

## Síntese e Caracterização de Membranas Porosas de Quitosana com Hidroxiapatita Obtida a partir da Casca do Ovo de Galinha

F. M. Sousa<sup>1</sup>, T. G. Almeida<sup>1</sup>, E. L. Canedo<sup>1\*</sup>, R. C. Barbosa<sup>2</sup>, M. V. L. Fook<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Av. Aprígio Veloso, 882, Bodocongó, Campina Grande – PB.

<sup>2</sup>Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais - CERTBIO da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil.

(Recebido em 16/03/2018; revisado em 09/04/2018; aceito em 23/04/2018)  
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

### Resumo:

Este trabalho objetiva obter hidroxiapatita a partir da casca do ovo de galinha pelo método da via úmida e sintetizar membranas porosas de quitosana, sem e com hidroxiapatita, pelo método de liofilização. As amostras foram caracterizadas por Difração de Raios X (DRX), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS). Através dos resultados verificou-se que é possível obter hidroxiapatita através da casca do ovo de galinha, e notou-se que o aumento do teor de hidroxiapatita nas membranas de quitosana resulta no aumento da cristalinidade, sugerindo também uma maior capacidade de retenção de água e estabilidade térmica das membranas. Na micrografia observou-se a presença de poros interconectados de tamanho e formas variados. No EDS verificou-se a presença de carbono, oxigênio, nitrogênio, cálcio e fósforo nas membranas. Portanto, foi possível obter hidroxiapatita a partir da casca do ovo de galinha e membranas de quitosana/hidroxiapatita.

**Palavras-chave:** Quitosana; Hidroxiapatita; Via úmida; Membranas.

### Abstract:

The goal of this work is to obtain hydroxyapatite from chicken eggshell by the wet road method and to synthesize porous membranes of chitosan, without and with hydroxyapatite, by the lyophilization method. The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray Dispersive Energy Spectroscopy (EDS). Through the results it was found that it is possible to obtain hydroxyapatite through the chicken eggshell, and it was noted that the increase of the hydroxyapatite content in the chitosan membranes results in increased crystallinity, also suggesting a higher water retention capacity and thermal stability of the membranes. In the micrograph the presence of interconnected pores of varied size and shapes was observed. In EDS the presence of carbon, oxygen, nitrogen, calcium and phosphorus in the membranes was verified. Therefore, it was possible to obtain hydroxyapatite from chicken eggshell, and chitosan/hydroxyapatite membranes.

**Keywords:** Chitosan; Hydroxyapatite; Wet road; Membranes

### 1. Introdução

Biomateriais são materiais não vivos utilizados na área médica ou biomédica, que tem o propósito de interagir com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente. Muitos deles são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, uma vez que não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica, além de apresentarem disponibilidade ilimitada [1]. Vários são os biomateriais desenvolvidos e aplicados em modelos animais para obtenção de uma regeneração óssea mais rápida, tais como os biopolímeros e os cimentos de fosfato de cálcio [2-3].

A quitosana é um biopolímero, polissacarídeo de cadeia linear, encontrada em pequenas quantidades em muitos tipos de fungos. Na sua forma semicristalina, a quitosana é normalmente insolúvel em soluções aquosas neutras, mas solúvel em soluções ácidas diluídas (pH <6,0), onde os íons H<sup>+</sup> livres no sistema se ligam ao grupo amino (NH<sub>2</sub>) deixando os protonados, diminuindo as ligações inter e intramoleculares. Assim, o conhecimento preciso do teor de grupos (NH<sub>2</sub>) é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações [4-6].

A quitosana é um polissacarídeo que estimula o sistema imune *in vitro* e *in vivo* a favorecer o processo cicatricial e também vêm sendo estudado com fins terapêuticos em vários setores da saúde, pois atua como agente cicatrizante,

\*Email: ecanedo2004@yahoo.com (E. L. Canedo)

antimicrobiano e hemostático, além de possuir efeito analgésico [7]. Também age como agente acelerador da reparação do tecido ósseo [8] e essas características ainda podem ser potencializadas com a adição de fosfatos de cálcio, em particular, a hidroxiapatita.

