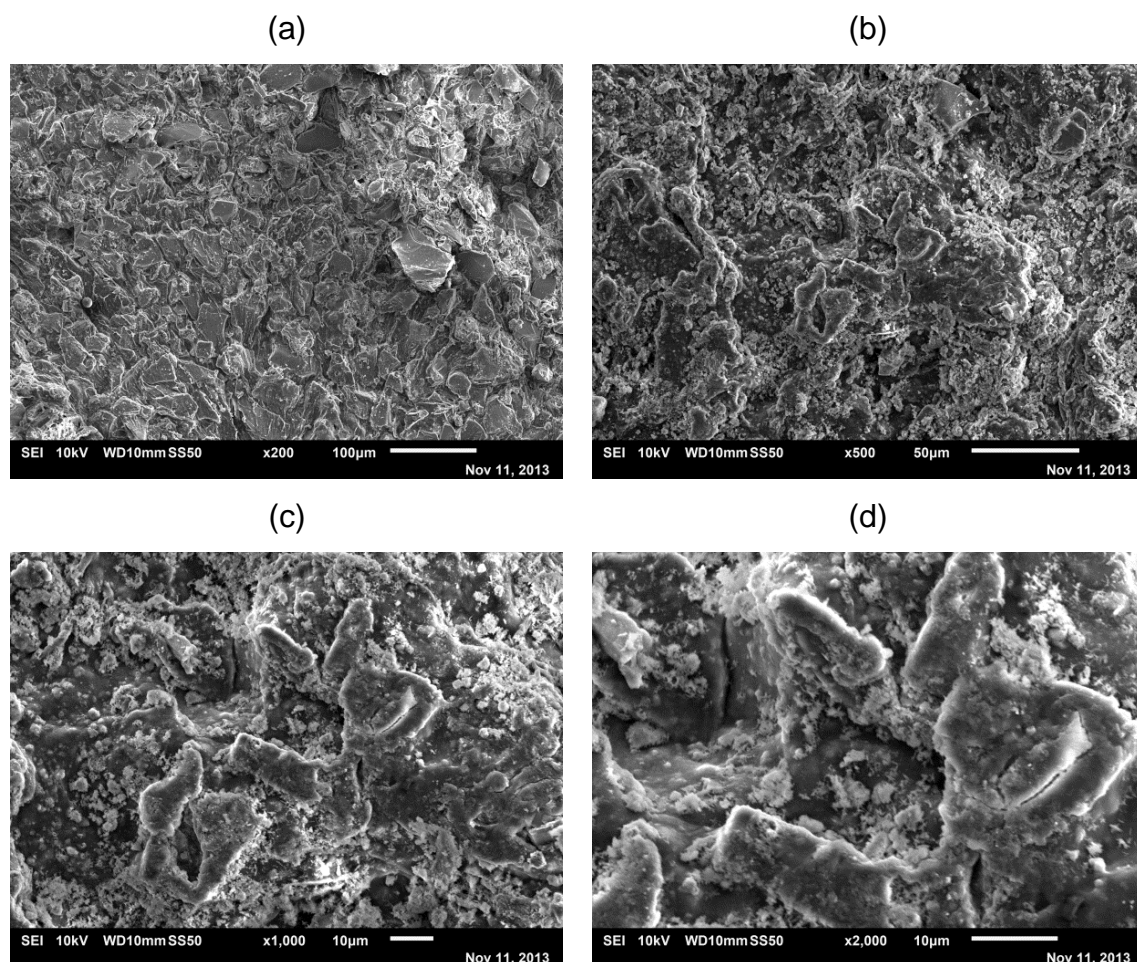


Figura 4.15: Micrografia obtida por Microscopia eletrônica de varredura de membranas de quitosana 2,5% (m/v) com 40%(m/m) de partículas de Biosilicato. Aumentos: (a) 200x, (b) 500x, (c) 1000x e (d) 2000x.

