



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-Graduação em Física - INFIS
Irisnei Luzia Ferreira

**Preparação e caracterização de biomateriais poliméricos para avaliação
da viabilidade de uso como *phantom* biológico.**

Uberlândia
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-Graduação em Física - INFIS
Irisnei Luzia Ferreira

**Preparação e caracterização de biomateriais poliméricos para avaliação
da viabilidade de uso como *phantom* biológico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Física.

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Andrea Antunes Pereira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Uberlândia

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383p Ferreira, Irisnei Luzia, 1981-
2016 Preparação e caracterização de biomateriais poliméricos para
avaliação da viabilidade de uso como *phantom* biológico / Irisnei Luzia
Ferreira. - 2016.
164 f. : il.

Orientadora: Andrea Antunes Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Física.
Inclui bibliografia.

1. Física - Teses. 2. Materiais biomédicos - Teses. 3. Pulmões -
Radiografia - Teses. I. Pereira, Andrea Antunes. II. Universidade Federal
de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**



IRISNEI LUZIA FERREIRA

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Física, do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Doutor em Física.

Uberlândia, 19 de Maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Andrea Antunes Pereira

Prof. Dra. Andrea Antunes Pereira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Alexandre Marletta

Prof. Dr. Alexandre Marletta
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Daniel Pasquini

Prof. Dr. Daniel Pasquini
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Eralci Moreira Terezio

Prof. Dr. Eralci Moreira Terezio
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Sergio Luiz Morelhão

Prof. Dr. Sérgio Luiz Morelhão
Universidade de São Paulo - USP

Agradecimentos

- A Deus, pela existência e possibilidade de concluir mais uma etapa da minha carreira profissional.
- Aos meus pais Abel e Geni e às minhas irmãs Helinei e Clerisnei, pela oportunidade de ter estudado, que sempre se mostraram zelosos e prontos a me ajudar. Pelo amor e entusiasmo que me abastecem, serei eternamente grata.
- Ao meu esposo Marcos pelo apoio, compreensão e pelo companheirismo inabalável. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.
- À minha orientadora, Profª. Andrea Antunes Pereira, pela paciência, pela amizade, pois sempre esteve presente, orientando e acompanhando o desenvolvimento do meu trabalho, por compreender claramente as dificuldades com que me deparava, pois foram muito importantes para não me deixar abater.
- Ao HC-UFU por conceder o afastamento de minhas atividades no andamento do meu doutorado.
- Aos amigos no setor de Endoscopia do HC-UFU, pelo apoio e colaboração durante meu desenvolvimento acadêmico.
- Aos colegas de grupo que contribuíram para enriquecer meu conhecimento, pela amizade e pelo companheirismo que sempre demonstraram e aos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
- À UFU, ao PPFIS, ao INFIS, ao GEM pela disponibilidade da infra estrutura, e a todos os professores e funcionários do INFIS, que sempre foram prestativos e atenciosos.
- Às agências CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelos recursos para aquisição de equipamentos de informática.

*"Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa de
sucesso. O sucesso é consequência."*

Albert Einstein

Resumo

Palavras Chaves: *phantom*, raios X, pulmão, radiografia de alta resolução, biomateriais, gelatina, quitosana.

Os desenvolvimentos teóricos e experimentais na área de biomateriais têm sido aplicados diretamente a distintos campos da Medicina (odontologia, medicina regenerativa e radioterapia). Esses avanços foram concentrados tanto para diagnosticar doenças como para a quantificação de seus graus de progressão. Na perspectiva desses estudos, biomateriais estão sendo projetados e confeccionados para aplicação em diversas áreas da ciência, proporcionado avanços no radiodiagnóstico, na dosimetria para radioterapia e na calibração de equipamentos radioterápicos. Desenvolver um *phantom* a partir de um biomaterial se tornou um grande aliado da Medicina no tratamento de pacientes com doenças oncológicas, possibilitando melhor desempenho dos equipamentos, com a finalidade de redução dos danos causados ao tecido sadio devido ao excesso de exposição à radiação. Este trabalho utilizou polímeros: quitosana e gelatina para confecção das estruturas poliméricas e foi possível controlar as diferentes formas de produção e processamento, caracterizar e avaliar o biopolímero por técnicas físicas (ELT, MEV, e DEI) e, por consequência, analisar a aplicabilidade como *phantom* pulmonar de camundongo. Foi possível avaliar a morfologia dos biomateriais quantitativamente por microscopia eletrônica de varredura associada a técnica de imagem. A relevância deste trabalho se concentra em desenvolver um *phantom* a partir de biomateriais poliméricos que possa atuar como objeto simulador fornecendo alto contraste de imagem quando submetido a análise. Dessa forma, a escolha da técnica DEI foi satisfatória uma vez que trata-se de uma técnica de imagem de raios X de alta resolução. As imagens obtidas por DEI têm mostrado os detalhes da microestrutura interna dos biomateriais produzidos as quais possuem $\approx 10\text{ m}$ de dimensão. Os *phantoms* confeccionados apresentaram densidade variando de 0,08 a 0,13 g/cm^3 .

Abstract

Keywords: phantom, X ray, lung, diffraction enhanced imaging, biomaterials, gelatin chitosan.

The theoretical and experimental developments in the biomaterials area have been directly applied to different fields of Medicine (odontology, regenerative medicine and radiotherapy). These advances have focused both for diagnosing diseases such as for quantifying degrees of progression. From the perspective of these studies, biomaterials are being designed and manufactured for application in various areas of science, provided advances in diagnostic radiology, radiotherapy dosimetry and calibration of radiotherapy equipment. Develop a phantom from a biomaterial has become a great ally of medicine in the treat patients with oncological diseases, allowing better performance of the equipment in order to reduce damage to healthy tissue due to excessive exposure to radiation. This work used polymers: chitosan and gelatin, for making the polymeric structures and controlled for different types of production and processing, characterizing and evaluating the biopolymer by physical techniques (STL, SEM and DEI) and therefore analyze applicability as phantom mouse lung. It was possible to evaluate the morphology of biomaterials quantitatively by scanning electron microscopy associated with imaging technique. The relevance of this work focuses on developing a phantom from polymeric biomaterials that can act as phantom providing high image contrast when subjected to analysis. Thus, the choice of DEI technique is satisfactory since it is an imaging technique of X-ray high resolution. The images obtained by DEI have shown the details of the internal microstructure of the biomaterial produced which have $\approx 10 \text{ } \mu\text{m}$ dimension. The phantoms had made density ranging from 0.08 a 0.13 g/cm^3 .

Lista de Figuras

1.1	Trabalho estruturado por etapas.	p. 23
2.1	Anatomia pulmonar - vista anterior.	p. 25
2.2	Anatomia do pulmão de camundongo.	p. 30
3.1	Gelatina.	p. 32
3.2	Espuma de poliuretano.	p. 32
3.3	Pulmão descelularizado.	p. 32
3.4	Resina epóxi.	p. 32
4.1	Estrutura da celulose: formada pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosana) através de ligações β -1,4-glicosídicas.	p. 38
4.2	Estrutura quitina.	p. 40
4.3	Fórmula estrutural da Quitosana.	p. 42
4.4	Desacetilação da quitina.	p. 45
4.5	Fórmula estrutural dos aminoácidos.	p. 46
5.1	Espectro eletromagnético.	p. 49
5.2	Representação esquemática da ELT.	p. 51
5.3	Aparato experimental ELT.	p. 55
5.4	Desenho esquemático MEV.	p. 57
5.5	Diferentes tipos de sinais produzidos quando elétrons colidem com um material.	p. 58

5.6	Síncrotron, <i>NSLS2 Brookhaven National Laboratory</i>	p. 62
5.7	<i>Setup</i> experimental da técnica DEI.	p. 64
5.8	Primeira imagem de alto contraste produzida por raio X <i>in vivo</i> de um camundongo. (a) Imagem de raios X baseada na atenuação. (b) Imagem de contraste de fase baseada na refração de raios X. (c) Imagem de raios X com base no espalhamento.	p. 65
5.9	A localização de cada tumor pode ser identificada na imagem de transmissão e confirmado na histopatologia numa imagem ampliada, apresentando seu diâmetro máximo.	p. 66
6.1	Filme de quitosana-gelatina.	p. 73
6.2	<i>Stent</i> a base de quitosana.	p. 74
6.3	Análise da espessura dos filmes: C, CG1, CG2 e CG3.	p. 77
6.4	Estruturas tridimensionais liofilizadas.	p. 79
6.5	Biomaterial quitosana-gelatina liofilizado, grupo CG1.	p. 80
7.1	Sinal de LT para gelatina 7,0% <i>bloom</i> 200.	p. 83
7.2	Sinal de LT para gelatina 7,5% <i>bloom</i> 200.	p. 83
7.3	Sinal de LT para gelatina 7,5% <i>bloom</i> 200 + quitosana 1,5%.	p. 84
7.4	Difusividade térmica <i>versus</i> diferentes concentrações das amostras.	p. 85
7.5	Estágios de posicionamento da amostra no MEV: a) 0 e b) 45°.	p. 87
7.6	Grupo CG1 - Corte de superfície.	p. 89
7.7	Grupo CG1 - Corte transversal (superfície).	p. 90
7.8	Calibragem da micrografia no programa <i>ImageJ</i>	p. 90
7.9	Realce da área de interesse na micrografia.	p. 91

7.10 Poros realçados pela cor preta, 100x	p. 92
7.11 Poros realçados pela cor preta, 300x	p. 92
7.12 Diâmetro de Feret.	p. 93
7.13 Grupo C - Corte de superfície.	p. 94
7.14 Grupo C - Corte transversal.	p. 94
7.15 Área com poros, 100x.	p. 95
7.16 Grupo CG2 - Área com poros, 500x.	p. 96
7.17 Grupo CG2 - Área com poros, 1000x.	p. 96
7.18 Realce dos poros, 500x.	p. 97
7.19 Grupo CG3 - Corte transversal, 60x.	p. 98
7.20 Grupo CG3 - Corte transversal, 100x.	p. 98
7.21 MEV do pulmão de camundongo dissecado. Esquerda: MEV dos ácinos pulmonares. Direita: pulmão insuflado com 60% da capacidade dos bronquíolos.	p. 101
7.22 MEV da área superficial, CG1.	p. 102
7.23 MEV da área transversal, CG1.	p. 102
7.24 <i>Phantom</i> de pulmão de camundongo produzido neste trabalho.	p. 103
7.25 Imagem DEI grupo C.	p. 106
7.26 Imagem DEI grupo CG1.	p. 107
7.27 Imagem DEI grupo C + HA.	p. 107
7.28 Imagem DEI grupo CG1+ HA.	p. 108
7.29 Imagem DEI grupo CG2 + HA.	p. 109
7.30 Imagem DEI grupo CG3 + HA.	p. 109

7.31 Imagem de uma fonte de RX convencional das estruturas poliméricas.	p. 111
7.32 Comparativo da imagem de raios X com imagem das estruturas.	p. 112
A.1 Efeito Compton.	p. 117
A.2 Efeito fotoelétrico.	p. 122
A.3 Produção de pares.	p. 125
A.4 Atenuação de um feixe de radiação monoenergético ao atravessar um meio com espessura x e coeficiente de atenuação linear S oriundos de uma fonte energética S	p. 128
A.5 Dependência da fase para razão do parâmetro do contraste de atenuação: tecido mole, água e osso em interação com raios X (energia de fótons).	p. 129
A.6 Raios X de freamento.	p. 137
A.7 Raios X característico.	p. 139
A.8 Efeito Auger.	p. 140
B.1 Difração de raios X	p. 142
B.2 Esquema da <i>Rocking Curve</i> , as posições de flanco esquerdo e direito correspondem a 50% da intensidade máxima.	p. 143
B.3 Esquema de um cristal analisador.	p. 144
B.4 Posicionamento do analisador para um flanco à esquerda.	p. 145
B.5 <i>Rocking Curve</i> do cristal analisador, com as posições angulares nas quais as imagens são adquiridas.	p. 151

Lista de Tabelas

2.1	Dimensão pulmonar num adulto jovem saudável.	p. 26
2.2	Referências e tamanhos dos tumores pulmonares.	p. 28
4.1	Diferentes biomateriais e aplicações biomédicas.	p. 37
4.2	Fontes de quitina.	p. 41
5.1	Principais sincrotrons no mundo.	p. 63
6.1	Densidade e coeficiente de atenuação de acordo com a ICRU 44.	p. 69
6.2	Concentrações dos filmes produzidos.	p. 72
6.3	Proporções e densidade de quitosana/gelatina para solução de 100 mL.	p. 76
6.4	Massa e densidade das estruturas liofilizadas.	p. 80
7.1	Valores de difusividade térmica disponíveis na literatura e obtido neste trabalho*.	p. 85
7.2	Resultado da seleção manual dos poros em micrografias obtidas por MEV associadas ao <i>ImageJ</i> .	p. 99
7.3	Características da linha de luz X15A <i>NSLS I</i> .	p. 105
A.1	Interação da radiação (<i>MeV</i>) para o pulmão, de acordo com a ICRU 44.	p. 130

Listas de Abreviaturas

Ac	Ácido acético
Ch	Quitosana
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DEI	Diffraction Enhanced Imaging
ELT	Espectroscopia de Lente Térmica
FWHM	Full Width at Half Maximum
Gel	Gelatina
GEM	Grupo de Espectroscopia de Materiais
Gly	Glicerol
HA	Hidroxiapatita
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
ICRU	Comissão Internacional de Radiação em Unidades e Medidas
InFis-UFU	Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

LT	Lente Térmica
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NSLS	National Synchrotron Light Source
PBS	Phosphated Buffered Saline
RC	Rocking Curve
SEM	Scanning Electron Microscope
STL	Spectroscopy Thermal Lens Spectroscopy

Sumário

1	Introdução	p. 17
1.1	Estado da arte	p. 20
1.2	Objetivos	p. 22
	i: Objetivos específicos	p. 22
	ii: Estrutura da tese	p. 24
2	Anatomia e fisiologia do pulmão	p. 25
2.1	Características dos estágios patológicos	p. 26
2.2	Pulmão de camundongo	p. 29
3	Tecido artificial, <i>phantom</i>	p. 31
3.1	Especificação e categoria funcional do <i>phantom</i>	p. 33
4	Biomateriais	p. 36
4.1	Carboidratos	p. 37
4.2	Quitina	p. 39
4.3	Quitosana	p. 41
	4.3.1 Processo de desacetilação da quitina	p. 44
4.4	Gelatina	p. 46

4.5	Hidroxiapatita	p. 47
5	Técnicas para determinação das propriedades dos biomateriais	p. 49
5.1	Espectroscopia de lente térmica	p. 50
	i: Modelo físico	p. 51
	ii: Aparato experimental	p. 54
5.2	Microscopia eletrônica de varredura	p. 56
	i: Princípio de funcionamento	p. 57
5.3	Radiografia de alta resolução - DEI	p. 61
	i: Luz Síncrotron	p. 61
	ii: Fundamentos da técnica DEI	p. 63
6	Metodologia de preparação dos biomateriais poliméricos	p. 68
6.1	Principais matérias primas	p. 70
6.2	Preparação dos filmes	p. 71
	6.2.1 Procedimento experimental	p. 71
	Etapa I)- filme quitosana/gelatina	p. 71
	Etapa II)- filme quitosana	p. 73
6.3	Preparação das estruturas quitosana-gelatina	p. 75
	6.3.1 Procedimento experimental	p. 75
7	Resultados experimentais e discussões	p. 81
7.1	Análise pela técnica de espectroscopia de lente térmica	p. 81

7.1.1	Filmes quitosana/gelatina	p. 81
7.2	Análise pela técnica MEV	p. 87
7.2.1	Metodologia para cálculo do diâmetro médio dos poros	p. 88
7.3	<i>Phantom</i> de pulmão de Camundongo	p. 103
7.4	Análise por radiografia de alta resolução - DEI	p. 104
8	Conclusões	p. 113
Apêndice A – Interação da radiação com a matéria		p. 115
A.1	Efeito Compton	p. 117
A.2	Efeito fotoelétrico	p. 121
A.3	Produção de pares	p. 124
A.4	Efeito Rayleigh	p. 126
A.5	Interações fotonucleares	p. 126
A.6	Coeficiente de Atenuação Total	p. 127
A.7	Raios X	p. 133
A.7.1	Absorção de raios X	p. 135
A.7.2	Produção de raios X	p. 136
A.7.3	Elétron Auger	p. 139
Apêndice B – Rocking Curve		p. 141
iv: Aquisição das imagens DEI: absorção, espalhamento e refração		p. 146
Referências Bibliográficas		p. 153

1 Introdução

A Física é um dos mais antigos e relevantes parceiros da Medicina. Os avanços nas pesquisas, no que diz respeito à Física, possuem impacto diretamente na área da Medicina, pois referem-se a incorporação de novas tecnologias. Renomados estudiosos da ciência básica foram responsáveis pela descoberta dos métodos de imagem (raios X, tomografia, entre outros) largamente empregados na medicina diagnóstica [1,2]. A Medicina é responsável pela manutenção e restauração da saúde em decorrência de sua enorme importância para toda a humanidade, continuamente é aprimorada pela introdução de descobertas originadas de outras áreas de estudo. No que diz respeito aos métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento, a Física Médica tornou-se responsável na área da ciência pela ligação entre essas áreas do conhecimento.

Diante dessa importância, a Física Médica está direcionada ao uso dos conhecimentos da Física para a Medicina. Usualmente, sua aplicação corresponde às áreas de imagens médicas e radioterapia, embora um físico médico possa trabalhar nas diversas áreas da saúde. Este amplo campo de atuação torna a Física multidisciplinar, pois aborda conceitos, técnicas básicas e especificidades de Física, Biologia e Medicina. No que se refere aos biomateriais e aplicações na Medicina, o físico tem um importante papel na designação, testes e uso clínico do produto. A Física Médica atua em conjunto com outras áreas na elaboração das bases biomédicas necessárias desde a elaboração das estruturas dos serviços radiológicos, calibração de equipamentos e medições de controle de proteção radiológica até o controle de qualidade nos equipamentos físicos empregados na área da saúde e pesquisa [3].

A busca pela qualidade de vida tem se tornado um assunto de relevância na área da ciências da Vida e Medicina. Os avanços na área da ciência da saúde têm proporcionado à população

uma escolha de vida mais saudável contribuindo para uma ampliação significativa na expectativa de vida do ser humano. Estudos apontam que as doenças de caráter multifatorial, cujas causas de progressão e instauração não são completamente conhecidas, podem ser influenciadas pela rotina de trabalhos intensos e ao aumento acentuado do fator estresse. Existe um crescimento expressivo no surgimento de algumas doenças relacionadas aos hábitos de vida não saudáveis, como o câncer [4, 5].

Câncer de pulmão, estômago, fígado e cólon são as maiores causas de morte (por câncer) a cada ano, cerca de 30% das mortes por câncer se devem a cinco principais fatores de risco: índice de massa corporal elevado, baixo consumo de frutas, legumes e verduras, falta de atividade física, tabagismo e uso de bebida alcoólica. O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer, sendo responsável por 22% das mortes (por câncer) e 71% das mortes por câncer de pulmão em todo mundo. Os principais tipos de câncer são: pulmão (1,37 milhões de mortes); estômago (736.000 mortes); fígado (695.000 mortes); colo retal (608.000 mortes); mama (458.000 mortes); câncer cervical (275.000 mortes)¹.

O câncer de pulmão tem sido o tipo de câncer de maior incidência no mundo, sendo a principal causa de morte por câncer. Estima-se que seja responsável por cerca de um em cada cinco mortes por câncer (1,59 milhões de mortes, 19,4% do total). Em 2012 surgiram em torno de 1,8 milhões de novos casos (12,9% do total), dos quais 58% ocorreram em regiões menos desenvolvidas sob influência do padrão geográfico. A doença permanece mais comum nos homens (1,2 milhões, 16,7% do total), apresentando alta taxa de incidência; na Europa Central e Leste (53,5 por 100.000), leste da Ásia (50,4 por 100.000), notavelmente as baixas taxas de incidência são observadas no Oriente e na África Ocidental (2,0 e 1,7 por 100.000 habitantes, respectivamente). Nas mulheres as taxas de incidência são geralmente reduzidas com relação à exposição histórica ao fumo do tabaco. Assim, as taxas estimadas são mais altas na América do norte (33,8%) e norte da Europa (23,7%) com uma taxa relativamente alta na Ásia Oriental (19,2%) e as taxas mais baixas, na África Ocidental e Oriente (1,1% e 0,8%, respectivamente)¹.

¹Globocan. Disponível em: globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em: 27 maio 2016.

Devido às dificuldades de diagnóstico precoce, considerando que os sintomas costumam surgir quando a doença está em estágio avançado, o câncer de pulmão se torna uma das neoplasias que apresenta a menor taxa de cura e alta taxa de mortalidade, por se tratar de uma doença com um período de evolução duradouro e, muitas vezes, levar anos para evoluir até a descoberta [6, 7]. O desafio da Medicina tem sido desenvolver ferramentas, técnicas de diagnóstico e terapia, para aplicação nos distintos estágios de evolução da doença pois esta apresenta na maioria dos casos um prognóstico ruim [8].

A Medicina oncológica destaca-se num atraente foco de estudo devido aos avanços nos resultados com relação ao tratamento radioterápico e dosimétrico, sendo observado uma preocupação extrema de pesquisadores, não somente para o tratamento efetivo da doença mas sim, a detecção das lesões cancerígenas em estágio inicial, proporcionando maior chance de êxito na cura efetiva do paciente. As pesquisas nessa área tem sido conduzidas a fim de propiciar um tratamento mais eficaz num período precoce da doença, redução dos danos causados ao paciente devido à radiação e aumento da probabilidade de cura [9].

Pesquisadores têm utilizado biomateriais com maior frequência particularmente, os biomateriais estão sendo empregados na construção de *phantoms* (objeto simulador) para diferentes áreas da Medicina. De uma forma geral são materiais utilizados como sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo. No Brasil, meados da década de 90, o desenvolvimento da área de biomateriais tornou-se relevante nas atividades de pesquisa científica e tecnológica.

Atuando em conjunto com o uso de biomateriais para desenvolver um *phantom*, faz-se necessário a utilização de métodos de imagens para análise das propriedades físicas, tais como: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Imagem de Alta Resolução de Raios X (DEI-Diffraction Enhanced Imaging) e Espectroscopia de Lente Térmica (ELT) [10–12].

Todo processo de produção do *phantom* necessita ser conduzido de forma sistematizada por técnicas de obtenção de imagem, com a finalidade de relacionar os dados das estruturas químicas formadas com dimensões realistas. As diversas técnicas de imagens se diferenciam por fatores como: resolução espacial, espessura da amostra, tempo de aquisição e características da

amostra [13, 14].

A análise do *phantom* por técnicas físicas está estritamente relacionada a interação da luz com a matéria. Fótons transferem sua energia aos elétrons contidos na matéria e, em resposta a essa interação, um detector converte os resultados dessa ação em imagens que podem ser visualizadas ou gravadas para posterior análise, este evento é de extrema relevância para exames de diagnósticos [15–17].

A resposta dos tecidos em interação com a matéria depende da sensibilidade do material quando exposto à radiação, da complexidade e características desse material, tais como: qualidade, quantidade de radiação, absorção e o tempo total de exposição.

1.1 Estado da arte

Os avanços nas pesquisas em diversas áreas do conhecimento estão diretamente relacionadas à capacidade de observação e investigação das estruturas do objeto disponível para estudo. Desde o aprofundamento dessas pesquisas a qualidade na observação dos objetos vem sendo aprimorada com o desenvolvimento de técnicas ópticas avançadas: microscopia eletrônica, raios X, fontes sincrotron, etc.

Em geral, os *phantoms* devem reproduzir dimensões e estruturas do tecido a ser simulado fornecendo bom contraste de imagem nas estruturas visualizadas, ou seja, para êxito no desenvolvimento, deve-se selecionar adequadamente os materiais destinados à confecção do objeto simulador associando a investigação das estruturas formadas a um excelente equipamento de obtenção de imagem. Uma variedade de materiais têm sido utilizados no desenvolvimento de *phantoms*, são eles: resina sintética (acrílica, poliuretano, polietileno, epóxi), parafina, policloroeteno (PVC), gel a base de ágar e solução aquosa [18]. Estes *phantoms* são utilizados comercialmente, porém são de alto custo ($\sim \$20,000.00$)² tornando-se inacessíveis aos sistemas de saúde.

²Disponível em: supertech-to-go.com/lucascctphls.html. Acesso em: 27 maio 2016.

Outro ponto importante é a qualidade da imagem gerada pelo *phantom* com relação à visualização das estruturas nos menores detalhes, como por exemplo nódulos em estagio inicial ($\sim 4\text{ mm}$) [4]. Sabe-se que o câncer de pulmão pode ser detectado como nódulos pulmonares em radiografias de tórax, no entanto a sensibilidade da radiografia convencional para nódulos pulmonares é insuficiente, especialmente para nódulos pulmonares menores. Radiografia de tórax para detectar nódulos pulmonares com um tamanho médio de 19 mm revelou uma sensibilidade ligeiramente inferior. Estudos revelam que o tamanho médio dos nódulos pulmonares omitidos em radiografias de tórax supera 15 mm [19]. Esta sensibilidade limitada explica por que o rastreamento de câncer de pulmão, usando radiografias de tórax, consistentemente não conseguem demonstrar redução na mortalidade.

Os avanços nas pesquisas em técnicas que utilizam raios X propiciaram o desenvolvimento de uma técnica capaz de gerar imagens de alto contraste: *Diffraction Enhanced Imaging* - DEI foi desenvolvida em 1995 no laboratório *National Synchrotron Light Source* (NSLS) - Estados Unidos - destinada inicialmente a pesquisas em mamografia e foi patenteada em 1999. Aplicações dessa técnica em ciências dos materiais têm gerado ganhos relevantes no contraste e na resolução, caracterizando-a como potencial utilização em imagiologia [20–22].

Diante de tal fato, existe uma preocupação a respeito da exposição à radiação e dos custos socioeconômicos relacionados com o excesso de investigação de nódulos pulmonares. Portanto, aumentar a precisão das radiografias de tórax na detecção de nódulos pulmonares pode otimizar a detecção do câncer de pulmão, evitando a intensa exposição à radiação. Desta forma, a investigação por radiografia de alta resolução (DEI) torna-se um mecanismo eficiente para investigação de nódulos pulmonares milimétricos.

A contribuição original deste trabalho se refere a aplicação da técnica DEI para avaliação dos biomateriais a base de quitosana e gelatina e o desenvolvimento de um polímero-mineral como modelo para estruturas biológicas internas ao *phantom* inclusas como lesões intrínsecas correspondendo aos estágios de evolução da doença no pulmão.

1.2 Objetivos

Motivados pelas contribuições na área da Física Médica e visando contribuir com os avanços nas pesquisas, o objetivo desse trabalho foi sintetizar e caracterizar uma matriz tridimensional de quitosana e gelatina para uso no desenvolvimento de um protótipo de *phantom* para imagem.

O desafio de utilizar biomateriais naturais para confeccionar um *phantom* é promissor, uma vez que o material resultante fornecerá imagens de alto contraste proporcionando análise detalhada das estruturas obtidas em conformidade com o órgão a ser simulado e sua potencial aplicação para investigação de estruturas nodulares milimétricas e, consequentemente, na dosimetria, no radiodiagnóstico e calibração dos equipamentos radioterápicos.

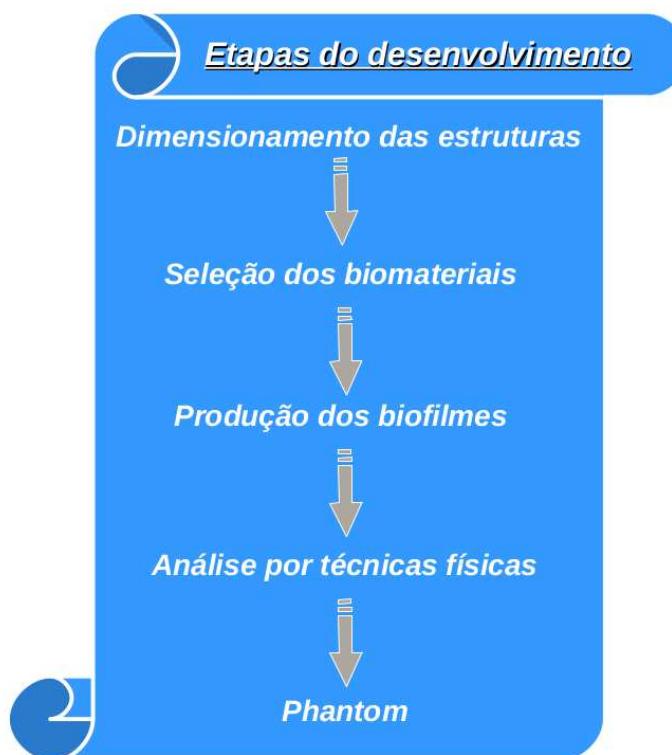
Dessa forma, fez-se necessário analisar os efeitos da interação da radiação em atuação com biomateriais para aplicação direta nas áreas: radioterapia, radiodiagnóstico e dosimetria. Destacando que a aplicabilidade da técnica DEI (imagens de alto contraste produzidas por raios X) revela em detalhes os contrastes produzidos em biomateriais com estruturas em comparação com técnicas convencionais.

i: Objetivos específicos

1. Produzir e caracterizar uma matriz porosa de quitosana e gelatina com a finalidade de reproduzir a estrutura do pulmão de camundongo;
2. Caracterizar a morfologia do biomaterial qualitativamente e quantitativamente de modo a obter parâmetros das características morfológicas.
3. Avaliar o comportamento da matriz tridimensional de quitosana e gelatina por técnica de imagem de raios X.
4. Avaliar a aplicabilidade do *phantom* produzido em comparação com resultados da literatura nos quais a estrutura do pulmão de camundongo é caracterizada.

O desenvolvimento do *phantom* foi estruturado por etapas: *Primeiro*: dimensionar as estruturas em conformidade com o órgão; *Segundo*: selecionar os biomateriais adequados; *Terceiro*: confeccionar os filmes e estruturas; *Quarto*: analisar as estruturas resultantes utilizando técnicas físicas e *Quinto*: obter o *phantom* de acordo com as estruturas adequadas após as análises estruturais. As etapas do desenvolvimento podem ser visualizadas na Fig. 1.1.

Figura 1.1: Trabalho estruturado por etapas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Contudo, foi confeccionado, através da síntese e caracterização de biomateriais, um objeto simulador (*phantom* de camundongo) equivalente ao pulmão, capaz de fornecer imagens de alto contraste com aplicações em dosimetria, sistemas de diagnóstico e calibração de equipamentos.

ii: Estrutura da tese

O primeiro capítulo está destinado a introdução, com breve discussão sobre a proposta da pesquisa, explicando a principal motivação para a realização do presente trabalho bem como sua contribuição original.

No segundo capítulo efetua-se uma breve análise da anatomia e fisiologia pulmonar, assim como a anatomia pulmonar do camundongo.

No terceiro capítulo apresentam-se considerações sobre a origem e funcionalidade do *phantom* de acordo com a padronização seguida para sua confecção a partir dos biomateriais. Dessa forma, faz-se necessário discutir sobre as normas ICRU para utilização dos biomateriais com a finalidade de obter um objeto simulador. Contudo, o capítulo será finalizado com a apresentação da proposta dimensional para o protótipo do *phantom* de pulmão.

No quarto capítulo serão discutidas as propriedades físicas e químicas dos biomateriais (quitosana e gelatina) utilizados para elaboração do *phantom*, assim como os meios de obtenção dessa matéria prima, as diluições utilizadas para obter o *phantom* de forma que ele apresente as mesmas propriedades de interação com o órgão, neste caso, o pulmão.

No quinto capítulo serão apresentadas as técnicas utilizadas para determinação das propriedades dos biomateriais confeccionados neste trabalho: espectroscopia de lente térmica, tomografia por coerência óptica, microscopia eletrônica de varredura e radiografia de alta resolução, para melhor compreensão dos resultados obtidos.

No sexto capítulo as diversas metodologias de preparação dos biomateriais e elaboração do *phantom* proposto neste trabalho serão apresentados, assim como as diferentes proporções e concentrações dos biomateriais poliméricos produzidos.

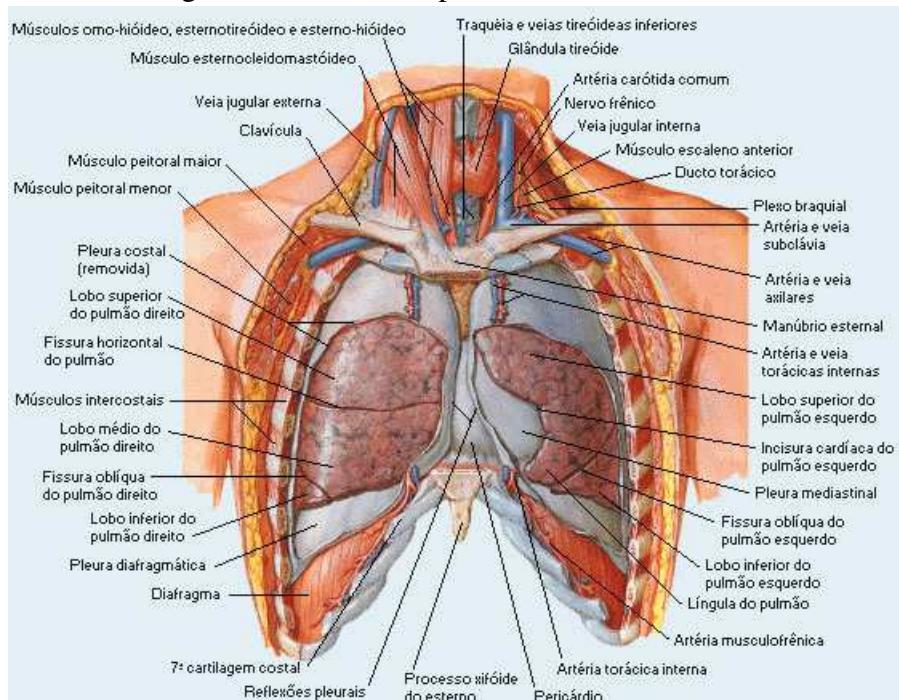
No sétimo capítulo serão apresentados os resultados obtidos na caracterização das estruturas produzidas, com relação a resposta da interação da radiação do biomaterial produzido por técnicas físicas e, por consequência, o êxito na aplicabilidade deste objeto simulador comparando as estruturas formadas com as estruturas de um pulmão.

No oitavo capítulo são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2 Anatomia e fisiologia do pulmão

O pulmão é o órgão essencial na respiração, trata-se de duas vísceras situadas, uma de cada lado, no interior do tórax e onde ocorre o encontro do ar atmosférico com o sangue circulante, fazendo-se então as trocas gasosas (hematóse). Localiza-se do diafragma até um pouco acima das clavículas e justaposto às costelas. O pulmão direito é mais espesso e mais largo que o esquerdo e, também, um pouco mais curto pois o diafragma é mais alto no lado direito para acomodar o fígado. O pulmão esquerdo possui uma concavidade característica para acomodar o coração [23–25]. Cada pulmão têm uma forma que lembra uma pirâmide com um ápice, uma base, três bordas e três faces [26], conforme anatomia apresentada na Fig. 2.1.

Figura 2.1: Anatomia pulmonar - vista anterior.



Fonte: Frank H. Netter, 2000.

O ápice do pulmão está voltado cranialmente e tem forma levemente arredondada. A base do pulmão apresenta uma forma côncava, apoiando-se sobre a face superior do diafragma, sendo que a concavidade da base do pulmão direito é mais profunda que a do esquerdo devido à presença do fígado.

Os pulmões apresentam características morfológicas diferentes: o direito é constituído por três lobos divididos por duas fissuras. Uma fissura oblíqua que separa lobo inferior dos lobos médio e superior e uma fissura horizontal, que separa o lobo superior do lobo médio. O pulmão esquerdo é dividido em um lobo superior e um lobo inferior por uma fissura oblíqua.

Cada lobo do pulmão se divide em lóbulos separados por septos e todos os lóbulos contêm um vaso linfático, uma arteríola, uma vénula e um ramo de um bronquíolo terminal. O pulmão é constituído por uma substância esponjosa leve, mas altamente elástica, denominada parênquima, que permite a expansão e contração dos mesmos e as trocas gasosas.

O tamanho, o peso e a densidade pulmonar são apresentados na Tab. 2.1 e correspondem à valores médios encontrados num adulto jovem saudável (feminino/masculino) com massa de 70 kg. Em mulheres, os volumes e capacidades pulmonares são cerca de 20% a 25% menores do que nos homens e, evidentemente, apresentam valores maiores em pessoas maiores e atléticas do que nas pessoas astênicas e pequenas [27, 28].

Tabela 2.1: Dimensão pulmonar num adulto jovem saudável.

Pulmão	Jovem saudável
Peso	900 g/1100 g (fem./masc.)
Tamanho (adulto)	16 cm/18 cm (fem./masc.)
Tamanho (adolescente)	10 cm/12 cm (fem./masc.)
Densidade	0,29 g/cm ³

2.1 Características dos estágios patológicos

Com a finalidade de incluir alterações na estrutura pulmonar produzida de forma a caracterizar um estágio patológico, apresenta-se neste item um pequena descrição das principais características dos estágio patológicos.

Para devida análise de nódulos pulmonares é importante destacar as classificações dos tipos de tumores mais comuns: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células e carcinoma de pequenas células. O esquema de classificação é útil para o devido tratamento e chance de cura do paciente para isto, utiliza-se a padronização pela nomenclatura TMN: Tumor, Linfonodo e Metástase [29].

T: Tumor Primário

TX: Tumor primário que não pode ser avaliado e não é visualizado por imagens ou análise patológica.

T0: Nenhuma evidencia do tumor primário.

T1: Tumor com três centímetros ou menos, envolvido por pulmão ou pleura visceral.

T2: Tumor com mais de três centímetros no maior diâmetro, envolve o brônquio principal, a pleura visceral, região hilar mas não envolve todo o pulmão.

T3: Tumor de qualquer tamanho que invade diretamente qualquer das seguintes estruturas: parede torácica, diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal.

T4: Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, esôfago, corpo vertebral, carina.

N: Linfonodos

NX: Linfonodos que não podem ser avaliados.

N0: Nenhuma metástases para linfonodos.