Os polissacarídeos apresentam características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, propriedades básicas para serem utilizados como biomateriais [9]. Quando associados à hidroxiapatita, as propriedades de reposição do tecido ósseo podem ser potencializadas devido à presença do cálcio e pelo fato da hidroxiapatita ser a fase mineral encontrada no tecido ósseo.

A hidroxiapatita (HA), fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é um biomaterial cerâmico e bioativo, do grupo do fosfato de cálcio (CaP). Apresenta formulação físico-química semelhante à do osso, possibilitando assim substrato para que ocorra o processo de osteocondução [10].

Caliman em seu estudo sintetizou hidroxiapatita por meio de uma reação de precipitação por via úmida entre o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e teve como fonte de cálcio a casca de ovo de avestruz [11]. A casca foi utilizada devido a sua composição rica em cálcio e com esse procedimento buscou-se dar um destino proveitoso a casca de ovo de avestruz sob o ponto de vista ambiental e tecnológico, transformando-as em um novo produto de maior valor agregado.

Materiais produzidos por substâncias originadas dos seres vivos (biomassa) tem sido uma grande fonte de interesse dos pesquisadores e seu uso têm tido grande atenção pela importância em relação a fatores ecológicos, por serem de fontes renováveis e também pelo fato de que o descarte de algumas delas constitui fontes de poluição, causando muitos problemas ambientais [12].

O desenvolvimento de novos materiais e aplicações para materiais já existentes surge como opção viável e importante para as mais diversas áreas do conhecimento. Na Ciência dos Materiais, é cada vez mais evidente a necessidade de lidar com materiais que possibilitem a obtenção de produtos de necessidade humana, com a máxima qualidade e desempenho, ao menor custo possível [13].

Desta forma o objetivo deste trabalho foi obter hidroxiapatita a partir da casca do ovo de galinha, produzir e comparar as propriedades físico-químicas, morfológicas e térmicas de membranas porosas de quitosana, sem e com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

A quitosana utilizada foi de médio peso molecular fornecida pela Sigma Aldrich. As cascas de ovos de galinha foram fornecidas pela padaria Forno Nobre, de Campina Grande-PB. Os reagentes utilizados foram:

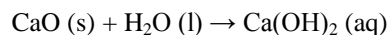
- Ácido Fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85% P.A., fornecido pela Synth.
- Ácido Acético Glacial ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) 99,8%, fornecido pela Neon.
- Hidróxido de Sódio ( $\text{NaOH}$ ) em Micropérola P.A.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

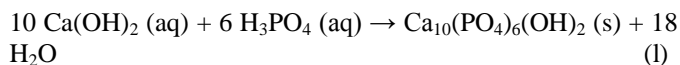
### 2.2 Obtenção da Hidroxiapatita

As cascas de ovos foram lavadas com água corrente, secas em estufa, submetidas à trituração em almofariz pistilo e em seguida peneiradas em malha de abertura 0,15mm (ABNT 100) para obtenção do pó. Em seguida o pó da casca do ovo foi submetido a um ciclo térmico de aquecimento a  $800^\circ\text{C}$  por 3 horas, com taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , para a obtenção do óxido de cálcio.

Para obtenção do hidróxido de cálcio utilizado nesta fase para obtenção de hidroxiapatita foram colocados 5,6g de óxido de cálcio em 150mL de água destilada, conforme a Equação 1.



A reação escolhida para síntese da hidroxiapatita foi o método de precipitação por via úmida, mais especificamente uma reação ácido-base, denominada neutralização, conforme a Equação 2.



Para tal, os reagentes utilizados foram o ácido fosfórico comercial ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e uma suspensão de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), preparada a partir do  $\text{CaO}$  obtido da casca.