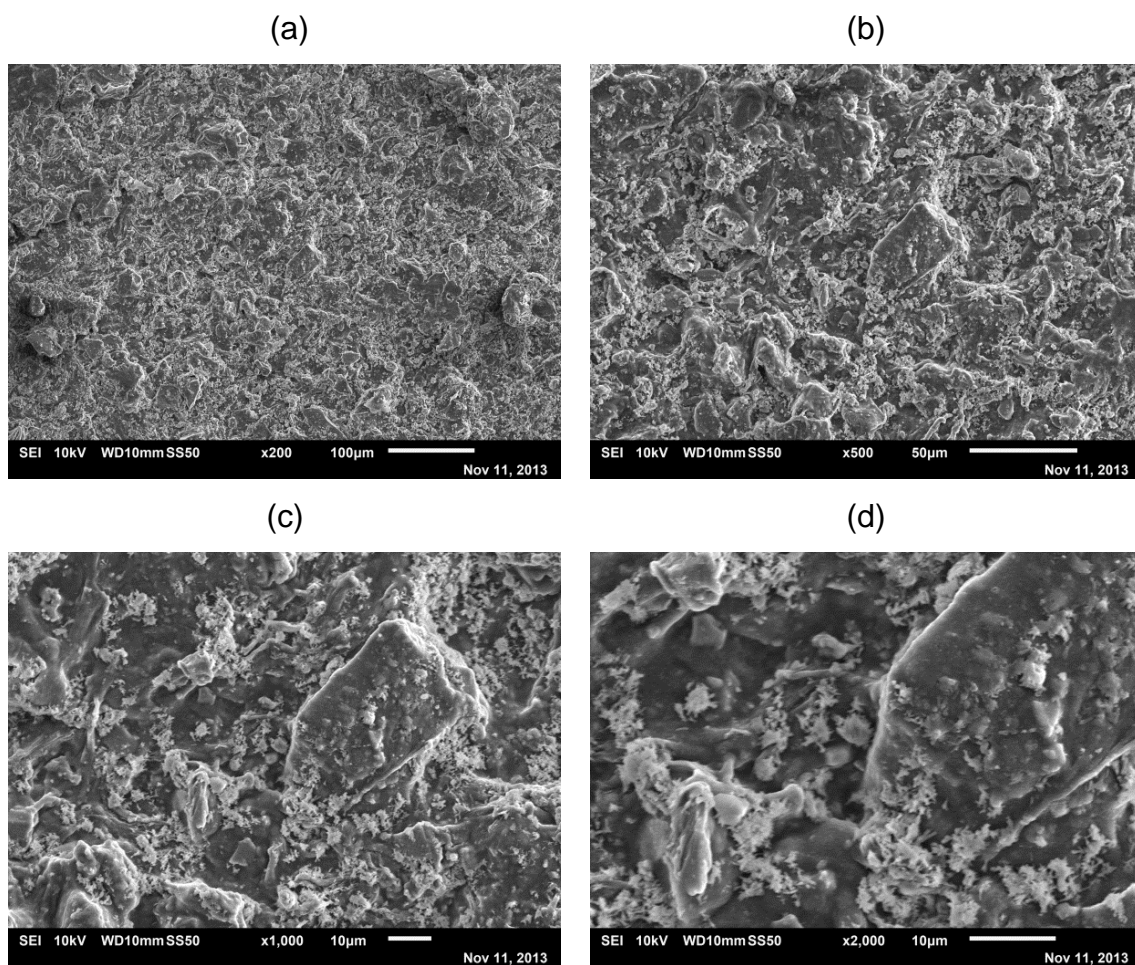


Figura 4.16: Micrografia obtida por Microscopia eletrônica de varredura de membranas de quitosana 2,5% (m/v) com 60%(m/m) de partículas de Biosilicato. Aumentos: (a) 200x, (b) 500x, (c) 1000x e (d) 2000x.

Nas figuras 4.15 e 4.16, é observada a presença de partículas de Biosilicato com tamanho menor que $50\text{ }\mu\text{m}$, embebidas em uma fina membrana de quitosana, e ainda, a formação de cristais menores que $5\text{ }\mu\text{m}$. Estes cristais são semelhantes aos de hidroxiapatita encontrados em estudos in vitro de materiais bioativos^{38,56}, e nas Figuras 4.15 (d) e 4.16 (d) é mais fácil observar esta formação. Acredita-se que, assim como para as membranas de QUI-Bioglass 45S5, a formação de hidroxiapatita esteja ocorrendo no material previamente. Porém, para uma melhor identificação de sua composição, seria necessária a análise por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), mas esta não estava disponível para uso.

4.2.3. Composição das membranas – microATR-FTIR

Na Figura 4.17 são mostrados os espectros FTIR-ATR da membrana de quitosana 2,5% (m/v) contendo 40%(m/m) de Biosilicato modificado, do Biosilicato modificado e da membrana de quitosana pura.