N1: Metástase para linfonodo peribrônquico e/ou linfonodos hilar e linfonodos intrapulmonar envolvido por extensão direta do tumor primário.

N2: Metástase para linfonodos mediastinal.

N3: Metástase para linfonodos mediastinal contralateral, hilar contralateral ou linfonodos supraclaviculares.

M: Metástase a Distância

MX: Presença de metástases à distância não pode ser avaliada.

M0: Ausência de metástases à distância.

M1: Presença de metástases à distância. Nódulo em lobo pulmonar diferente do tumor primário e classificado como M1.

Pelas características e acometimento dos tumores pulmonares as referências de acordo com o tamanho, invasão e presença de nódulos podem ser visualizadas na Tab. 2.2. Os nódulos pulmonares variam de tamanho $4 - 20\text{ mm}$, com grau específico para malignidade: $< 4\text{ mm}$ 0% de malignidade; $4 - 7\text{ mm}$ 1% de malignidade; $8 - 20\text{ mm}$ 15% de malignidade; $> 20\text{ mm}$ 75% de malignidade.

Tabela 2.2: Referências e tamanhos dos tumores pulmonares.

Ref.	Diâmetro do tumor	Invasão	Nódulos
T1	$T1_a \leq 2\text{ cm};$ $2\text{ cm} < T1_b \leq 3\text{ cm}$	Não tem invasão	Não tem invasão lobular
T2	$3\text{ cm} < T2_a \leq 5\text{ cm};$ $5\text{ cm} < T2_b \leq 7\text{ cm}$	Visceral pleural	Não tem invasão lobular
T3	$T3 > 7\text{ cm}$	Torácica, diafragma, mediastino pleural, pericárdio	Nódulos no mesmo lóbulo
T4	Qualquer tamanho	Coração, grandes vasos, traqueia, esôfago, coluna vertebral	Nódulos em outro lóbulo

2.2 Pulmão de camundongo

O camundongo é um dos animais mais utilizados para pesquisas em laboratório. Os seres humanos e os camundongos são surpreendentemente similares quanto às características genéticas, biológicas e até comportamentais.

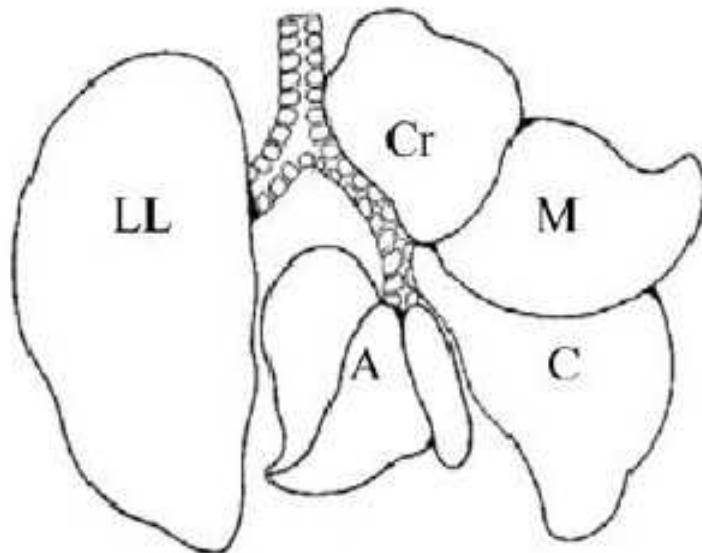
No que diz respeito à fisiologia compartilham cerca de 95% similaridade dos genes, isto permite que cientistas realizem experiências em camundongos, conduzindo a um melhor diagnóstico e tratamento de várias doenças. No camundongo é possível manipular diretamente seu genoma, para simular diversas doenças específicas humanas quando se conhece o gene causador, em busca de tratamento e/ou cura.

A seguir, destacam-se as vantagens de se utilizar o camundongo como cobaia [30].

- Devido à alta semelhança biológica, o sistema imunológico dos camundongos e dos humanos são compatíveis, ambos desenvolvem as mesmas doenças pelas mesmas razões genéticas.
- Os camundongos também podem ser geneticamente manipulados para simular condições ou doenças humanas, além de contemplar um tempo de vida acelerado, onde um ano de vida do camundongo equivale cerca de 30 anos em humanos, por consequência seu ciclo de vida pode ser estudado em apenas dois ou três anos.
- Outro fato importante é que eles são bem compreendidos pelos cientistas pois são utilizados em investigação biomédica por quase um século, já que são pequenos se reproduzem rapidamente e são relativamente fáceis de manusear e transportar.
- Finalmente, o período de gestação da fêmea é de 21 dias, dessa forma os resultados das experiências podem ser obtidos rapidamente.

A estrutura anatômica do pulmão de camundongo pode ser observada na Fig. 2.2: A-lobo acessório, C-lobo caudal, Cr-lobo cranial, M-lobo mediano, LL-lobo esquerdo [30].

Figura 2.2: Anatomia do pulmão de camundongo.



Fonte: Raul Lopes, 2005.

Diante dos pontos positivos descritos, a escolha do modelo *phantom* de pulmão de camundongo é satisfatória, principalmente devido ao tamanho reduzido do órgão (pulmão) e a alta semelhança biológica com ser humano.

3 *Tecido artificial, phantom*

De acordo com a Comissão Internacional de Radiação em Unidades e Medidas (ICRU), *phantom* define-se como: "volume de um tecido substituto que é utilizado para simular interações da radiação no corpo humano e, também, pode simular um tecido corporal considerando os detalhes anatômicos, tais como: forma e distribuição de densidade de massa espacial" [18, 31].

Qualquer material que simule um tecido corporal na sua interação com radiação ionizante é chamado de tecido substituto. Uma estrutura que contém um ou mais tecidos substitutos que é usada para simular interações da radiação em um corpo é denominada *phantom* [32–35].

Para identificar e caracterizar o *phantom* é necessário expressar as variações dentro da população. Os principais fatores que influenciam as formas e dimensões do corpo são: idade, sexo e etnia. Em geral, os homens são mais altos, possuem mais massa muscular e ombros mais largos que as mulheres, enquanto elas têm maior proporção de tecido adiposo e quadris mais largos. O pulmão masculino difere do feminino com um aumento na dimensão cerca de 20% (massa e tamanho).

Os *phantoms* são utilizados para reproduzir as propriedades físicas e biológicas do tecido, sua principal aplicação se concentra na dosimetria, radiodiagnóstico e radioterapia. No radiodiagnóstico é importante avaliar as imagens médicas (propagação e atenuação da radiação e as propriedades de absorção do tecido humano), sem que haja necessidade de expor o paciente a tal radiação, destacando-se a sua utilização para dosimetria durante a radioterapia, calibração e manutenção dos equipamentos, finalidade para pesquisa didática, treinamento de pessoal, ou seja, o *phantom* é essencial para garantir a qualidade no diagnóstico possibilitando fidedignidade no tratamento do paciente [31].

A seguir, apresentam-se *phantoms* de pulmão utilizados comercialmente e didaticamente: na Fig. 3.1 *phantom* a base de gelatina [36]; na Fig. 3.2 *phantom* a base de espuma de poliuretano [33]; na Fig. 3.3 *phantom* obtido a partir da descelularização pulmonar de um camundongo [37]; na Fig. 3.4 a base de resina epóxi utilizado para ensino e pesquisa [38].

Figura 3.1: Gelatina.



Fonte: G. Gambarini, 2009.

Figura 3.2: Espuma de poliuretano.



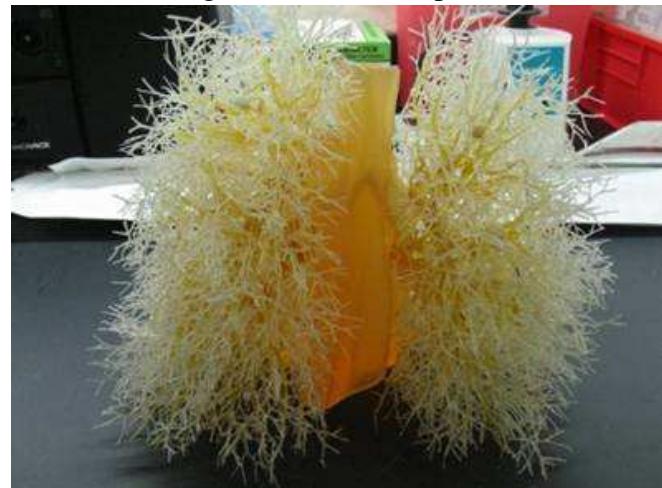
Fonte: R. A. D. Cerqueira, 2011.

Figura 3.3: Pulmão descelularizado.



Fonte: T. Luque, 2013.

Figura 3.4: Resina epóxi.



Fonte: Marios A. Gavrielides, 2010.

Como ferramenta de calibração e demonstração, o *phantom* tem sido cada vez mais utilizado nos diversos setores relacionados à interação de radiação com a matéria. Na dosimetria, o controle de qualidade dos aparelhos, podem reduzir a duração e a exposição do paciente, pois o *phantom* oferece uma rotina de monitoramento do controle de qualidade proporcionando um tratamento eficaz com menos exposição do paciente à radiação garantindo qualidade no tratamento de radioterapia. Além disso, é possível treinar o profissional de saúde, por exemplo, para a avaliação de estruturas do tecido e como guia em investigações cirúrgicas no que diz respeito ao radiodiagnóstico.

O *phantom* em geral apresenta diversas utilidades, a diferença está na aplicação planejada e no tipo de material a ser empregado em sua construção, geralmente são utilizadas substâncias que simulam propriedades biológicas e físicas de determinadas partes do tecido humano.

Desde a inserção dos tecidos substitutos no início do século XX, os *phantoms* de uma forma ou de outra, têm sido amplamente utilizados em dosimetria de radiação sob diferentes formas de fabricação.

O primeiro *phantom* foi relatado em 1920, tanques de água e blocos de cera eram frequentemente usados em radiografia. Mais tarde na década de 60, novos tecidos substitutos com certo grau de sofisticação e mais confiáveis começaram a surgir. Desde sua criação e até os dias atuais, a tecnologia de produção do *phantom* se desenvolveu consideravelmente em parceria com a tecnologia de imagens médicas. Atualmente, para construção do *phantom*, uma ampla variedade de matéria prima está disponível e com processos de fabricação bem sofisticados [39].

3.1 Especificação e categoria funcional do *phantom*

A ICRU no relatório 44 de 1989, determina que a escolha do tecido substituto dependerá de um conjunto de características físicas em sua interação com radiação (ionizante ou não-ionizante), a escolha desse conjunto dependerá da finalidade de aplicação [18].

Em geral, dois diferentes conjuntos de características físicas são utilizados como critério de seleção do material para o tecido substituto: a) interação da radiação com o tecido corporal e

b) a quantidade dosimétrica no ponto de interesse do tecido corporal. As categorias funcionais dos *phantoms* podem ser destacadas como:

1. ***Phantoms de Calibração***: são usados para estabelecer a resposta de detectores de radiação e para corrigir informações quantitativas derivadas de imagens digitais, para atividade envolvendo controle de qualidade e calibração de equipamentos médicos.
2. ***Phantoms de Imagem***: são usados para a avaliação da qualidade das imagens. Dentro desta categoria de *phantoms* funcionais podemos subdividi-los em:

Phantoms de Corpo: tem a forma e a composição de um corpo humano ou parte dele. Geralmente é constituído de vários tecidos substitutos com respectivos tamanhos, formas, distribuição espacial, densidade e interações de radiação. As geometrias variam de simples/idealizada a complexa/realística, esses últimos são chamados de antropomórficos.

Phantoms Dosimétrico: é usado para medida de dose absorvida em uma geometria específica.

Phantoms Padrão: possui geometria simples e reproduzível, são usados para comparar e padronizar medidas dentro de condições padrão de irradiação. Este grupo de simulador tem como principal função servir como referência na garantia da reprodutibilidade das propriedades ao longo do tempo.

3. ***Phantoms de Referência***: *phantom* homogêneo com geometria, dimensão composição e densidade de massa claramente definidos para cálculos de dose de radiação, equivalências de densidades minerais ou outras medidas de tipos semelhantes. Podem ser definidos pela modalidade de imagem a ser utilizada: Ressonância Magnética, Ultrassom, Mamografia, Tomografia Computadorizada (TC), etc.

4. Simuladores de Massa Sólida (tumores): localizado próximo ao objeto a ser irradiado para promover espalhamento ou acúmulo do feixe de atenuação, alguns têm estruturas cilíndricas que imitam tumores sólidos. Estas estruturas sólidas são normalmente mais atenuantes e produzem mais ecos internos (ecoicos) em relação aos que formam o tecido mole.

Como objeto de estudo deste trabalho, o *phantom* a ser desenvolvido, de acordo com as categorias funcionais apresentadas anteriormente, pode ser aplicado como *phantom* de calibração e dosimétrico (imagem).

A escolha do tecido substituto para a produção do *phantom* é baseada na composição do tecido do corpo a ser simulado e as características do campo de radiação. Não existe um único composto químico que se equipara à composição atômica do tecido do corpo, a composição requerida deve ser atingida em misturas aquosas ou em gel que são frequentemente formuladas, de modo que suas propriedades de interação da radiação e não a sua composição atômica, correspondam às do tecido do corpo com o grau necessário para a aplicação específica.

No entanto, as vezes é conveniente utilizar essas formulações e outras misturas empregadas, em que o principal ingrediente é um material que se aproxima do tecido verdadeiro em relação a uma ou mais interações com a radiação. Outras substâncias podem ser utilizadas para minimizar as deficiências do material base.

A geometria e composição do *phantom* devem se aproximar biologicamente numa precisão exigida para aplicação específica. Os *phantoms* podem ser tão simples quanto pequenos, apresentar-se sob forma de filmes para o tecido substitutivo ou podem ser tão complexos quanto o tamanho antropomórfico e a precisão da reprodução específica do órgão [40].

A avaliação da adequação de um determinado substituto inclui uma comparação pertinente das características de interação da radiação e densidades de massa do tecido corporal e substituto. *Phantoms* podem representar uma ampla variedade de tecidos corporais órgãos ou conjunto de órgãos e podem ser utilizados para análises com: fôtons, elétrons, nêutrons e partículas pesadas.

4 *Biomateriais*

Biomateriais são quaisquer substâncias ou combinação entre elas, de origem natural ou sintética, que pode ser utilizada em conjunto ou como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função de um sistema de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável. São substâncias sistêmicas e farmacologicamente inertes, designadas para implantação ou incorporação em sistemas e, em contato com tecidos, sangue e fluidos corpóreos biológicos destinados a uso de próteses, diagnósticos, terapia e aplicações de armazenamento, mantém a homeostasia do organismo ou de qualquer componente do meio, ou seja, é uma substância destinada a interagir com sistemas biológicos complexos [3, 41].

O advento da utilização dos biomateriais se tornou evidente na década de 50 (após a Segunda Guerra Mundial), diante da necessidade de tratar feridos durante o combate, diminuindo a alta mortalidade dos soldados [42]. Nesse contexto, a integração entre os diversos agentes de saúde teve um papel importante para implementação do uso de biomateriais. Desde então, a utilização de biomateriais vêm se destacando em diversas áreas do conhecimento, inclusive com o vínculo entre a Medicina e Ciências Exatas tais como: Física, Engenharia de Materiais, Engenharia Biomédica, entre outras [43, 44].

Os biomateriais são classificados de acordo com a sua origem de obtenção, ou seja, natural e artificial. A classificação na forma natural ocorre quando o biomaterial é retirado do meio ambiente sem a necessidade de manipulação em laboratório; na forma artificial ocorre uma combinação de substâncias, manipulação em laboratório ou síntese de novos materiais. É relevante para o desenvolvimento de um bom trabalho que, para um material ser utilizado como biomaterial, as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, devem ser monitora-

das para garantir uma perfeita funcionalidade. Para possibilitar uma melhor compreensão do desenvolvimento deste trabalho será introduzido as principais características dos biomateriais aqui utilizados [45, 46].

Biomateriais possuem uma variedade de aplicações e não há um biomaterial ideal para todas as indicações. As aplicações e os diferentes tipos de biomateriais podem ser visualizados na Tab. 4.1.

Tabela 4.1: Diferentes biomateriais e aplicações biomédicas.

Biomaterial	Aplicações
Polímeros sintéticos: poliuretano, nylon, polietileno, poliéster, PMMA (polimetil-metacrilato), silicone. Polímeros naturais: colágeno, gelatina, quitosana.	Suturas, artérias, veias, maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula), tendão artificial, oftalmologia.
Compósitos (cerâmica-metal, carbono-carbono, fosfato de cálcio-colágeno).	Válvula cardíaca artificial, juntas de joelho, etc.
Cerâmicas (óxidos de alumínio, zircônio, e titânio, porcelana, fosfatos de cálcio, carbono e vidros bioativos).	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, prótese de bacia, traqueias artificiais.
Metais e ligas (aço inoxidável, ligas de titânio e cobalto-cromo).	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios) e implantes dentários.

Polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, de alto peso molecular, são obtidos através de reações químicas de polimerização formando estruturas moleculares que consistem na repetição de pequenas unidades, chamadas mero (unidade básica de repetição da cadeia polimérica). Devido ao seu tamanho avantajado, a molécula de um polímero é chamada macromolécula [47, 48].

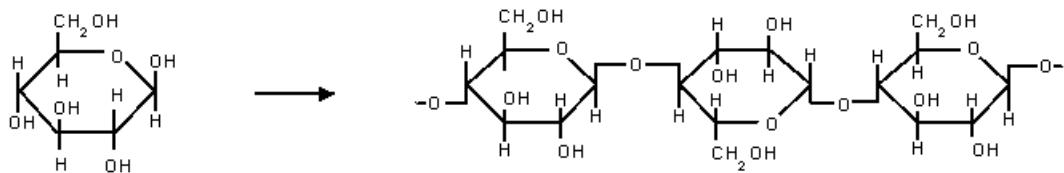
4.1 Carboidratos

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza, constituídas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, podendo apresentar nitrogênio, fósforo ou enxofre na sua composição. Dentre as diversas funções atribuídas aos carboidratos, a principal é a ener-

gética porém, atuam como elementos estruturais e de proteção na parede celular das bactérias, fungos e vegetais, bem como em tecidos conjuntivos e envoltório celular de animais. Agem como lubrificantes das articulações esqueléticas e fornecem coesão entre as células. Possuem grupos funcionais que podem ser aldeído ($O=C-H$) ou cetona ($-C=O-$) respectivamente, e várias grupos hidroxila, geralmente uma em cada átomo de carbono que não faz parte do aldeído ou grupo funcional cetona [49].

Os polissacarídeos (glicanos) são carboidratos que por hidrólise, originam uma grande quantidade de monossacarídeos, apresentam massa molecular muito elevada que depende do número de unidades de monossacarídeos que se unem, sendo polímeros naturais. A reação que produz o polímero é denominada reação de polimerização, a molécula inicial (monômero), une-se sucessivamente outras originando o dímero, trímero, tetrâmero, e assim por diante ou até originar o polímero. Por exemplo, a celulose (Fig. 4.1) é um polímero da glicose.

Figura 4.1: Estrutura da celulose: formada pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosa) através de ligações β -1,4-glicosídicas.



Fonte: Peter Atkins, 2006.

A celulose é um polímero de cadeia longa de peso molecular variável, tem uma estrutura linear, fibrosa e úmida, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias junta postas de glicose, fazendo-as impenetráveis a água e portanto, insolúveis, originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais.

Conforme o tamanho, os carboidratos podem ser classificados em monossacarídeos, oligosacarídeos e polissacarídeos.

- Os **monossacarídeos** são carboidratos com reduzido número de átomos de carbono em sua molécula ($C_nH_{2n}O_n$), em que n pode variar de 3 a 7 (trioses, tetroses, pentoses, he-

xoses e heptoses). São relativamente pequenos, solúveis em água e não sofrem hidrólise (reação química de quebra de uma molécula devida a água). Uma cadeia de monossacarídeos forma um polissacarídeo, que é um carboidrato de alto peso molecular. Nesta categoria estão: pectina, quitina, celulose, ágar, goma xantana, entre outros.

- Os **oligossacarídeos** são carboidratos compostos pela união de duas a dez moléculas de monossacarídeos. A ligação entre os monossacarídeos ocorre por meio de ligação glicosídica (ligação entre a hidroxila do carbono de um monossacarídeo com a hidroxila de um álcool ou qualquer carbono de outro monossacarídeo) formada pela perda de uma molécula de água. Quando são constituídos por duas moléculas de monossacarídeos, recebem o nome de dissacarídeos. Os oligossacarídeos são solúveis em água, mas como não são carboidratos simples como os monossacarídeos necessitam ser quebrados na digestão para que sejam aproveitados pelos organismos como fonte de energia.
- Os **polissacarídeos** são carboidratos grandes (macromoléculas), às vezes ramificados formados pela união de mais de dez monossacarídeos ligados em cadeia, constituindo assim, um polímero de monossacarídeos, geralmente de hexoses. São insolúveis em água (apresentando um caráter apolar, devido ao elevado peso molecular) e portanto, não alteram o equilíbrio osmótico das células. Os polissacarídeos possuem duas principais funções biológicas, como: forma armazenadora de combustível e elementos estruturais.

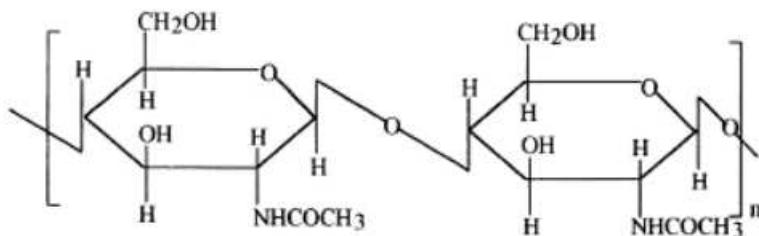
4.2 Quitina

A quitina foi descoberta pelo professor francês Henri Braconnot em cogumelos (1811), recebendo a denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, quando esta foi isolada de insetos. O termo quitina é derivado da palavra grega *khitón*, que significa carapaça ou caixa de revestimento, cuja função na natureza é de revestimento e proteção dos invertebrados. Por muitos anos, houve controvérsia de que se tratava de um novo material, devido às diversas semelhanças estruturais com a celulose. Finalmente, em 1843, Payen regis-

trou a presença de nitrogênio na estrutura da quitina [44].

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, após a celulose, fórmula molecular $(C_8H_{13}O_5N)_n$, que se trata de uma estrutura similar à estrutura da celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$, um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. Sua hidrólise completa produz glicose. A quitina possui grupos amino acetilados ($-NHCOCH_3$), cuja fórmula estrutural pode ser visualizada na Fig. 4.2.

Figura 4.2: Estrutura quitina.



Fonte: Peter Atkins, 2006.

A quitina é um material biodegradável, não-tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetil acetamida com 5% de cloreto de lítio (DMAc-LiCl).

A quitina pode ser encontrada naturalmente na parede celular de fungos mas, sua maior fonte disponível são nos exoesqueletos de vários crustáceos, como caranguejos e camarões [50] que contém de 15% a 25% de quitina. A quitina está fortemente associada com proteínas, material inorgânico, pigmentos e lipídios. Várias condições são usadas para remover essas impurezas e ainda não existe um processo padrão. A Tab. 4.2 apresenta uma lista das fontes de obtenção de quitina.

Tabela 4.2: Fontes de quitina.

Animais marinhos	Micro-organismos	Insetos
Anelídeos	Algas verdes	Escorpiões
Moluscos	Leveduras	Aracnídeos
Celenterados	Fungos (parede celular)	Braquiópodes
Crustáceos	Penicillium	Formigas
Lagosta	algas castanhas	Baratas
Caranguejo	Esporos	Besouros
Camarão	Chytridiaceae	
Camarão grande	Asconoide	
Krill	Blastocladiaceae	

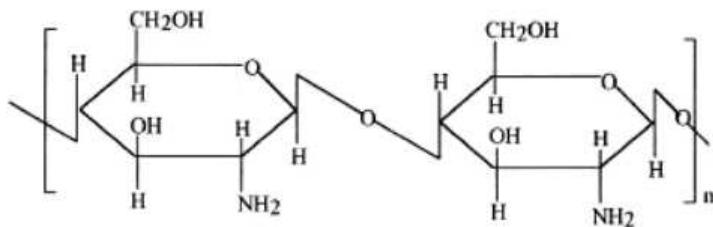
4.3 Quitosana

A quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget. Porém, foi descoberta anos antes (em torno de 1823), quando os pesquisadores Odier e Children isolaram a quitosana (porém imaginavam que fosse quitina) através de múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado. O nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe Seyler pelo fato de que esta substância possuía quantidade de nitrogênio igual a quitina [51, 52].

A quitosana é um polissacarídeo amino, obtida através do processo de desacetilação da quitina. Trata-se de um polímero (copolímero-formado por diferentes monômeros) biocompatível e naturalmente biodegradável pelas enzimas do corpo, de forma que os produtos dessa degradação são atóxicos [53–55]. Os dados específicos da quitosana são apresentados a seguir:

- denominação química: **Poli- β -(1→4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucose ou Poli-(N-acetyl glucosamina),**
- formula molecular $(C_6H_{11}NO_4)_n$,
- fórmula estrutural apresentada na Fig. 4.3.

Figura 4.3: Fórmula estrutural da Quitosana.



Fonte: Peter Atkins, 2006.

A quitosana é considerada uma base fraca e insolúvel em água, bases, álcool e acetona, porém dissolve-se em soluções ácidas diluídas de ácidos orgânicos, como os ácidos: acético, fórmico e cítrico, além de ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas. Em soluções aquosas cujo pH esteja próximo de 7 ou acima deste ela é insolúvel, porém em soluções mais ácidas, com pH abaixo de 5, este biopolímero começa a apresentar uma leve solubilidade devido à protonação dos grupos amino que aparecem na cadeia polimérica. Em soluções de pH entre 1 e 2 a quitosana se torna totalmente solúvel no meio. Por apresentar esta característica, alguns métodos de modificação da sua cadeia polimérica, passam primeiramente por uma dissolução em soluções ácidas e, depois pela adição do modificador ou espécie funcionalizante [56].

A solubilidade da quitosana é obtida partir da sua dissolução em ácido acético a 1% ou 0,1 M, formando um polímero catiônico, com protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais como uma resina trocadora de íons, e devido a carga elétrica positiva, tem habilidade de atrair as gorduras ingeridas, que são carregadas negativamente [57, 58]. De fato, é um parâmetro difícil de ser controlado e está relacionado com a desacetilação, concentração iônica, pH, natureza do ácido usado para protonação e a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia [59].

A massa molecular, assim como o grau de desacetilação, influencia nas propriedades físicas-químicas da quitosana, como a solubilidade. Considera-se que derivados da quitosana com baixa massa molecular são mais solúveis. Também, a massa molecular influencia na atividade antimicrobiana onde, quanto maior a massa molecular da quitosana maior é a atividade antimicrobiana [52].

A escolha da quitosana é satisfatória pois, trata-se de um produto natural, de baixo custo e renovável, biocompatível, biodegradável e atóxica. Pode ser quimicamente modificada e processada em diferentes formas, tais como: soluções, filmes, blendas e sistemas de liberação controlada de fármacos [60–62], tem sido amplamente utilizada na engenharia de tecidos (medicina regenerativa) e de grande importância econômica e ambiental, dentre outras vantagens: hemostasia na cicatrização de feridas; aceleração da regeneração dos tecidos; propriedade antibacteriana e antifúngica [63–65]; a grande quantidade de poros se apresenta de maneira uniforme desde a superfície até seu interior, provendo desta a difusão do substrato.

Geralmente, a quitosana possui 3 grupos funcionais: um grupo amino ($R-NH_2$) e dois grupos hidroxila primário ($R-CH_2-OH$) e secundário ($R_1R_2-CH-OH$). A obtenção da quitosana se faz da seguinte forma: através de um processo de desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH seguida de descoloração com KMnO₄ e ácido oxálico (ou ácido etanoico C₂H₄O₂), a quitosana pode ser separada dos outros componentes da carapaça. A partir daí, a quitina obtida (biopolímero contendo grupos acetil -NHCOC) é desacetilada com solução concentrada de NaOH produzindo a quitosana [66, 67].

Devido à estrutura porosa da quitosana é possível modular e desenvolver uma variedade de tecidos para substituição e/ou simulação e regeneração, sendo que as propriedades mecânicas da quitosana dependem do tamanho dos poros e da orientação desses poros. Pode ser modulada de várias formas e formar estruturas porosas através do processo de liofilização (processo de desidratação por sublimação). Portanto a sua bioatividade precisa ser melhorada como na maioria dos polímeros, pela adição biológica de materiais ativos como: hidroxiapatita, colágeno ou gelatina.

4.3.1 Processo de desacetilação da quitina

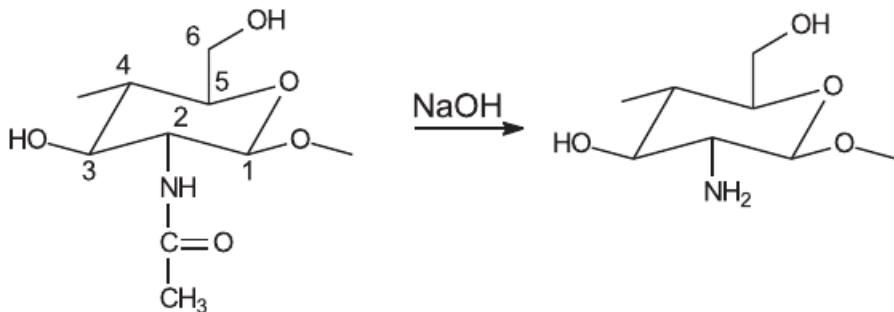
A quitosana é obtida a partir do processo de desacetilação da quitina em soluções alcalinas. A completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despólymerização. A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases, bem como sua baixa produtividade. O conteúdo de nitrogênio na quitosana varia de 5% a 8 %, dependendo do processo de desacetilação [68].

A quitina e a quitosana são consideradas distintas porém, o grau de desacetilação definirá a forma do biopolímero (agrupamento de macromoléculas de origem biológica) predominante. Assim, o biopolímero é considerado quitosana quando o grau de desacetilação for superior a 60%, tendo em vista que o prolongamento da reação, gera produtos mais completamente desacetilados, provocando degradação das cadeias poliméricas. O grau de desacetilação influencia na solubilidade da quitosana, pois quanto maior a quantidade dos grupos aminos maior é a repulsão eletrostática entre as cadeias e, consequentemente, maior é a solvatação em água [69].

As características da quitosana (diferentes graus de desacetilação) e a eficiência da desacetilação são afetadas pelos seguintes fatores: temperatura e tempo de reação; razão quitina/solução alcalina; tamanho das partículas de quitina; concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregados); atmosfera da reação e presença de agentes que evitam a despólymerização.

Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana. O processo de desacetilação da quitina ocorre em meio básico com a solução de hidróxido de sódio (ou KOH) em torno de 40% a 60%, sob temperatura variando de 80°C a 150°C, durante um período de 0,5 - 24 horas. Na Fig. 4.4 é mostrada a reação química de desacetilação da quitina na presença de NaOH.

Figura 4.4: Desacetilação da quitina.



Fonte: Peter Atkins, 2006.

Esse processo de desacetilação envolve a remoção dos grupos acetil da cadeia de quitina resultando em grupos amino livres (NH_2). A reação de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana não ocorre de forma total, de modo a obter um homopolímero 100% desacetilado. Estruturalmente, a quitosana pode ser considerada um copolímero com unidades 2-amino-2-desoxi-D-glucose-glucosamina (maior número) e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose - N acetil-glucosamina (menor número), as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo β ($1 \rightarrow 4$), com sua estrutura C6 sendo composta de um grupo amino primário e dois grupos hidroxila livres.

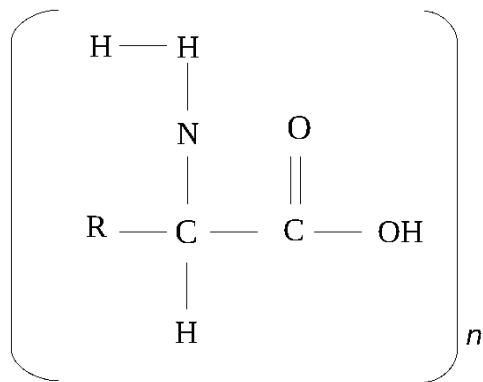
O grau de desacetilação da quitosana em produtos comerciais normalmente se encontra na faixa de 70% a 95%, e a massa molar média 10^4 g.mol^{-1} , estes definem praticamente todas as propriedades físico-químicas e suas aplicações. Para produção de biomateriais, normalmente utiliza-se quitosana com grau de desacetilação $\sim 85\%$ [70].

A desacetilação da quitina em meio básico produz a quitosana, com o grupo amino livre, como mostra a Fig. 4.4, que pode reagir com várias moléculas com a finalidade de tornar o biopolímero com maior disponibilidade de grupos pendentes, para exercer outras atividades e são ainda amplamente empregadas tanto nas formas em pó, esferas ou filmes.

4.4 Gelatina

A palavra gelatina tem a sua origem do latim *gelatus* que significa firme, rígido, gelado. Em 1682 o francês Denis Papin descreveu o processo de cozimento para obtenção da gelatina a partir de ossos de animais porém, o primeiro registro de uma fábrica de gelatina foi em 1754 na Inglaterra. Em 1850 Poetevine e Gaudin recomendaram o uso da gelatina como aglutinante (que gruda, cola) dos sais de prata na emergente indústria fotográfica e C. Volt demonstrou que a gelatina era constituída de componentes proteicos [41, 71, 72]. A fórmula estrutural é apresentada na Fig. 4.5.

Figura 4.5: Fórmula estrutural dos aminoácidos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A gelatina é um polímero natural composto por proteínas e peptídeos, derivada da hidrólise parcial do colágeno, correspondente ao principal componente de proteína fibrosa em ossos, cartilagens, pele, tendões e tecido conectivo [72]. Os peptídeos são biomoléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas (ligação covalente C-N), estabelecidas entre um grupo amina ($\text{R}-\text{NH}_2$) de um aminoácido, e um grupo carboxila (-COOH) do outro aminoácido, são resultantes do processamento de proteínas e podem possuir na sua constituição 2 ou mais aminoácidos. Destaca-se a fórmula molecular geral dos aminoácidos $(\text{RC}_2\text{H}_4\text{NO}_2)_n$ que irá compor a molécula formadora da gelatina.

A gelatina é praticamente insípida e inodora, incolor ou ligeiramente amarelada, solúvel em água quente (temperaturas entre 45°C a 60°C) e a compostos como glicerol e ácido acético, in-

solúvel em solventes orgânicos, a umidade pode variar entre 7% a 15% de acordo com o grau de secagem e conteúdo de cinzas menor que 2% da amostra. O peso molecular é relativamente alto (20.000-250.000 Da) comparado aos polímeros sintéticos devido ao modo de processamento. Sob condições específicas como temperatura ambiente, solventes ou pH, a gelatina pode apresentar diferentes modos de geleificação, podendo ser moldada de acordo com o interesse do pesquisador.

Apresenta-se relevante interesse de aplicação para as indústrias farmacêuticas médicas, devido às suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade com ambientes fisiológicos, alta resistência à tensões mecânicas, antigenicidade (devido à sua desnaturação do colágeno). Sua aplicação se estende à área médica, culinária, industrial, cosmética, entre outras. Dentre as aplicações médicas se destacam: o desenvolvimento de *phantom* (objeto simulador), *scaffolds* (arcabouços) e sistemas de *drug-delivery* (transporte de drogas) [57, 73].

4.5 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é formada por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sendo o principal componente inorgânico do tecido, um osteo condutor não tóxico, biomaterial não inflamatório, que promove a proliferação celular e diferenciação da célula osteoblástica. A hidroxiapatita foi identificada como sendo componente mineral do osso pela primeira vez em 1926. Dejong realizou o primeiro estudo de difração de raios X do osso e reconheceu que sua fase inorgânica, assemelha-se às estruturas minerais conhecidas como apatitas [74].

Trata-se de um constituinte mineral natural encontrado no osso (representando 30% a 70% da massa dos ossos e dentes). A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteo integração, possui alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, tornado-a um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos [75, 76].

Para o preparo da hidroxiapatita, deve-se considerar que as características do fosfato de cálcio podem ser facilmente modificadas devido à alta complexidade na química desses fosfatos, simplesmente variando o método de preparação. Por isso, a escolha e o controle da metodologia adotada no preparo do material é fundamental para cada aplicação do produto final. Neste trabalho, a hidroxiapatita será incorporada ao biomaterial com a finalidade de simular calcificações no tecido, ou seja, uma possível formação nodular que predispõe o câncer.

Caracterização de biomateriais

A análise e caracterização de biomateriais têm se destacado de uma forma relevante no cenário científico devido à necessidade de adequada seleção do material, no que se refere ao desempenho do sistema em estudo. A caracterização de biomateriais descreve os aspectos de composição e estrutura, incluindo defeitos dos materiais, dentro de um contexto de relevância para um processo, produto ou propriedade em particular ao qual será designado [77–79].

Dependendo da finalidade a que este material será submetido, a caracterização pode abranger a avaliação da bioatividade e imunogenicidade, propriedades mecânicas, elétricas, eletrônicas, magnéticas, ópticas, químicas, térmicas ou, até mesmo, a combinação destas propriedades. A avaliação destas propriedades visa principalmente estimar o desempenho no período de "vida útil" do material, minimizando eventos indesejáveis (degradação, imperfeições ou defeitos) durante a utilização do material [43, 46].

Ao analisar a aplicabilidade dos biomateriais a base de quitosana e gelatina para confecção do *phantom*, diversos métodos de otimização devem ser considerados durante a preparação das amostras, tais como proporções e concentrações, método de preparação, forma e tamanho. É relevante caracterizar as estruturas obtidas na sua interação com a radiação, dessa forma será necessário validar o método de obtenção das amostras que originarão o *phantom* por variadas técnicas físicas: ELT, MEV e DEI.