Foi utilizado 150mL de solução de hidróxido de cálcio e 30mL de ácido fosfórico a 2M. O gotejamento da solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  foi realizado por meio de uma bureta com controle de vazão à solução alcalina, com velocidade manualmente controlada, para que seja aproximadamente 1,0mL/min, previamente aquecida à temperatura de  $\pm 80^\circ\text{C}$ , sob constante agitação magnética. Após a completa adição da solução de ácido fosfórico, o produto obtido permaneceu por um período de  $\pm 50$  minutos, sob agitação magnética à temperatura de  $100^\circ\text{C}$ , até que o líquido fosse totalmente evaporado formando uma pasta viscosa. Em seguida essa pasta foi levada para a estufa a  $110^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, o produto final foi desaglomerado no almofariz, passado em peneira de malha 100 mesh, e calcinada a  $900^\circ\text{C}$  por 2 horas. O material obtido foi caracterizado por difração de raios X, nas condições descritas no item 2.4 deste artigo, para confirmação da fase hidroxiapatita e, após confirmada a obtenção da hidroxiapatita, a mesma foi utilizada para obtenção das membranas.

### 2.3 Preparação das Membranas Porosas de Quitosana Pura e Quitosana com Hidroxiapatita

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1g de quitosana em 100mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial, sob agitação mecânica, a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida foi vertida em placas de petri com diâmetros de 60mm e congeladas em Ultra Freezer 490L, à  $-46^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após congelamento, o material

foi liofilizado por 48 horas no Liofilizador L108, marca Liotop, à  $-56^{\circ}\text{C}$ , 210Vca e pressão de  $43\mu\text{Hg}$ . Posteriormente, foi imerso em solução de hidróxido de sódio a 1M por 30 minutos e, em seguida, lavados em água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio. Terminada a lavagem as membranas foram novamente imersas em água destilada, congeladas e liofilizadas.

A solução de quitosana com hidroxiapatita dispersa foi obtida com a adição da hidroxiapatita nas proporções de 1%, 5% e 10% sob agitação magnética por 30 minutos. O processo de obtenção das membranas porosas com hidroxiapatita foi o mesmo utilizado na obtenção das membranas sem hidroxiapatita. Após obtenção das membranas seguiu-se o processo de caracterização das mesmas por DRX, DSC, MEV e EDS, nas condições descritas abaixo.

#### 2.4 Difração de raios X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação  $K\alpha$  do cobre ( $1,5418\text{\AA}$ ), tensão de 40kV e corrente 30mA. As membranas foram examinadas em um intervalo de  $2\theta$ , entre  $5^{\circ}$  e  $70^{\circ}$ , a uma velocidade de  $2^{\circ}/\text{min}$ .

#### 2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise foi realizada em um equipamento DSCQ20 (TA Instruments, EUA). As curvas foram analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50\text{mL}/\text{min}$ ) usando amostras de 2mg e razão de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . As amostras foram pesadas com precisão ( $\pm 0,1\text{mg}$ ) e prensadas em cadinhos de alumínio. A calibração do equipamento foi feita com metal índio (99,9%) em relação à temperatura e entalpia. As curvas de DSC foram registradas de 0 a  $400^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram retirados fragmentos de aproximadamente  $0,5\text{cm}^2$  de cada membrana. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Phenon TM Pro X, com a finalidade de observar a morfologia de todas as membranas, foram utilizados aumentos de 500 e 1000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

#### 2.7 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

As análises por espectroscopia por energia dispersiva de raios X foram realizadas no equipamento Phenon TM Pro X, com um detector instalado na câmara de vácuo do MEV, que mede a energia associada aos elétrons da amostra, uma vez que os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, onde é possível determinar quais elementos químicos estão presentes na amostra.

### 3. Resultados e Discussões

O difratograma de raios X da hidroxiapatita obtida está representado na Figura 1.