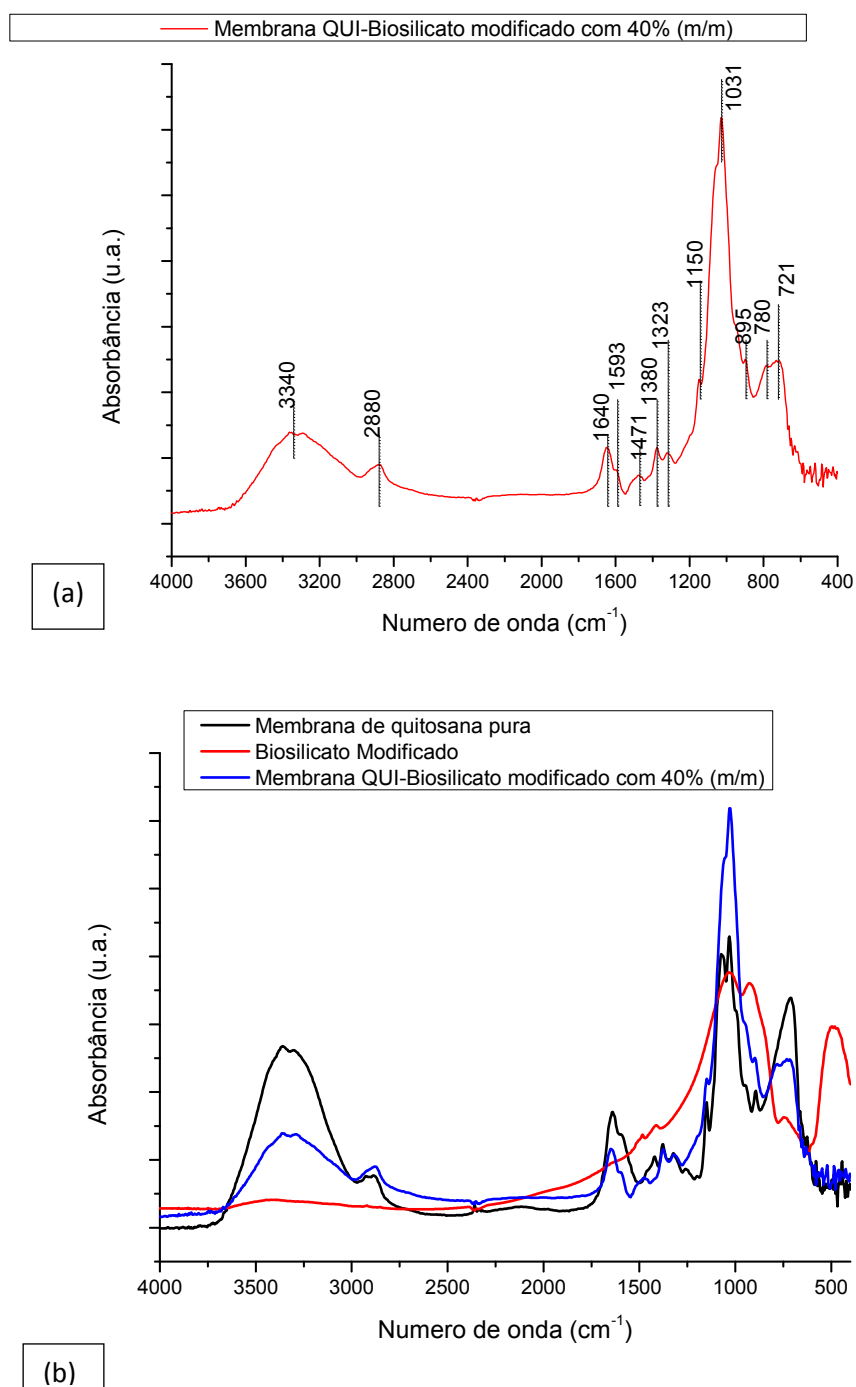


Figura 4.17: Espectros de FTIR (a) da membrana de quitosana 2,5% (m/v) contendo 40%(m/m) de Biosilicato modificado (b) da membrana de quitosana pura, do Biosilicato modificado e da membrana QUI-Biosilicato modificado 40%(m/m).

A Figura 4.18 é uma ampliação da Figura 4.17 para uma melhor observação dos espectros.