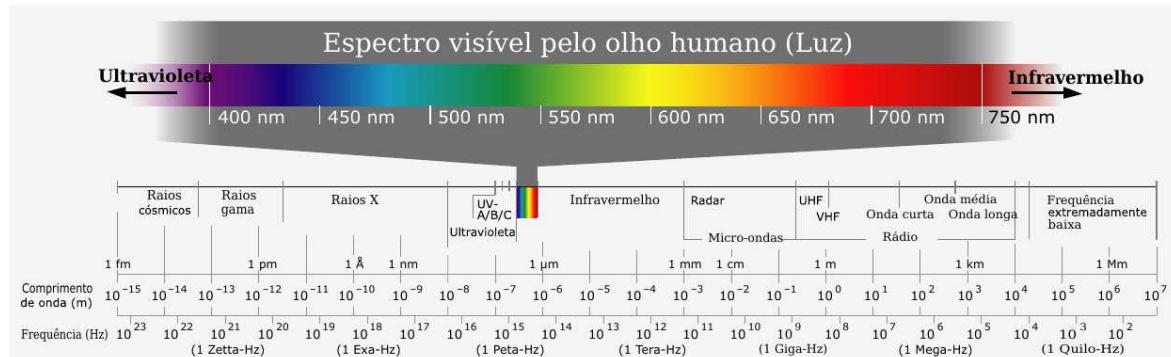
É importante salientar que essas técnicas não são capazes de fornecerem por si só uma análise completa da estrutura, no entanto a informação combinada será determinante através dos resultados obtidos devido às propriedades estruturais e composição química.

5 *Técnicas para determinação das propriedades dos biomateriais*

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria (ver apêndice A) utilizando técnicas de análises, tendo como principal objetivo a obtenção de informações físicas e químicas sobre o material analisado, como por exemplo: determinação do nível de energia dos átomos ou moléculas e análise da estrutura química ou grupos funcionais. Os espectros fornecem as transições numa representação bidimensional da força da interação versus a energia, ou seja, a diferença de energia entre os níveis determinando as posições dos níveis energéticos como função do comprimento de onda (λ) e frequência (v) [80–84].

Cada tipo de espectroscopia possui tecnologia própria uma vez que, as diferentes regiões espectrais exigem espetrômetros com elementos dispersivos e detectores apropriados [85]. O espectro eletromagnético pode ser observado na Fig. 5.1.

Figura 5.1: Espectro eletromagnético.



Fonte: H. Bolton, 1983.

5.1 Espectroscopia de lente térmica

Sabe-se que as características de superfície do material apresentam fatores importantes que influenciam a resposta dos tecidos a novos biomateriais. É relevante compreender como o biomaterial altera as suas propriedades físicas, numa nova visão da interação com o tecido biológico simulando diversas condições fisiológicas. Técnicas ópticas têm sido utilizados em muitas áreas de investigação biomédica como boas ferramentas para monitorar o comportamento óptico. O efeito de lente térmica (LT) foi observado pela primeira vez em 1965 por Gordon [86] por um solvente quase transparente usado numa experiência de cavidade do laser.

É importante discutir sobre as propriedades térmicas, utilizando a técnica espectroscopia de lente térmica (ELT) induzida por laser. Esta técnica, permite a obtenção de valores precisos da difusividade térmica sendo aplicada a materiais transparentes na região visível do espectro, até mesmo materiais com baixo coeficiente de absorção. A medida da difusividade térmica é uma das mais importantes em problemas que envolvem estados não estacionários de trocas de calor. A alta sensibilidade da técnica de espectroscopia fototérmica, tem conduzido às análises de amostras de baixa absorvância [87], isto causa uma dependência do sinal ELT sobre a densidade de energia do laser em excitação.

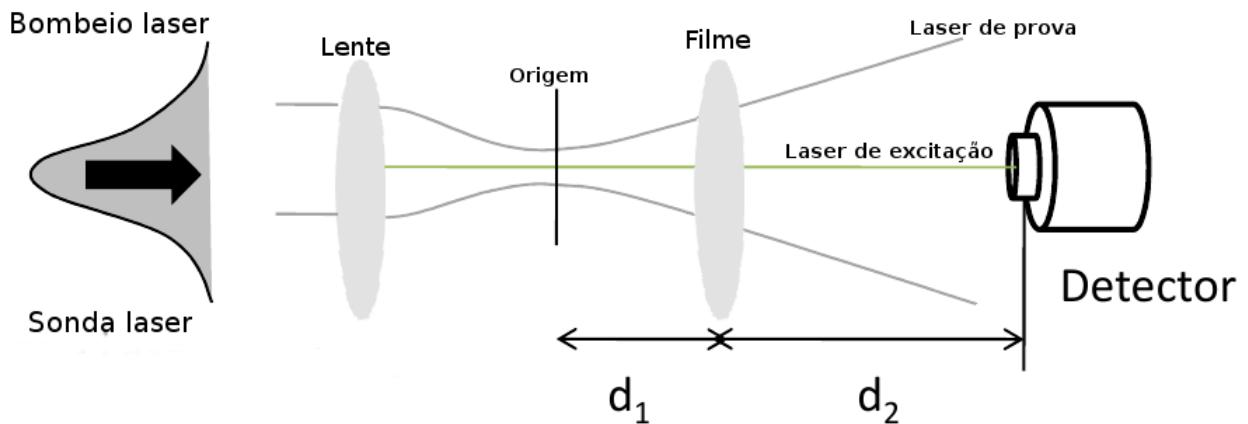
ELT é um processo induzido a laser que ocorre quando a energia do laser absorvida por uma amostra e a energia de radiação absorvida é parcialmente ou totalmente convertida em calor para a caracterização de materiais. O efeito de lente térmica é produzido iluminando uma amostra transparente com um laser apresentando perfil de intensidade gaussiano. A energia do feixe ao ser absorvida é convertida em calor gerando aquecimento na região iluminada. Como a intensidade do feixe é maior no centro, uma distribuição radial de temperatura é criada, produzindo uma variação do índice de refração em função da temperatura (dn/dT), e consequentemente variando o caminho óptico percorrido pelo laser. Isto faz com que a região iluminada se comporte como uma lente que poderá mudar a intensidade do centro do feixe laser que atingirá a amostra para verificar a formação dessa lente, o laser de prova.

Devido a esta alteração no índice de refração, a região iluminada se comporta com um elemento refrator, chamado de lente térmica. A formação da LT ocorre através de um transiente que é da ordem de milissegundos. Este é o tempo necessário para que o equilíbrio térmico, o estado estacionário, seja alcançado. A ELT é uma técnica não destrutiva de caráter remoto, ou seja, não exige contato entre a amostra e o detector o que possibilita a realização de medidas em função da temperatura de modo a estudar as transições de fase que possam ocorrer.

i: Modelo físico

Nos últimos anos, grupos de pesquisa têm mostrado que o uso de ELT pode apresentar uma excelente alternativa para caracterização de materiais [88]. A representação geral da distribuição espacial e temporal da temperatura em biomateriais é conhecida como transferência biotérmica, esse caminho foi inicialmente sugerido por Pennes [89] e a representação teórica de ELT por Sheldon [90]. Considere um feixe de laser com distribuição de intensidade Gaussiana (TEM_{oo}), conforme apresentado na Fig. 5.2, para formulação do modelo físico.

Figura 5.2: Representação esquemática da ELT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A nomenclatura utilizada para as variáveis físicas, estão listadas a seguir:

n : índice de refração;	ΔT : variação de temperatura (K);
P : potência do feixe (W);	Φ_0 : potência incidente (W);
α : absorbância (cm^{-1});	r : raio em relação ao eixo do feixe (cm);
ρ : densidade ($g.cm^{-3}$);	D : difusividade térmica ($\epsilon/c\rho, cm^2.sec^{-1}$);
l : espessura da amostra (m);	c : calor específico ($cal.g^{-1}.K^{-1}$);
I : intensidade do feixe ($W.cm^{-2}$);	ω : raio do feixe de excitação (cm);
d : posição do eixo do feixe (cm);	λ : ($457 nm$);
ϵ : condutividade térmica ($cal.sec^{-1}.cm^{-1}.K^{-1}$).	

O fluxo de calor na amostra será determinado como uma relação da função de tempo e pode ser obtido através da resolução da equação de estado de calor e a sua forma geral será dada:

$$c\rho \frac{\partial}{\partial t}[\Delta T(r,t)] = \dot{q}(r) + \epsilon \nabla^2[\Delta T(r,t)]. \quad (5.1)$$

O modelo proposto por Pennes [89] considera os princípios de conservação de energia assumindo que os materiais são homogêneos e possui propriedades térmicas isotrópicas. Esta equação representa o calor que é gerado dentro da amostra durante a exposição à radiação laser. Como condições de contorno, temos:

$$\begin{cases} r < \infty; \\ \Delta T(r,0) = 0 \end{cases} \quad (5.2)$$

pela condição 5.2, quando o tempo for igual a zero, não há mudança de temperatura na amostra, logo a lente térmica ainda não foi formada.

A expressão na Eq. 5.1, representa a equação de condução de calor. A quantidade $\dot{q}(r)$ do termo fonte, é o fluxo de energia por uma unidade de volume por unidade de tempo a uma distância r do eixo. Para intensidade do laser incidente $I_0(r)$ e espessura de material l , a intensidade transmitida $I(r)$ pode ser escrita como:

$$\Delta I(r) = I_0(r) - I(r) \simeq I_0(r)\alpha l, \quad (5.3)$$

onde $I_0(r), I(r), \alpha$ são a intensidade do feixe na amostra, intensidade do feixe de saída e absorção, respectivamente. Portanto

$$\dot{q}(r) = \frac{\Delta I(r)}{l} = I_0(r)\alpha. \quad (5.4)$$

Para um feixe de laser com perfil Gaussiano, a intensidade de entrada $I_0(r)$ é:

$$I_0(r) = \frac{2\Phi_0}{\pi\omega^2} e^{-2r^2/\omega^2}. \quad (5.5)$$

Combinando as equações 5.4 e 5.5 o termo fonte de luz é obtida

$$\dot{q}(r) = \frac{2\Phi_0\alpha}{\pi\omega^2} e^{-2r^2/\omega^2}. \quad (5.6)$$

A solução da equação 5.1 é:

$$\Delta T(r,t) = \frac{2\Phi_0\alpha}{\pi c\rho\omega^2} \int_0^t \left(\frac{1}{1+2t'/t_c} \right) \times \exp\left(\frac{-2r^2/\omega^2}{1+2t'/t_c}\right) dt'. \quad (5.7)$$

A resolução detalhada da equação 5.7 e as demais, podem ser encontradas em [91]. A

constante característica de tempo térmica então é calculada como se segue:

$$t_c = \frac{\omega^2 c \rho}{4\epsilon} = \frac{\omega^2}{4D}. \quad (5.8)$$

A expressão na equação 5.8 representa o tempo de formação da LT, ou seja, o tempo que o calor leva para atingir a posição $r = \omega$ na amostra. A dedução desta expressão considera o calor produzido pela absorção da energia do feixe de excitação como uma fonte cilíndrica com distribuição radial Gaussiana, com o eixo ao longo da direção z, e a amostra como um meio infinito em relação ao raio do feixe de excitação. Considera-se, também, que toda a energia absorvida é totalmente convertida em calor. O comportamento da temperatura na amostra é apresentado na Eq. 5.7 e 5.8.

O índice de refração $n(r, t)$ pode ser encontrado substituindo $\Delta T(r, t)$ da Eq. 5.7 na equação a seguir:

$$n(r, t) = n_0 - \frac{dn}{dT} \Delta T(r, t), \quad (5.9)$$

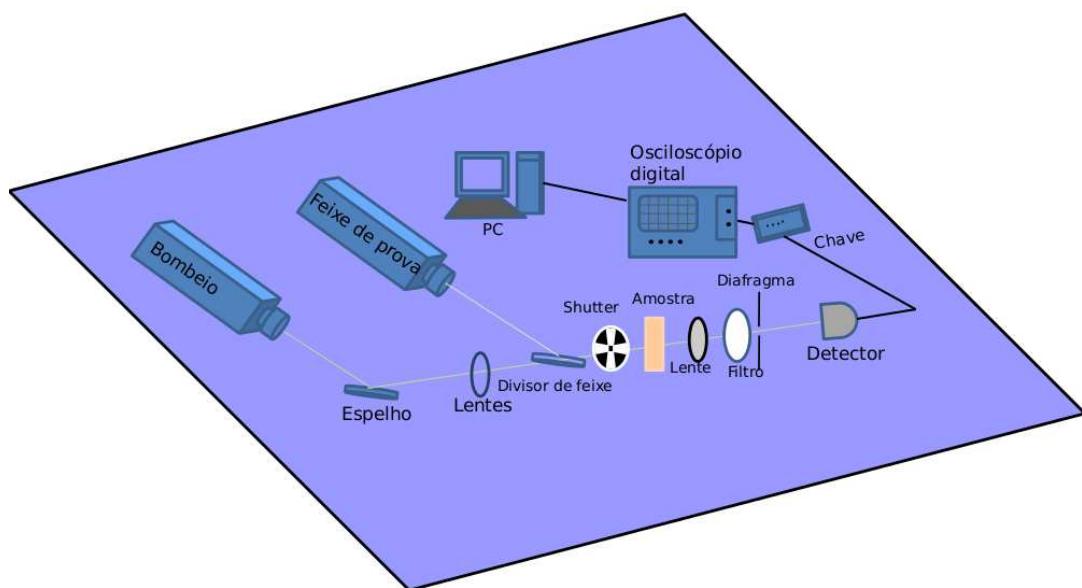
onde n_0 é o índice de refração do meio (normalmente ar) a uma temperatura inicial, dn/dT é a variação do índice de refração com a temperatura (K^{-1}) e ΔT é a variação de temperatura, dessa forma a amostra se comporta como um elemento óptico.

ii: Aparato experimental

O laser do equipamento foi utilizado como fonte de excitação na amostra e feixe de prova do sinal ELT. No experimento de lente térmica no modo descasado (utiliza-se um laser de prova com diâmetro na amostra maior do que o do laser de excitação) um feixe Gaussiano monomodo TEM_{oo} de onda contínua incide sobre uma amostra de baixa absorção, criando uma lente térmica. Outro feixe, com as mesmas características do primeiro, mas de intensidade

menor e colinear com este também incide sobre a amostra para monitorar a formação da lente térmica. A posição da cintura do feixe de prova é tomada como a origem ao longo do eixo z. A célula com a amostra de comprimento l é colocada em d_1 , e o plano do detector é posicionado em $d_1 + d_2$. Os raios dos feixes de prova e excitação na amostra são r e ω respectivamente. O aparato experimental é um espectrômetro de ELT de feixe único e está apresentado na Fig. 5.3.

Figura 5.3: Aparato experimental ELT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A principal vantagem da técnica ELT é a natureza não-destrutiva que permite a análise de objetos biológicos e biomateriais para aplicações médicas. A sensibilidade da ELT é de algumas ordens de grandeza superiores ($\sim 3\times$) às técnicas convencionais. A base da espectroscopia fototérmica é a alteração foto-induzida no estado térmico da amostra devido à absorção óptica por moléculas e, consequentemente os processos de relaxação não radiativos que resultam no aquecimento da amostra, que por sua vez modifica seu estado térmico.

A validade da técnica de lente térmica depende de alguns pressupostos: a) o feixe de laser é no modo TEM_{oo} de modo que a seção transversal do feixe é Gaussiana; b) o ponto do feixe

de laser permanece constante ao longo do comprimento da célula de amostra; c) a amostra é homogênea; d) a condução térmica é o principal mecanismo de transferência de calor e o aumento da temperatura produzida na amostra não induz convecção; e) mudança do índice de refração de calor da amostra com a temperatura; f) detecção do perfil de intensidade do feixe de laser é realizado no campo distante; e g) a resistência térmica da lente não é suficiente para induzir uma mudança no perfil do feixe no interior da amostra.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

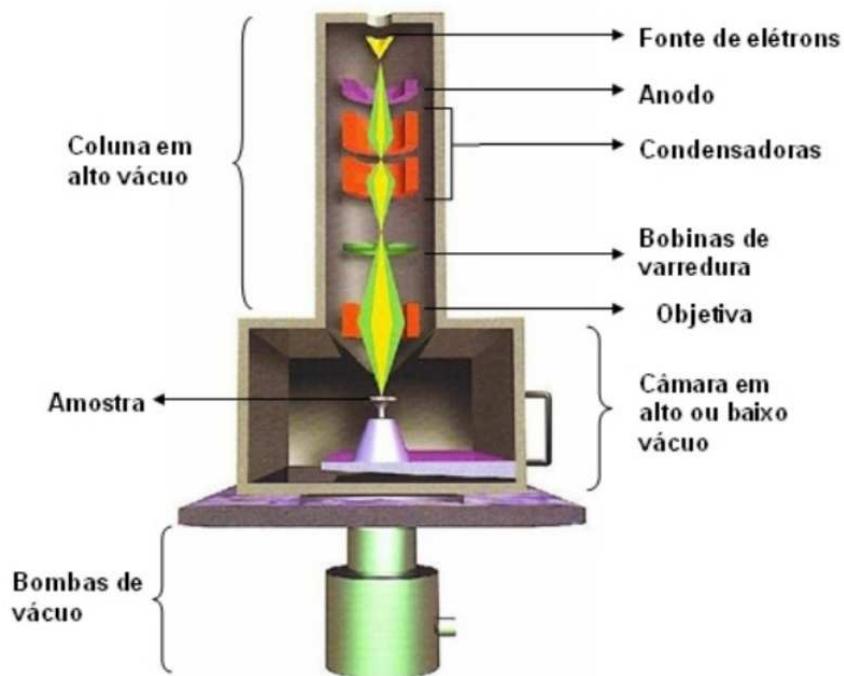
O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um instrumento frequentemente utilizado para análise de topografia da superfície, composição e propriedades de um determinado material. A resolução espacial é melhor do que a do microscópio óptico (aumento de 100 vezes), que estão limitados a um aumento máximo de 2000 vezes a superfície analisada. A aplicação do MEV é adequada para imagens topográficas devido a grande profundidade de foco, produzindo imagens de alta resolução e profundidade de campo da superfície de uma amostra. O primeiro instrumento MEV foi projetado por Stinzing e Knoll na Alemanha no início dos anos 30 [92].

Para aumentar o poder de resolução, utiliza-se radiação com comprimento de onda menor que o da luz visível como fonte de iluminação do objeto, sendo que a profundidade do campo é inversamente proporcional aos aumentos, significando que a superfície da amostra deve apresentar um grau de rugosidade pequeno, caso isso não ocorra é incompatível a formação da imagem. Sob alta voltagem, como 50 kV por exemplo, elétrons de comprimento de onda curtos podem produzir um alto poder de resolução como uma fonte de iluminação. Além disso, devido às cargas produzidas os elétrons são focalizados através de campos eletrostáticos e eletromagnéticos para assim formar as imagens. Os resultados dessas interações eletrônicas permitem aumento de 300.000 vezes para materiais sólidos conservando a profundidade e a observação na superfície da amostra. O poder de resolução das imagens no MEV é em torno de 2 – 5 nm.

i: Princípio de funcionamento

O princípio básico do funcionamento do MEV consiste em incidir sobre a amostra um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, varrendo a imagem em pequenas linhas. A fonte de elétrons gera o feixe que através das lentes condensadoras e objetivas controlam o diâmetro do feixe e o direciona até a amostra. Este feixe de elétrons gera diferentes tipos de sinais, os quais são emitidos a partir da área de interação e então esses sinais são detectados e a intensidade é amplificada, gerando o primeiro pixel. O feixe de elétrons, em seguida, move-se para a próxima posição na amostra e a intensidade detectada fornece a intensidade no segundo pixel e assim por diante. Logo após, a intensidade do sinal amplificado é transmitida para uma tela de visualização para formação da imagem, o desenho esquemático do MEV é apresentado na Fig. 5.4.

Figura 5.4: Desenho esquemático MEV.

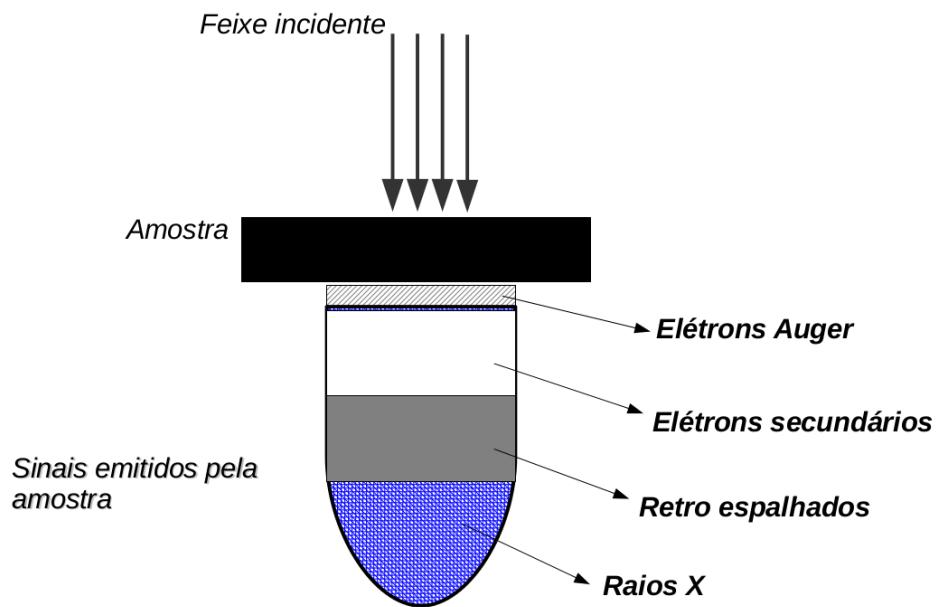


Fonte: fap.if.usp.br/ lff/mev. Acesso em: 28 maio 2016.

A resolução espacial (profundidade máxima de detecção), depende da energia que as partículas ou feixes atingem o detector. A imagem formada pode apresentar diferentes características dependendo do sinal que foi detectado. Os sinais comumente emitidos para obtenção da imagem são os elétrons secundários e os elétrons retro espalhados. A interação do feixe na amostra depende da tensão de aceleração do feixe de elétrons e da constituição atômica da amostra que serão utilizados para formar a imagem, por exemplo: elétrons Auger ($\sim KeV$), elétrons secundários ($< 50 eV$), elétrons retro espalhados ($\sim 50 eV$), raios X ($\sim 70 KeV$).

Um feixe de elétrons é acelerado em direção a amostra varrendo a superfície do material, iluminando áreas de $10 nm$ de diâmetro. O sinal recolhido é enviado ao detector que modula o brilho na tela catódica. A maioria dos instrumentos para produzir os feixes de elétrons utiliza elementos com alto número atômico como tungstênio (W), operando numa faixa de $1 a 50 kV$. O feixe acelerado pela alta tensão é focalizado por uma série de três lentes eletromagnéticas, o feixe coletado produz elétrons e fôtons que convertidos em sinal geram a imagem na tela. Os sinais emitidos pela amostra, podem ser visualizados na Fig. 5.5.

Figura 5.5: Diferentes tipos de sinais produzidos quando elétrons colidem com um material.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Da interação do feixe eletrônico com a amostra, os sinais produzidos de maior interesse para formação da imagem são os elétrons secundários e os elétrons retro espalhados. Os elétrons secundários possuem baixa energia ($0 - 50 \text{ eV}$) e formam imagens de alta resolução. O contraste da imagem é dado pelo relevo da amostra e são geradas apenas imagens de superfície.

Os elétrons retro espalhados são responsáveis pelo sinal recebido pelo detector, o sinal produzido por esses elétrons é resultante das interações ocorridas no interior da amostra procedente de uma região maior que o diâmetro do feixe incidente. A imagem gerada nos oferece a topografia do material e a composição química (pelo contraste em função dos números atômicos do material) [93].

Os elétrons secundários resultam da interação da amostra com o feixe eletrônico e fornecem imagens topográficas. Estes elétrons resultantes foram produzidos pelas interações elétron-átomo da amostra e, somente aqueles localizados na superfície poderão ser reemitidos.

Os elétrons retro espalhados fornecem a imagem característica de variação de composição. Os elétrons retro espalhados, com energia próxima à dos elétrons primários, são aqueles que sofreram espalhamento elástico, e são responsáveis por maior parte do sinal recebido. Os retro espalhados de alta energia (resultantes da colisão elástica), deriva de camadas mais superficiais da amostra. Assim, se somente os sinais dos elétrons retro espalhados forem captados, as informações de profundidade contidas na imagem serão insuficientes se comparadas com a profundidade de penetração do feixe. A imagem gerada fornece diferentes informações em relação ao contraste: imagem topográfica (função do relevo); imagem de composição (em função do número atômico dos elementos da amostra).

Os parâmetros que influenciam na resolução da imagem no MEV são: a tensão de aceleração dos elétrons, corrente de excitação do filamento de tungstênio e a distância entre a amostra e o feixe. Os elétrons secundários são as interações que possuem o melhor poder de resolução, sendo que a resolução varia com relação tensão do feixe emitido. O diâmetro do feixe vai depender da tensão de aceleração, número atômico da amostra e o ângulo de incidência com a superfície.

Para melhor desempenho da relação sinal-ruído na imagem, utiliza-se uma velocidade de varredura lenta. Isto significa que o feixe de elétrons permanece por um período mais longo a sobre a superfície da amostra, antes de passar para a próxima varredura, promovendo um alto sinal detectado e uma melhor relação sinal-ruído.

Vantagens de utilização do equipamento

A elevada profundidade de foco e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química.

Utiliza um feixe de elétrons como fonte de iluminação, facilita observar os aspectos morfológicos dos materiais, com grande aumento e boa resolução espacial. Os microscópios ópticos convencionais utilizam luz proveniente de uma lâmpada.

Apresenta alta resolução espacial, permitindo a determinação (qualitativa, semi quantitativa e quantitativa) da composição química elementar de partículas com diâmetro da ordem de poucos micrômetros ($2 \text{ } \mu\text{m}$ de diâmetro).

O material pode ser visualizado durante a análise, proporcionando a correlação entre a composição química e a morfologia da amostra.

O método analítico não é destrutivo, bem como a incidência do feixe não acarreta modificações na composição química da amostra, é de grande eficiência em relação ao tempo de análise da morfologia, tamanho da partícula e dosagem química.

O uso direto de computadores acoplados ao equipamento, juntamente com softwares, possibilita um emprego seguro e rápido da técnica.

As desvantagens estão relacionadas a análise das interfaces que ocorre apenas em plano horizontal e ao alto custo do equipamento.

5.3 Radiografia de alta resolução - DEI

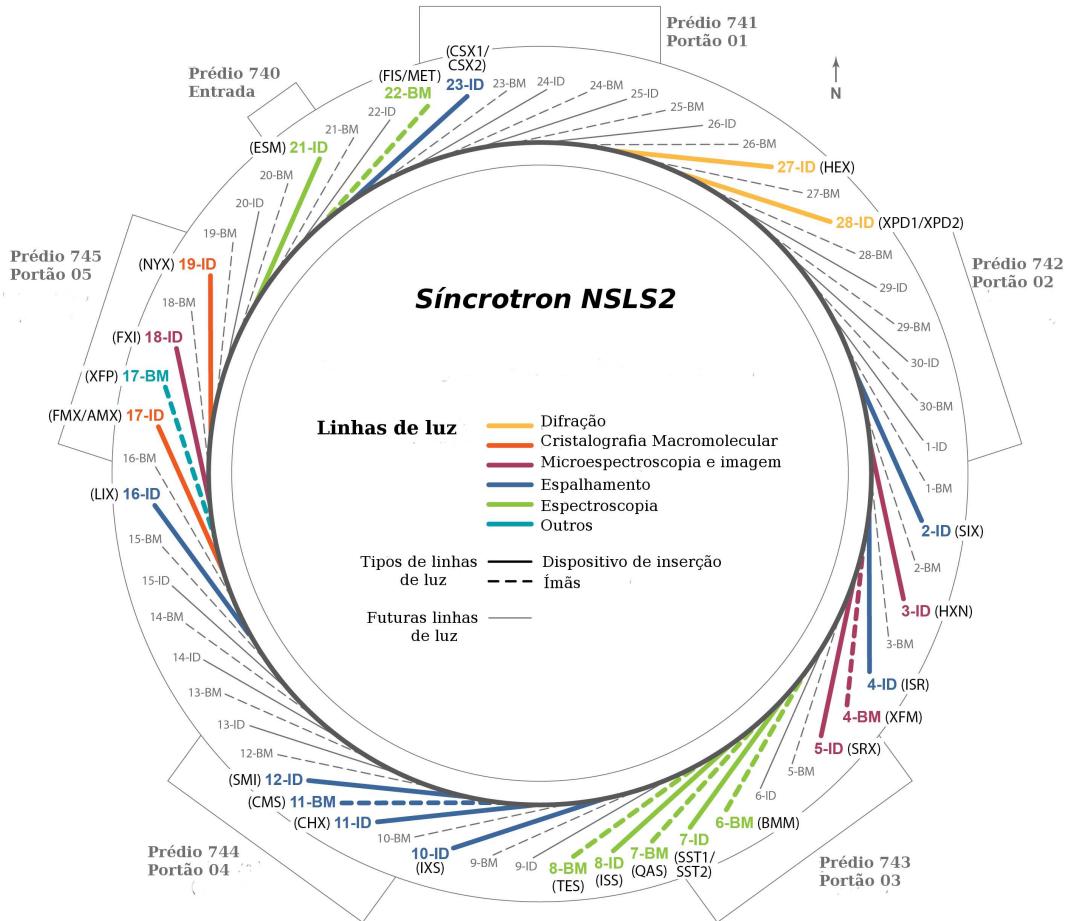
Radiografia de alta resolução ou DEI (*Diffraction enhanced imaging*) é um método utilizado para visualizar tecidos moles, a dificuldade de obter imagens dessas estruturas é devido ao coeficiente de absorção do raio X ser pequeno, esta técnica é conhecida como imagem de raios X de alta resolução. Trata-se de um método de contraste de fase que utiliza alta energia de raios X (com fraca absorção e pequeno dano), explorando a estreita aceitação angular das reflexões de Bragg de cristais perfeitos, geralmente de silício e recebe este nome devido à difração gerada pelo cristal [94–97].

DEI tradicionalmente utiliza radiação síncrotron, e é capaz de produzir imagens baseadas na independência de contraste dos mecanismos de refração, absorção e espalhamento devido às propriedades únicas da difração de raios-X em cristais perfeitos [98]. A técnica de processamento de imagens proporciona a remoção de artefatos devido a presença do cristal analisador gerando imagens únicas no radiodiagnóstico.

i: Luz Síncrotron

A radiação síncrotron é gerada através do movimento de partículas carregadas (elétrons ou pósitrons) em uma órbita circular, dentro de anéis de estocagem em alto vácuo, provocando a liberação de fótons. Os elétrons são então alimentados por um anel de reforço, viajando numa órbita fechada e curvada por ímãs sob influência de fortes campos magnéticos e direcionados a um anel principal de armazenamento. As diversas linhas de luz geradas pela fonte síncrotron são apresentadas na Fig. 5.6.

Figura 5.6: Síncrotron, NSLS2 Brookhaven National Laboratory.



Fonte: bnl.gov/ps/nsls2/beamlines/map.php. Acesso em: 28 maio 2016.

A geração de raios X começa com a injeção de elétrons direcionados ao acelerador linear, em que os mesmos são acelerados a uma velocidade próxima da luz, ou seja: $\sim 99,99986\% v_{luz}$. Quando os elétrons são defletidos em trajetórias curvas emitem radiação eletromagnética extremamente intensa, colimada, polarizada e com regiões do espectro abrangendo do infravermelho ($\sim m$) ao raio X (1 Å). A energia perdida pelos elétrons durante a emissão da radiação eletromagnética é restabelecida por um sistema sincronizado de radiofrequência que mantém os elétrons circulando no anel de armazenamento por um período de dezenas de horas. As linhas de luz são posicionadas tangencialmente ao anel de armazenamento e os feixes de raios X são guiados para uma caixa experimental, e podem ser utilizados conforme a necessidade dos experimentos [99].

Na Tab. 5.1 são listados os principais sincrotrons disponíveis no mundo [100].

Tabela 5.1: Principais sincrotrons no mundo.

Europa	
Elettra	Trieste, Italy
European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)	Grenoble, France
Estados Unidos	
Advanced Light Source (ALS)	Berkeley, California
Advanced Photon Source (APS)	Argonne, Illinois
National Synchrotron Light Source (NSLS)	Brookhaven, New York
Ásia	
Photon Factory	Tsukuba, Japan
Supor Photon Ring, 8 GeV (SPring8)	Nishi-Harima, Japan

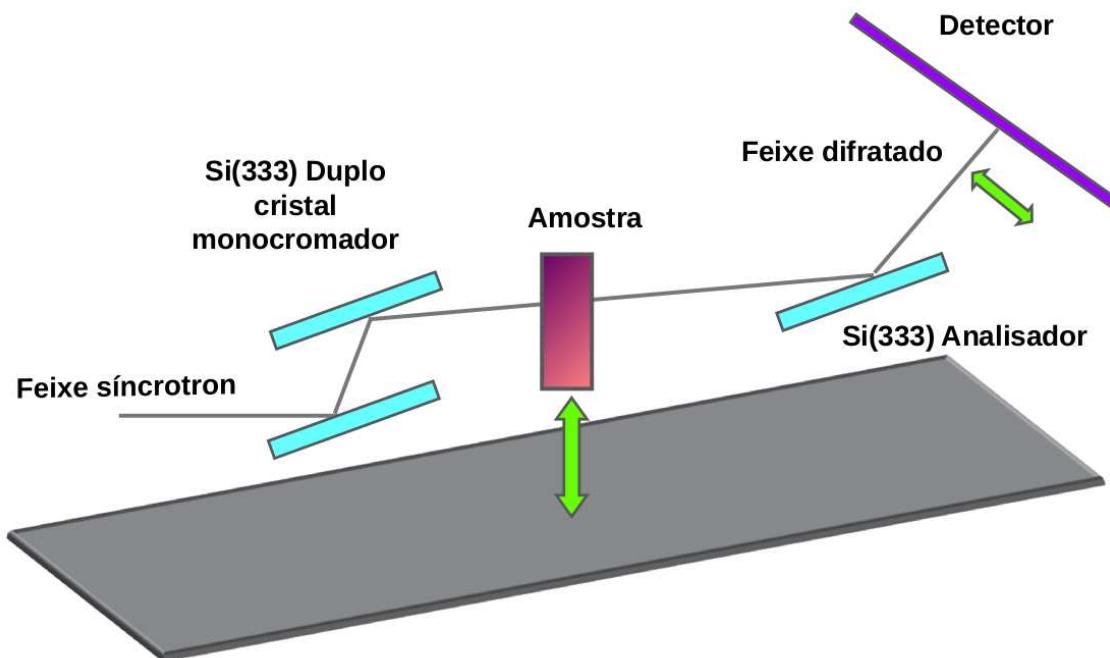
ii: Fundamentos da técnica DEI

A técnica DEI permite a obtenção de imagens por contraste de fase pelo arranjo de dois cristais em condição de difração. Nesse caso, a amostra é posicionada entre dois cristais de alta qualidade cristalina.

O cristal posicionado antes da amostra, denominado monocromador, tem como finalidade dar coerência difrativa e monocromatizar o feixe de raios X que incide na amostra. O cristal posicionado após a amostra (estreita fenda angular), denominado analisador, é responsável por filtrar seletivamente os raios difratados pela amostra.

Interferências destrutivas podem ocorrer com a alteração de intensidade, caso os raios numa mesma frente de onda estejam fora de fase com os feixes adjacentes devido aos efeitos de refração na amostra, mesmo que incidam dentro da condição de Bragg do cristal analisador. Caso estes raios sejam refratados fora da condição de difração, a sua refletividade torna-se próxima de zero o que faz com que eles não sejam difratados construtivamente o que também altera a intensidade. Um esquema do *setup* da técnica DEI é apresentado na Fig. 5.7.

Figura 5.7: *Setup* experimental da técnica DEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

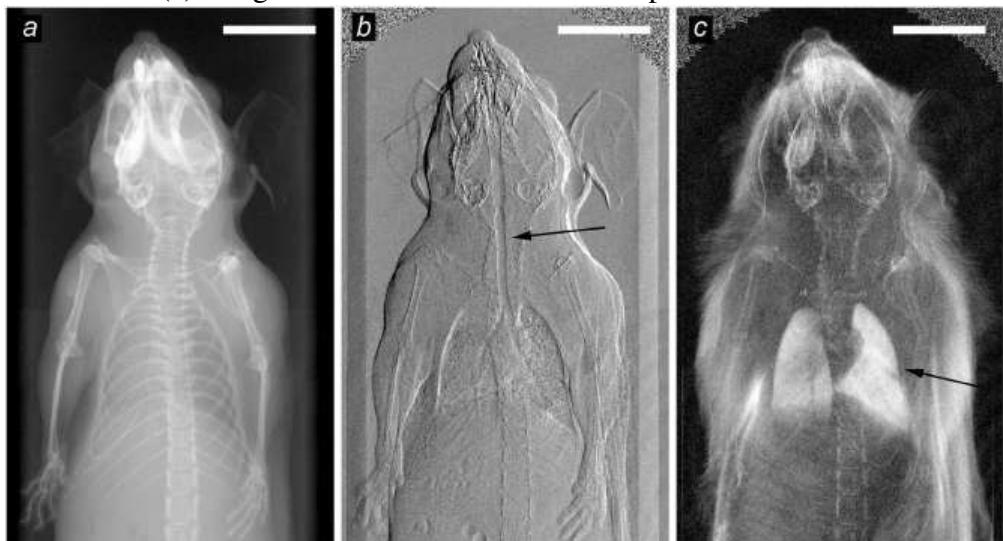
Os efeitos de difração no cristal analisador acarretam na formação do contraste, onde o cristal analisador possui uma refletividade característica, conhecida como *Rocking Curve* (ver apêndice B), que varia fortemente com o ângulo quando este varia poucos microradianos, a inclinação desta curva converte efetivamente a mudança de fase dos raios X e as mudanças angulares resultantes em variações de intensidade. O uso de diferentes reflexões de Bragg com diferentes gradientes da *rocking curve* permite que a sensibilidade da conversão fase-intensidade seja ajustada.

Imagens de raios X de alta resolução de um pulmão de camundongo

Em trabalhos publicados recentemente [101, 102], é possível visualizar o alto contraste das imagens fornecido pela técnica DEI.