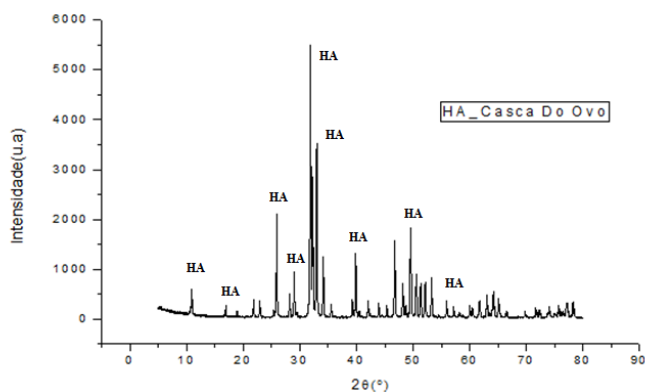


Figura 1: Difratograma de raios X para a amostra de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de galinha.

Através dos padrões de difração foi possível identificar a presença da fase cristalina de hidroxiapatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  numa quantidade de 100%, com simetria hexagonal e grupo espacial  $P63/m$ , calculado pelo programa Calculate e mostram-se perfeitamente alinhados com o padrão da hidroxiapatita do banco de dados JCPDS, ficha número 9-432. Isso indica que a metodologia foi eficaz e que conseguiu sintetizar hidroxiapatita em laboratório corroborando com Kamalanathan et al., (2014). Suchanek, Yoshimura (1998), Dorozhkin (2009) e Mendes Filho (2006) citam que a razão Ca/P depende diretamente das condições de preparo e na maioria dos casos apresenta-se menor do que a da hidroxiapatita estequiométrica, mesmo que a reação aconteça em condições estequiométricas ideais, por isso obtêm-se fosfatos de cálcio. Dorozhkin (2009) reforça que o fosfato de cálcio não sinterizado é usualmente pouco cristalino e frequentemente não estequiométrico.

Na Figura 2 observam-se os difratogramas de raios X para as membranas porosas de quitosana pura e quitosana com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita.

Os difratogramas de raios X observados apresentam comportamento semelhante, com a presença de dois picos de difração, sendo um em  $10^{\circ}$  e outro em  $20^{\circ}$ , referentes à quitosana, corroborando com a literatura e também está de acordo com a ficha JCPDS 40-1518. Observa-se ainda que quanto maior o teor de hidroxiapatita maior é a cristalinidade da membrana, confirmado através do estreitamento e intensificação dos picos e ainda, com o aparecimento de um pico em torno de  $30^{\circ}$  nas membranas com 5% e 10% de hidroxiapatita, como observado nas Figuras 2c e 2d.

A Figura 3 ilustra as curvas DSC da quitosana pura e das membranas com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita sob atmosfera de  $\text{N}_2$  na faixa de temperatura entre  $0^{\circ}$  e  $400^{\circ}\text{C}$ .