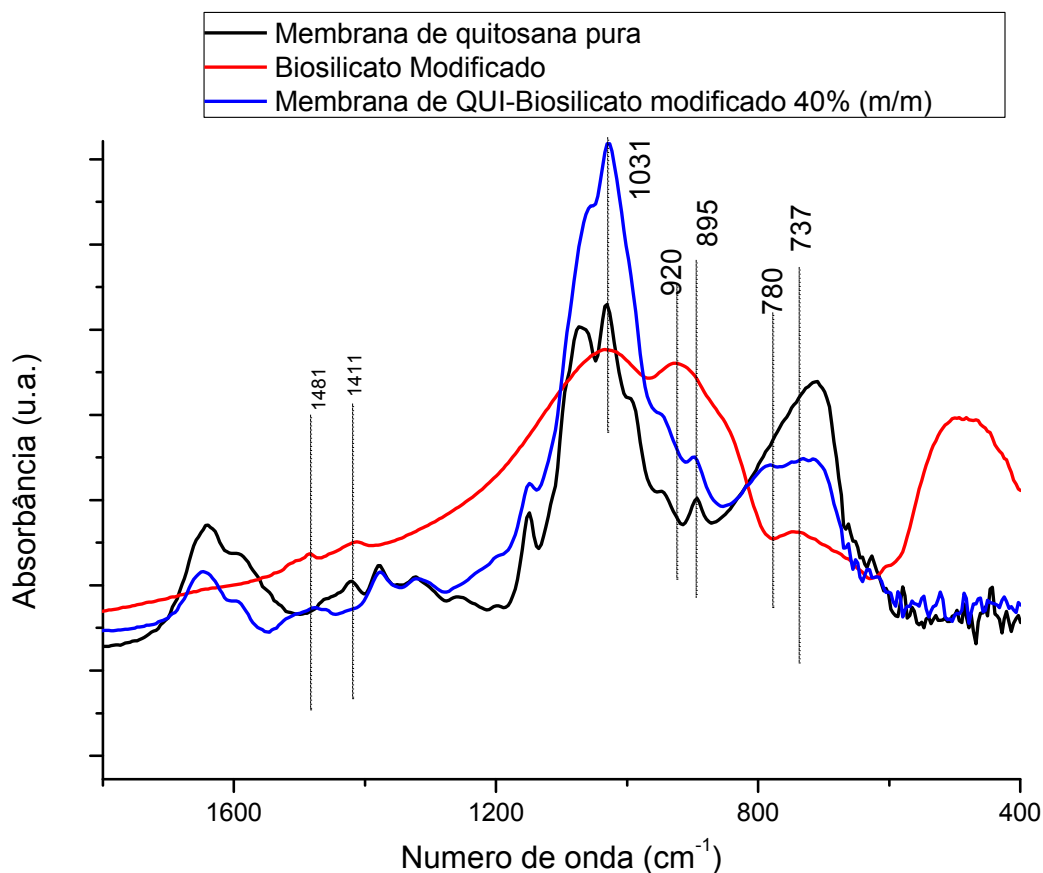


Figura 4.18: Ampliação dos espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} .

Analisando as figuras 4.17 e 4.18 observa-se que as membranas de quitosana 2,5% (p/v) com partículas de Biosilicato modificado 40% (m/m) apresentam picos nas regiões de 1481, 1411, 1031, 920 e 737 cm^{-1} , sendo estes característicos do Biosilicato modificado. A presença destes picos na membrana pode indicar a incorporação do biovidro pela quitosana. Além disso, é observado uma banda na região de $\sim 890 \text{ cm}^{-1}$ que está relacionado com o estiramento CO e CO_3^{2-} ⁵⁶, isto representaria a formação de hidroxiapatita carbonatada nas membrana compósito. Já uma maior intensidade do espectro na região da banda $\sim 1031 \text{ cm}^{-1}$ pode também ser atribuída ao estiramento do PO⁵⁶. Ainda, a formação de hidroxiapatita também pode ser observada nas imagens do MEV (Figuras 4.15 e 4.16), o que corrobora estes resultados.

Na Figura 4.19 são mostrados os espectros FTIR-ATR da membrana de quitosana 2,5% (m/v) contendo 60%(m/m) de Biosilicato modificado, do Biosilicato modificado e da membrana de quitosana pura.