Na Fig. 5.8, publicação de 2013, *Bech et al.* [101], é possível visualizar um conjunto de imagens de alto contraste produzidas por raios X adquiridas com sucesso de um camundongo *in vivo*, apresentando os três componentes da imagem adquirida, simultaneamente: imagem baseada na atenuação (Fig. 5.8a); na refração (Fig. 5.8b), e no espalhamento (Fig. 5.8c).

Figura 5.8: Primeira imagem de alto contraste produzida por raio X *in vivo* de um camundongo. (a) Imagem de raios X baseada na atenuação. (b) Imagem de contraste de fase baseada na refração de raios X. (c) Imagem de raios X com base no espalhamento.

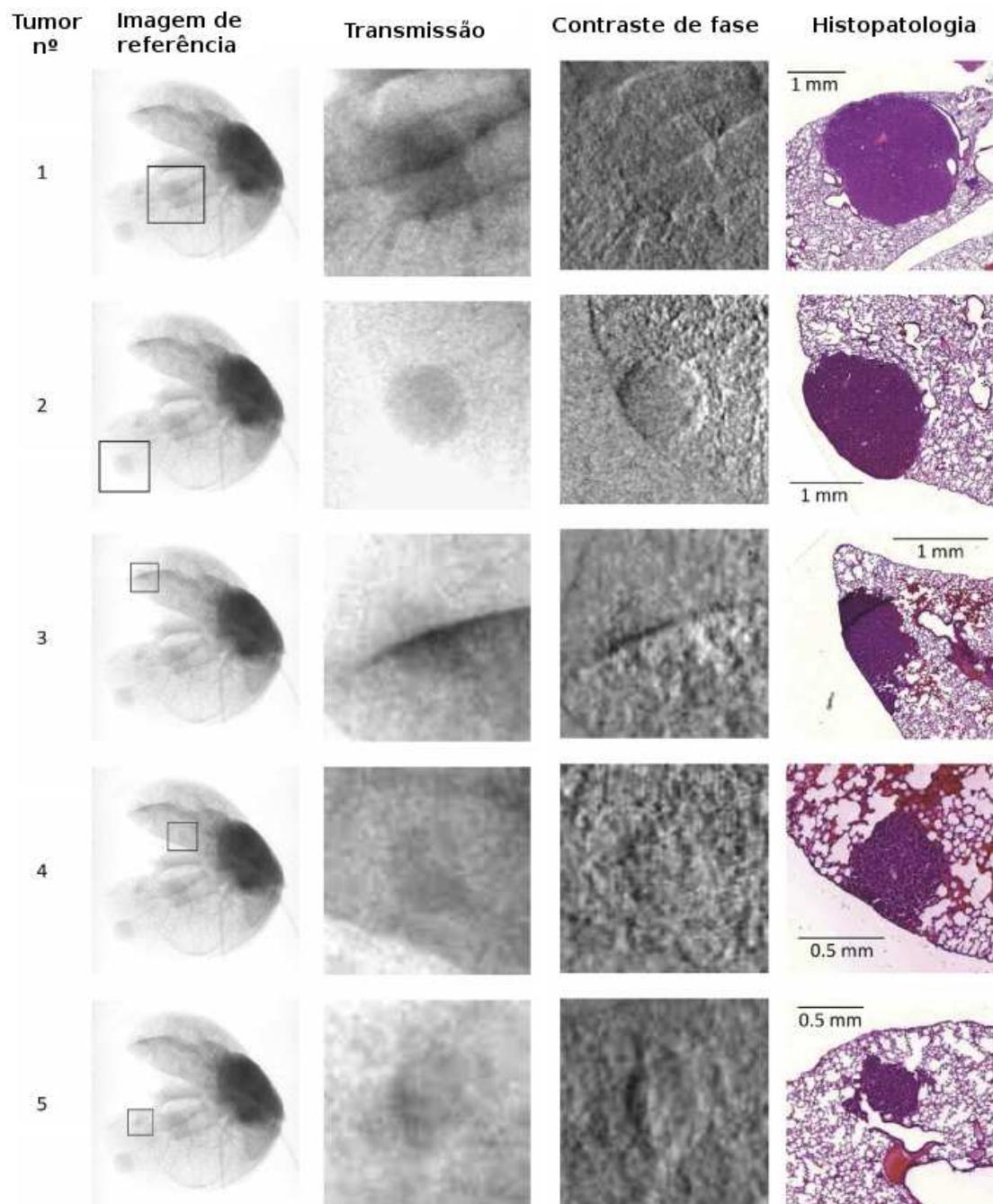


Fonte: M. Bech, 2013.

Todas as imagens registradas foram extraídas e gravadas a partir dos mesmos dados do equipamento de alto contraste. As regiões de aumento de contraste estão marcados com setas, mostrando a refração da traqueia (b), e o espalhamento dos pulmões (c). As barras correspondem a 1 cm [101].

A Fig. 5.9, numa publicação de 2013, Meinel *et al.*, apresenta uma imagem detalhada para tumores de pulmão de camundongo [102].

Figura 5.9: A localização de cada tumor pode ser identificada na imagem de transmissão e confirmado na histopatologia numa imagem ampliada, apresentando seu diâmetro máximo.



Fonte: Felix G. Meinel, 2014.

Cinco lesões são claramente visualizadas na imagem de transmissão, imagem equivalente à imagem de raios X convencional, com opacidade (áreas de diminuição da transmissão) e correspondem a tumores pulmonares em histopatologia, o tamanho do tumor médio foi de $1,8\text{ mm}$ (intervalo $0,6 - 2,8\text{ mm}$).

Nas imagens de contraste de fase, os tumores podem ser definidos pelo deslocamento de fase que ocorre nas bordas. Os tumores foram claramente visualizados (nº. 2, 3 e 5), enquanto que (nº. 1 e 4) foram fracamente visualizados nas imagens de contraste de fase.

A imagem de alto contraste de fase exibe um forte efeito na interface da borda entre o tumor e tecido pulmonar adjacente que pode ser confirmado na imagem histopatológica, portanto, essa técnica contribui para determinar o tamanho exato e as bordas de um nódulo pulmonar.

6 *Metodologia de preparação dos biomateriais poliméricos*

No presente trabalho, confeccionou-se diferentes estruturas de biomateriais poliméricos visando criar um *phantom* de pulmão de camundongo com características realísticas baseada na fisiologia deste órgão. Partiu-se de amostras de materiais poliméricos para tal simulação desenvolvendo um *phantom* baseado em uma blenda de quitosana e gelatina de custo acessível, com possibilidade de avaliação por métodos de imagens sem degradação aparente após irradiação.

De acordo com a definição estabelecida pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), blenda é uma mistura homogênea de diferentes (dois ou mais) tipos de polímeros, onde os constituintes dessa mistura são separáveis por processos físicos.

A produção do *phantom* pulmonar de camundongo consiste, basicamente, no cumprimento de duas etapas: traqueia e lobos. Os lobos serão representados por estruturas poliméricas e a traqueia será representada por uma endoprótese expansível na forma de um tubo perfurado conhecido como *stent* [103]. Em geral, *stents* são feitos de materiais metálicos, polímeros sintéticos ou biomateriais com diversas aplicações na biomedicina [104–106], dentre elas se destaca a inserção em um conduto do corpo para prevenir ou impedir a constrição do fluxo no local causado pela obstrução dos vasos.

Comparando as densidades e os coeficientes de atenuação de alguns biomateriais e tecidos equivalentes com os dados listados nas publicações da ICRU sobre as propriedades dos diversos órgãos, a escolha das matérias primas quitosana e gelatina é satisfatória para simular o tecido pulmonar [33, 39].

Na Tab. 6.1, visualizam-se as densidades (em temperatura ambiente) e coeficiente de atenuação mássico ($E = 40 \text{ KeV}$) de alguns materiais simuladores em comparação com o tecido corporal bem como o pulmão.

Tabela 6.1: Densidade e coeficiente de atenuação de acordo com a ICRU 44.

Material Simulador	Densidade (g/cm^3)	$/\rho(\text{m}^2.\text{kg}^{-1})$
Tecido adiposo	0,92	$2,40 \times 10^{-2}$
Pele	1,09	$2,62 \times 10^{-2}$
Água	0,99	$2,68 \times 10^{-2}$
Músculo	1,00 a 1,04	$2,69 \times 10^{-2}$
Resina epóxi	1,06 a 1,40	$2,65 \times 10^{-2}$
Pulmão	0,29	$2,70 \times 10^{-2}$
Espuma de poliuretano	0,30	$2,70 \times 10^{-2}$

Nesta seção serão apresentados os principais métodos de preparação envolvendo as matérias primas utilizadas. Esta síntese não pretende ser exaustiva, mas apenas caracterizar sumariamente cada um dos processos.

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram realizados diversos testes de otimização, tais como: métodos de filtragem, temperatura de secagem, condições de armazenamento, metodologia de preparação das soluções em diferentes proporções de quitosana/gelatina e recipientes para produção e armazenagem.

Posterior às determinações das soluções poliméricas empregadas, realizou-se a liofilização para validação dos resultados obtidos por métodos de imagens das estruturas produzidas e dimensionamento das mesmas.

6.1 Principais matérias primas

- **Quitosana - Ch:** em pó adquirida pela POLYMAR (Indústria e Com. Imp. e Exp. LTDA.) origem da casca do caranguejo; grau de desacetilação fornecido pelo fabricante de 86,6%; coloração característica tanto em pó quanto em solução, densidade de 0,15 – 0,3 g/cm³ e peso molecular médio (Mw) de $1,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$.
- **Gelatina - Gel:** em grânulos adquirida pela General Iron Fittings LTDA; apresentando viscosidade (12,5%) de 60 a mais de 220 mP e; consistência de geleia *bloom 200* e *bloom 500*. Possui aspecto sólido e coloração variando de amarelo claro a marrom, odor leve e característico, densidade de 1,27 g/cm³, solubilidade em água a temperatura de 45°C.
- **Ácido acético - Ac:** apresentado na forma líquida; fórmula molecular (CH_3COOH) com grau de pureza 99,7%, densidade de 1,05 g/cm³ e massa molecular (M) 60,05 g.mol⁻¹.

A designação *bloom* refere-se a quantificar a força do gel de gelatina, refletindo o peso molecular médio dos seus constituintes [107]. A força *bloom* influencia fortemente na estrutura atômica da gelatina e, portanto, em suas aplicações biomédicas e engenharia de tecidos. Quanto maior o *bloom* mais rígida a gelatina resultante, no caso deste trabalho foi utilizado dois tipos: *bloom 200* e *bloom 500*.

Conforme discutido no Cap. 4.3 a solubilidade da quitosana pode ser obtida a partir da dissolução em ácido acético e a gelatina (Cap. 4.5) é completamente solúvel em água.

Para o desenvolvimento *stent* confeccionou-se duas classes distintas de filmes: etapa I: quitosana e gelatina; etapa II: quitosana. Estas duas classes de filmes foram projetadas para avaliação da aplicabilidade como traqueia. Para simulação dos lobos pulmonares foram produzidas blendas de quitosana-gelatina na obtenção da estrutura desejada¹.

¹O procedimento experimental para o desenvolvimento dos filmes e das blendas foi realizado no laboratório GEM do InFis-UFU.

6.2 Preparação dos filmes

6.2.1 Procedimento experimental

Etapa I)- filme quitosana/gelatina

A primeira etapa para a confecção do *phantom* consiste em desenvolver filmes poliméricos com a finalidade de atuar como traqueia pulmonar, o *stent*. As matérias primas associadas foram avaliadas adequadamente no que se refere à preparação em diferentes proporções para a formação dos filmes quitosana/gelatina.

Materiais

Quitosana: Solubilizada em ácido acético 1% (v/v).

Gelatina: Tipo I - *bloom* 200 e *bloom* 500 solubilizada em água deionizada.

Glicerol: Agente plastificador - (nome IUPAC 1,2,3-propanotriol) obtido de Sigma-Aldrich com grau de pureza 99,5%.

Método

A primeira etapa do procedimento experimental, consiste na preparação das soluções de quitosana e gelatina. A solução de quitosana foi obtida da seguinte maneira: com um auxílio de um bêquer de 300 mL, misturou-se 1 g e 1,5 g (m/v) do pó de quitosana em 100 mL de ácido acético a 1% e mantido sob agitação magnética por 24 horas em capela sob temperatura ambiente.

A solução de gelatina foi preparada da seguinte maneira: com um auxílio de um bêquer de 300 mL, misturou-se 7,0 g dos grãos de gelatina em 100 mL de água deionizada, em outro bêquer de 300 mL misturou-se 7,5 g dos grãos de gelatina com 100 mL de água deionizada, mantendo as misturas em uma cuba ultrassônica numa temperatura de 45°C por um período de

8 horas. O glicerol foi adicionado às preparações 7,0% e 7,5% (m/v) de gelatina como agente plastificante, nas concentrações: 0,75% 1,5% e 3,0% (v/v).

Após o processo de dissolução das amostras, as mesmas foram acondicionadas em tubos cônicos e submetidas a centrifugação por 5 minutos numa rotação de 4000 rpm para que fosse realizado o processo de filtragem por agitação. Adicional a essa filtragem, outro processo também foi aplicado, utilizando papel filtro e um funil peneira fixada em um kitassato (sob sucção contínua) com uma bomba de vácuo acoplada.

Ao final desse procedimento, monitorou-se os valores de pH das soluções preparadas com o auxílio de um pHmetro Thermo Scientific ("Ultra glass combination pH electrode") obtendo os seguintes valores: $pH_{Ch} \simeq 3,61$, $pH_{gel} \simeq 6,23$ e $pH_{gly} \simeq 5,75$.

Os filmes foram elaborados de acordo com os valores especificados na Tab. 6.2 em proporções iguais e, para melhor compreender os resultados, foram separados em dois grupos: com e sem quitosana.

Tabela 6.2: Concentrações dos filmes produzidos.

Grupo 1	Grupo 2
Ch1,0% + Gel 7,5% Bloom 200	Gel 7,0% Bloom 200
Ch1,0% + Gel 7,5% Bloom 500	Gel 7,5% Bloom 200
Ch1,0% + Gel 7,5% Bloom 500 + Gly3,0%	Gel 7,5% Bloom 500
Ch1,5% + Gly1,5% 1:1	Gel 7,5% Bloom 500 + Gly 0,75%
Ch1,5% + Gel 7,5% Bloom 200	Gel 7,5% Bloom 500 + Gly 1,5%
Ch1,5% + Gel 7,5% Bloom 200 + Gly1,5%	Gel 7,5% Bloom 500 + Gly 3,0%

Após o preparo das soluções, as mesmas foram colocadas em placa de *Petri* cilíndricas com dimensões aproximadas de superfície ($\sim 1 \times 9\text{ cm}$) mantidas sob temperatura ambiente por 48 h para secagem e formação das películas apresentando espessura de $(46,00 \pm 0,01) \times 10^{-3}\text{ mm}$ (medida utilizando micrômetro analógico de 0-25 mm com precisão de $\pm 0,01\text{ mm}$, Starrett, Brasil). Na Fig. 6.1, visualiza-se a imagem do filme de quitosana/gelatina desenvolvido nesta etapa.

Figura 6.1: Filme de quitosana-gelatina.



A segunda etapa do procedimento experimental consiste na preparação de filmes constituídos apenas de quitosana.

Etapa II)- filme quitosana

Materiais

Quitosana: Quitosana 4,0% (m/v) dissolvida em ácido acético 2% (v/v).

PBS: Solução tampão fosfato salino, pH= 7,0.

Solução de NaOH.

Método

Para confecção do filme de quitosana, em um bêquer de 300 mL dissolveu-se 4,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a 2% permanecendo sob agitação por 48 h para preparação dos filmes. É relevante considerar a dissolução da quitosana em ácido acético a 2%, visto que a quantidade de soluto foi alterada de 1,5 g para 4,0 g.

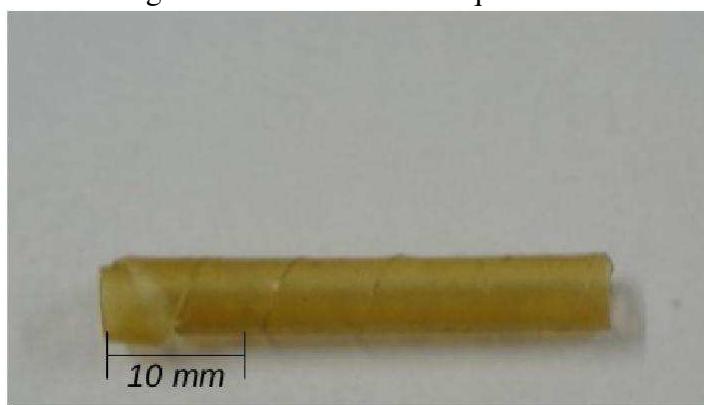
Logo após o processo de dissolução, as mesmas foram acondicionadas em tubos cônicos e submetidas a centrifugação por 8 minutos numa rotação de 4000 rpm para que fosse realizado o

processo de filtragem por agitação. Adicional a essa filtragem, outro processo também foi aplicado, utilizando papel filtro e um funil peneira fixo em um kitassato (sob sucção contínua) com uma bomba de vácuo acoplada. Posteriormente monitorou-se os valores de pH ($pH_{Ch} \simeq 4,03$; $T=18^\circ\text{C}$).

As amostras selecionadas foram dispostas em placas acrílicas de *Petri* (espessura $\sim 4\text{ mm}$) para a formação dos filmes, permanecendo em temperatura ambiente por 3 dias para secagem. Os filmes foram retirados da placa e foram imersos em solução de NaOH por 15 min e, posteriormente, lavados por diversas vezes na solução tampão (PBS, pH=7,0) para neutralização do pH.

Concluído o processo de neutralização e após estiramento, os filmes foram cortados em tiras retangulares ($0,5 \times 4\text{ cm}$ e espessura $\sim 1\text{ mm}$) e enrolados num cilindro metálico ($d = 4\text{ mm}$) revestido por uma fina camada de solução de quitosana para prevenir a expansão abrupta da estrutura. Posteriormente foi produzido o *stent*, conforme visualizado na Fig. 6.2.

Figura 6.2: *Stent* a base de quitosana.



Importante ressaltar que as diferentes preparações (em proporção e concentração) foram otimizadas em cada etapa para adequadamente desenvolver o filme para aplicação como *phantom*.

Os filmes desenvolvidos a partir dos biomateriais quitosana e gelatina (etapa I) não se mostraram adequados como molde para traqueia uma vez que não foi possível adequar a estrutura dos filmes na forma cilíndrica, pois resultaram em filmes quebradiços. As preparações que

continham o glicerol também não foram adequadas para aplicação pois ao modular o filme na estrutura cilíndrica, após estiramento, não foi possível desenformar o mesmo. Os filmes confeccionados utilizando gelatina *bloom 500* foram inadequados pois resultaram em filmes muito rígidos.

O filme de quitosana (etapa II) mostrou-se satisfatório para aplicação como simulador da traqueia pois foi possível modular o filme na forma cilíndrica sendo permitindo sua retirada sem qualquer alteração estrutural significativa.

6.3 Preparação das estruturas quitosana-gelatina

A quitosana possui habilidade de interagir e/ou reagir com diversos compostos apresentando características funcionais mais específicas e/ou melhoradas. A escolha de blendas quitosana-gelatina é satisfatória devido à biocompatibilidade entre esses polímeros [108]. A utilização de gelatina melhora a absorção de água e conduz à excelentes propriedades biológicas, tais como: melhor afinidade celular e cicatrização de feridas, propicia um material elástico e macio, melhora a atividade antibacteriana e também as propriedades de estabilidade física e química do material devido a reticulação por ligações covalentes [109–112].

Diante das inúmeras vantagens apresentadas, a blenda quitosana-gelatina, torna-se uma potencial aplicação para a confecção dos lobos pulmonares do *phantom* de camundongo proposto.

6.3.1 Procedimento experimental

Materiais

Quitosana: Solubilizada em ácido acético 1%.

Gelatina: Tipo I - *bloom 200* solubilizada em água deionizada.

Hidroxiapatita (HA): 2g fosfato de cálcio cristalino ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) dimensão de 20 μm .

Método

O processo de preparação é análogo ao apresentado na preparação dos filmes, difere apenas das concentrações. Diluiu-se 2 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a 1% sob agitação magnética por 24 h. Separadamente, dissolveu-se 7 g de gelatina em 100 mL de água deionizada, sob agitação a 45°C por 8 h. Seguido ao processo de dissolução, as amostras foram submetidas a processos de filtragem.

O pH foi monitorado, obtendo os seguintes valores: $\text{pH}_{Ch} \simeq 3,6$ e $\text{pH}_{gel} \simeq 6,23$.

Após a análise do pH as amostras foram divididas em 4 grupos com diferentes proporções de quitosana/gelatina e a densidade da solução foi avaliada conforme os dados apresentados na Tab. 6.3:

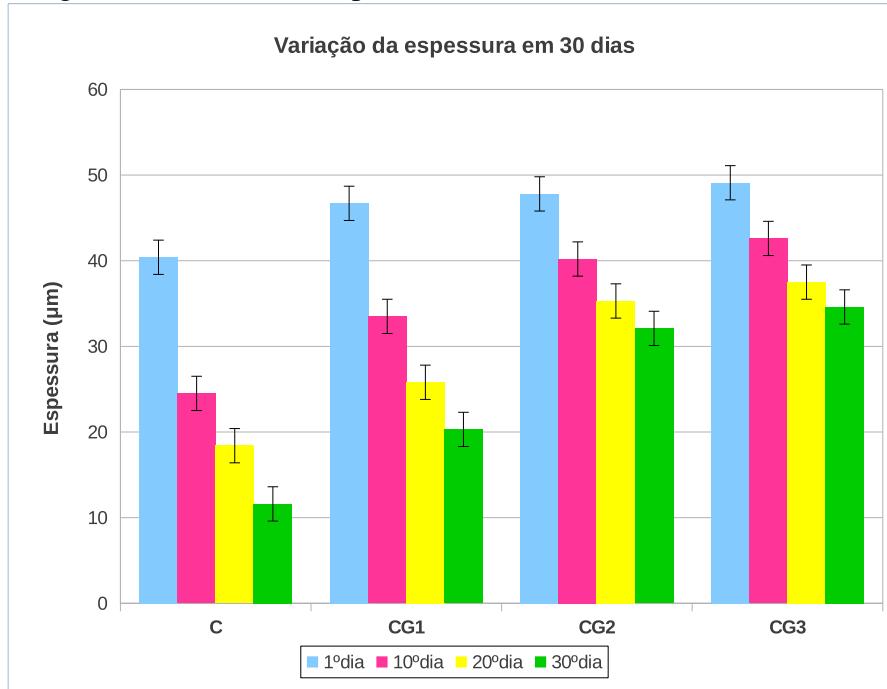
Tabela 6.3: Proporções e densidade de quitosana/gelatina para solução de 100 mL.

Grupos	Quitosana (mL)	Gelatina (mL)	Ch:Gel	$\rho(g/cm^3)$
C	100	0	1 : 0	0,979
CG1	75	25	3 : 1	0,986
CG2	50	50	1 : 1	0,992
CG3	25	75	1 : 3	0,998

Com o auxílio de uma pipeta graduada, os volumes indicados na Tab. 6.3 foram devidamente colocados em placas de *Petri* acrílicas de 100 mL e, após secagem em temperatura ambiente, os filmes passaram pelo processo de neutralização no qual foi imerso em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% por 10 min. em seguida, lavado com água deionizada por mais 10 min. e por fim, o filme foi imerso em solução tampão fosfato salino (*PBS-Phosphated Buffered Saline*, pH= 7,0) por mais 10 min. Este processo é realizado tantas vezes quantas forem necessárias para neutralização do pH.

A espessura das amostras foi monitorada por um período de 30 dias sob temperatura ambiente, conforme apresentado na Fig. 6.3.

Figura 6.3: Análise da espessura dos filmes: C, CG1, CG2 e CG3.



A análise da variação da espessura das amostras contribui para a verificação da estabilidade do filme produzido. A redução da espessura do filme de quitosana é mais acentuada em comparação aos outros filmes analisados. Neste caso, a redução da espessura do grupo quitosana foi de 71,29%, conforme previsto na literatura [48, 59].

Os filmes formados que possuem gelatina apresentaram uma redução menos acentuada que a quitosana, pois a gelatina tem a capacidade de absorver até cinco vezes mais água que qualquer composto presente em seu meio [112]. Notou-se que quanto maior a concentração da gelatina, menor a redução da espessura do filme, dessa forma os valores da redução de espessura nos grupos são: CG1 - redução de 56,53%, CG2 - redução de 32,84% e o CG3 - redução de 29,53%. Após 30 dias de análises as espessuras dos filmes mantiveram-se estáveis.

Paralelo a esta etapa, 2 g de partículas de hidroxiapatita (dimensão 20 μm) foram incorporadas às preparações (Tab. 6.3) quando as mesmas foram dispostas em placas acrílicas (anterior ao processo de liofilização), com a finalidade de simular formações nodulares (calcificações), que possam ser visualizadas em técnicas de imagens. As imagens serão analisadas posteriormente no Cap. 7.4.

Com a finalidade de confeccionar estruturas para reproduzir o lobo pulmonar, as soluções preparadas foram dispostas em placas cilíndricas (acrílicas), com um conjunto de moldes cilíndricos (volume aproximado 6 mL) e, logo após, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização. O processo de liofilização é comumente utilizado para preservação dos tecidos biológicos pois impede a proliferação de micro organismos.

Liofilização

Liofilização é um processo de secagem que constitui na remoção de água através da sublimação (processo de desidratação onde a água é retirada sem que passe pelo estado líquido), esse processo pode acarretar numa redução da espessura da amostra ($\sim 30\%$) e, desse modo, o uso de soluções para produção de biomateriais permite uma estimativa mais coerente em função do volume esperado ou projetado. Ocorre quando todo o conteúdo de água da substância está na forma de gelo, sendo submetido a condições de pressões muito baixas, através de bombas de alto vácuo para secagem a frio por um período de 24 a 48 horas, criando um ambiente favorável para que ocorra a sublimação da água [113].

Etapas da liofilização:

I)- Congelamento prévio; que pode ser realizado a parte, a fim de transformar as soluções aquosas em uma mistura de duas fases: uma constituída por cristais de gelo e a outra pela solução concentrada de soluto. A formação dos poros dependerá do tamanho dos cristais de gelo formados, se houver a formação de grandes cristais de gelo tem-se um boa estrutura porosa que facilitará o escape de vapor d'água durante a liofilização.

II)- Desidratação; sob baixas pressões e temperaturas. Nesta etapa, a água é removida por sublimação e com adição de calor. Quando as moléculas passam do estado sólido ao gasoso, parte do calor latente é consumida e então a temperatura do sistema diminui, dessa forma, faz-se necessário fornecer mais calor ao produto. Ao final da desidratação a temperatura do produto aproxima-se da temperatura ambiente. Placas de um condensador fornecem uma superfície, que deve estar mais fria que a temperatura do material, para que o vapor se solidifique e migre ao

coletor. A temperatura para esta captação é em torno de T=-40°C.

III)- Secagem; ocorre logo após a eliminação de todo gelo mas o material ainda continua retendo certa quantidade de água líquida. Assim, o produto deve permanecer no liofilizador sob vácuo por aproximadamente 2 a 6 horas e aquecido a temperatura de 20°C a 60°C e, assim, ocorre a evaporação dessa água residual.

Equipamento:

O equipamento é constituído pelos componentes: câmara de alto vácuo, fonte de calor, placas condensadoras e bomba de vácuo.

A câmara de vácuo é onde o material fica localizado, tem o objetivo de diminuir a pressão para que não ocorra fusão do gelo. A fonte de calor tem a finalidade de fornecer calor latente de sublimação. O condensador é formado por serpentinas de refrigeração, responsável pela execução da sublimação inversa (transforma o vapor em gelo), esta parte do equipamento é adaptada com dispositivos automáticos de descongelamento para manter a serpentina livre e aumentar a eficiência do processo. A bomba de vácuo é designada a remover os vapores não condensáveis.

Processo de secagem a baixa temperatura: as amostras dos grupos C, CG1, CG2 e CG3 foram mantidas sob refrigeração a -4°C por 12 h para congelamento prévio. Após o congelamento, essas placas passaram pelo processo de liofilização a vácuo (equipamento LabComo Triad) para secagem a frio -20°C por um período de 24 h, resultando em estruturas tridimensionais (Fig. 6.4).

Figura 6.4: Estruturas tridimensionais liofilizadas.



A Fig. 6.4 apresenta imagens das estruturas confeccionadas referentes aos grupos: C, CG1, CG2 e CG3, concluído o processo de secagem a vácuo. Posterior ao processo de liofilização a densidade ($\rho = m/V$) dos grupos poliméricos foi determinada levando em consideração o formato cilíndrico das amostras resultantes, conforme apresentado na Tab. 6.4.

Tabela 6.4: Massa e densidade das estruturas liofilizadas.

Grupos (Ch:Gel)	Massa ($\pm 0,0001$ g)	ρ (g/cm^3)
C (1 : 0)	0,0599	0,0839
CG1 (3 : 1)	0,0625	0,047
CG2 (1 : 1)	0,0725	0,014
CG3 (1 : 3)	0,0850	0,13

A imagem na Fig. 6.5 apresenta o biomaterial liofilizado referente ao grupo CG1 (Tab. 6.3) na proporção 3:1 (quitosana:gelatina).

Figura 6.5: Biomaterial quitosana-gelatina liofilizado, grupo CG1.



As amostras dos grupos C, CG1, CG2 e CG3 confeccionadas utilizando o método de liofilização apresentaram potencial aplicação como lobos pulmonares, uma vez que o método proporcionou a obtenção de estruturas porosas. Análises de imagens das estruturas desenvolvidas serão realizadas posteriormente para a devida escolha do grupo a ser utilizado como simulador do lobo pulmonar de camundongo.

7 *Resultados experimentais e discussões*

Realizados os processos de preparação das amostras para aplicação como *phantom* conforme descrito no Cap. 6, os filmes e as estruturas produzidas foram submetidas a análises por técnicas físicas utilizando espectroscopia de lente térmica, microscopia eletrônica de varredura e radiografia de alta resolução. Os resultados e discussões serão apresentados a seguir.

7.1 Análise pela técnica de espectroscopia de lente térmica

7.1.1 Filmes quitosana/gelatina

A difusividade térmica dos biomateriais, foi analisada a partir da produção de filmes bicomadas (quitosana e gelatina), com o objetivo de investigar a condução de calor no regime não estacionário. A técnica ELT foi configurada experimentalmente¹ no modo descasado utilizando laser de comprimento de onda $\lambda = 457 \text{ nm}$.

Os filmes analisados foram confeccionados em diferentes proporções e concentrações (procedimento descrito no Cap. 6.2.1): quitosana (1,0% m/v e 1,5% m/v) em ácido acético (1% v/v) e gelatina (7,0% e 7,5% m/v) *bloom* 200 e 500. O glicerol foi adicionado como agente plastificador em três diferentes concentrações (0,75% 1,5% e 3,0% v/v), conforme disposição apresentada na Tab. 6.2.

¹As medidas experimentais de ELT foram realizadas no laboratório do InFis-UFU, sob responsabilidade do Prof. Dr. Acácio A. Andrade

O efeito de LT tem como princípio a variação no índice de refração com a temperatura. A curva característica da lente térmica depende do sinal de dn/dT (variação do índice de refração em função da temperatura). Quando dn/dT for negativo, a lente térmica resultante será côncava provocando divergência do feixe do laser, dessa forma a curva apresentará concavidade positiva. Para dn/dT positivo, a lente térmica formada será convexa e provocará e a curva apresentará concavidade negativa. O sinal LT depende do meio, do comprimento de onda do laser de prova e da temperatura.

A curva transiente é obtida utilizando a Eq. 7.1 que descreve a evolução temporal do sinal de lente térmica no detector $I(t)$. $I(0)$ é o valor antes da formação da LT, θ é a diferença de fase (aproximadamente) termicamente induzida do feixe de prova após passar pela amostra e t_c é o tempo característico de formação da LT. A Eq. 7.1 é utilizada para ajustar os dados experimentais de LT na configuração descasada onde é possível determinando os parâmetros θ e t_c relacionados com as propriedades ópticas e térmicas da amostra. Quando $\theta = 0$ não há sinal de lente térmica no plano de detector.

$$I(t) = I(0)[1 - (\theta/2)\tan^{-1}(2mV[((1+2m)^2 + V^2)(t_c/2t) + 1 + 2m + V^2]^{-1})]^2 \quad (7.1)$$

onde

$$m = \left(\frac{r}{\omega}\right)^2 \quad e \quad V = \frac{d_1}{d_c}$$

sendo: r = raio do feixe de prova, ω =raio do feixe de excitação, d_1 =posição relativa à cintura do laser de excitação e d_c =distância confocal do laser de prova, conforme descritos no Cap. 5.1.

Os gráficos nas Fig. 7.1, Fig. 7.2 e Fig. 7.3 apresentam a curva transiente obtida para os diferentes filmes: Gel 7,0% *bloom* 200, Gel 7,5% *bloom* 200, Gel 7,5% Ch1,5% *bloom* 200, respectivamente.

Figura 7.1: Sinal de LT para gelatina 7,0% bloom 200.

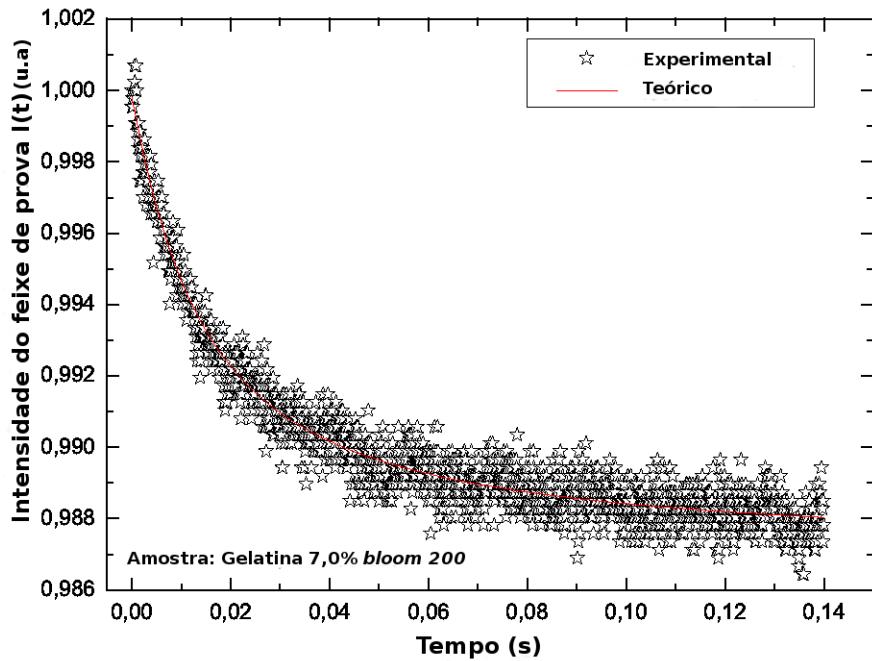


Figura 7.2: Sinal de LT para gelatina 7,5% bloom 200.

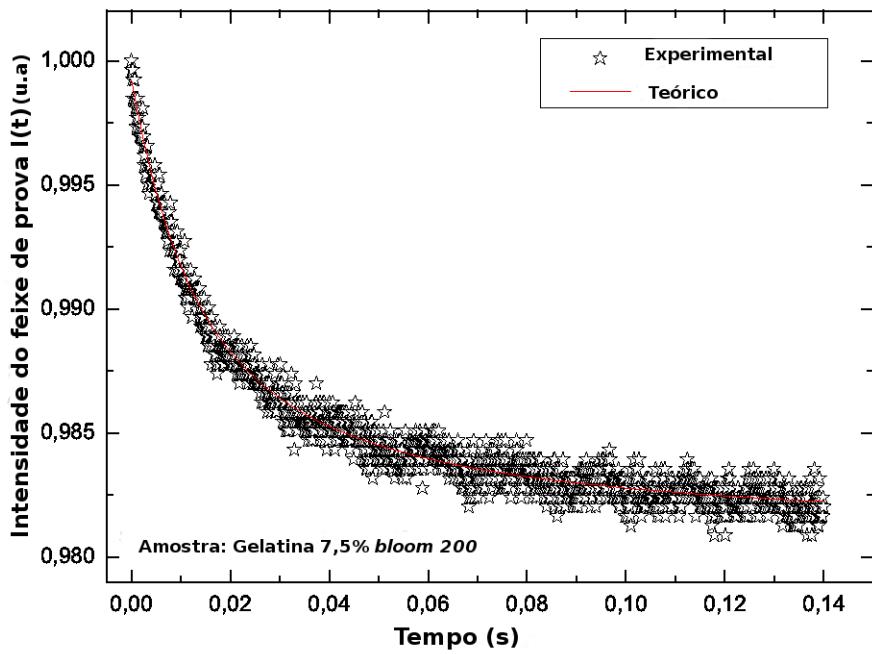
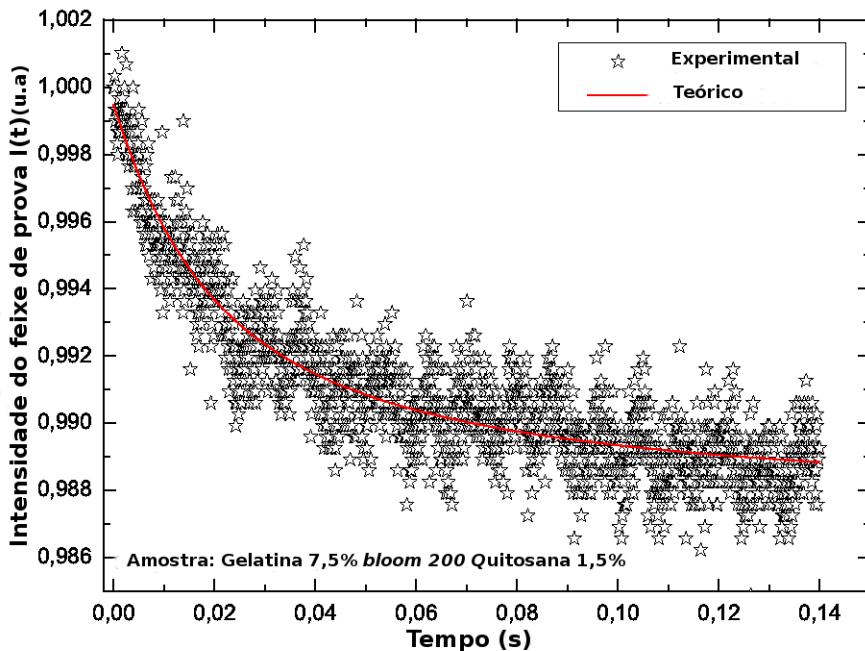


Figura 7.3: Sinal de LT para gelatina 7,5% *bloom* 200 + quitosana 1,5%.