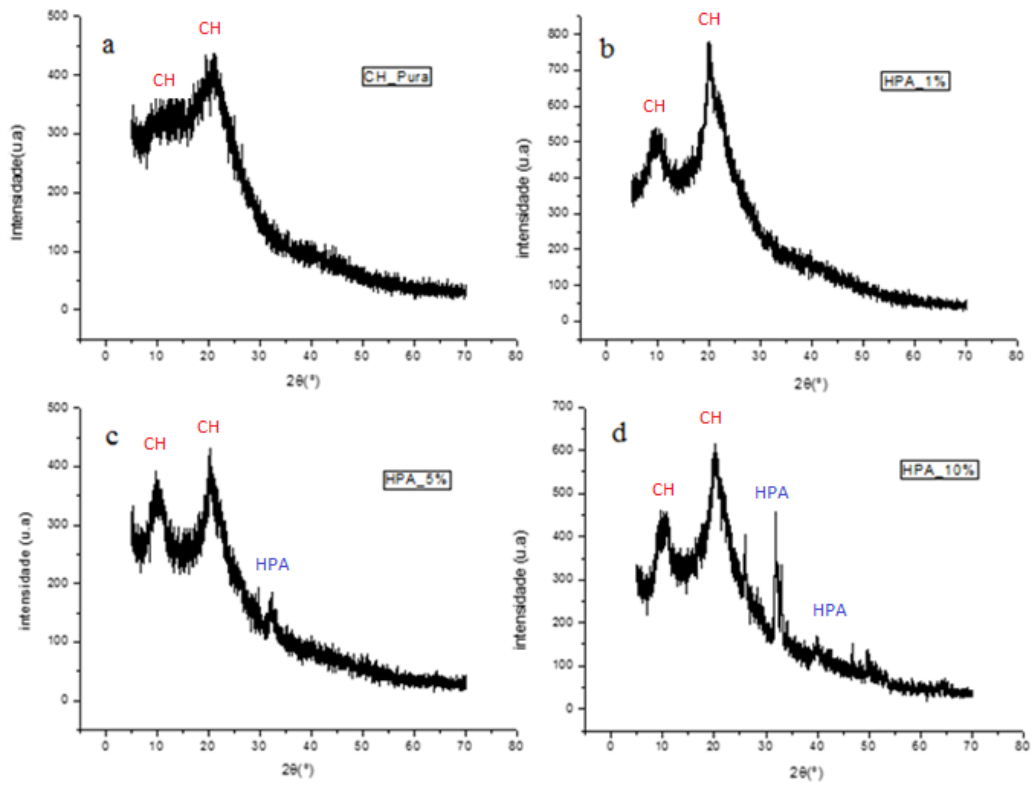


Figura 2: Difratoformas de raios X para: a) membrana porosa de quitosana pura; b) membrana porosa de quitosana com 1% de hidroxiapatita; c) membrana porosa de quitosana com 5% de hidroxiapatita e d) membrana porosa de quitosana com 10% de hidroxiapatita.