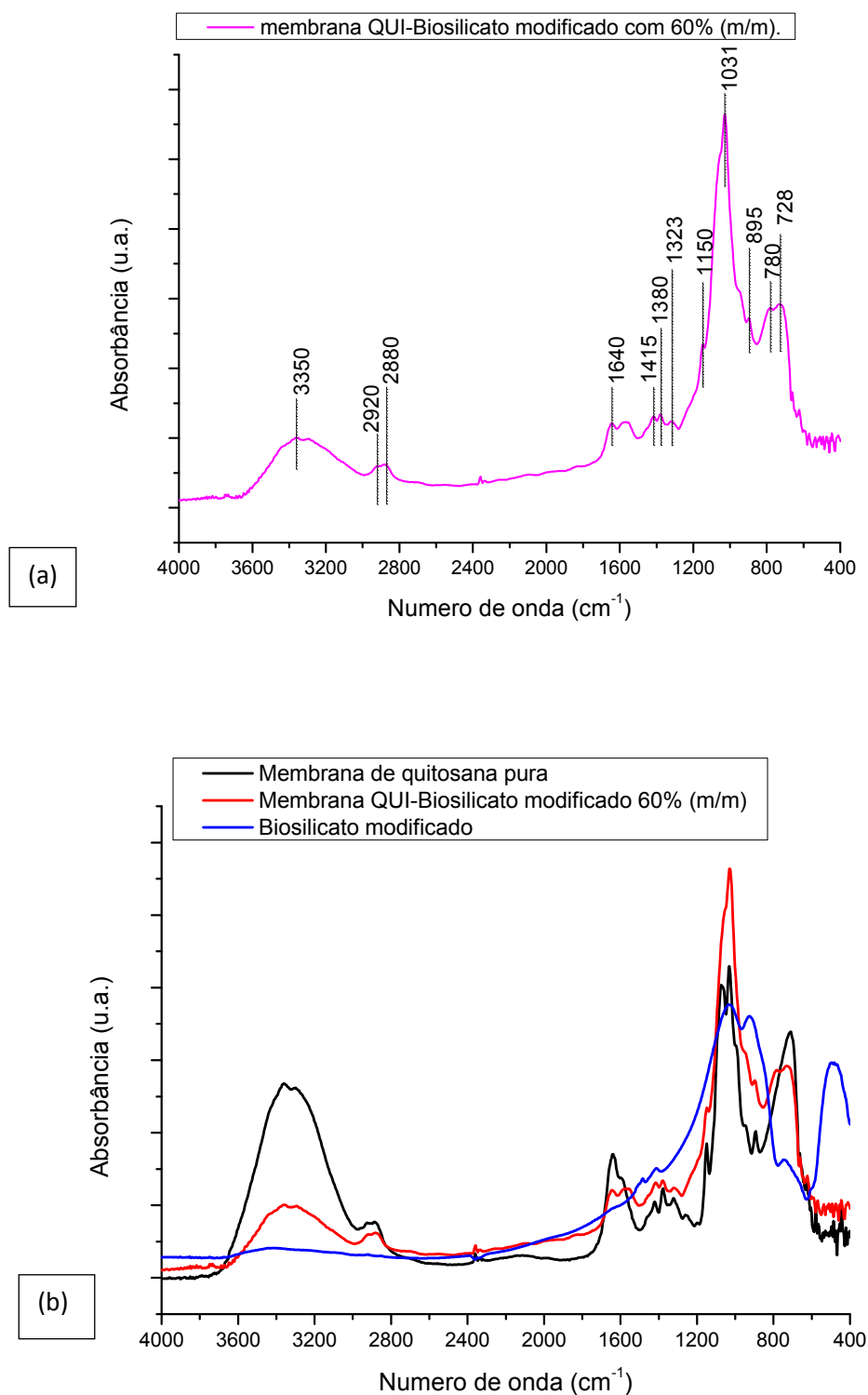


Figura 4.19: Espectros de FTIR (a) da membrana de quitosana 2,5% (m/v) contendo 40%(m/m) de Biosilicato modificado (b) da membrana de quitosana pura, do Biosilicato modificado e da membrana QUI-Biosilicato modificado 60%(m/m).

A Figura 4.20 é uma ampliação da Figura 4.19 para uma melhor observação dos espectros.

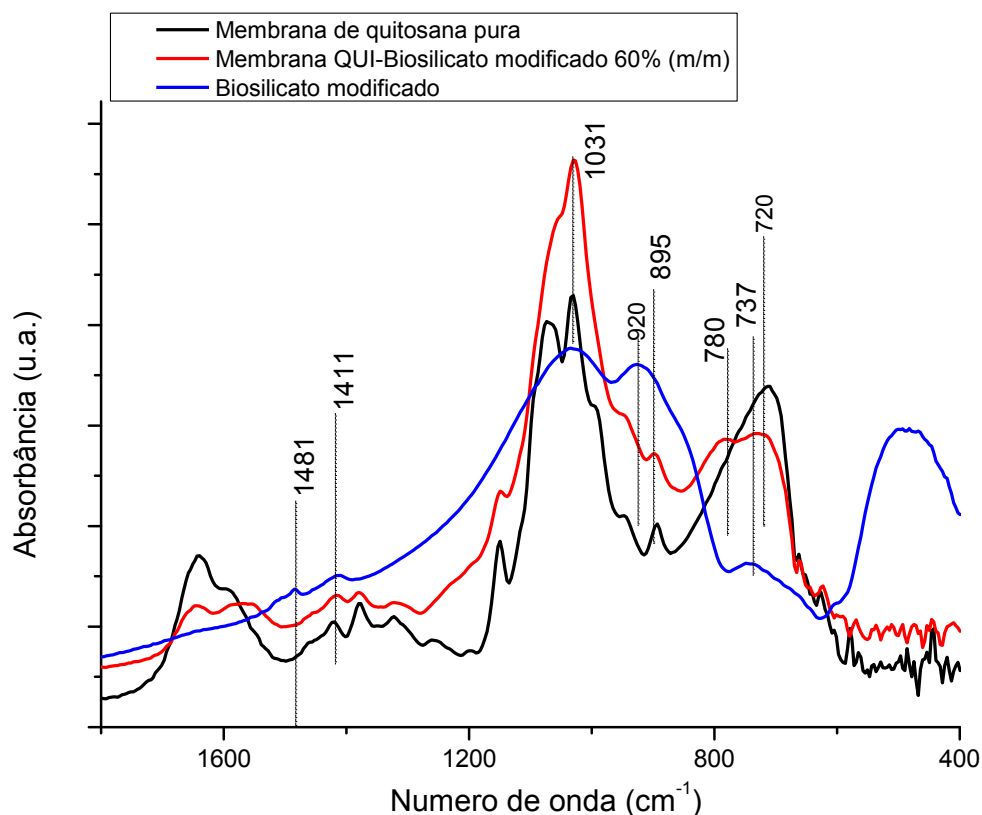


Figura 4.20: Ampliação dos espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} .