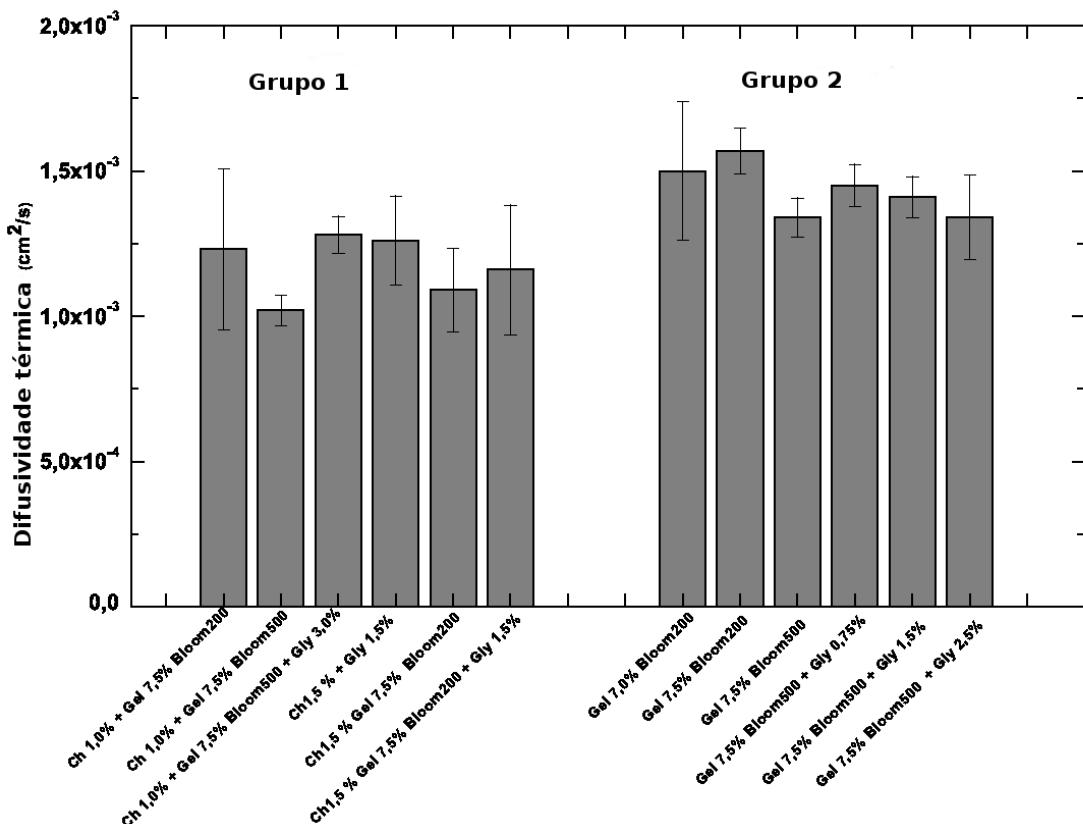
Os sinais de LT apresentados nas Fig. 7.1, Fig. 7.2 e Fig. 7.3 foram todos normalizados pelo valor inicial da intensidade $I(0)$. A normalização das curvas LT é um procedimento importante pois pode eliminar possíveis flutuações do laser permitindo uma melhor comparação entre as curvas obtidas já que todas começam de um mesmo ponto. O valor de t_c e θ são obtidos a partir do ajuste teórico da Eq. 7.1, ou seja, $t_c = 10,34 \pm 0,16\text{ ms}$ e $\theta = 0,22$. Sabendo que o raio da cintura do feixe de excitação é $\omega = 6,50 \times 10^{-3}\text{ cm}$ obtém-se o valor da difusividade térmica dos filmes utilizando a Eq. 5.8. Dessa forma, o valor da difusividade térmica corresponde a $D = 1,25 \pm 0,03 \times 10^{-3}\text{ cm}^2/\text{s}$ que está em conformidade com medidas reportadas na literatura [114, 115], conforme apresentado na Tab. 7.1.

Tabela 7.1: Valores de difusividade térmica disponíveis na literatura e obtido neste trabalho*.

Material/tecido	Difusividade ($\times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{s}$)
Gelatina <i>bloom</i> 125	1,44±0,04
Gelatina <i>bloom</i> 175	1,47±0,04
Gelatina <i>bloom</i> 250	1,43±0,03
Cérebro	1,38
Mama	7,28
Gordura	0,771
Músculo	1,48
Pulmão humano	1,192
Pulmão suíno	0,69
Pulmão coelho	1,071
Quitosana-Gelatina	1,25±0,03*

*Valor obtido neste trabalho para os filmes de quitosana-gelatina.

O gráfico na Fig. 7.4 apresenta os valores da difusividade dos filmes a base de quitosana (1,0% e 1,5%), gelatina (7,0% e 7,5%) *bloom* 200 e 500 e glicerol (0,75%, 1,5% e 2,5%), em função das diferentes concentrações e proporções.

Figura 7.4: Difusividade térmica *versus* diferentes concentrações das amostras.

O parâmetro da difusividade térmica é uma importante propriedade para análise do comportamento de materiais em resposta a variações térmicas em sua estrutura pois expressa o quanto rapidamente o corpo se ajusta à nova temperatura. A compreensão dos mecanismos de transferência de calor dos materiais requer o conhecimento das propriedades termo-físicas (condutividade térmica, difusividade térmica e calor específico) dos biomateriais confeccionados [88, 116].

A técnica ELT permitiu a obtenção dos valores precisos da difusividade térmica de materiais transparentes em temperatura ambiente. Materiais com alto valor de difusividade térmica respondem rapidamente a mudanças térmicas, enquanto materiais com baixo valor respondem mais lentamente demorando a alcançar um novo estado de equilíbrio [117].

Neste trabalho optou-se pela determinação da difusividade térmica por espectroscopia de lente térmica por permitir esta análise sem alteração do filme produzido na forma com que foi confeccionado não sendo necessário qualquer ajuste na preparação dos mesmos. Pela análise dos resultados, não houve alteração significativa do parâmetro da difusividade nos filmes a base de quitosana e gelatina no que diz respeito a diferentes concentrações e proporções, quando associada a diferentes valores de *bloom* (grau de rigidez) e até mesmo quando na presença de glicerol.

7.2 Análise pela técnica MEV

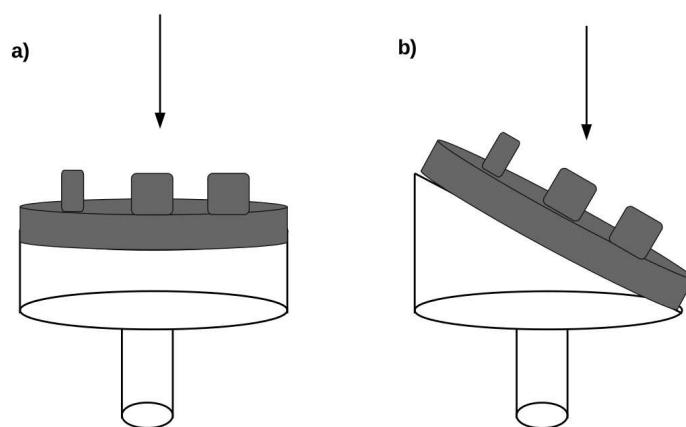
Para análise das imagens obtidas por MEV², utilizou-se o equipamento Jeol JSM-T330A *Scanning Microscope Eletronic* (Japão) operando com feixe de elétrons na faixa 0,5 – 30 kV.

Realizou-se dois tipos de análise: uma imagem de superfície e outra de corte transversal. As micrografias obtidas por MEV mostram diferentes tipos de estrutura de biomateriais com heterogeneidade para distintas escalas de comprimento.

A visualização das imagens no MEV é favorecida ao analisar amostras liofilizadas visto que a técnica de liofilização torna a amostra menos suscetível ao acúmulo de cargas na superfície (baixa condutividade) pois utiliza um sistema com baixo vácuo.

Para análise das amostras no microscópio eletrônico de varredura não foi necessário qualquer preparação de recobrimento da amostra. As estruturas tridimensionais confeccionadas foram posicionadas no porta amostra em estágios de 0 e 45° utilizando fita de carbono conforme indicado na figura 7.5.

Figura 7.5: Estágios de posicionamento da amostra no MEV: a) 0 e b) 45°.



Fonte: Elaborada pelo autor.

²As medidas foram realizadas no Centro de Lasers e Aplicações IPEN/CNEN na Universidade de São Paulo (USP-SP).

7.2.1 Metodologia para cálculo do diâmetro médio dos poros

Os parâmetros quantitativos representativos da morfologia são densidade media de poros por área e distribuição do tamanho dos poros, que tanto pode relacionar a área como o diâmetro, os diâmetros máximos, mínimos e médio de cada poro e a porosidade superficial.

Para a determinação do diâmetro dos poros e análise morfológica utilizaram-se as micrografias obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura. As imagens foram geradas com aumento de 50x, 100x, 200x, 250x, 400x e 500x.

No presente trabalho foi aplicado um método de processamento de imagem para analisar as imagens MEV das amostras liofilizadas, a fim de medir o diâmetro médios dos poros [118].

O processamento de imagem digital proporciona informações quantitativas, tais como: diâmetro médio dos poros e análise da distribuição dos diâmetros ao longo da seção transversal. As dimensões dos poros, como aparecem nas imagens de MEV, foram determinadas através do processamento das imagens utilizando o programa *ImageJ*.

O primeiro passo para a análise da micrografia pelo *ImageJ* refere-se a realização do procedimento de calibração. Para essa etapa usa-se a ferramenta *Straight*. Define-se então, uma linha do tamanho da barra existente na imagem e posteriormente na opção *Analyze* da barra de ferramentas faz-se uso da ferramenta *Set Scale* e então pode-se incluir o tamanho da barra e a unidade de medida indicada na micrografia.

Etapas de análise das imagens

Cada imagem é composta por vários pixels, cada um com uma tonalidade de cinza diferente que pode variar de zero até 255, no caso um *pixel* branco. Escolher o tom de cinza para o corte e posterior transformação num padrão binário corresponde à primeira etapa de tratamento de imagem. Neste caso, a imagem resultante após a realização do *Threshold* será apenas preto e branco. A ideia é ajustar a tonalidade cinza para a representação adequada dos poros, de forma que apenas os poros sejam identificados.

Posterior a transformação em sistema binário a quantificação dos poros e de suas áreas

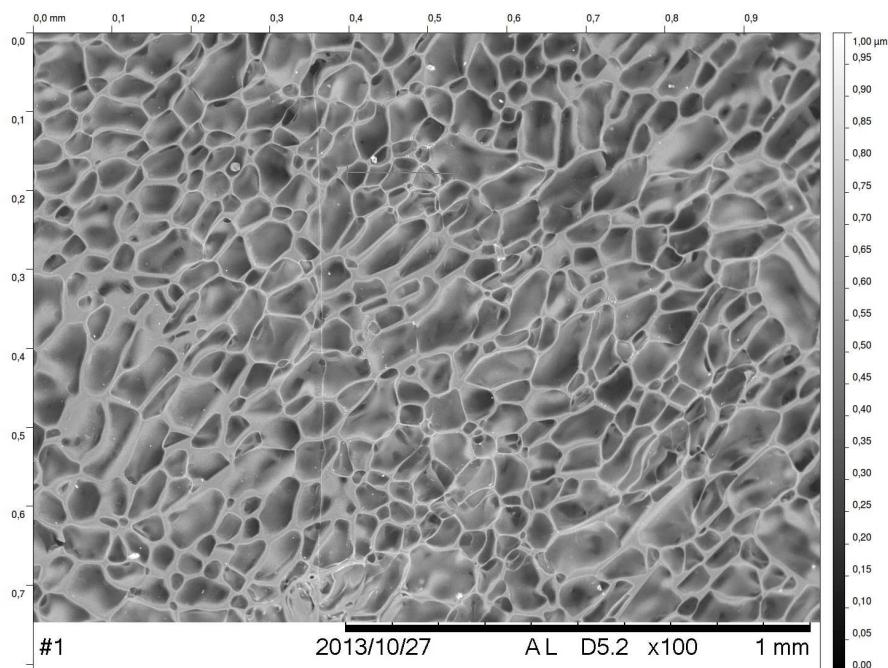
com base na contagem de *pixels* pretos pode ser processada. O ajuste da escala de cinza é um processo empírico, sempre considerando a necessidade de identificação dos poros de forma otimizada.

Quitosana/Gelatina - CG1

O grupo CG1 na proporção 3:1 (quitosana:gelatina) foi analisado utilizando imagem de superfície (Fig. 7.6) e de corte transversal (Fig. 7.7) numa ampliação de 100x.

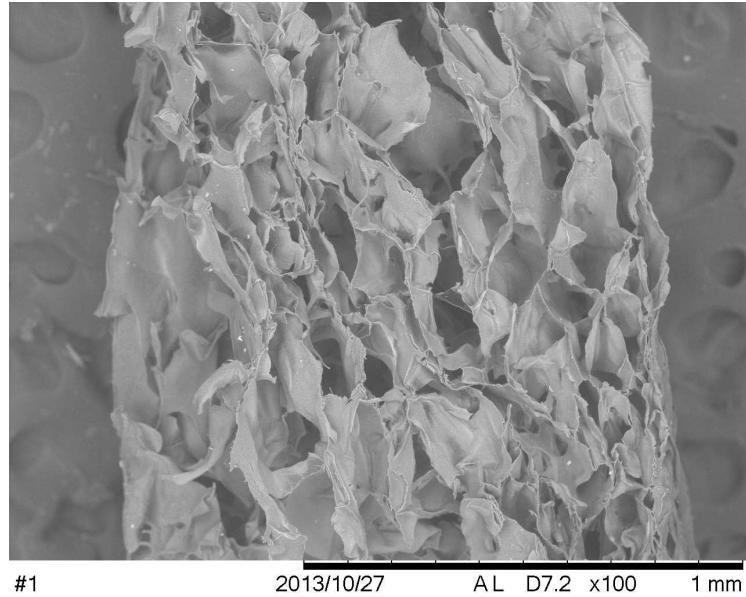
A imagem na Fig. 7.6 retrata uma superfície com poros interconectados formando um aspecto de rede e apresentando regularidade do tamanho dos poros. Dessa forma, o valor médio da dimensão dos poros do grupo CG1 corresponde à faixa de 230 μm .

Figura 7.6: Grupo CG1 - Corte de superfície.



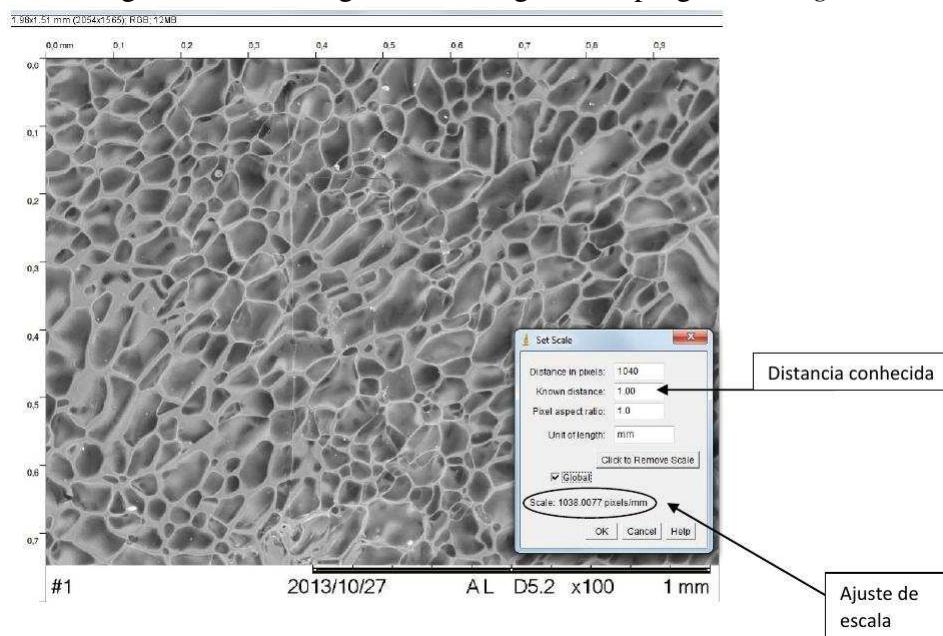
A imagem na Fig. 7.7 sugere uma superfície laminar e pequenas variações em sua extensão com regularidade de tamanho.

Figura 7.7: Grupo CG1 - Corte transversal (superfície).



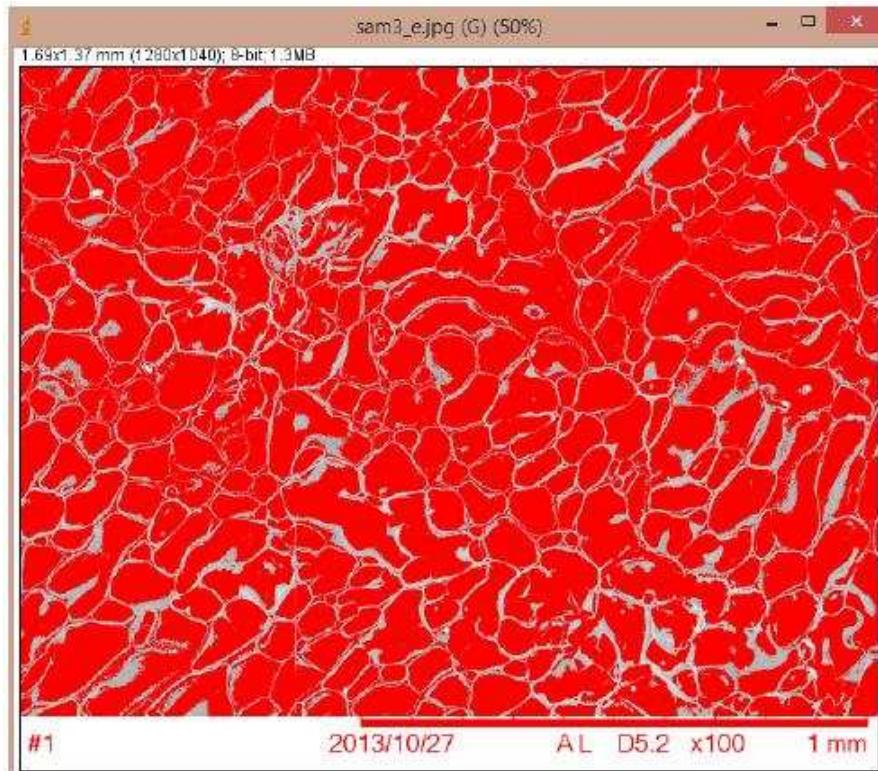
Para o tratamento da imagem uma sequência de passos é executada conforme pode ser visualizado na Fig 7.8. Na análise da micrografia para o grupo CG1 determinou-se através da calibração que 1 m corresponde a $2,253 \text{ pixels}$, indicando que temos uma calibração de $2,253 \text{ pixel/m}$.

Figura 7.8: Calibragem da micrografia no programa *ImageJ*.



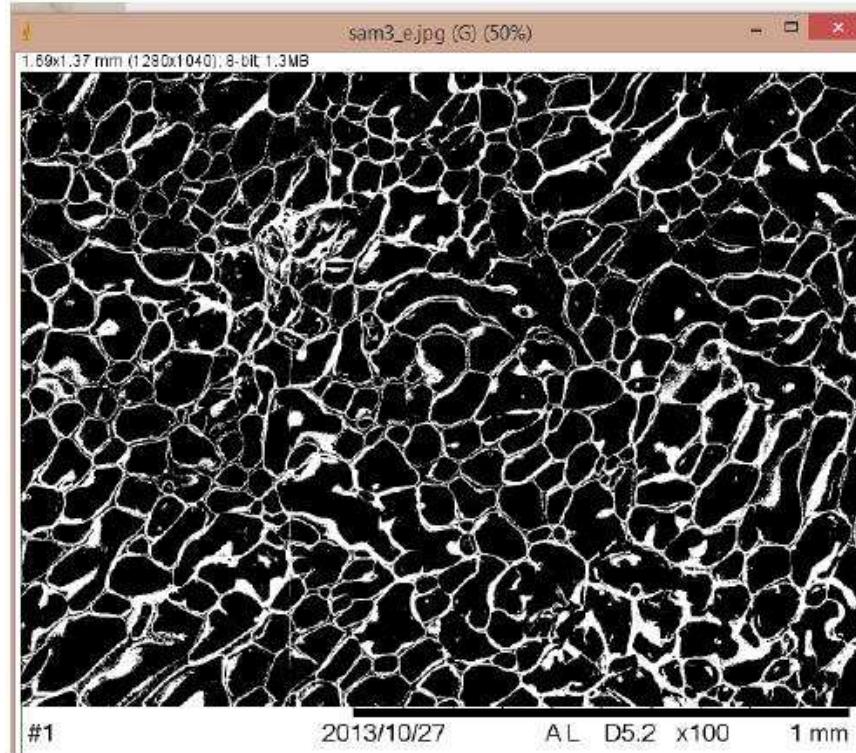
A primeira etapa corresponde em definir a área de interesse na micrografia e executar o procedimento descrito na primeira etapa da calibragem. O segundo passo é realçar as bordas usando na opção *Process* a ferramenta *Find Edges*. Na sequência temos o preenchimento dos poros contornados, conforme Fig. 7.9.

Figura 7.9: Realce da área de interesse na micrografia.



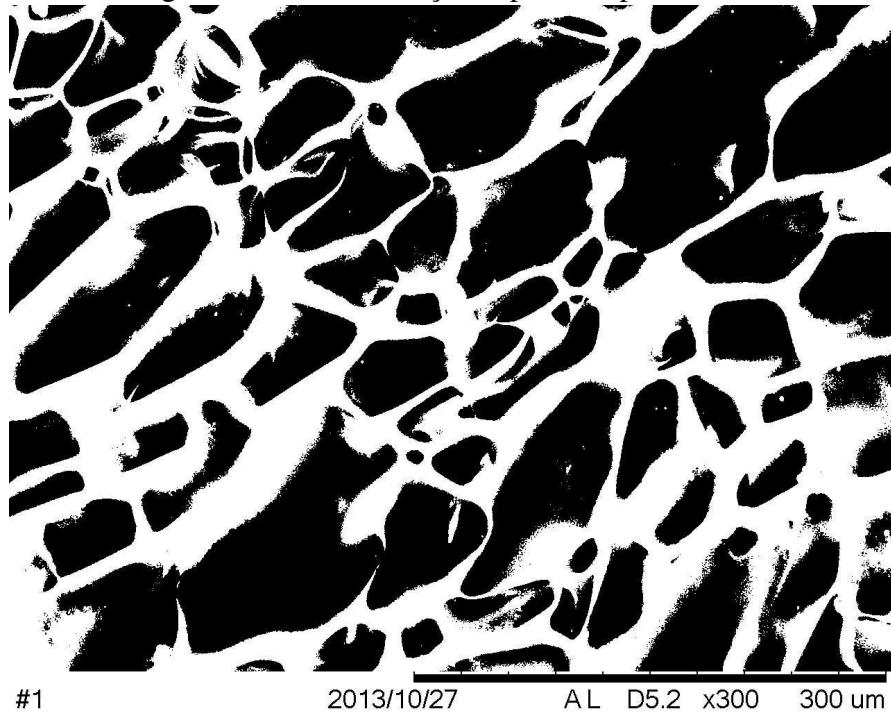
Posterior ao preenchimento executa-se na opção *Process* a ferramenta *Binary*, cuja finalidade no tratamento é transformar a imagem em preto e branco. Após a realização deste procedimento temos uma imagem na qual os poros aparecem na cor preta permitindo mensurar os diâmetros de poros e sua distribuição, conforme Fig. 7.10.

Figura 7.10: Poros realçados pela cor preta, 100x.



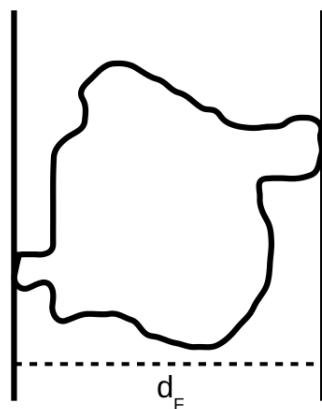
Na Fig. 7.11 é possível observar a área realçada com poros numa ampliação de 300x.

Figura 7.11: Poros realçados pela cor preta, 300x.



Em *Set Measurement* seleciona-se o *Feret's diameter* para calcular o diâmetro de poros e novamente na opção *Analyze* utiliza-se a ferramenta *Measurement* e efetua-se a medição. A partir dos resultados do diâmetro de Feret para cada poro individualmente é calculado o diâmetro médio de poros. No gráfico da Fig. 7.12 apresenta-se a distribuição dos diâmetros de Feret.

Figura 7.12: Diâmetro de Feret.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O diâmetro de Feret é usado em microscopia e representa a distância entre duas linhas paralelas que são tangenciais ao contorno da projeção da partícula ou poro.

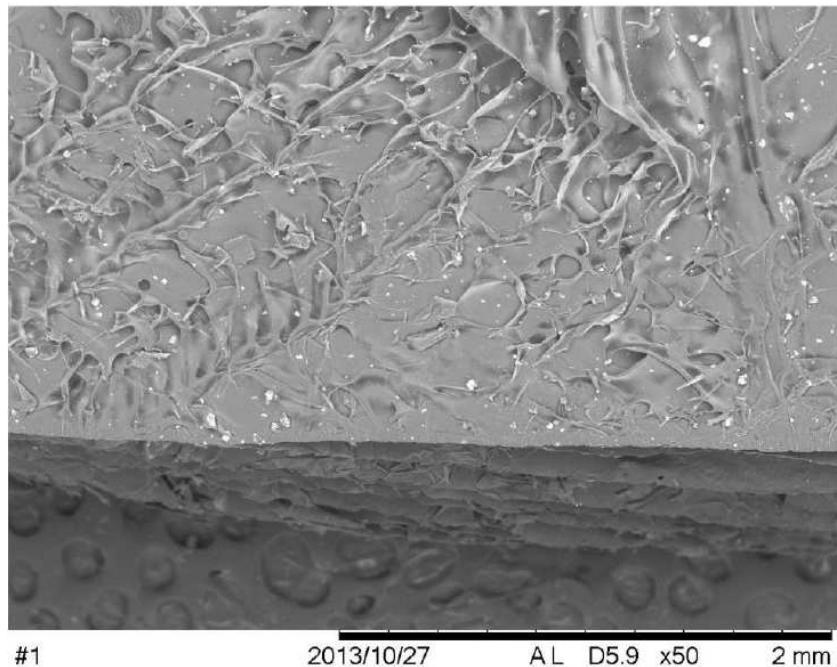
Quitosana - C

Para a análise por MEV foram utilizados dois estágios de posicionamento da amostra, imagem de superfície (Fig. 7.13) e imagem de corte transversal (Fig. 7.14).

O grupo C corresponde à quitosana pura (Fig. 7.13), a análise da imagem fornece as características da amostra retratando uma superfície laminar com pequenas variações em sua extensão.

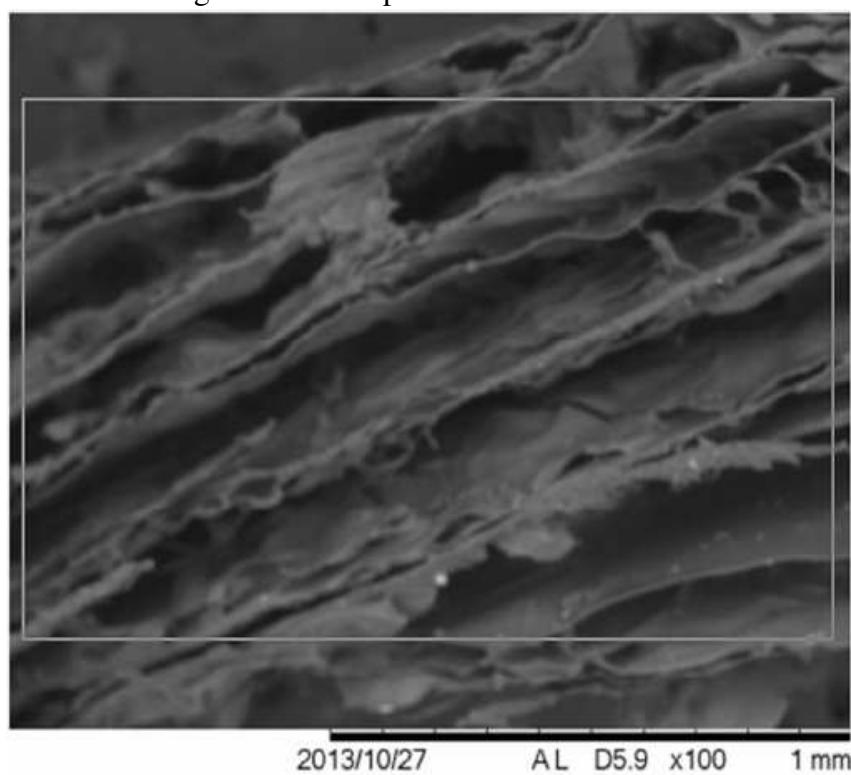
O valor médio da dimensão dos poros corresponde à faixa de 155 μm .

Figura 7.13: Grupo C - Corte de superfície.



A imagem de corte transversal na Fig. 7.14 permite observar um padrão regular formado por camadas.

Figura 7.14: Grupo C - Corte transversal.



A Fig. 7.15 apresenta área com poros (realce em preto) numa ampliação de 100x para o grupo C.

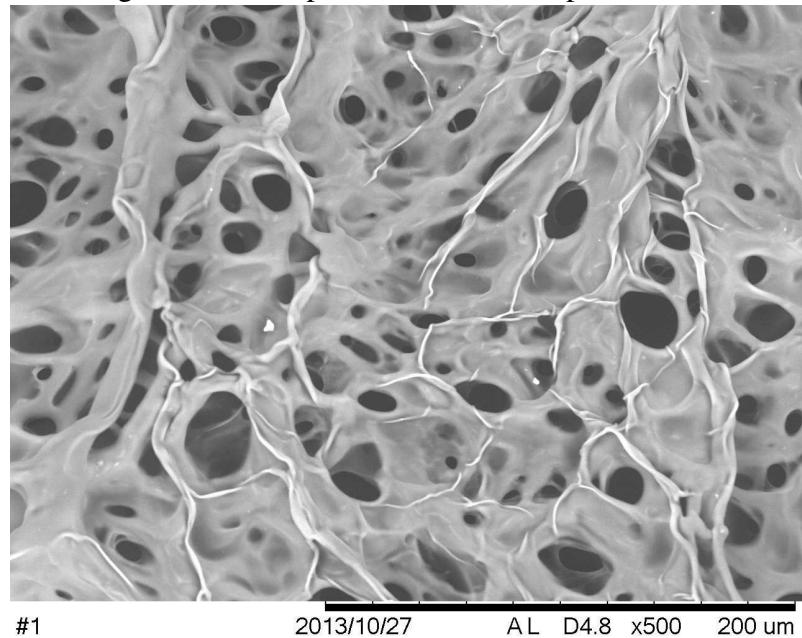
Figura 7.15: Área com poros, 100x.



Quitosana/Gelatina - CG2

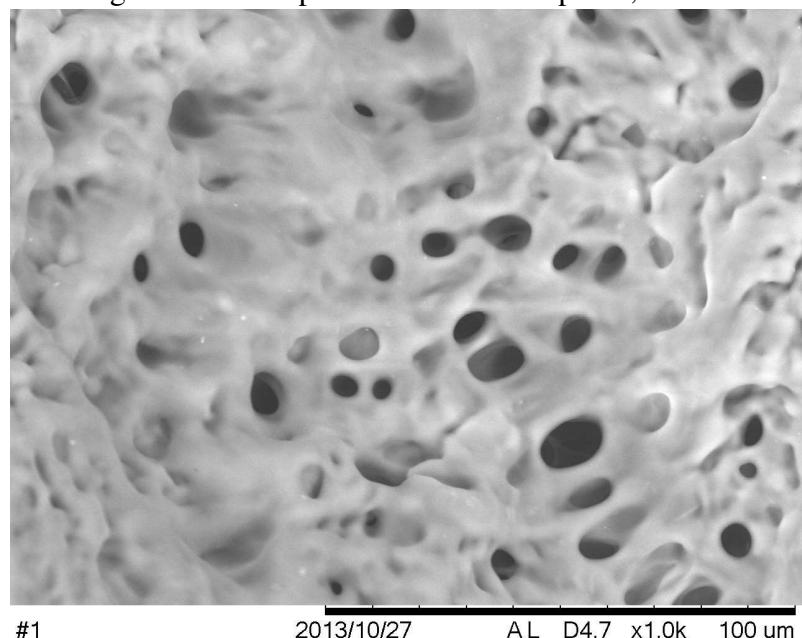
A imagem do grupo CG2 na proporção 1:1 (quitosana:gelatina) pode ser visualizada na Fig. 7.16, observa-se uma superfície de padrão uniforme com valor médio da dimensão dos poros de 11,5 m . Os poros apresentados pela estrutura do grupo CG2 demonstraram que a proporção 1:1 é adequada na obtenção de estruturas porosas, fato este que pode ser confirmado analisando as imagens nas Fig. 7.16 e Fig. 7.17, as imagens apresentadas possuem ampliação de 500x e 1000x, respectivamente.

Figura 7.16: Grupo CG2 - Área com poros, 500x.



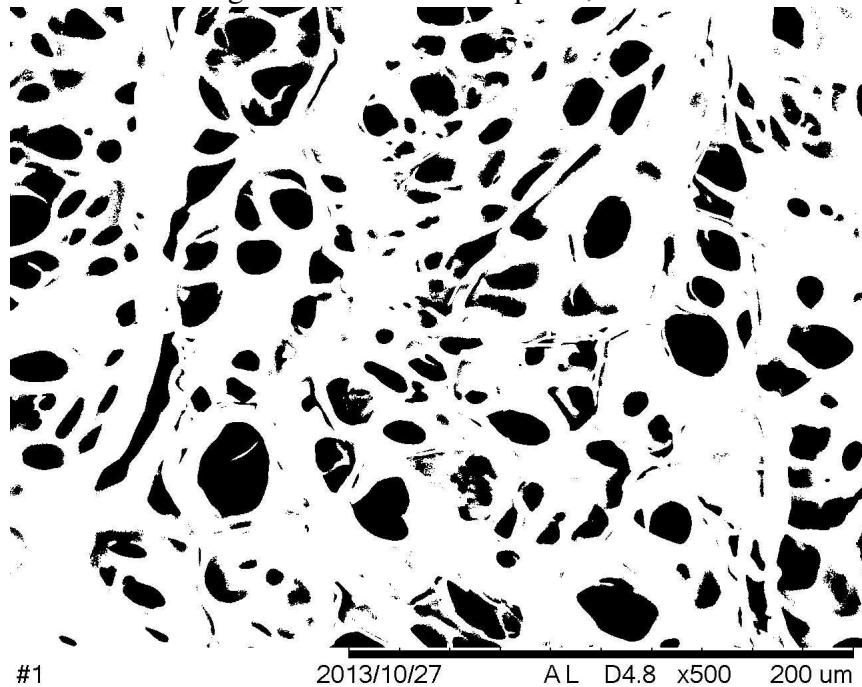
A Fig. 7.17 apresenta área com poros (em preto) numa ampliação de 1000x para o grupo CG2.

Figura 7.17: Grupo CG2 - Área com poros, 1000x.



A fig. 7.18 apresenta uma imagem com realce dos poros (em preto) numa ampliação 500x.

Figura 7.18: Realce dos poros, 500x.



O padrão de imagem obtido no grupo CG2 na proporção 1:1 (quitosana:gelatina), mostrou-se adequado para a formação de uma estrutura porosa.

Quitosana/Gelatina - CG3

As imagens obtidas do grupo CG3 na proporção 1:3 (quitosana:gelatina), podem ser visualizadas em corte transversal numa ampliação de 60x (Fig. 7.19) e 100x (Fig. 7.20), pelas imagens é possível observar que o grupo CG3 apresentou morfologia em camadas com aspecto regular e dimensão dos poros de 225 μm .

Figura 7.19: Grupo CG3 - Corte transversal, 60x.