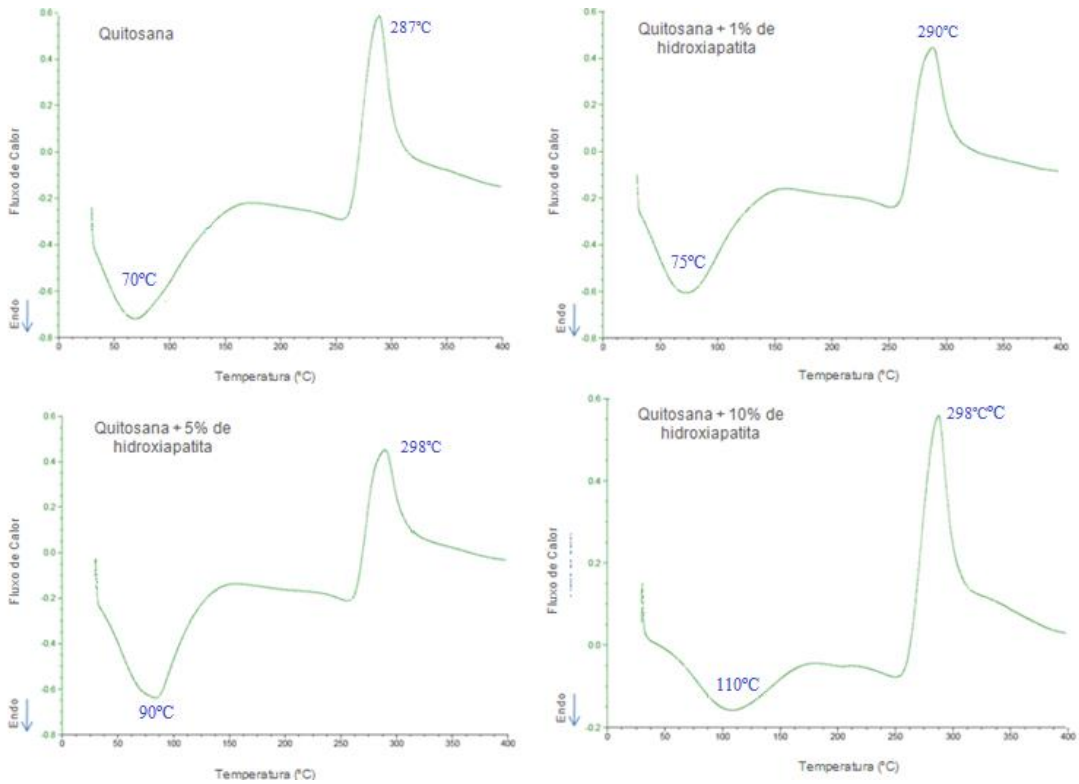


Figura 3: Análise de DSC para as membranas: membrana porosa de quitosana pura; membrana porosa de quitosana com 1% de hidroxiapatita; membrana porosa de quitosana com 5% de hidroxiapatita e membrana porosa de quitosana com 10% de hidroxiapatita.

Em todos os casos, observaram-se dois picos: o primeiro pico endotérmico na faixa de 70 a 100°C é atribuído ao processo de desidratação (perda de água residual), cuja área depende da secagem da amostra antes de realizar o ensaio; o segundo pico exotérmico próximo a 300°C, corresponde ao processo de decomposição (degradação propriamente dita), que continua além do limite de temperatura do experimento. No primeiro estágio, é possível verificar que a membrana sem hidroxiapatita perdeu água mais facilmente do que os compósitos quitosana/hidroxiapatita, tendo em vista que há um deslocamento do pico endotérmico, indicando que quanto maior a quantidade de hidroxiapatita, maior a temperatura para retirar toda água livre do material, pois o deslocamento aconteceu em torno de 70°C, para membrana de quitosana pura, para aproximadamente 110°C, nas membranas de

quitosana com 10% de hidroxiapatita. Esse resultado sugere que a membrana com 10% de hidroxiapatita em sua composição apresenta maior capacidade de retenção de água e maior estabilidade térmica.

Na análise morfológica observam-se características de um material com tamanhos variados, geometria lamelar e poros interconectados, distribuídos por toda amostra, como ilustrado na Figura 4. Nota-se ainda que as membranas com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita apresentam partículas de cor branca, que se intensificam com o aumento de hidroxiapatita na membrana. A estrutura morfológica da amostra com 10% de hidroxiapatita é totalmente diferente das demais composições, com o aumento da quantidade e tamanho de poros mais isométricos em toda a estrutura.