Semelhante às membranas com adições de 40% (m/m), podem ser identificados picos nas regiões de 1411, 1031, 920, 737 cm^{-1} nos espectros apresentados nas Figuras 4.19 e 4.20, indicando possivelmente a incorporação do Biosilicato modificado pela quitosana e, conseqüentemente, formação do compósito. Entretanto, novamente pode ser observada a presença de cristais de hidroxiapatita, com bandas características em 890 e 1031 cm^{-1} .

Porém, comparados os materiais desenvolvidos com o Biosilicato modificado, algo notado foi que na membrana de quitosana contendo 40%(m/m) (Figura 4.18) há um aumento na intensidade na banda 1481 cm^{-1} e um decréscimo na banda 1411 cm^{-1} , já na membrana de quitosana contendo 60%(m/m) (figura 4.20) ocorre o fenômeno inverso. Para este comportamento, é possível supor que a variação na pressão exercida pela ponta de germânio

pode ter influenciado nestas intensidades⁵⁷. Outra suposição é que as moléculas de NH_2 da quitosana podem ter se transformado (através de reações) em NH_3 , ficando positivamente carregadas e reagindo com o grupo fosfato (PO_4^{3-})^{58,59}.

4.2.4. Módulo de elasticidade e Resistência à Tração

A Tabela 4.4 apresenta os valores médios do módulo de elasticidade e resistência à tração de dez amostras.

Tabela 4.4: valores médios do módulo de elasticidade e da resistência a tração das membranas.		
Membrana	Mód.Elasticidade	Resistência à tração
	(GPa)	(MPa)
Quitosana pura 2,5% (p/v)	$0,9 \pm 0,2$	47 ± 12
Quitosana + 40%(m/m) Biosilicato	$0,8 \pm 0,2$	22 ± 4
Quitosana + 60%(m/m) Biosilicato	$0,5 \pm 0,1$	12 ± 5

Analisando os dados obtidos na tabela 4.4, o comportamento mecânico não ocorreu como o esperado que com o aumento da concentração de partículas de vidro (Biosilicato) os valores do módulo de elasticidade cresceriam, porém ocorreu o fenômeno inverso, o módulo de elasticidade decresceu com o aumento da concentração de partículas. O que pode influenciar na formação de compósitos com propriedades mecânicas inferiores a da matriz é quando o teor de reforço encontra-se abaixo da concentração crítica ou quando há formação de aglomerados que fragilizam o sistema⁴⁸. Neste caso o que pode ter ocorrido para a diminuição do módulo de elasticidade das membranas de quitosana 2,5% (m/v) quando acrescentado partículas de vidro, foi a má dispersão da carga e a formação de aglomerados na membrana. Análises micrográficas feitas através do estereomicroscópio confirmam que houve a formação de aglomerados quando a incorporação da carga na matriz.

5. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foi desenvolvido um projeto piloto com o intuito de obtenção de membranas compósito de quitosana com biovidro para aplicações em tratamento de úlceras cutâneas. Para tanto, foram testados dois biovidros obtidos por processo de fusão: Bioglass 45S5 e Biosilicato modificado. Entretanto, foi observado que o aumento da concentração de partículas de biovidro na membrana de quitosana interferiu negativamente na capacidade de absorção de água e nas propriedades mecânicas. A análise morfológica revelou que houve uma aglomeração de partículas de biovidros nas membranas, e isto influenciou estes resultados. Para a utilização de vidros de fusão na obtenção destes compósitos seria necessária uma modificação superficial, de forma a privilegiar ligações entre a superfície do vidro e da quitosana. Por fim, o Bioglass 45S5 e o Biosilicato modificado reagiram mais rápido que o esperado, formando hidroxiapatita carbonatada na superfície, possivelmente devido à etapa de reticulação com NaOH.

Desta forma, ainda serão necessários mais estudos e preparo de novas membranas de quitosana com biovidros e vitrocerâmicas, porém, ambos feitos por processo sol-gel para a obtenção do material de interesse. Além disso, deverá ser buscado um meio alternativo no processamento das membranas com as partículas de biovidros e vitrocerâmicas para que não haja aglomerações de partículas no compósito e nem a formação de hidroxiapatita antecipadamente. Tudo isto para que futuramente este biomaterial esteja apto para testes *in vivo* para o tratamento de úlceras.