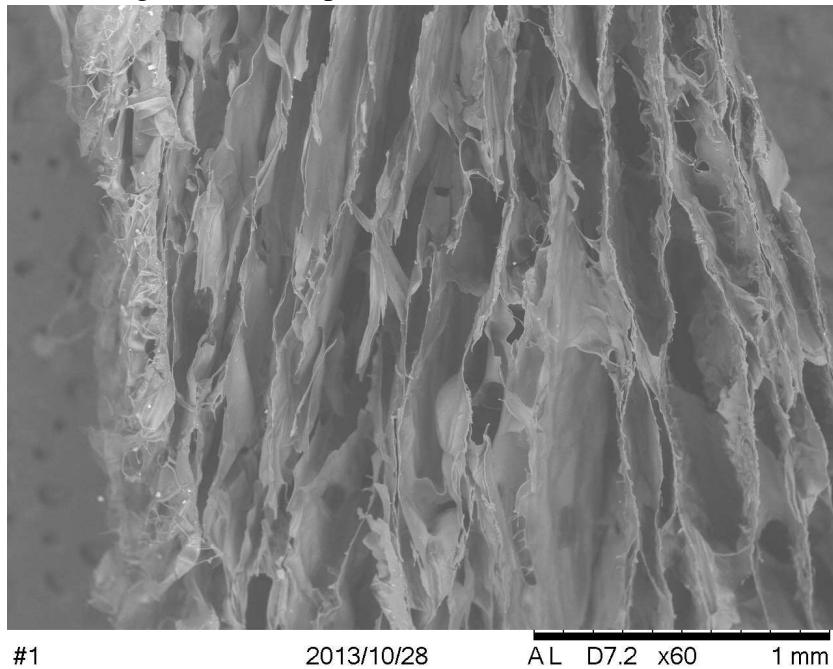
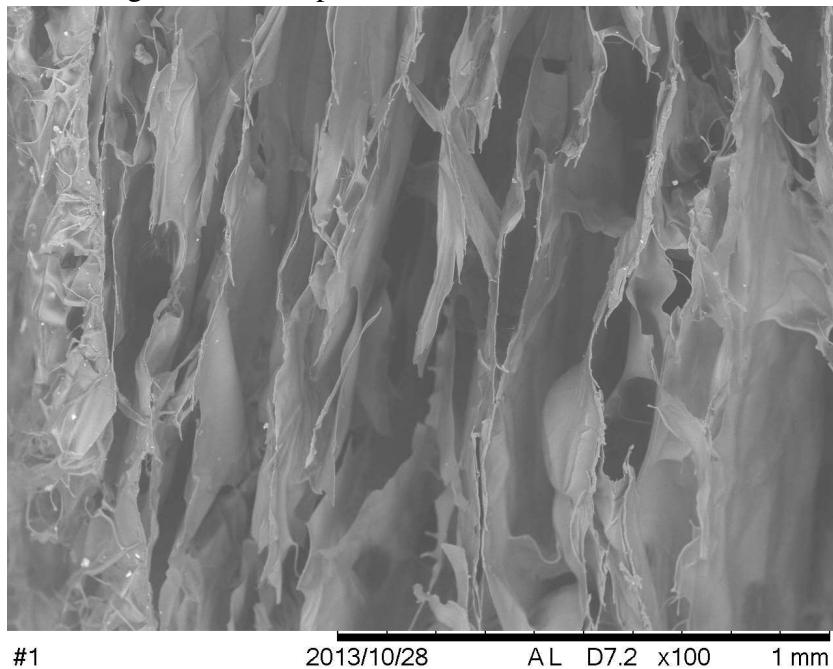


Figura 7.20: Grupo CG3 - Corte transversal, 100x.



Na Tab. 7.2 estão apresentados os resultados numéricos obtidos para o diâmetro de Feret e a área analisada através da análise pelo software *ImageJ* dos poros com contornos selecionados de forma manual para cada região definida.

Tabela 7.2: Resultado da seleção manual dos poros em micrografias obtidas por MEV associadas ao *ImageJ*.

Grupos	Parâmetro	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
C	Diâmetro médio Feret (m)	72,92	22,07	44,59	125,30
	Área %	77,25	11,50	54,83	96,43
CG1	Diâmetro médio Feret (m)	46,52	8,32	44,59	57,42
	Área %	51,25	11,50	12,90	70,72
CG2	Diâmetro médio Feret (m)	25,11	6,08	16,17	37,94
	Área %	71,80	11,44	48,79	97,42
CG3	Diâmetro médio Feret (m)	114,76	19,09	91,95	140,44
	Área %	83,95	9,50	71,37	92,54

As análises das imagens obtidas por MEV permitiu avaliar a porosidade dos filmes. O espaçamento dos poros formados nas estruturas obtidas com os grupos C, CG1, CG2 e CG3 ($\sim m$), condiz com o tamanho de células ($10 - 0,2 m$) e tecidos ($100 - 10 m$) tornando possível sua utilização para produção de *phantom* e uma potencial aplicação na engenharia de tecidos e/ou medicina regenerativa [119].

A microscopia eletrônica de varredura forneceu informações das estruturas obtidas quanto à sua morfologia superficial e transversal. Devido ao método utilizado no processo de filtragem, as amostras apresentaram uniformidade em sua superfície indicando aplicabilidade em diversas áreas, uma vez que o filme pode se adequar à rugosidade de outros ambientes que possa ser inserido [70, 120].

Para a análise dos poros foram selecionadas regiões aleatórias. Nesta etapa do trabalho foi caracterizada qualitativamente a morfologia dos biomateriais pela técnica de microscopia eletrônica de varredura e análise das imagens. Neste sentido foi possível quantificar características morfológicas utilizando as imagens obtidas por MEV.

Considera-se que a caracterização da morfologia do biomaterial é de suma importância como fator de escolha para uma determinada aplicação e para verificação do processo de produção podendo também ser um parâmetro que define a qualidade do biomaterial. Parâmetros estruturais tais como: distribuição de poros, porosidade, morfologia e espessura são possíveis de serem determinados e mensurados a partir das imagens de MEV e posterior análise por *softwares* de imagem. Justifica-se o uso do método de imagem para quantificação de características

morfológicas para uma interpretação metódica e rápida.

Os resultados obtidos pela análise de imagem foram similares à análise qualitativa das micrografias. Os diâmetros de Feret determinados para os poros individualmente permitiram calcular o diâmetro médio dos poros.

Devido ao método de secagem a baixa temperatura, materiais com características polissacárideas apresentaram capacidade de formar estruturas porosas. Notou-se que dos quatro grupos, o que apresentou a maior regularidade em relação ao tamanho de seus poros foi o grupo CG1, na proporção 3:1 (quitosana:gelatina), apresentando-se adequado para a exploração das características do tecido pulmonar.

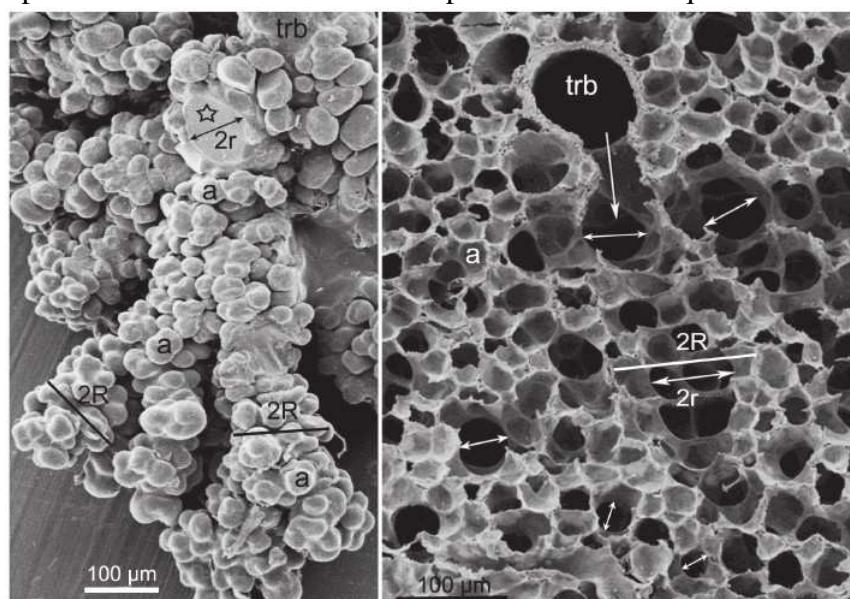
O grupo C e CG2 praticamente possui o mesmo valor de variação do tamanho dos poros. Quando aumentamos a concentração de gelatina, no grupo CG3, a variação do tamanho dos poros aumenta, porém para valores abaixo do grupo CG1. Dessa forma, conclui-se que blendas de quitosana-gelatina proporcionam a formação de boas estruturas porosas quando submetidas ao processo de liofilização.

Análise MEV: estruturas poliméricas x lobo pulmonar de camundongo

Imagens MEV de um pulmão de camundongo [6] foram utilizadas para análise em comparativo com as imagens MEV dos grupos: C, CG1, CG2 e CG3, com a finalidade de obter o grupo adequado para aplicação como lobos pulmonares.

Na Fig. 7.21, visualizam-se imagens MEV de um pulmão de camundongo. Analisando as imagens MEV do pulmão de camundongo em confronto com as imagens MEV dos grupos C, CG1, CG2 e CG3, a escolha do grupo CG1 torna-se adequada (Fig. 7.22 e Fig. 7.23) uma vez que a blenda quitosana-gelatina (3:1) proporcionou uma estrutura porosa com regularidade de tamanho dos poros ($230\text{ }\mu\text{m}$).

Figura 7.21: MEV do pulmão de camundongo dissecado. Esquerda: MEV dos ácinos pulmonares. Direita: pulmão insuflado com 60% da capacidade dos bronquíolos.



Fonte: E. Osmanagic, 2010.

A análise da microscopia eletrônica dos filmes permitiu determinar qualitativamente as interações entre a composição quitosana-gelatina mostrando-se favorável na formação de poros conforme apresentado na imagem de superfície numa ampliação de 300x (Fig. 7.22) e na imagem de corte transversal numa ampliação de 300x (Fig. 7.23) em conformidade com resultados MEV do pulmão de camundongo (Fig. 7.21). Dessa forma a escolha do grupo CG1 é pertinente

para compor os lobos pulmonares, uma vez que possibilitou a formação de uma estrutura com regularidade porosa.

Figura 7.22: MEV da área superficial, CG1.

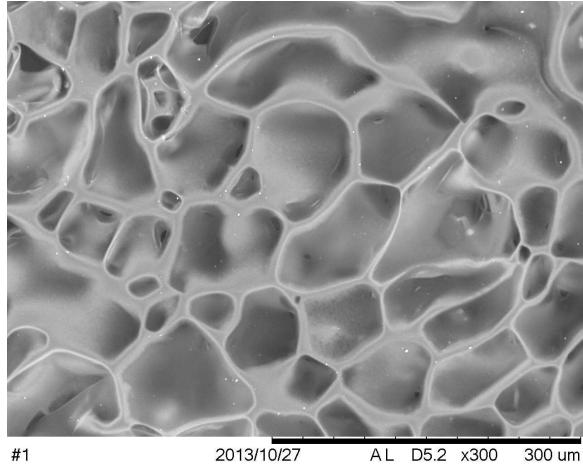
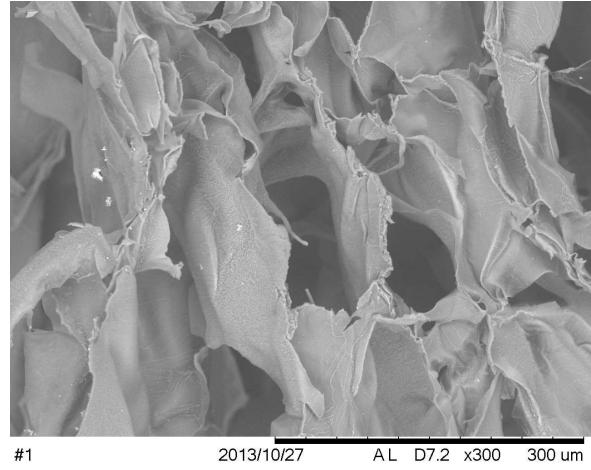


Figura 7.23: MEV da área transversal, CG1.



A microscopia eletrônica de varredura forneceu imagens que possibilitaram obter informações quanto a formação de poros se apresentando de forma satisfatória para aplicação como *phantom* de pulmão de camundongo, especificamente para aplicação nos lobos pulmonares.

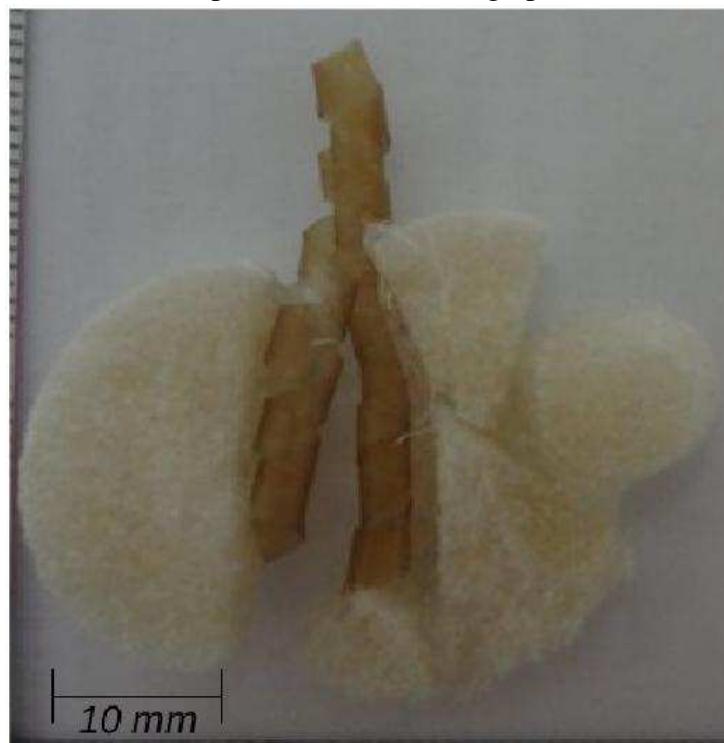
As micrografias obtidas por MEV possibilitaram a inspeção da microporosidade das estruturas tridimensionais obtidas, confirmando a produção de estruturas com tamanho médio dos poros $\sim 181 \text{ } \mu\text{m}$.

7.3 *Phantom* de pulmão de Camundongo

Diante dos resultados analisados, confeccionou-se um *phantom* de pulmão de camundongo a base de polímeros (quitosana e gelatina). Um biomaterial a base de quitosana foi composto na forma cilíndrica e circular (*stent*) sem irregularidades superficiais como molde para traqueia. Uma blenda de polímeros (quitosana-gelatina) liofilizados foi projetada como molde para os lobos pulmonares.

O *phantom* de pulmão de camundongo que foi produzido pelas estruturas conforme descrição no Cap. 6, pode ser visualizado na Fig. 7.24.

Figura 7.24: *Phantom* de pulmão de camundongo produzido neste trabalho.



Os biomateriais produzidos tiveram suas dimensões monitoradas e foram confeccionados com diferentes espessuras, variando de 230 μm a 1 mm e comprimento da ordem de alguns centímetros.

O *phantom* produzido apresentou estabilidade estrutural adequada, com ausência de degradação, para períodos longos (2 anos) permitindo seu uso potencial para aplicações na área de Física Médica.

7.4 Análise por radiografia de alta resolução - DEI

Os biomateriais poliméricos foram projetados com estruturas complexas nas quais as características dimensionais estão hierarquicamente organizadas de acordo com a fisiologia do órgão. Alguns tecidos biológicos exibem contraste inerente em uma imagem de raios X. As imagens de absorção de raios X para ossos, dentes e tecidos mineralizados constituídos de compostos de cálcio, apresentam-se similares e por isso, neste trabalho, utilizou-se compostos de hidroxiapatita (partículas de tamanho 20 μm).

As imagens deste trabalho foram adquiridas na linha de luz X15A do *National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY)*, a qual tem uma fonte de raios X proveniente de um anel síncrotron. O projeto intitulado: "*Characterization of biomaterials phantoms for medical applications*" foi aprovado para uso da linha de luz em questão.

DEI é um tipo de imagem de raios X por contraste de fase. Em todos os tipos de imagem de raios X por contraste de fase, o contraste da imagem é gerado quando o raio X passa através do material com diferentes índices de refração, o que conduz a mudanças na fase do feixe transmitido. As imagens foram processadas, posteriormente a sua aquisição usando o software *ImageJ* para à extração da informação qualitativa no que se refere ao nível de contraste nas imagens.

Cada imagem nas Fig. 7.25 a Fig. 7.30 representa um ponto de mudança na posição do cristal analisador obtido para o intervalo de 5 rad a -5 rad . No total foram extraídas 11 imagens de cada amostra compondo a varredura sobre toda a curva de refletividade do cristal.

A radiografia convencional mostra uma característica do material que corresponde a atenuação do feixe de raios X não considerando outros efeitos físicos existentes com informações importantes da interação sobre o feixe transmitido. Nesse aspecto refere-se a radiografia clásica como limitada. Por outro lado, a radiografia convencional são degradadas pelo efeito de espalhamento, o qual pode contribuir com a perda de detalhes da imagem [98].

As amostras foram preparadas de acordo com o processo descrito na seção 6.3 e a hidroxi-

patita foi acrescentada em alguns filmes quando estes foram dispostos em placa de *Petri* anterior ao processo de secagem nas proporções adequadas.

A aquisição das imagens de DEI foi realizada com o cristal analisador sintonizado para varias posições sobre a *Rocking Curve* através da translação da amostra. A velocidade de varredura da amostra correspondeu a 10 mm/s , a dose sobre a amostra foi de poucos mGy (miligrays) para 18 KeV .

Na Tab. 7.3, apresentam-se as características da linha de luz síncrotron DEI e XSW³ utilizada para análise dos dados deste trabalho.

Tabela 7.3: Características da linha de luz X15A *NSLS I*.

Faixa de energia	Monocristal	Resolução $\Delta E/E$	Fluxo	Tamanho local (mm)	Aceitação Angular Total
3-20 <i>KeV</i> para XSW	Si(111), Si(220), Si(400) para XSW	2×10^{-4}	$10^{8-9} ph/s/mm^2$ (@ 30 <i>KeV</i> , 200 <i>mA</i> , 2.8 <i>GeV</i>)	15H \times 2V (desfocado) para XSW	10 (<i>mrad</i>)
15-60 <i>KeV</i> para DEI	Si(111) Si(333) para DEI	2×10^{-4}	$10^{8-9} ph/s/mm^2$ (@ 30 <i>KeV</i> , 200 <i>mA</i> , 2.8 <i>GeV</i>)	115H \times 2V para DEI	10 (<i>mrad</i>)
Tipo de fonte					
<i>Bending Magnet</i>					
Sistema Ótico					
Monocromador: Silício (111) e (333) monocromador com o correspondente analisador.					
Aparato experimental					
Radiação adequada para o modo feixe branco. Detector CMOS digital $50\text{ mm} \times 100\text{ mm}$, e placa de imagem $200\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ para o detector com leitor Fuji, ambos com tamanho de 50 <i>pixel</i> . Sistema DEI utilizando silício (111) e (333) para reflexões. Tempo de varredura típico é de um minuto por conjunto de imagem DEI para amostras $100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ com 40 <i>mm</i> de espessura equivalente (água).					
Sistema computacional Hardware & Software					
Computador PC486 com sistema operacional Linux, Windows-X, SPEC e CPlot para operar o monocromador e o aparato experimental via CAMAC e uma placa PCAII MCA. Computador Windows com software personalizado para controle do experimento DEI via interface GPIB, operando o quadro <i>grabber</i> para o detector de raios X 2D.					

Fonte: <http://beamlines.ps.bnl.gov/beamline.aspx?blid=X15A>. Acesso em: 30 maio 2016.

³X Ray Standing Waves - Ondas estacionárias de raios X; técnica utilizada para analisar a estrutura da superfície e a interface de uma amostra com elevada resolução espacial, utilizando fonte de luz síncrotron.

A técnica de imagem de alta resolução foi utilizada de forma qualitativa para a identificação das diferenças de contraste obtidos (pontos da curva de refletividade) nos biomateriais devido as diferentes condições de preparação e biopolímeros empregados nas mesmas.

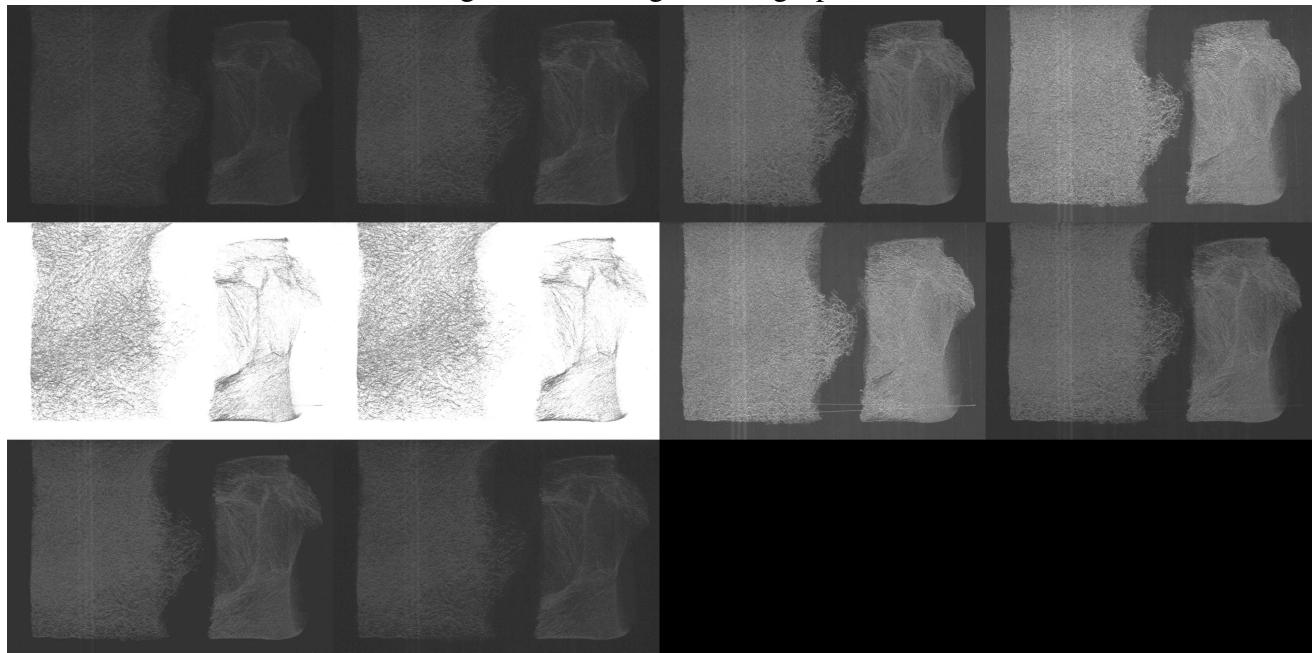
Com a finalidade de observar o contraste de imagem, a técnica DEI foi utilizada para análise das amostras confeccionadas conforme disposição dos grupos em diferentes proporções de quitosana:gelatina C (1:0), CG1 (3:1), CG2 (1:1) e CG3 (1:3) com ou sem partículas de hidroxiapatita.

As imagens apresentadas nas Fig. 7.25 e Fig. 7.26 correspondem às estruturas dos grupos C e CG1, respectivamente.

Grupo C - Quitosana.

As imagens de radiografia de alta resolução na Fig. 7.25 referem-se à quitosana pura.

Figura 7.25: Imagem DEI grupo C.



Para os biomateriais do grupo C compostos unicamente de quitosana visualiza-se uma estrutura porosa com junções identificando a interface entre duas partes entre cruzadas do mesmo identificados como partes de maior espessura.

Grupo CG1 - Quitosana:Gelatina (3:1).

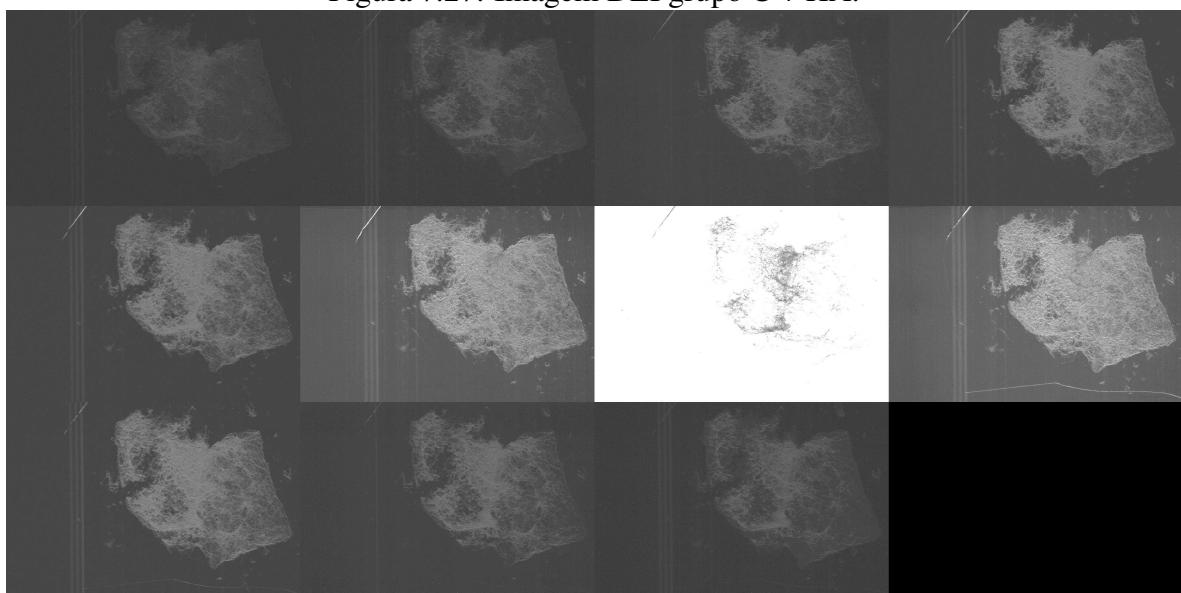
As imagens na Fig. 7.26 referem-se à blenda quitosana-gelatina.

Figura 7.26: Imagem DEI grupo CG1.

**Grupo C - Quitosana + 2 g hidroxiapatita.**

As imagens na Fig. 7.27 referem-se à quitosana pura adicionada 2 g HA.

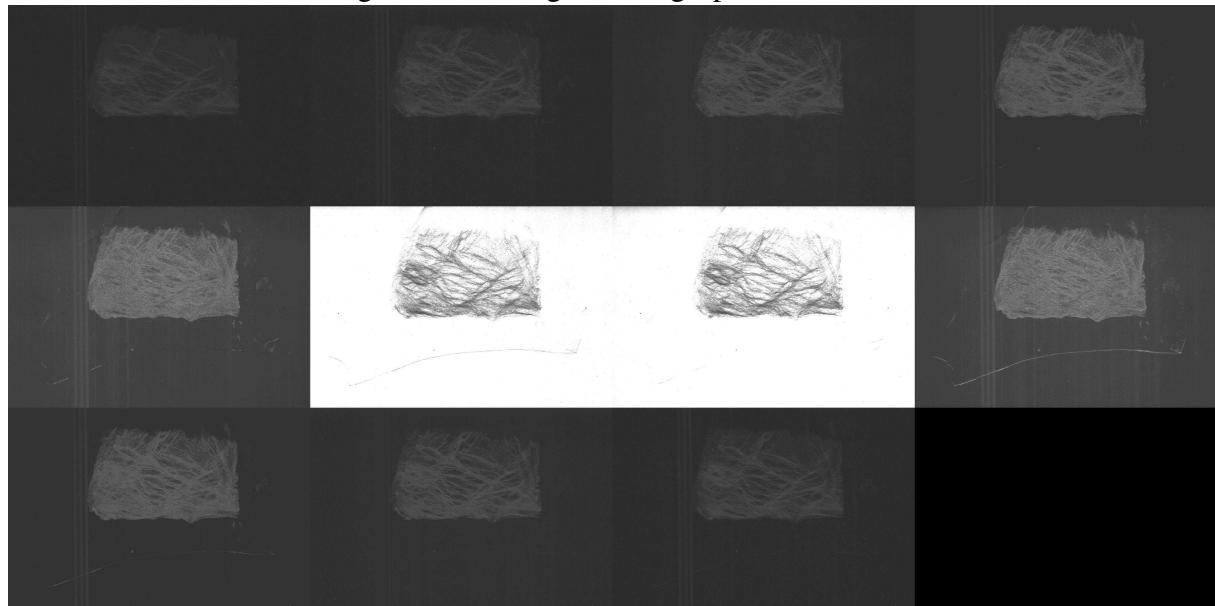
Figura 7.27: Imagem DEI grupo C + HA.



Grupo CG1 - Quitosana:Gelatina (3:1) + 2 g hidroxiapatita.

As imagens de radiografia de alta resolução na Fig. 7.28 referem-se à blenda quitosana-gelatina na proporção 3:1 adicionada 2 g hidroxiapatita.

Figura 7.28: Imagem DEI grupo CG1+ HA.

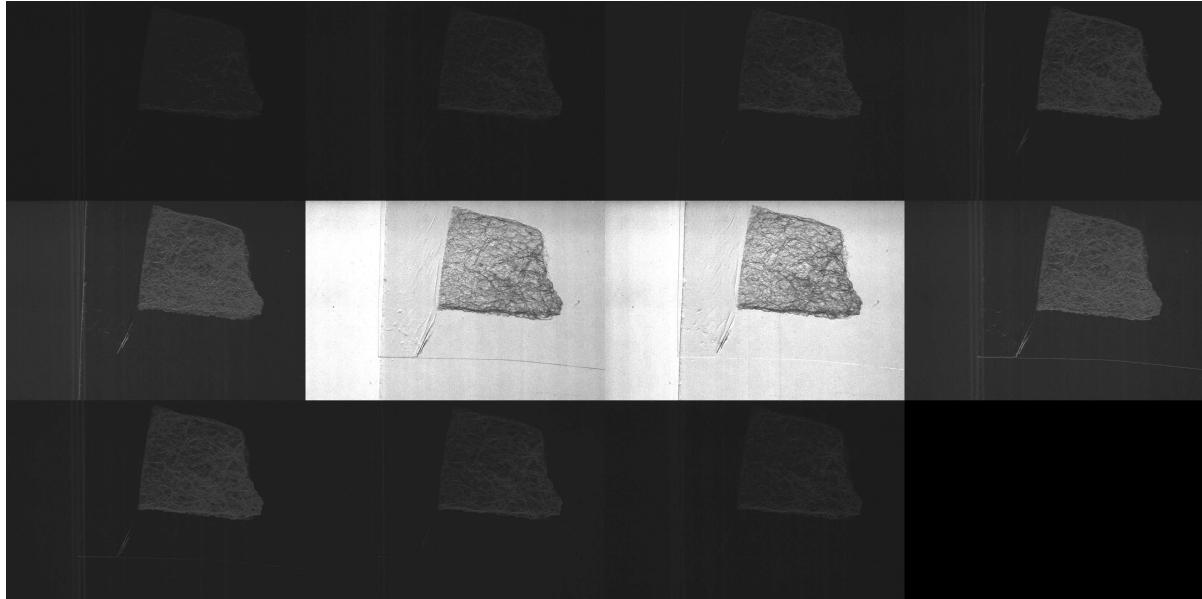


Nas imagens do grupo CG1 com a inclusão de HA visualiza-se um padrão fibroso com junções de HA incorporada. As variações de contraste nas distintas posições da curva de reflectividade permitem visualizar o biomaterial na forma 3D com uma estrutura de fibras internas interlaçadas.

Grupo CG2 - Quitosana:Gelatina (1:1) + 2 g hidroxiapatita.

As imagens de radiografia de alta resolução na Fig. 7.29 referem-se à quitosana-gelatina na proporção 1:1 adicionada 2 g hidroxiapatita.

Figura 7.29: Imagem DEI grupo CG2 + HA.

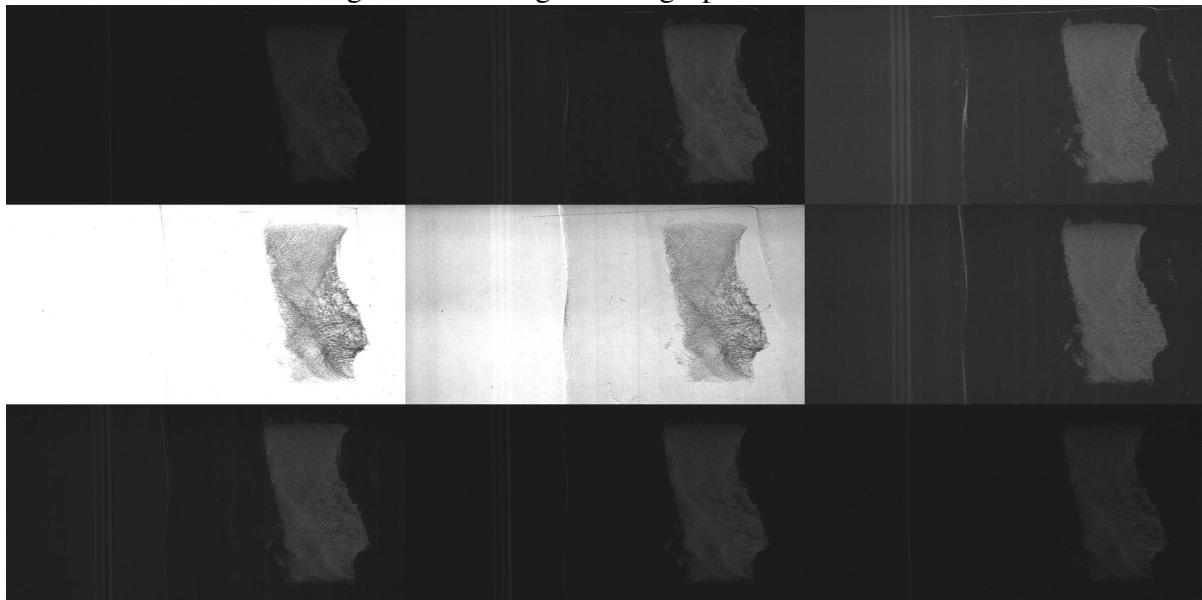


A imagem do grupo CG2 aponta para um padrão mais poroso do biomaterial com áreas livres de HA sendo possível identificar a incorporação da HA. A incorporação da HA fez-se apenas em parte do biomaterial sugerindo que durante o processo de liofilização houve uma modificação do material devido as diferenças de composição.

Grupo CG3 - Quitosana:Gelatina (1:3) + 2g hidroxiapatita.

As imagens na Fig. 7.30 referem-se à blenda quitosana-gelatina adicionada 2 g HA.

Figura 7.30: Imagem DEI grupo CG3 + HA.



Os grupos que apresentam a HA em áreas distintas foram preparados de modo a apresentarem parcialmente o compósito. De forma geral, a estrutura base dos grupos está evidenciada nas imagens com os respectivos contrastes para as diferentes posições angulares no perfil de difração.

Os resultados obtidos por essa técnica são importantes por terem sido realizados para os biopolímeros selecionados e a aplicação pela primeira vez. Nas imagens obtidas pela técnica de imagem foi possível identificar padrões distintos devido a variação nas quantidades dos biopolímeros usados nas preparações efetivadas. Entende-se que um aprimoramento das preparações ainda deverá ser realizado e novas análises poderão ser desenvolvidas junto ao setor de Radio-terapia do Hospital de Clínicas visando o desenvolvimento de *phantoms* de custo acessível para outros tecidos e órgãos.

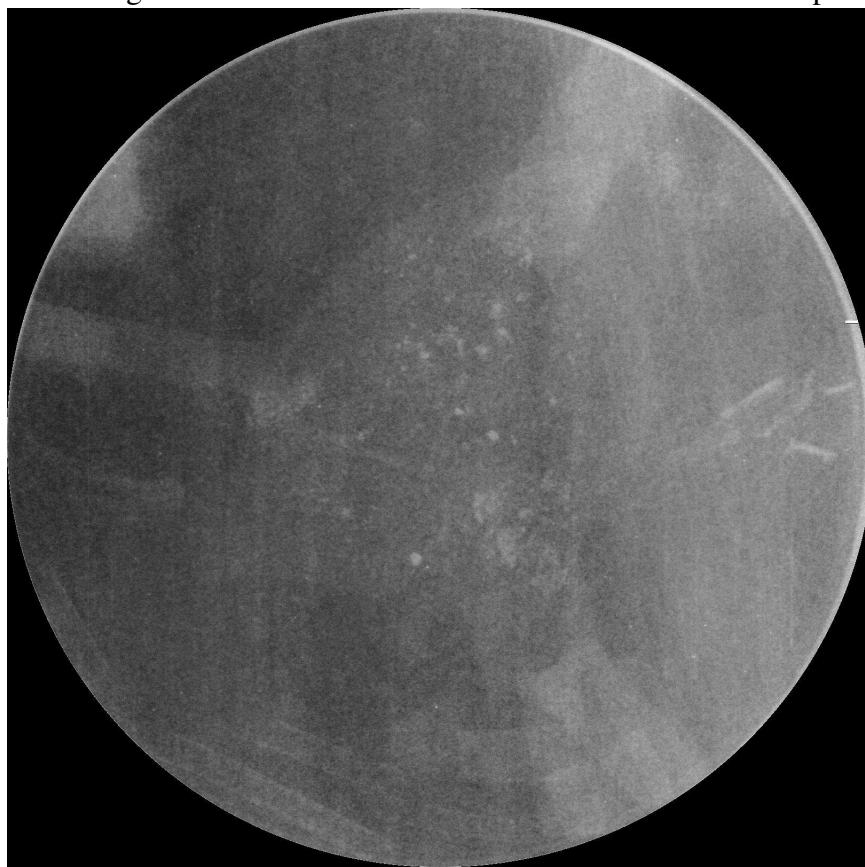
As imagens produzidas pelo método DEI fornecem alta resolução e contraste elevado, tornando-se uma excelente técnica para aplicação na análise de biomateriais poliméricos. As bordas e fibras ficaram evidentemente realçadas, inclusive partículas de hidroxiapatita. Isto se deve a resolução espacial do analisador com gradiente de fase, o que não ocorre numa imagem convencional.

Detalhes finos das estruturas formadas pela junção dos biomateriais e os contornos são claramente visíveis nas imagens de DEI. O mesmo fato não ocorre para os mesmos materiais quando observados pela Radiografia Convencional.

Análise das estruturas em uma fonte de raios X convencional

As estruturas confeccionadas: filmes com e sem hidroxiapatita, *stent* e *phantom*, foram submetidas a análise em uma fonte convencional de raios X com $E = 40 \text{ KeV}$. Os dados foram realizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), no setor de radiologia. As amostras foram dispostas em uma placa para obtenção das imagens de raios X, conforme visualizado na Fig. 7.31.