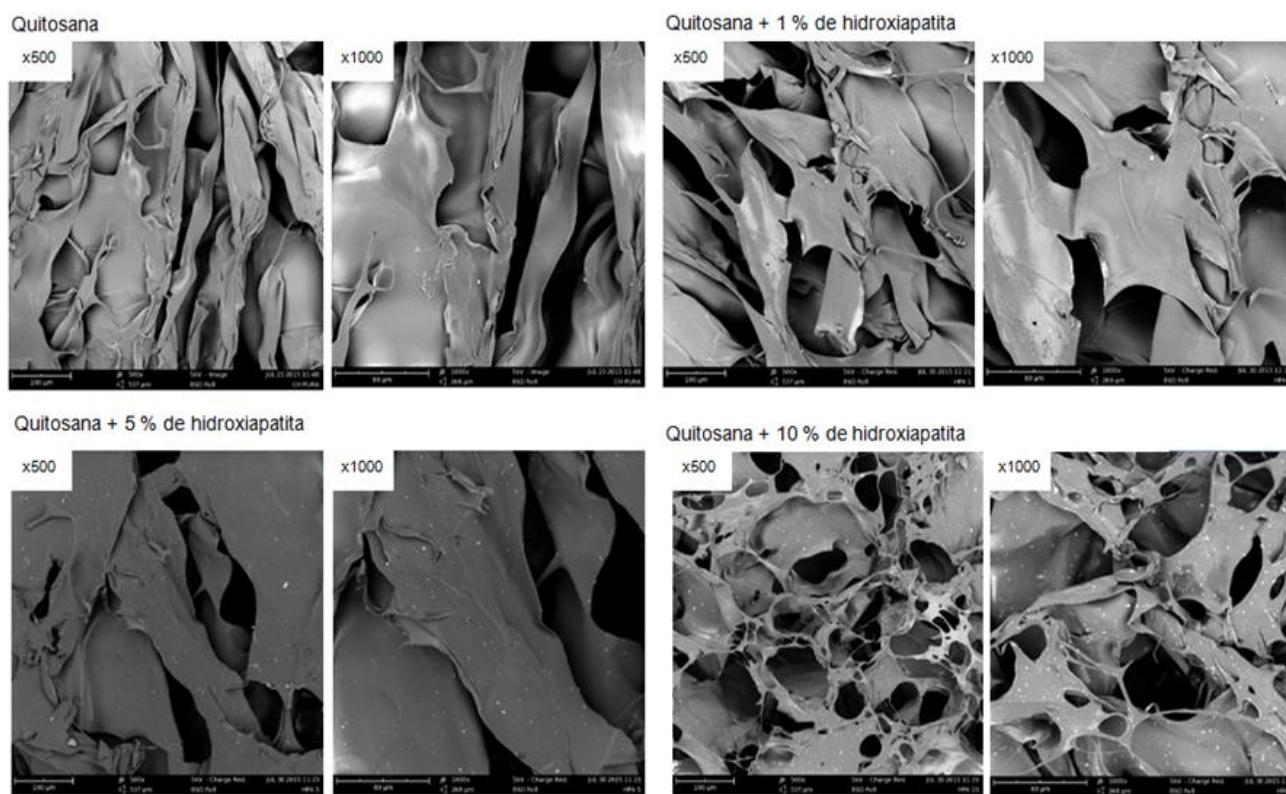


Figura 4: Micrografias da membrana porosa de quitosana pura, membrana porosa de quitosana com 1% de Hidroxiapatita, membrana porosa de quitosana com 5% de hidroxiapatita e membrana porosa de quitosana com 10% de hidroxiapatita.

Na Figura 5 observa-se o resultado de EDS das membranas de quitosana sem e com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita.

É possível observar que a membrana de quitosana é constituída em sua maioria de carbono, oxigênio e nitrogênio. Os elementos cálcio e fósforo na amostra indicam a presença da hidroxiapatita na mesma, o que é confirmado pelo resultado de DRX e MEV, onde foram observados os picos e as partículas brancas distribuídas sobre toda a amostra e associadas à hidroxiapatita, respectivamente. O percentual de cálcio aumentou de acordo com o aumento do percentual de

hidroxiapatita nas membranas, já o percentual de fósforo se manteve constante. Na amostra com 1% de hidroxiapatita não foi possível observar a presença do cálcio e fósforo, o que não significa que a mesma não esteja presente na amostra, já que foram encontrados indícios de sua presença na superfície da amostra através dos resultados obtidos por MEV. Isso pode ter ocorrido devido o ensaio de EDS ser pontual e ter sido realizado em parte da membrana onde a hidroxiapatita não estava presente.

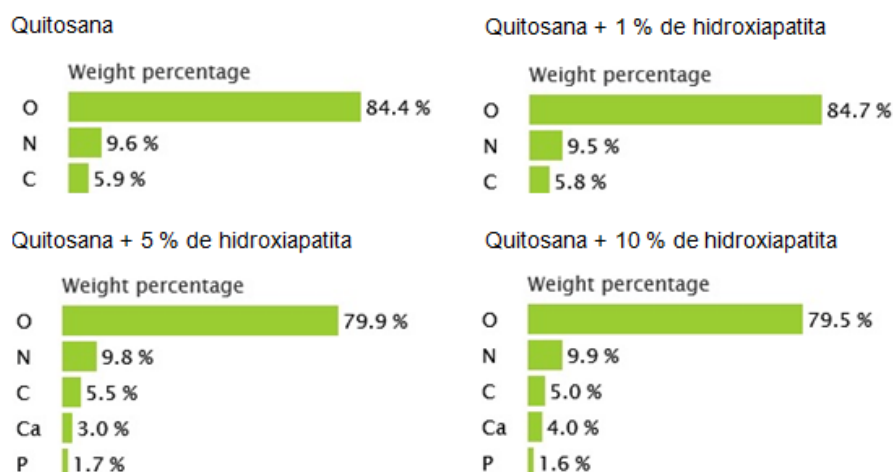


Figura 5: Resultado de EDS com a composição química das membranas de quitosana sem e com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita.