Como possíveis trabalhos futuros, são sugeridos:

- A substituição dos vidros fabricados por fusão por vidros feitos a partir de sol-gel, para uma maior interação dos vidros com as membranas de quitosana.
- Soluções menos concentradas de quitosana e também menores concentrações de partículas de vidros na membrana, para uma maior homogeneização da matriz com o reforço.
- Substituição do agente reticulante NaOH por glutaraldeído, para minimizar o problema da reatividade do vidro na membrana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ministério da Saúde.** *Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes.* 2. Brasília : Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2008.
2. **Ministério da Saúde.** *Doença falciforme : úlceras : prevenção e tratamento / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada.* Brasília : Ministério da Saúde, 2012.
3. **Kloste, A. P.** Desenvolvimento e análise “in vitro” do efeito antimicrobiano de bandagem bucal. Bauru. 2011. Tese de mestrado.
4. **Wei-Tao Jia, et al.** Novel borate glass/chitosan composite as a delivery vehicle for teicoplanin in the treatment of chronic osteomyelitis. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 812–819.
5. **O'Donnell, Matthew D.** Melt-Derived Bioactive Glass. [A. do livro] Julian Jones and Alexis G. Clare. *Bio-glasses : an introduction.* Chichester, West Sussex : Wiley, 2012.
6. **Hench, L.L. and Polak, J.M.** (2002) Third-generation biomedical materials. *Science*, 295, 1014–1017.
7. **Siqueira RL, Zanotto ED.** Biosilicato: Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 7, 1231-1241, 2011.
8. **Wilson, J.; Pigott, G. H.; Schoen, F. J.; Hench, L. L.;** *J. Biomed. Mater. Res.* 1981, 15, 805.
9. **Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC.** *Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica.* Jul-Dez de 2010, *Rev.Med.* (São Paulo), pp. 125-131.
10. **Blanes, Leila.** *Tratamentos de feridas. Cirurgia vascular: guia ilustrado.* São Paulo. *BAP Baptista® Médicos Associados Ltda.* [Online] Baptista-Silva JCC, 2004. [Citado em: 20 de Novembro de 2013.] <http://bapbaptista.com.br/feridasLeila.pdf>.
11. **Broughton G , Janis JE, Attinger CE.** The basic science of wound. *Plastic & Reconstructive Surgery.* June de 2006, Vol. 117, pp. 12S-34S.
12. **Gray H, et al.** *Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery.* Nova Iorque : Churchill Livingstone, 1995. pp. 395-416.
13. **Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK.** Cicatrização de feridas. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* Artigo de revisão, 2007, Vol. 20, (1), pp. 51-58.
14. **ALBERTS, Bruce.** *Biologia molecular da célula.* 5 ed. Porto Alegre : Artmed, 2010.
15. **Gartner, L. P. & Hiatt, J. L.** *Tratado de Histologia em Cores.* 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2003.
16. **Junqueira, L.C. & Carneiro, J.** *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004.
17. **BOSQUEIRO, C. M. et al.** *Manual de tratamento de feridas.* Campinas, SP : Unicamp, 1999.
18. **SANTOS, Joseane Brandão et al.** Avaliação e tratamento de feridas: Orientação aos profissionais de saúde. [Online] Hospital de Clínicas-RS, 2011. [Citado em: 20 de Novembro de 2013.]

- <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/34755/000790228.pdf?sequence=1>.
19. **LARANJEIRA, Mauro C. M. and FAVERE, Valfredo T. de.** Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quím. Nova* [online]. 2009, vol.32, n.3, pp. 672-678
 20. **SILVA, Hélio S. R. Costa e SANTOS, Kátia S. C. R. dos and FERREIRA, Elizabeth I.** Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quím. Nova*. 2006, Vol. 29,n.4, pp. 776-785.
 21. **Kubota, N.; Tastumoto, N.; Sano, T.; Toya, K.;** *Carbohydr. Res.* 2000, 324, 268.
 22. **M.A. Barbosa, A.P. Pêgo and I.F. Amaral.** 2.213 - Chitosan. [A. do livro] Paul Ducheyne. *Comprehensive Biomaterials*. Oxford : Elsevier, 2011, pp. 221-237.
 23. **Sergio Paula Campanha Filho, et. al.** Propriedades e Aplicações de Quitosana. *Revista processo químicos*. [Online] Julho/ dezembro de 2007. [Citado em: 21 de Novembro de 2013.] http://www.rpqsena.org.br/index.php?option=com_k2&view=item&id=5:propriedade-s-e-aplica%C3%A7%C3%B5es-de-quitosana.
 24. **Abram, A. P.; Higuera, I.;** Em Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones, A. P.Abram ed., Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial, Lima, Peru, 2004.
 25. **Campana Filho, S. P.; Britto D.; Curti E.; Abreu F. R.; Cardoso M. B.; Battisti M. V.; Sim P. C.; Goy R. C.; Signini R.; Lavall, R. L.;** *Quím. Nova* 2007, 30 (3), 644.
 26. **Muzzarelli, R. A. A.;** *Natural Chelating Polymers*, Pergamon: Oxford, 1973, p. 1-254.
 27. **Singla, A. K.; Chawla, M.;** *J. Pharm. Pharmacol.* 2001, 53, 1047.
 28. **Tonhi, E.; Peplis, A. M. G.;** *Quím. Nova* 2002, 25, 943.
 29. **Lifeng, Q.; Zirong, Xu.; Jiang, X.; Zou, X.;** *Carbohydr. Res.* 2004, 339, 2693.
 30. **Rao, S. B.; Sharma, C. P.;** *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 1997, 34, 21.
 31. **Ravi Kumar, M. N. V.;** *React. Funct. Polym.* 2000, 46, 1.
 32. **Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I.;** *Quím. Nova* 2006, 29, 776.
 33. **Allan, G. G.; Altman, L. C.; Bensinger, R. E.; Gosh, D. K.; Hirabayasi, Y.; Neogi, S.** Em *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*; Zikakis, J. P., ed.; Academic Press: Orlando, 1984
 34. **Carter, I. R.;** *J. Fam. Practice.* 2001, 50, 394
 35. **Aksungur, P.; Sungur, A.; Ünal, S.; Iskit, A. B.; Squier, C. A.; Senel, S.;** *J. Controlled Release* 2004, 98, 269
 36. **Issa, M.M.; Köping-Höggard, M.; Artursson, P.;** *Drug Discovery Today: Technologies / Drug delivery/formulation and nanotechnology* 2005, 2, 1.
 37. **P.N. De Aza,* A.H. De Aza, P. Pena and S. De Aza.** Bioactive glasses and glass-ceramics. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*. 2007, Vol. 46, [2], pp. 45-55.
 38. **Hench, L.L.** (1991) Bioceramics – from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74, 1487–1510
 39. **Clark, A.E., Pantano, C.G. and Hench, L.L.** (1976) Auger spectroscopic analysis of Bioglass corrosion films. *Journal of the American Ceramic Society*, 59, 37–39.