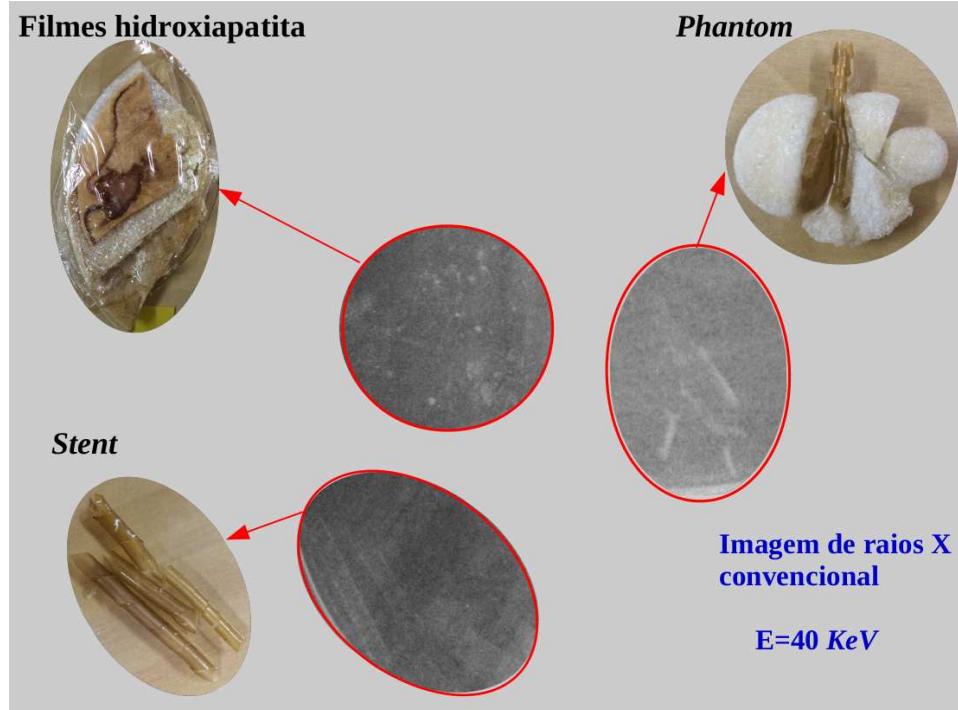
Figura 7.31: Imagem de uma fonte de RX convencional das estruturas poliméricas.



Pela imagem (Fig. 7.31) obtida de um fonte de raios X convencional das estruturas poliméricas desenvolvidas neste trabalho é possível visualizar áreas de contraste de imagem dos filmes com hidroxiapatita, *stent* e *phantom*.

Para melhor análise, a Fig. 7.32 apresenta as imagens de raios X em contraste com a imagem real de cada estrutura.

Figura 7.32: Comparativo da imagem de raios X com imagem das estruturas.



Comparando os resultados de uma fonte de raios X convencional com as imagens obtidas pela fonte de radiografia de alta resolução (DEI), pode-se dizer que as imagens de raios X convencional forneceu contraste nas imagens das estruturas, porém as imagens obtidas pela técnica DEI proporcionou às imagens um alto contraste entre interfaces e bordas.

8 *Conclusões*

A maioria dos estudos envolvendo a produção de *phantom* se baseiam no uso de um único material. No presente trabalho confeccionou-se estruturas tridimensionais com diferentes biomateriais. Como principal resultado desta tese foi obtido *phantom* pulmonar de camundongo adequado para uso em dosimetria.

A metodologia de preparação das amostras foi aperfeiçoada e permitiu a determinação dos biomateriais poliméricos adequados para a aplicação biomédica proposta, destacando as diversas etapas para manufatura do biomaterial. Os métodos de filtragem e neutralização foram eficientes para o controle do pH. O processo de secagem a baixa temperatura a vácuo proporcionou a formação de estruturas porosas determinantes para a aplicação escolhida.

Micrografias superficiais obtidas por MEV de estruturas selecionadas permitiram a verificação da homogeneidade e a formação de uma estrutura ordenada sem apresentar artefatos expressivos. Além disso, esta técnica forneceu informações destacando a morfologia superficial e em corte transversal. As técnicas experimentais selecionadas para caracterização das propriedades dos biomateriais conduziram a resultados preliminares importantes para o desenvolvimento do *phantom*.

A determinação de parâmetros estruturais através da técnica de MEV associada ao método de imagem foi essencial para a escolha do biomaterial cujas características morfológicas estão em acordo com as características existentes na literatura. A organização e alinhamento das estruturas na matriz do biomaterial permitiram estabelecer uma relação com a anatomia do tecido biológico em questão. A estrutura física apresentada pelo biomaterial condiz com a proposta de uso potencial para aplicação como *phantom*.

As imagens obtidas pela técnica de radiografia de alta resolução dos filmes liofilizados mostraram que as proporções de quitosana e gelatina foram adequadas para confecção do *phantom* apresentando alto contraste nas imagens adquiridas, especialmente nas amostras com hidroxiapatita. Em contraste com as imagens obtidas de uma fonte de raios convencional, as imagens obtidas pela técnica DEI apresentaram maior nitidez de imagem, especialmente em interface e contorno das bordas.

Este estudo demonstra as vantagens de uso da técnica DEI para caracterização de biomateriais constituído basicamente por elementos leves, validando que as imagens obtidas detectam claramente as microestruturas produzidas nos biomateriais. Essas informações são relevantes para auxiliar clínicos e médicos radiologistas na avaliação das estruturas biológicas mais complexas através do *phantom*. O uso de DEI pode aprimorar a redução de falsos positivos e falsos negativos nos diagnósticos por imagem, uma vez que as imagens produzidas devem ser utilizadas para análises quantitativas e qualitativas comparadas com as radiografias.

Os biomateriais produzidos não apresentaram indícios de degradação (presença de fungos ou redução de tamanho) em atmosfera ambiente nas proporções preparadas adequadamente. A utilização bem sucedida dos biomateriais se deve a construção da estrutura/função pela comparação com as estruturas biológicas e a inclusão de artefatos da doença em sua matriz. Como perspectivas futuras, a técnica DEI pode ser aplicada no estudo detalhado da arquitetura dos *phantoms* produzidos com a observação de sua degradação.

APÊNDICE A – Interação da radiação com a matéria

A interação da radiação eletromagnética com a matéria envolve diretamente os mecanismos de propagação da luz no tecido, dessa forma é importante compreender os fundamentos presentes nesta interação. De uma maneira geral, a radiação interage pelos processos de absorção e espalhamento. O processo de absorção de fótons pode ocorrer sob forma de radiação ionizante e não ionizante. O que distingue os fótons nessas classificações são suas energias, os raios X e raios gama, pois apresentam energia suficiente para ionizar os átomos do meio, pelos processos de absorção fotoelétrica, produção de pares, absorção fotonuclear e espalhamento Compton. Por outro lado, se a luz não possui energia suficiente para que esses processos ocorram, caso em que sua energia é menor que a energia de ligação da maioria dos elétrons, ocorre então o espalhamento onde, a energia que incide em uma direção é espalhada ou desviada para outras direções.

A radiação eletromagnética pode atravessar um meio modificando-o ou não, a probabilidade de ocorrer interação, dependerá da característica do meio e da radiação [121]. As radiações eletromagnéticas emitidas pelos tubos de raios X, quase invariavelmente têm um comprimento de onda maior do que os raios gama emitidos por núcleos radioativos.

Os raios X possuem frequência ($\sim 10^{17} Hz$), energia entre ($100 eV – 100 KeV$) e comprimento de onda ($\sim nm$). A radiação gama é uma radiação eletromagnética ionizante de alta energia ($> 0,1 MeV$), alta frequência ($> 10^{19} Hz$) e, portanto, com comprimento de onda ($\sim pm$). Dessa forma, raios X e raios gama podem ser diferenciados com base no valor da energia.

Quando feixes de raios X ou raios γ atravessam o meio ocorrem interações entre fótons e a matéria. Dessa forma, a energia é transferida para o meio, sendo capaz de arrancar elétrons dos átomos provocando ionizações ao longo de sua trajetória. Se o meio for um tecido humano essa energia é capaz de destruir células, impedindo que elas se reproduzam ou reproduzam de forma inadequada. O processo de ionização ocorre quando elétrons são removidos de átomos ou moléculas, devido à incidência de uma energia que seja capaz de superar a energia de ligação desses elétrons, resultando em elétrons de alta energia, quando ocorre a quebra de ligações químicas. No caso da excitação, os elétrons são deslocados de seus orbitais atômicos, e ao retornarem, emitem a energia remanescente sob forma de luz ou raios X.

As radiações ionizantes incidentes, ao atravessarem um meio material, transferem energia para as partículas no decorrer de sua trajetória. Caso esta energia transferida seja superior à energia de ligação do elétron com o restante da estrutura atômica, este é ejetado de sua órbita (o átomo é momentaneamente transformado em um íon positivo). O elétron ejetado (íon negativo) desloca-se no meio, impulsionado pela energia cinética adquirida neste processo. Esta energia é dissipada através da interação do elétron com elétrons e núcleos de outros átomos eventualmente encontrados em sua trajetória e por consequência, novos íons podem ser introduzidos na matéria. O processo é interrompido quando, a energia dissipada nas interações (choques), os elétrons (e suas cargas negativas) acabam capturados por moléculas do meio.

As radiações ionizantes contribuem para romper, mesmo que momentaneamente, o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas do átomo, pois "arrancam" aleatoriamente, elétrons das camadas eletrônicas. A inserção de cargas elétricas livres em um meio irradiado segue um rearranjo eletrônico que pode envolver elétrons de outros átomos e moléculas. Este rearranjo dos elétrons tem como consequência o restabelecimento do equilíbrio perdido [121].

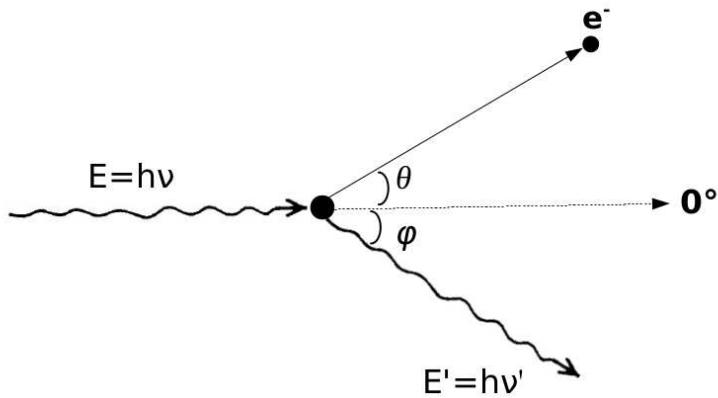
A radiação eletromagnética ionizante é considerada, em boa parte dos casos, como um conjunto de partículas (fótons) em que, cada energia do fóton $h\nu$ corresponde a um momento associado $h\nu/c$ dessa forma, podem ocorrer "colisões" em que o fóton transfere energia e momento para outras partículas.

As principais interações que ocorrem na matéria com fótons de energia na faixa de *KeV* até dezenas de *MeV* são: Efeito Rayleigh, Efeito fotoelétrico, Efeito Compton, Produção de pares, Interações fotonucleares.

A.1 Efeito Compton

Descoberto em 1923 por Arthur Compton, o efeito Compton, pode ser descrito sob dois aspectos: cinemática e seção de choque, efeito descrito conforme Fig. A.1. A cinemática descreve a energia envolvida no processo e a seção de choque descreve a probabilidade de ocorrer a interação Compton. A principal característica do Efeito Compton é que apenas uma parte da sua quantidade total de energia é transferida do fóton ao elétron, o restante da energia continua como um fóton de baixa energia em outra direção, e portanto, chamado um fóton espalhado [122]. Este efeito predomina na faixa de energia de 100 *KeV* – 2 *MeV*).

Figura A.1: Efeito Compton.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um fóton incidente com energia $h\nu$ interage com o elétron estacionário fracamente ligado ao átomo, como resultado dessa interação, o elétron estacionário é espalhado a um ângulo θ , em relação à direção do fóton incidente, com energia cinética K , chamado agora elétron de recuo. A velocidade do elétron depende da energia que foi transferida ao elétron. Um fóton de energia $h\nu'$ menor que $h\nu$ é espalhado a um ângulo φ . Depois da colisão o elétron se afasta a um ângulo θ , com energia cinética K e momento p . O fóton espalha a um ângulo φ com energia $h\nu'$ e momento $h\nu'/c$.

Cinemática

A energia do fóton espalhado é:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + (h\nu/m_0c^2)(1 - \cos \varphi)}. \quad (\text{A.1})$$

O momento de recuo do elétron espalhado é igual a diferença entre o momento do quantum incidente e o do quantum espalhado logo, a energia do elétron de recuo é:

$$E_r = h\nu \frac{(h\nu/m_0c^2)(1 - \cos \varphi)}{1 + (h\nu/m_0c^2)(1 - \cos \varphi)}. \quad (\text{A.2})$$

Seção de choque para o efeito Compton

J. J. Thomson propôs a primeira descrição teórica para o processo em que o elétron pode ser espalhado por fótons, deduziu a seção de choque diferencial por elétron por fóton espalhado a um ângulo φ , por unidade de ângulo sólido, que pode ser expresso na forma:

$$\frac{d_e\sigma_0}{d\Omega_\varphi} = \frac{r_0^2}{2}(1 + \cos^2\varphi) \quad (\text{A.3})$$

em unidades de $\text{cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ por elétron, $r_0 = e^2/m_0^2 = 2,818 \times 10^{-13} \text{ cm}$ é o raio clássico do elétron. O valor da Eq. A.3 é $7,94 \times 10^{-26} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1} \text{ e}^{-1}$ para $\varphi = 0$ e 180° .

Integrando a Eq. A.3 sobre todas as direções de espalhamento, obtém-se a seção de choque total para o espalhamento Thomson por elétron $_e\sigma_0$:

$$_e\sigma_0 = \frac{8}{3}\pi r_0^2 = 6,65 \times 10^{-25} \text{ cm}^2/\text{elétron}. \quad (\text{A.4})$$

Esta seção de choque é numericamente igual a probabilidade de ocorrer o espalhamento Thomson quando um fóton passa através de uma camada contendo um elétron por cm^2 .

Em 1928 Klein e Nishina aplicaram a teoria Dirac de afim de obter a seção de choque e obtiveram sucesso ao prever o correto resultado experimental [123].

A equação diferencial de Thomson para seção de choque Eq. A.3 pode ser escrita na forma:

$$\frac{d_e\sigma_0}{d\Omega_\varphi} = \frac{r_0^2}{2} \left(\frac{hv'}{hv} \right)^2 \left(\frac{hv}{hv'} + \frac{hv'}{hv} - \operatorname{sen}^2\varphi \right) \quad (\text{A.5})$$

em que hv' é dado pela Eq. A.1, para baixas energias $hv \cong hv'$, consequentemente Eq. A.5, será:

$$\frac{d_e\sigma_0}{d\Omega_\varphi} = \frac{r_0^2}{2}(2 - \operatorname{sen}^2\varphi) = \frac{r_0^2}{2}(1 + \cos^2\varphi) \quad (\text{A.6})$$

que é idêntico à Eq. A.3, verificando que a seção de choque proposta por Klein e Nishina se reduz à proposta por Thomson para o caso de fótons de baixa energia.

A seção de choque total, Klein-Nishina, por elétron ($_e\sigma$) pode ser obtida pela integração de Eq. A.5 para todos os fótons espalhados a um ângulo ϕ :

$$_e\sigma = 2\pi r_0^2 \left[\frac{1+\alpha}{\alpha^2} \left[\frac{2(1+\alpha)}{1+2\alpha} - \frac{\ln(1+2\alpha)}{\alpha} \right] + \frac{\ln(1+2\alpha)}{2\alpha} - \frac{1+3\alpha}{(1+2\alpha)^2} \right] \quad (\text{A.7})$$

onde $\alpha = h\nu/m_0c^2$.

Vimos que a seção de choque por elétrons $_e\sigma$, pode ser obtida através da integração sobre todos os fótons espalhados, $_e\sigma$ independe de Z logo, $_e\sigma \propto Z^0$, desde que assumindo a energia de ligação dos elétron zero. Assim, a seção de choque (Klein-Nishina) por átomo de um determinado elemento Z , é dada por:

$$_a\sigma = Z \, _e\sigma \quad (\text{A.8})$$

em que σ_a seção de choque por átomo ($cm^2/\text{átomo}$) e $_e\sigma$ seção de choque por elétron.

Verifica-se que a seção de choque atômica não despreza a fraca ligação entre os elétrons e o núcleo. A seção de choque por unidade de massa σ_c/ρ é denominada coeficiente de atenuação Compton, e pode ser obtido de:

$$\frac{\sigma_c}{\rho} = \frac{N_A Z}{A} \, _e\sigma \quad (\text{A.9})$$

onde:

σ_c : espalhamento Compton;

$N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$: número Avogadro;

Z : número de elétrons por átomo;

A : massa atômica (g/mol);

ρ : densidade (g/cm^3);

$N_a Z / A$: número de elétrons por grama do material.

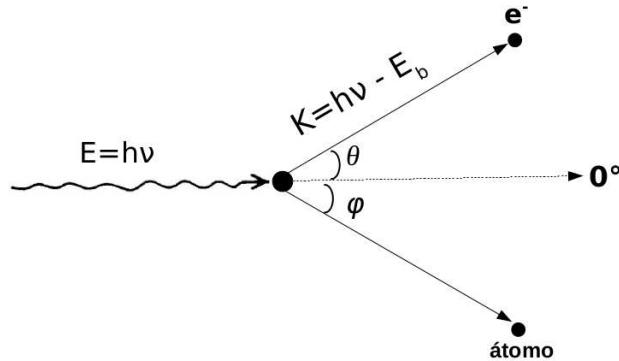
É importante notar que a seção de choque atômica é linearmente proporcional a Z , e o coeficiente de atenuação mássico independe de Z .

A.2 Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é um fenômeno no qual os elétrons são emitidos após a absorção da energia da radiação eletromagnética, como raios X ou luz visível. A energia dos elétrons emitidos, denominados fotoelétrons, não depende da intensidade da radiação incidente mas sim do comprimento de onda de radiação. Como o comprimento de onda é mais curto, os elétrons com maior energia podem ser emitidos. Este efeito é um fenômeno de interação fotônica com a matéria, que envolve baixas energias ($< 100 \text{ KeV}$).

Einstein propôs que a radiação incidente é um quantum (fótons), que tem a energia de $E = h\nu$, e ele assumiu que o efeito fotoelétrico é produzido quando um elétron absorve completamente um fóton, conforme Fig. A.2.

Figura A.2: Efeito fotoelétrico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A energia cinética K que o elétron recebe é igual à energia do fóton incidente menos a energia de ligação do elétron alvo, ou seja, K pode ser representada pela equação:

$$K = h\nu - E_b - K_a, \quad (\text{A.10})$$

$h\nu$ é a energia do fóton incidente; E_b é a energia de ligação eletrônica; K_a é a energia cinética do átomo, $K_a \cong 0$.

$$K = h\nu - E_b. \quad (\text{A.11})$$

A variação do momento fóton é devido à sua energia e velocidade, pois a massa é muito pequena, sendo transferidos para o elétron apenas uma pequena parte. O restante do momento deve ser transferido ao núcleo.

A interação do elétron ocorre a um desvio θ relativo à direção do fóton incidente com momento p . Uma vez que o fóton foi totalmente absorvido não haverá espalhamento auxiliando na conservação do momento, como no caso do efeito Compton. No efeito fotoelétrico este

papel é assumido pelo átomo do qual o elétron foi removido. Embora a energia cinética pode ser desprezada $K_a \cong 0$ o momento do átomo p_a não pode ser desprezado. A direção tomada pelo átomo de recuo é de pouca importância, uma vez que a energia cinética é insignificante. Basta ressaltar que no caso fotoelétrico o átomo espalha na direção necessária para conservar o momento.

Seção de choque para o efeito fotoelétrico

O cálculo da seção de choque para o feito fotoelétrico não é tão simples como o calculado para o efeito Compton, pelo método Klein e Nishina, devido a energia de ligação do elétron. Embora alguns autores tenham reportado soluções satisfatórias confrontando resultados teóricos com experimentais, proposto por Davisson e Evans [123, 124].

A interação da seção de choque por átomo por efeito fotoelétrico ($_a\tau$), integrada sobre todos os ângulos de emissão do fotoelétron, ou seja, a probabilidade de absorção por efeito fotoelétrico, pode ser escrita como:

$$_a\tau = k \frac{Z^n}{(hv)^m} \text{ (cm}^2/\text{átomo)} \quad (\text{A.12})$$

k é uma constante; $n = 4$ e $m = 3$. Esta dependência do efeito fotoelétrico com o número atômico do material é a principal razão para o uso de materiais de alto Z (como o chumbo) em blindagens.

O coeficiente de atenuação mássico ($\tau_m = \tau/\rho$), devido ao efeito fotoelétrico, está relacionado com o número atômico (Z) e a energia hv dos fôtons incidentes, utilizando as Eqs. A.8 e A.9, pode ser escrito na forma:

$$\frac{\tau}{\rho} \propto \frac{Z^3}{(hv)^3} \text{ (cm}^2/\text{atomo).} \quad (\text{A.13})$$

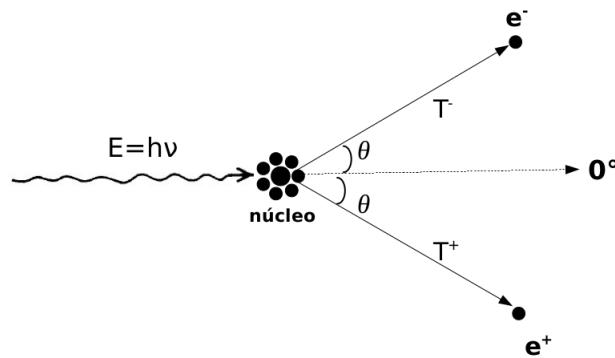
O coeficiente de atenuação mássico devido ao efeito fotoelétrico varia diretamente com a terceira potência do número atômico e inversamente com a terceira potência da energia. Desse modo, a probabilidade de ocorrência para o efeito fotoelétrico aumenta para baixas energias e elevados números atômicos.

É evidente a conservação de energia, pela Eq. A.13 para o efeito fotoelétrico, em que a fração hv é transferida para o fotoelétron, trata-se de uma aproximação. A energia de ligação E_b deve ser levada em conta e parte ou toda é convertida em energia cinética através do efeito Auger.

A.3 Produção de pares

A produção de pares é um processo de absorção em que um fóton (com energia superior a 1,02 MeV) desaparece originando um elétron e um pósitron, devido a interação do fóton com o campo elétrico do núcleo do átomo, conforme Fig. A.3. Quando fótons altamente energéticos se aproximam do núcleo, a transformação de energia em massa pode ocorrer devido ao efeito do campo elétrico do núcleo. Com isso, o fóton é convertido em um par elétron-pósitron com a mesma massa de acordo com a relação $E = mc^2$. Este processo é o inverso do processo de aniquilação de pósitrons (massa é convertida em energia) [122].

Figura A.3: Produção de pares.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um fóton incidente $h\nu$ fornece todo seu quantum de energia para criação do par elétron-pósitron com energia cinética K^- e K^+ . Pela conservação de energia, a equação será:

$$\begin{aligned} h\nu &= 2m_0c^2 + K^- + K^+ \\ h\nu &= 1,022 \text{ MeV} + K^- + K^+ \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

o elétron e o pósitron não recebem necessariamente a mesma quantidade de energia, mas a média da energia cinética é dada por:

$$\bar{K} = \frac{h\nu - 1,022 \text{ MeV}}{2}. \quad (\text{A.15})$$

Para valores de $h\nu$ acima do limiar de energia $2m_0c^2$, ocorre a criação de elétrons e pósitrons, ou seja, a energia é convertida em massa de duas partículas distintas.

Tem-se o coeficiente de atenuação para produção de pares por átomo (${}_a\kappa$) e, o coeficiente de atenuação para produção de pares será:

$$\frac{\kappa}{\rho} = {}_a\kappa \frac{N_A}{A} \quad (\text{cm}^2/\text{g}) \quad (\text{A.16})$$

uma vez que, Z/A é constante e $\kappa/\rho \propto Z$.

A.4 Efeito Rayleigh

O espalhamento Rayleigh é chamado espalhamento coerente devido a combinação de eventos que ocorre no átomo como um todo sem que haja transferência de energia. Quando o fóton incidente é espalhado pelo átomo e muda sua direção, o átomo alvo recua para conservar momento antes e depois do espalhamento. Essa energia de recuo é pequena e pode ser desprezada devido a grande massa atômica. Portanto, o fóton muda sua direção e mantém a mesma energia após o espalhando. Como resultado, nenhuma energia é transferida. O espalhamento coerente, envolve o espalhamento de um fóton sem transferência de energia (espalhamento elástico). O fóton espalhado possui o mesmo comprimento de onda que o fóton incidente. O único efeito é o espalhamento dos fótons com um ângulo pequeno. Este espalhamento tem maior probabilidade de ocorrer em materiais com alto número atômico e fótons de raios X com energias menores que 10 KeV [122]. O coeficiente de atenuação, em unidade de massa, para o espalhamento Rayleigh é dada por:

$$\frac{\sigma_{Ray}}{\rho} \approx \frac{Z}{(h\nu)^2} \quad (cm^2/g \text{ ou } m^2/kg). \quad (\text{A.17})$$

A importância do espalhamento Rayleigh é muito pequena, pois não contribui significativamente para o coeficiente de atenuação.

A.5 Interações fotonucleares

Na interação fotonuclear (fotodesintegração), um fóton energético ($\sim 10 MeV$) é completamente absorvido pelo núcleo que, em seguida emite um próton ou um nêutron (γ, n). Ocorre principalmente em geradores de raios X de alta energia como: acelerador linear, sincrotron, etc, onde elétrons são acelerados e atingem energia de $\sim MeV$. As reações fotonucleares são de

grande preocupação na área da proteção radiológica devido a produção de nêutrons [122].

Para baixos valores de energia $\sim 100 \text{ KeV}$ predomina o efeito fotoelétrico, em qualquer que seja o átomo. A medida que a energia vai aumentando predomina o efeito Compton $\sim 100 \text{ KeV} - 2 \text{ MeV}$, atingindo o valor máximo de 2 MeV . Acima de 2 MeV a energia aumenta assim, o fenômeno de produção de pares será predominante.

A.6 Coeficiente de Atenuação Total

A interação da radiação com a matéria ocorre através de processos físicos como: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. A energia do fóton incidente e o tipo de material atravessado determinará qual a probabilidade de ocorrer um desses processos [125].

O coeficiente de atenuação de um material varia com a energia da radiação (E), mas se considerando um mesmo material, dependerá do seu estado físico ou fase. Divide-se o valor do coeficiente de atenuação pela densidade do material (ρ), tornando-o independente de sua fase. O coeficiente de atenuação pode ser denominado: coeficiente de atenuação em massa ou coeficiente mássico de atenuação ($/\rho$), pode ser expresso como a soma dos coeficientes responsáveis por cada interação, em unidades de cm^2/g ou m^2/kg , como:

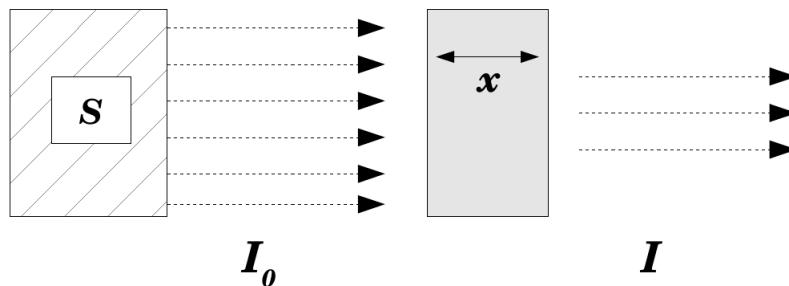
$$\frac{1}{\rho} = \frac{\sigma_{Ray}}{\rho} + \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma_c}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} \quad (\text{A.18})$$

ρ é a densidade do meio atenuador, σ_{Ray} , τ , σ_c e κ são os coeficientes de atenuação linear devido ao espalhamento Rayleigh, efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares, respectivamente.

A atenuação refere-se à redução na intensidade de um feixe (onda eletromagnética) quando atravessa um determinado meio devido ao espalhamento e absorção, que resultam da interação dos fótons com os átomos do meio [126, 127]. Dessa forma, a radiação tem sua intensidade

diminuída (em número de fótons) em função das interações que podem ocorrer de acordo com o material que as absorve, conforme esquema na Fig. A.4.

Figura A.4: Atenuação de um feixe de radiação monoenergético ao atravessar um meio com espessura x e coeficiente de atenuação linear μ oriundos de uma fonte energética S .



Fonte: Elaborada pelo autor.

A atenuação da energia da radiação está subordinada à espessura do material absorvedor e à intensidade do feixe incidente, pois o feixe diminui de intensidade quanto mais espesso for o material atravessado. De outro modo, quanto maior a energia de radiação dos fótons incidentes, maior será a capacidade de penetração aumentando a probabilidade das interações ocorrerem. Dessa forma, a atenuação da energia de radiação ocorre com o decaimento exponencial em função da espessura do material. Considerando um feixe monoenergético de fótons incidentes, a atenuação de radiação (dos fótons) pode ser representada pela equação:

$$I = I_0 e^{-(\mu/\rho)x} \quad (\text{A.19})$$

onde:

- I_0 e I : intensidade do feixe incidente e transmitido ao atravessar o material, respectivamente;
- x : espessura do material;
- ρ : densidade do material;
- μ : coeficiente de atenuação.

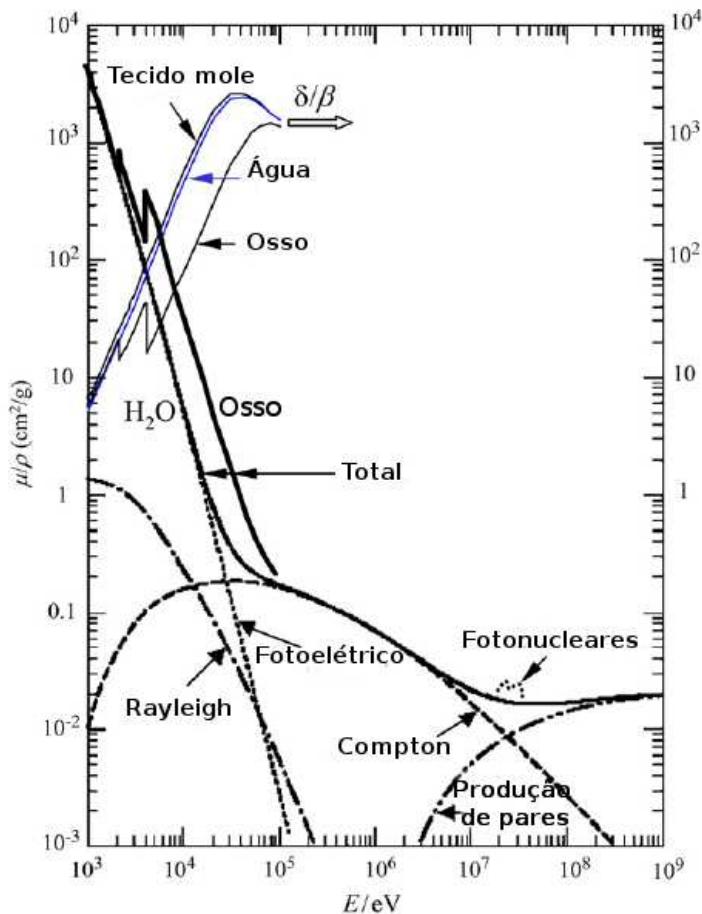
Para o coeficiente de atenuação, a equação pode ser da forma:

$$\mu/\rho = -x^{-1} \ln(I/I_0), \quad (\text{A.20})$$

μ/ρ pode ser obtido a partir dos valores I_0, I e x . Note que para cada um dos processos de interação do feixe de fótons com o meio material, define-se um coeficiente de atenuação parcial de modo que é o coeficiente de atenuação total.

Na Fig. A.5 é possível observar a interação da radiação para diferentes valores de energia e a dependência do coeficiente de atenuação mássico (μ/ρ) dos efeitos de interação para o tecido mole, água e osso [128].

Figura A.5: Dependência da fase para razão do parâmetro do contraste de atenuação: tecido mole, água e osso em interação com raios X (energia de fótons).



Fonte: Shu-Ang Zhou, 2008.

Os coeficientes de atenuação para o tecido mole e o osso são muito próximos da água (H_2O , $Z = 10$). A maior parte do fótons ($\sim 50 \text{ KeV}$) que interage com o tecido mole ($Z \approx 7$) e osso ($Z \approx 20$) sofrem efeito Compton, o efeito fotoelétrico predomina para valores menores que (50 KeV), conforme observado na Fig. A.5.

Interação da radiação com o tecido substituto

A interação da radiação com o tecido substituto deve ser analisada de acordo com as características de densidade de massa do tecido corporal e o substituto equivalente que neste caso, o *phantom* de pulmão. Dessa forma, é importante conhecer as quantidades físicas de interação, para dosimetria (fótons), com o pulmão e, por consequência, obter com sucesso um *phantom* que descreva tais quantidades de interação [18].

Na Tab. A.1 estão descritos os valores da energia (MeV), em interação da radiação com o tecido corporal (pulmão).

Tabela A.1: Interação da radiação (MeV) para o pulmão, de acordo com a ICRU 44.

Energia (MeV)	σ_{Ray}/ρ	τ/ρ	σ_c/ρ	κ/ρ
0,01	$2,26 \times 10^{-2}$	$5,08 \times 10^{-1}$	$1,53 \times 10^{-2}$	0
0,10	$5,27 \times 10^{-4}$	$2,99 \times 10^{-4}$	$1,61 \times 10^{-2}$	0
1,00	$5,55 \times 10^{-6}$	$4,07 \times 10^{-7}$	$7,01 \times 10^{-3}$	0
10,00	$5,55 \times 10^{-8}$	$1,52 \times 10^{-8}$	$1,70 \times 10^{-3}$	$5,02 \times 10^{-4}$
100,00	$5,55 \times 10^{-10}$	$1,37 \times 10^{-9}$	$2,74 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-3}$

No processo de interação da radiação com a matéria ocorre atenuação, ou seja, parte da intensidade de radiação incidente é espalhada e parte é transmitida com menor intensidade, atravessando o meio ou sendo absorvida pelo mesmo. A transmissão da radiação incidente, proporciona a formação da imagem radiográfica, imprimindo no filme as características das diferentes regiões do material que absorvem a radiação da área de interesse.

Atenuação da radiação ionizante

Na dosimetria das radiações ionizantes, dois coeficientes de atenuação adicionais são frequentemente utilizados: coeficiente de transferência (τ_{tr}) na Eq. A.21, e coeficiente de absorção de energia (α_{ab}) na Eq. A.22, onde (\overline{E}_{tr}) é a energia média transferida e (\overline{E}_{ab}) é a energia média absorvida pelo material:

$$\tau_{tr} = \frac{\overline{E}_{tr}}{h\nu} \quad (\text{A.21})$$

$$\alpha_{ab} = \frac{\overline{E}_{ab}}{h\nu}. \quad (\text{A.22})$$

As investigações dos efeitos das radiações assim como as medidas de radiação exigem várias especificações do campo de radiação no ponto de interesse. O estudo da dosimetria das radiações é realizado através do uso de métodos para determinar, de uma maneira quantitativa, a energia depositada em um meio, seja ela radiação diretamente ou indiretamente ionizante.

Exposição

A exposição X é a quantidade de radiação absorvida pelo ar, ou seja, a ionização produzida no ar por fótons. É definida pela quantidade de carga dQ (íons) produzida numa quantidade de massa dm de ar [129]. Denomina-se que, dQ é o valor absoluto da carga total de íons, de um mesmo sinal, produzidos no ar quando todos os elétrons liberados por fótons em um dado volume de ar de massa dm são completamente freados no ar:

$$X = \frac{dQ}{dm}. \quad (\text{A.23})$$

A unidade de exposição expressa no Sistema Internacional é C/kg, mas a unidade especial é o Röntgen (R), que ainda pode ser verificada em alguns equipamentos ($1R = 2,58 \times 10^{-4} C/kg$). A grandeza exposição não é definida para radiações de elétrons, prótons e nêutrons.

A taxa de exposição (\dot{X}) é a quantidade de energia depositada numa determinada massa em um intervalo de tempo ($C/kg.s$), conforme a equação A.24,

$$\dot{X} = \frac{dX}{dt}. \quad (\text{A.24})$$

Kerma

A grandeza kerma foi introduzida para descrever as interações iniciais de fótons em um meio, definida como o quociente de dE_{tr} por dm . Do inglês, Kerma: *Kinetic energy released per unit of mass*; energia cinética transferida por unidade de massa [122, 129] é definida por:

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm} \quad (\text{A.25})$$

na qual dE_{tr} é a soma das energias cinéticas iniciais de todas as partículas ionizantes carregadas, liberadas pela incidência de nêutrons ou fótons em um material de massa dm . A unidade de kerma no SI é o Gray (Gy), ou seja, J/kg. O conceito de kerma está diretamente relacionado com a energia recebida pelas partículas carregadas, normalmente elétrons oriundos de ionização, sendo que estes elétrons podem dissipar essa energia em colisões sucessivas com outros elétrons ou na produção de radiação de freamento (Bremsstrahlung). Dessa forma,

$$K = K_c + K_r; \quad (\text{A.26})$$

K_c - kerma de colisão, quando a energia é dissipada localmente, por ionizações e/ou excitações;
 K_r - kerma de radiação, quando a energia é dissipada longe do local de incidência, por meio de emissão de raios X.

Dose absorvida

A grandeza dose absorvida D (ou simplesmente dose), descreve a quantidade de radiação ionizante cedida à matéria, e é definida para todos os tipos de radiação, incluindo partículas carregadas ou não [122,129]. A definição de dose absorvida (D) é o quociente da energia média $d\bar{E}$ depositada na matéria, por um volume elementar de matéria de massa dm ,

$$D = \frac{d\bar{E}}{dm}; \quad (\text{A.27})$$

a dose absorvida é medida com a mesma unidade de kerma, Gy.

É relevante compreender a diferença conceitual entre kerma e dose absorvida. A dose absorvida reflete a energia média absorvida na região de interação; o kerma expressa a energia total transferida ao material.

Para o controle de qualidade na área do radiodiagnóstico são utilizados objetos simuladores (*phantom*) para padronizar a atenuação e a absorção sofrida por feixes de distintos aparelhos de raios X. Como definido no capítulo 3, o objeto simulador tem a função de reproduzir as características de órgãos ou tecidos, principalmente humanos, em procedimentos dosimétricos de rotina no radiodiagnóstico dessa forma, o objeto simulador pode proporcionar diferentes atenuações do feixe, o que possibilita imagens com áreas distintas de contraste.

A.7 Raios X

O raio X é uma importante ferramenta na área da ciência médica para obtenção de imagens. Sua descoberta foi documentada no fim do século XIX por Wilhelm Conrad Röntgen (1895), físico da Universidade de Würzburg que realizava experiências com raios catódicos e descobriu

uma radiação penetrante, invisível ao olho humano, e que posteriormente foi denominada raios X. Em 1901, Röntgen foi premiado com o Nobel de Física pela descoberta desta radiação [130].