## Conclusões

A obtenção de hidroxiapatita a partir da casca do ovo de galinha foi confirmada através dos padrões de difração, em que foi possível identificar a presença da fase cristalina de hidroxiapatita numa quantidade de 100%, confirmado pelo P63/m, através do programa Calculate. No ensaio de DRX das membranas foi possível observar que quanto maior a quantidade de hidroxiapatita na membrana maior é a cristalinidade do compósito.

A análise por calorimetria exploratória diferencial mostrou um deslocamento do pico endotérmico indicando que quanto maior a quantidade de hidroxiapatita maior foi a temperatura para retirar toda água livre do material, sugerindo que a membrana com 10% de hidroxiapatita em sua composição apresenta maior capacidade de retenção de água e maior estabilidade térmica.

Os resultados de MEV mostraram a presença de poros interconectados de tamanho e formas variados e que as membranas com 1%, 5% e 10% de hidroxiapatita apresentam partículas de cor branca que se intensificam com o aumento de hidroxiapatita na mesma. Já por EDS observou-se que a membrana de quitosana é constituída em sua maioria de carbono, oxigênio e nitrogênio e a presença dos elementos químicos cálcio e fósforo indicam a presença da hidroxiapatita na mesma.

Conclui-se que foi possível obter a hidroxiapatita a partir da casca de ovo de galinha pelo método de via úmida e que as membranas de quitosana/hidroxiapatita apresentam possível potencial para serem utilizados como biomaterial, já que a adição de hidroxiapatita na quitosana proporciona maior estabilidade térmica e conseqüentemente, a esterilização do mesmo com temperatura. Porém, isto só pode ser confirmado através de caracterizações citológicas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro outorgado durante a realização deste trabalho.

## Referências

- [1] Spin-neto, R., Pavone, C., Freitas, R. B., Marcantonio, R. A. C., Marcantonio-Junior, E. Biomateriais a base de quitosana com a aplicação médica e odontológica: revisão da literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37(2), 155-161, 2008.
- [2] Khor, E.; Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v.24, p.2339-2349, 2003.
- [3] Azevedo, A. S.; Sá, M. J. C.; Cosa Neto, P. I.; Fook, M. V. L.; Portela, R. A.; Azevedo, S. S. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.49, p.12-18, 2012.
- [4] Dallan, P. R. M. In: *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele. (Tese Doutorado)*. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.
- [5] Assis, A. S. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9 (5), 480-491, 2008.
- [6] Neto, R. S. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37, 155-161, 2008.
- [7] Senel, S.; McClure, J. S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.56, p. 1467-1480, 2004.
- [8] Azevedo, S. A., Sá, M. J. C., Fook, M. V. L., Nóbrega Neto, P. I, Sousa, O. B., Azevedo, S. S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. *Estudo histológico*

- e morfométrico. *Ciência Rural*, Santa Maria, vol. 43, p. 1265-1270, 2013.
- [9] Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., Kandel, R.A., Renlund, R., Filiaggi, M., Dumitriu, M. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies. *Biomaterials*, vol.23, p. 2063-2070, 2002.
- [10] Legeros, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.395, p.81-98, 2002.
- [11] Caliman, L. B., Della, V. P., Gouvêa, D. Síntese e caracterização de Hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz. In: 55º Congresso brasileiro de Cerâmica, 29 de maio a 01 de junho de 2011, Porto de Galinhas, PE, Brasil, 2011. p.88.
- [12] Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, vol. 46, p. 1-27, 2000.
- [13] Dobrzánski, L. A. Significance of materials science for the future development of societies. *Journal of Materials Processing Technology*. vol. 175, p. 133-145, 2006.