40. **Ravagnani, C.**; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2003.
41. **Kokubo, T.**; Bioceramics and their clinical applications, CRC Press: Boca Raton, 2008.
42. **Moura Neto, J.**; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007; Moura Neto, J.; Teixeira, L. N.; Ravagnani, C.; Peitl, O.; Zanutto, E. D.; Beloti, M. M.; Panzeri, H.; Rosa, A. L.; Oliveira, P. T.; J. Biomed. Mater. Res. 2007, 82, 545.
43. **Crovace, M. C.**; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.
44. **Assis, O. B. G., Silva, V. L.**, (2003) Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n.4, pp. 223-228.
45. **Silva, R. M., Silva, G. A., Coutinho, O. P. et al.**, (2004) Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.15, pp. 1105-1112.
46. **Thein-Han, W. W. e Kittyanant, Y.**, (2007) Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80, n.1, pp. 92-101.
47. **Fernandes, Ligia Lopes.** Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Junho de 2009. [Citado em: 27 de Novembro de 2013.] <http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10003532.pdf>.
48. **Neto, J. R. A. et al.** Influência da Adição de uma Carga Nanoparticulada no Desempenho de Compósitos Poliuretano/Fibra de Juta. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 17, nº 1, p. 10-15, 2007.
49. **COSTA JR., Ezequiel de Souza and MANSUR, Herman Sander.**Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Quím. Nova* [online]. 2008, vol.31, n.6, pp. 1460-1466. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000600034>.
50. **Shimadzu.** Q: I can see noise near 4000 to 3400 cm⁻¹ and 2000to1300 cm⁻¹ in the spectrum. How can I get rid of it? Shimadzu. [Online] [Citado em: 28 de Novembro de 2013.] <http://www.shimadzu.com/an/ftir/support/faq/4.html>.
51. **Shigemasa, Y. et al.**, Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 18, p. 237-242, 1996.
52. **Daguno, Juliana Kelmy Macário de Faria**, Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema 3CaO.P2O5-SiO2-MgO para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas; orientador Claudinei dos Santos --Lorena, 2010.(Tese de doutorado)
53. **Marta Cerruti, David Greenspan, Kevin Powers.** Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 14, May 2005, Pages 1665–1674 < link <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.009> >
54. **Sara Abdollahi.** Bioglass 45S5 transformation and molding material in the processing of biodegradable poly-DL-lactide scaffolds for bone tissue engineering.

Department of Mining and Materials Engineering McGill University, Montréal
December 2011.

55. **Stoch A, Jastrzebrski W, Brozek A, Trybalska B, Cichocinska MS, Zarawara E.** FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids. *J Mol Struct* 1999;511:287–94.
56. **Elke M. F. et al.** Filmes e matrizes hibridas de quitosana e vidro bioativo: avaliação da bioatividade e do comportamento mecânico. Depto. de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brasil. Ano 2012
57. **Shimadzu.** FTIR : Fundamentals of FTIR Analysis > ATR Precautions Shimadzu. [Online] [Citado em: 28 de Novembro de 2013.] <http://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/letter1/atr1.html>.
58. **A. C. B. M. Fook ; BARBOSA, R. C. ; Thiago Bizerra Fidèles ; G.T.F.S. Furtado ; Marcus Vinícius Lia Fook .** Arcabouços Compósitos Hidroxiapatita/Quitosana. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
59. **VERMA, D., KATTI, K.S., KATTI, D.R.** Effect of biopolymers on structure of hydroxyapatite and interfacial interactions in biomimetically synthesized hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 36, 2008.