Röntgen observou que os raios que se propagavam em linha reta não eram desviados por um campo eletromagnético, concluiu-se então que não podiam ser partículas carregadas. Descobriu ainda que o raio X podia produzir ionização em qualquer gás. Investigou também se os raios X apresentavam qualquer das propriedades da luz (sem ser a propagação retilínea) porém, seus resultados foram todos negativos. Não encontrou nenhuma propriedade: reflexão nos espelhos, refração no vidro (ou em qualquer outra substância), difração nos retículos e nem polarização pela passagem dos raios através dos cristais.

Somente em 1912 é que a natureza dos raios X foi firmemente estabelecida como onda eletromagnética, por Max von Laue (1879-1960), físico alemão que utilizou um cristal como rede de difração em experimentos de difração de raios X, concluindo que os raios X podiam ser refletidos, refratados, polarizados, difratados e atenuados, assim como a luz, porém com um comprimento de onda muito menor. Com a teoria da dualidade onda-partícula (em 1920), ficou estabelecido que a luz e o raio X apresentavam caráter dual, e foi dado o nome de fóton à partícula associada a onda eletromagnética [131, 132].

Os raios X se tornaram uma valiosa ferramenta na pesquisa médica e industrial, devido à sua capacidade de atravessar materiais densos. Para obtenção de imagens do interior do corpo, os raios X transmitidos através do corpo são os agentes mais utilizados, ora em radiografias convencionais, ora em tomografia computadorizada. O contraste observado nas radiografias, por exemplo entre ossos e músculos, deve-se à diferença na absorção de raios X pelos diferentes tecidos do corpo.

Contemporâneo a este fato, descobriu-se que raios gama emitidos espontaneamente pelos núcleos dos átomos radioativos possuem a mesma natureza física do raio X, ou seja, ambos são ondas eletromagnéticas de alta frequência, maior que a onda da radiação ultravioleta.

A.7.1 Absorção de raios X

Os fótons de um feixe de raios X que atravessam um material, podem ser absorvidos pela matéria e portanto, removidos do feixe, o que torna o mecanismo de absorção uma importante interação da radiação com a matéria. Os processos responsáveis pela absorção de fótons em um material, de um modo geral, são: efeito fotoelétrico; espalhamento Compton e produção de pares (discutidos anteriormente em A). Os raios X possuem energias máximas da ordem de algumas centenas de KeV , dessa forma não podem produzir pares elétron-pósitron (requerem energia da ordem de 1000 KeV) assim, o feixe sofrerá redução por apenas os dois outros processos, sendo que o efeito fotoelétrico é dominante.

Quando os fótons de raios X incidem no material podem ocorrer diversos efeitos, sendo que a principal perda de intensidade de um feixe de raios X utilizados para produção de imagens é por efeito fotoelétrico. A quantidade de intensidade perdida na amostra pode ser medida através do coeficiente de absorção ou coeficiente de atenuação linear (μ) das amostras, conforme demonstrado pela equação A.19 na seção A.6.

A imagem produzida através do método convencional, ou seja, o contraste na imagem, se baseia primordialmente na diferença de absorção para cada região da amostra. Neste tipo de imagem, a amostra é posicionada entre a fonte de raios X e o detector. Com a finalidade de diminuir o ruído nas imagens, utilizam-se grades entre a amostra e o detector, diminuindo o espalhamento provocado pelas ondas ao atravessarem a amostra [133].

Alguns fatores podem influenciar no processo de absorção de raios X, como: características do corpo (espessura, densidade, número atômico), meios de contraste, quilovoltagem, forma de onda de voltagem, filtragem e composição do ponto focal.

A espessura do corpo influencia na absorção de raios X, em termos de dimensão um material maior absorve mais radiação X do que um material menor. No caso da densidade, um material mais denso absorve mais do que um material menos denso (em volume). Elementos com número atômico mais alto, absorvem mais radiação X do que os elementos de baixo número atômico.

Os raios X produzidos a baixas energias ou quilovoltagens (com grande comprimento de onda), são facilmente absorvidos e, os raios X de alta energia ou quilovoltagem (com curto comprimento de onda) penetram nos materiais com maior facilidade, conforme observado na equação A.28.

O organismo humano é uma estrutura complexa constituída não somente de diferentes espessuras mas também de diferentes composições que absorvem os feixes de radiação em graus variáveis. Por exemplo, a densidade óssea é de certa forma maior que a densidade do tecido macio e, o número atômico ósseo é maior do que o do tecido macio, por isso, o osso absorve mais raios X do que o tecido macio. Neste contexto, a idade do indivíduo deve ser considerada na sua influência da absorção, por exemplo: em pessoas idosas os ossos podem ter menor quantidade de cálcio, e por isso apresentam menor absorção de raios X do que em jovens [9].

Considerando, as intensidades de raios X que emergem de uma determinada parte do corpo, a matéria mais absorvente terá uma intensidade de feixe através dessa matéria menor do que uma matéria menos absorvente, já que, uma maior quantidade de feixes atravessará obtendo assim um bom contraste de imagem.

A.7.2 Produção de raios X

Os raios X são produzidos quando elétrons acelerados por um campo elétrico, colidem com um alvo metálico e são desacelerados bruscamente, dessa forma, esses elétrons sofrem espalhamento e redução da energia cinética (devido a atração da carga do núcleo). O choque do feixe de elétrons (que saem do emissor com energia de dezenas de *KeV*, da ordem da energia de ligação) com o alvo produz dois tipos de raios X. Um deles constitui o espectro contínuo, denominado radiação Bremsstrahlung ou radiação de freamento. O outro tipo é o raio X característico do material do alvo [132].

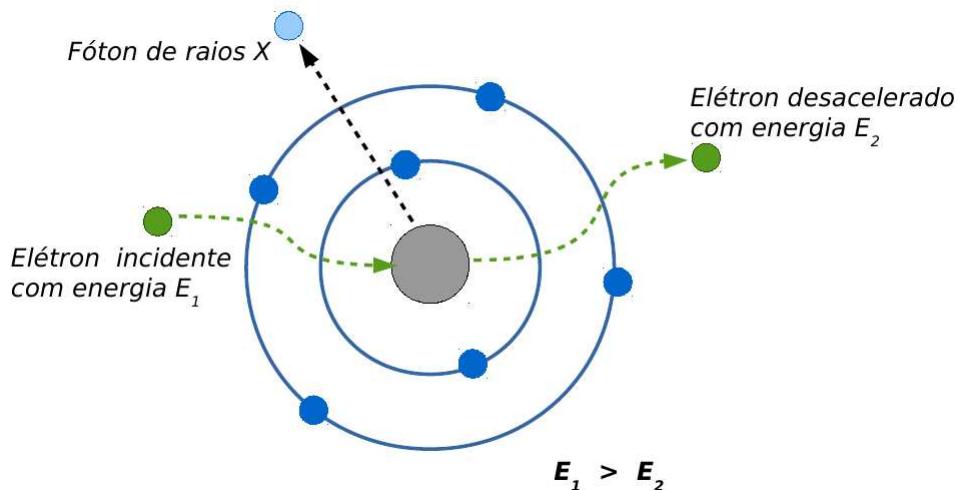
i) Freamento dos feixes de raios X

Numa máquina geradora de raios X, o filamento ao ser aquecido, emite um feixe de elétrons que serão acelerados através de um campo elétrico. Os elétrons são gerados no cátodo, um filamento normalmente formado de metal com alto ponto de fusão (tungstênio ou molibdênio). Uma corrente de alta tensão (quanto maior a tensão aplicada ao tubo, maior será a energia de raios X gerado e maior também o seu poder de penetração) eleva a temperatura do filamento liberando elétrons numa taxa que aumenta com a corrente.

Os elétrons gerados são acelerados devido à alta tensão e encontram o alvo onde sofrem uma brusca desaceleração. Ao serem desacelerados, esses elétrons emitem uma diferença de energia sob a forma de raios X, que são emitidos por uma vasta distribuição de energia. Os raios X emergem do alvo em diversas direções, mas são contidos pelos colimadores para produzir um feixe útil de radiação. O vácuo deve ser mantido no interior da ampola de vidro do tubo de raios X para evitar a interação dos elétrons com o ar.

A dinâmica do processo de raios X de freamento pode ser visualizada na Fig. A.6.

Figura A.6: Raios X de freamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A radiação *Bremsstrahlung*, (do alemão *Bremsen* frear e *Strahlung* radiação), pode obter qualquer energia que dependerá do grau de aproximação elétron-núcleo e da energia cinética do elétron. Assim, a forma do espectro é um espectro contínuo, ou seja, os fótons de raios X produzidos podem obter qualquer energia, desde valores próximos do zero até uma valor máximo $E_{máx}$, que corresponde a toda energia cinética K do elétron ao atingir o alvo, e será dado por:

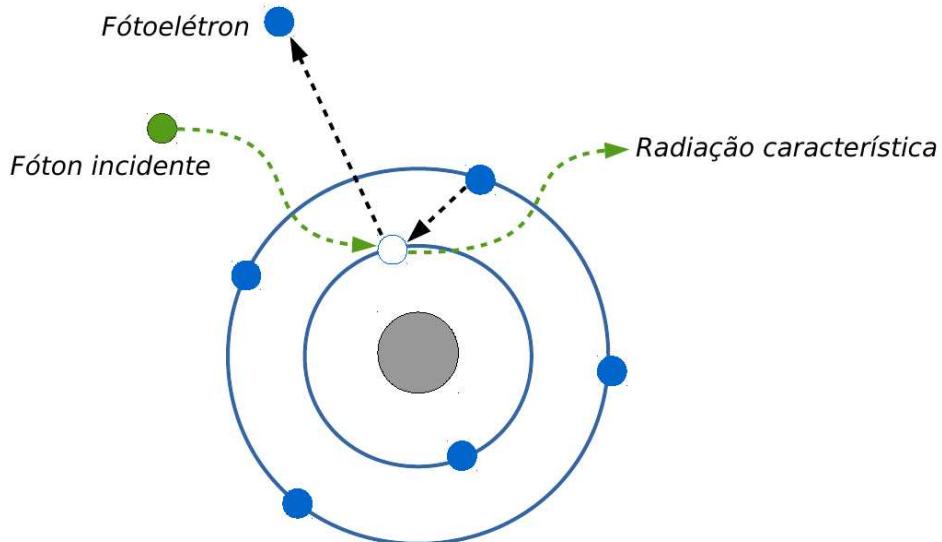
$$K_{(elétron)} = eV = E_{máx} \text{ do fóton} = h\nu_{máx} = \frac{hc}{\lambda_{mín}} \quad (\text{A.28})$$

onde, e é a carga do elétron, V é a diferença de potencial aplicada entre o catodo e o anodo; ν e λ frequência e comprimento de onda da radiação X, respectivamente [1].

ii) Raios X característico

A produção de raios X característico ocorre devido ao processo de remoção de elétrons do átomo, onde surge uma "vaga" na eletrosfera do átomo com uma determinada quantidade de energia, conforme apresentado na Fig. A.7. A vacância originada pelo elétron é imediatamente preenchida por algum elétron de orbitais superiores. O excesso de energia do elétron é liberado por meio de uma radiação eletromagnética, quando este passa de um estado menos ligado (camada mais externa) para outro mais ligado (camada mais interna na estrutura eletrônica), cuja energia é igual à diferença de energia entre o estado inicial e o final.

Figura A.7: Raios X característico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A designação "característico" se deve ao fato dos fótons emitidos serem monoenergéticos e assim, sua energia e intensidade relativa revelam características específicas, que permitem a identificação do elemento de origem assim, cada espectro de raios X é a superposição de um espectro contínuo e de uma série de linhas espectrais características do alvo.

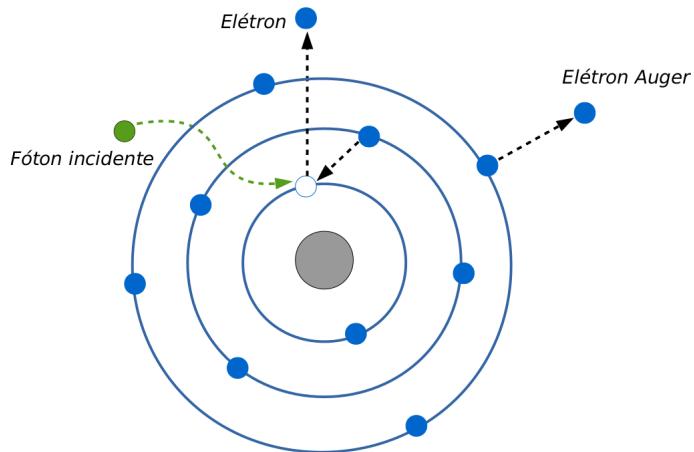
A produção de raios X só ocorre em materiais de número atômico elevado (como o caso do tungstênio). Quando se usa como alvo um material como tungstênio, o bombardeamento por elétrons de alta energia gera uma radiação com características específicas (radiação característica), pois esse material possui um número atômico definido (bastante alto), necessitando um nível alto de energia para retirar os elétrons da camada K .

A.7.3 Elétron Auger

O evento elétron Auger ocorre quando o fóton incidente com energia igual ou maior que o elétron de ligação das camadas K e L é absorvido pelo átomo e um elétron é liberado para se mover no material. Ocorre que, parte da energia do fóton é utilizada para superar a energia de ligação do elétron e a restante é transferida ao elétron que então é ejetado e denominado

fotoelétron (efeito fotoelétrico). Nesse tipo de interação ocorre a completa absorção do fóton e por consequência ele não é espalhado. Após a ejeção do fotoelétron, o átomo apresentará uma vacância que será preenchida por um elétron da camada vizinha que emitirá um fóton na forma de radiação característica, conforme Fig. A.8.

Figura A.8: Efeito Auger.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um elétron que se move da camada l para camada k , não necessariamente emite um fóton, pode ocorrer dessa energia ser transferida a um outro elétron de uma camada mais externa e com menor energia de ligação, este elétron também será ejetado (no caso dois elétrons) e será denominado elétron Auger (francês Pierre Auger 1899-1993). Após a ejeção do elétron Auger, haverá uma nova vacância no átomo que deverá ser preenchida desencadeando novas interações. Este efeito predomina numa faixa de energia relativamente baixa (menor que 100 KeV).

APÊNDICE B – Rocking Curve

A *rocking curve* é a curva de refletividade característica do cristal analisador, é obtida fazendo uma varredura no cristal em torno do ângulo de Bragg, ou seja, ela seleciona, a partir do posicionamento do cristal analisador, os ângulos de espalhamento que o sistema de detecção irá capturar.

Cristais perfeitos são produzidos de muitos planos de átomos formados por células unitárias tridimensionais, estas células unitárias podem assumir diversas formas. O espaçamento entre os átomos na célula unitária é denominado como o espaçamento d . Cada plano de átomos no cristal irá refletir uma parte do feixe incidente, de modo que a intensidade diminua com o aumento da profundidade no cristal [133]. A difração em cristais perfeitos é descrita pela lei de Bragg [134].

Derivada por W.H. Bragg e seu filho W.L. Bragg em 1913, a lei de difração de Bragg explica como superfícies de cristais perfeitos refletem os feixes de raios X incidentes sob certos ângulos de incidência. Para que ocorra espalhamento (interferência construtiva entre as ondas) por um cristal, os átomos devem estar posicionados de modo que as ondas espalhadas pelos átomos estejam em fase, esta interferência construtiva deve seguir a Lei de Bragg [135], segundo a equação:

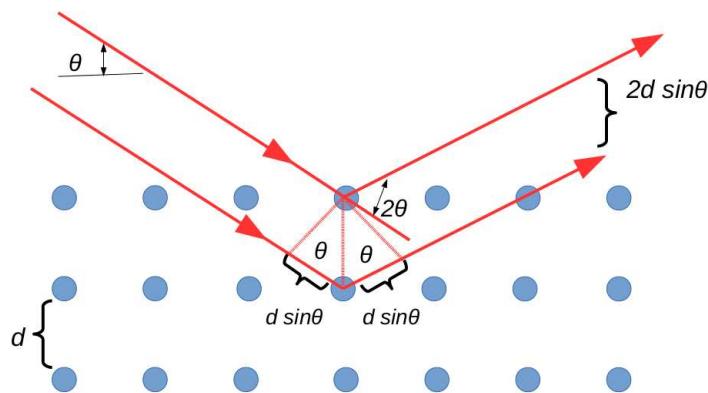
$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{B.1})$$

em que, λ é o comprimento de onda do feixe de raio X incidente, θ é o ângulo de incidência, d é o espaçamento entre os planos de átomos e $n = 1, 2, 3, \dots$ é um inteiro representando a

ordem da reflexão (para [111] - refletividade n=1; para [333] - refletividade n=3).

A condição de Bragg tornou possível observar que a periodicidade do cristal faz com que haja planos de átomos separados por uma distância fixa nas diferentes direções do espaço, conforme apresentado na Fig. B.1.

Figura B.1: Difração de raios X



Fonte: Elaborada pelo autor.

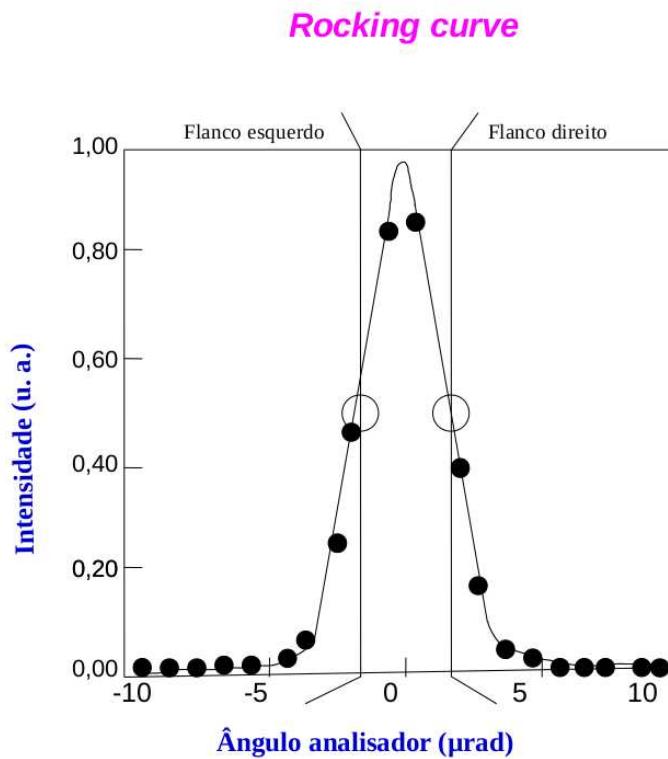
A difração de Bragg ocorre quando a radiação eletromagnética ou ondas de matéria de comprimento de onda comparável à distância entre dois planos de átomos, é refletida espacialmente por planos consecutivos. Rigorosamente, duas ondas que incidam em fase num cristal em um dado ângulo serão fortemente difratadas quando a diferença de caminho óptico for um múltiplo inteiro do comprimento de onda ($n\lambda$), o que significa que elas emergirão do cristal em fase criando assim uma interferência construtiva.

A lei de Bragg está relacionada ao espalhamento de ondas quando incidem em um cristal, ou seja, é a condição para que uma radiação com comprimento de onda λ (ou múltiplo inteiro) incide com um ângulo θ sobre um cristal com distância planar d , tenha interferência construtiva, devido aos efeitos difrativos observados por esta interação.

A *Rocking Curve (RC)* corresponde à curva de refletividade característica de um material cristalino, que varia fortemente com o ângulo quando este varia alguns micro radianos (μrad), a inclinação desta curva converte efetivamente a mudança de fase do raio X e as mudanças angulares resultantes em variações de intensidade [136].

Quando o cristal analisador é ajustado em relação à curva de refletividade do monocromador somente os raios X que estiverem dentro da faixa de aceitação angular do cristal analisador serão refletidos sobre o detector de imagens. Um esquema da *rocking curve* pode ser visualizado na Fig. B.2.

Figura B.2: Esquema da *Rocking Curve*, as posições de flanco esquerdo e direito correspondem a 50% da intensidade máxima.



Fonte: Elaborada pelo autor.

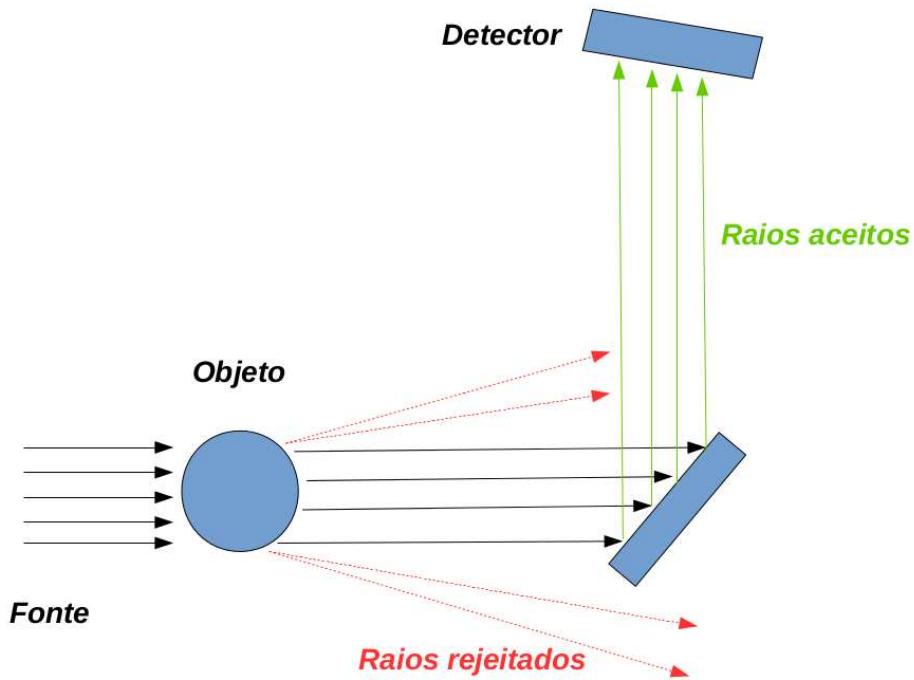
Alterando o ângulo do cristal analisador é possível registrar diferentes ângulos de refração, tornando possível extrair as componentes de fase e absorção de um pequeno número de imagens. A estreita largura da *rocking curve* do cristal analisador representa um mecanismo

eficiente para rejeitar os raios X espalhados a ângulos fora desta largura.

A largura da curva de difração-reflexão do cristal analisador e a escolha do ponto de trabalho desta curva são os fatores decisivos que aumentam a sensibilidade do método, o contraste da imagem formada, sua adequação com o objeto real e a taxa de sua aquisição.

Na técnica de imagem de raios X de alta resolução (DEI) utiliza-se a curva de refletividade (*rocking curve*) para selecionar através do posicionamento do cristal analisador, qual é o ângulo de espalhamento que o sistema de detecção irá capturar. Dessa forma, as imagens podem ser obtidas em função da posição na *rocking curve*, conforme apresentado na Fig. B.3.

Figura B.3: Esquema de um cristal analisador.



Fonte: Elaborada pelo autor.

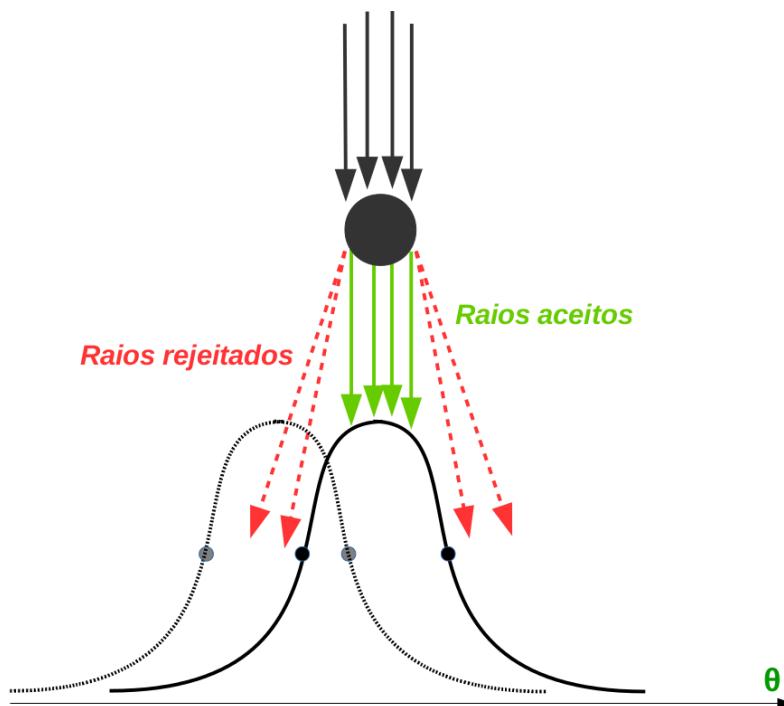
Caso o sistema seja posicionado no ponto de máxima intensidade de difração da curva, ou seja, os raios que não sofreram desvios na amostra serão difratados com o máximo de intensidade pelo cristal analisador, acarretando numa imagem de pura absorção ou também chamada

de imagem por extinção, isto é, os fótons espalhados não chegarão ao detector.

Se o cristal analisador for colocado numa posição de flanco na RC os feixes serão difratados pelo cristal analisador com intensidade reduzida então, a imagem obtida será composta dos feixes espalhados naquele ângulo selecionado. Caso os feixes sejam desviados a ângulos mais distantes do topo da RC, a refletividade do cristal diminui, diminuindo também a intensidade com que eles foram difratados.

O cristal analisador é ajustado para um dos flancos pois, os raios que antes estavam sendo difratados com o máximo de refletividade na amostra (não foram desviados), agora serão refletidos com refletividade mais baixa. Nesta nova posição, os feixes refratados possuem sua intensidade aumentada (flanco direito) ou diminuída (flanco esquerdo) dependendo da escolha da posição do cristal analisador em relação à posição na curva de difração, conforme Fig. B.4.

Figura B.4: Posicionamento do analisador para um flanco à esquerda.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao se ajustar a curva para FWHM em flanco direito, por exemplo, os feixes que antes eram refletidos com o máximo de intensidade, agora apresentarão intensidade reduzida (refletividade) pela metade. Os raios que antes do deslocamento da curva, estavam sendo refratados com in-

tensidade da refletividade reduzida pela metade, agora serão ajustados para o topo da curva com o máximo de intensidade. Similarmente ocorre quando a curva de refletividade é posicionada para FWHM em flanco esquerdo, agora os feixes com máximo de intensidade serão aqueles que eram refratados com ângulos para a esquerda da curva de difração.

Os feixes que sofreram desvios maiores que a largura da RC não satisfazem a condição de difração, dessa forma, o cristal analisador pondera a intensidade desses feixes para zero. Isto ocorre principalmente em regiões de interface de tecidos onde há uma variação do índice de refração. Portanto, estas regiões podem ser visualizadas com maior nitidez devido ao alto contraste formado. Esta forma é comumente utilizada para se obter realces em objetos que apesar de apresentarem baixa atenuação para os feixes transmitidos, podem ter alto espalhamento em algumas posições como por exemplo, interfaces ou bordas.

iv: Aquisição das imagens DEI: absorção, espalhamento e refração

Sabe-se que a finalidade do cristal analisador é selecionar o feixe de raios X refratado após interagir com a amostra. Dessa forma, os fótons desviados podem ser detectados separadamente daqueles que foram simplesmente transmitidos pela amostra diante de diferentes posicionamentos angulares do cristal. A técnica de raios X de alta resolução proporciona três imagens do objeto que descrevem separadamente os efeitos de refração, atenuação e espalhamento (extinção) [137–139].

Comparado com o contraste absorção na radiografia convencional, os dois mecanismos de contraste adicionais de refração e espalhamento permitem a visualização de mais recursos em objetos. O ângulo de refração representa a projeção da densidade de massa ($\bar{\rho}t$) do objeto, a absorção mede a projeção do coeficiente de atenuação (\bar{t}) do objeto. A propriedade de absorção de raios X de um elemento é definida como coeficiente de atenuação de massa ($/\rho$), que neste caso requer o conhecimento da composição e da densidade do material.

Utilizando um método simples de integral, é possível demonstrar que a densidade de massa

$(\bar{\rho}t)$ da imagem, pode ser obtida a partir da imagem do ângulo de refração. A questão é desenvolver uma combinação de imagens dividindo estas duas imagens para criar uma imagem $(\bar{\rho}t)$. O $\bar{\rho}t$ é uma propriedade fundamental do material e, portanto, útil para identificar a composição do objeto, ou seja, a imagem obtida de $\bar{\rho}t$ a partir dos feixes de raios X, identifica a composição dos elementos ao longo do percurso de feixe. Este método apresenta um novo tipo de espectroscopia com base na radiografia [140].

A projeção das imagens de absorção (coeficiente de atenuação) e refração (densidade de massa), podem ser expressas como:

$$\begin{aligned}\bar{t} &= \sum_{i=1}^N \frac{1}{\rho_i} \rho_i t_i \\ \bar{\rho}t &= \sum_{i=1}^N \rho_i t_i,\end{aligned}\tag{B.2}$$

para N diferentes materiais, a soma pode ser substituída pela integral se o material for composto por uma distribuição contínua de materiais. Para simplificar, assumiremos uma distribuição discreta de materiais. Expressando a razão, tem-se:

$$\frac{\bar{t}}{\bar{\rho}t} = \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{\rho}/\rho_i) \rho_i t_i}{\sum_{i=1}^N \rho_i t_i}.\tag{B.3}$$

Esta propriedade é determinada em pixel da seção transversal de área A, assim:

$$\frac{\bar{t}}{\bar{\rho}t} = \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{\rho}/\rho_i) \rho_i t_i \cdot A}{\sum_{i=1}^N \rho_i t_i \cdot A} = \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{\rho}/\rho_i) m_j}{M} = \sum_{i=1}^N \frac{\bar{\rho}}{\rho} f_i,\tag{B.4}$$

onde M é a massa total projetada em pixels da área de seção transversal através do objeto, m_i

é a massa de cada componente do material e f_i é a fração de massa do i -ésimo componente. O último resultado recorda facilmente a equação para determinar o coeficiente de atenuação de mássico para um material de vários componentes.

Este método de determinar a absorção e densidade projetada, usando o método DEI ou vários métodos de imagem, apresenta uma oportunidade única para explorar combinações de imagens de refração e de absorção, especificamente para determinar a imagem ($/\rho$).

Imagens de absorção

A imagem absorção é uma projeção das propriedades atenuantes de todos os materiais ao longo do caminho do raio X. A média do coeficiente de atenuação linear de um material que varia espacialmente por meio de uma espessura fixa t dentro de um pixel de x_i, z_j pode ser descrita:

$$\overline{(x_i, z_j)t} = \int_0^t (x_i, z_j, y) dy, \quad (\text{B.5})$$

na qual (x_i, z_j, y) é o coeficiente de atenuação linear para a localização do pixel x_i, z_j , como função da trajetória do feixe de raios X, y . A integral é realizada através da espessura do objeto, t . O valor de $\overline{(x_i, z_j)t}$ pode ser obtido a partir de qualquer radiografia convencional ou DEI, como:

$$\overline{(x_i, z_j)t} = -\ln \frac{I(x_i, z_j)}{I_0}, \quad (\text{B.6})$$

na qual $I(x_i, z_j)$ é a intensidade medida em pixels x_i, z_j e I_0 é a intensidade incidente sobre a primeira superfície do objeto (assumido como sendo uniforme e caracterizado por um único valor).

Imagens de refração

O ângulo de refração da imagem DEI é a medida do gradiente da densidade projetada do objeto e pode ser expresso como [129]:

$$\Delta\theta(x_i, z_j) = K_e \frac{\partial}{\partial z} \int_0^t \rho_e(x_i, z_j, y) dy \equiv K_e \frac{\partial}{\partial z} \overline{\rho_e(x_i, z_j)t}, \quad (\text{B.7})$$

onde $K_e = r_e \lambda^2 / 2\pi$, r_e é o raio clássico do elétron ($2,82 \times 10^{-15} m$), λ é o comprimento de onda do raio X e t é a espessura do objeto. A quantidade $\rho_e(x_i, z_j)t$ é a densidade média de elétrons ao longo da espessura t .

Integrando a Eq. B.7 na direção z , obtém-se a imagem da densidade eletrônica, B.8,

$$\begin{aligned} \overline{\rho_e(x_i, z_j)t} &= \rho_e(x_i, z_0)t + \sum_{l=0}^j \frac{z_{pix}}{K_e} \Delta\theta(x_i, z_j) \\ \overline{\rho_e(x_i, z_j)t} &= \rho_e(x_i, z_0)t + \sum_{l=0}^j \frac{z_{pix}}{K_e} K_e \frac{\partial}{\partial z} \int_0^t \rho_e(x_i, z_j, y) dy, \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

em que z_{pix} é a dimensão linear do detector (em pixel) na direção z e é um resultado do processo (integração) de soma. O primeiro termo é a constante de integração, o segundo termo é a mudança na densidade eletrônica da integração começando ponto ($l = 0$). Assim, o método requer o conhecimento da densidade de elétrons no ponto de partida da integração.

Uma vez que esta imagem é o resultado de um somatório da borda, existem algumas limitações em sua aplicação. Primeiro, aplica-se melhor quando a borda da região do campo de

imagem se estende para além do objeto de modo que uma região conhecida pode ser usada para determinar a constante de integração. Segundo, as somas são realizadas ao longo da coluna z da imagem, esta soma sofrerá ruído devido às flutuações estatísticas no ângulo de refração da imagem.

Comparando as equações B.5 e B.8, é evidente que os resultados em relação a uma imagem, estão relacionados com a absorção por unidade de densidade eletrônica (semelhante a μ/ρ),

$$\frac{\overline{(x_i, z_j)t}}{\overline{\rho_e(x_i, z_j)t}} = \frac{\int_0^t (x_i, z_j, y) dy}{\rho_e(x_i, z_0)t + \sum_{l=0}^j (z_{pix}/K_e) K_e(\partial/\partial z) \int_0^t (x_i, z_j, y) dy}. \quad (\text{B.9})$$

A razão representa a imagem da seção transversal de atenuação dimensionada para densidade eletrônica e , portanto é a média (por elétrons) da atenuação da seção transversal. Embora a representação para a absorção na Eq. B.9 é mais natural, também é comum utilizar a representação μ/ρ onde ρ é a densidade de massa do material. A fração μ/ρ tem sido estudada e, elementos e compostos classificados para valores μ/ρ para diferentes energias de raios X. A Eq. B.9 pode ser reescrita como:

$$\frac{\overline{(x_i, z_j)t}}{\overline{\rho_e(x_i, z_j)t}} = \frac{\overline{(x_i, z_j)t}}{(\bar{Z}/A)^{-1} u \overline{\rho_e(x_i, z_j)t}} \quad (\text{B.10})$$

$$\frac{\overline{(x_i, z_j)t}}{\overline{\rho_e(x_i, z_j)t}} = \frac{\int_0^t (x_i, z_j, y) dy}{(\bar{Z}/A)^{-1} u [\rho_e(x_i, z_0)t + \sum_{l=0}^j (z_{pix}/K_e) K_e(\partial/\partial z) \int_0^t (x_i, z_j, y) dy]}, \quad (\text{B.11})$$

onde (\bar{Z}/A) é a razão da média de Z para A para um material, que pode ser aproximadamente de $1/2$ para valores medianos de Z e elementos superiores a Z , u é a massa do núcleon ($1,67 \times 10^{-27}$ kg).

A Eq. B.11 pode ser utilizada para converter as imagens de atenuação e refração em com-

posições de imagens de projeção a partir de DEI. Especificamente,

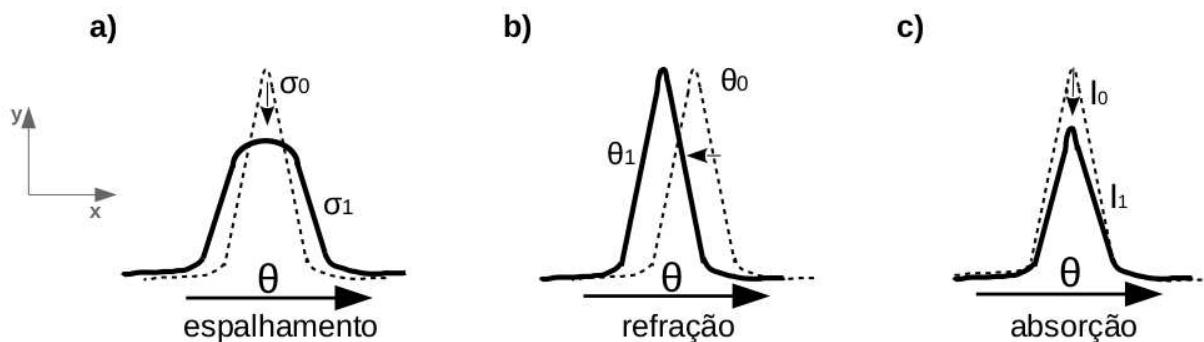
$$\frac{\overline{(x_i, z_j)t}}{\rho_e(x_i, z_j)t} = \frac{-\ln(I(x_i, z_j)/I_0)}{(\bar{Z}/A)^{-1}u [\rho_e(x_i, z_0)t + \sum_{l=0}^j (z_{pix}/K_e)\Delta\theta(x_i, z_j)]}. \quad (\text{B.12})$$

Caso o analisador seja posicionado no topo da curva de refletividade, outra imagem pode ser obtida observando os efeitos de espalhamento a baixo ângulo. De fato, esta imagem ainda possui alguns efeitos devido ao índice de refração e atenuação, porém devido aos procedimentos de soma e subtração das imagens não sofre acréscimo de ruído.

A posição da *rocking curve* influencia fortemente na contribuição de cada mecanismo de contraste. Com o cristal analisador posicionado no pico da curva, o feixe incidente é totalmente refletido e o contraste da imagem baseia-se predominantemente na absorção do feixe de raios X. Qualquer mudança na direção de propagação dos raios X por meio de refração ou espalhamento resulta na diminuição da intensidade. A refletividade máxima ocorre no pico da RC, onde o contraste de imagem é obtido pela absorção, refração e espalhamento.

Através das diferentes posições angulares da RC, DEI permite explorar as imagens obtidas através dos efeitos de espalhamento (Fig. B.5a), refração (Fig. B.5b) e absorção (Fig. B.5c).

Figura B.5: *Rocking Curve* do cristal analisador, com as posições angulares nas quais as imagens são adquiridas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analizando as diferentes posições angulares na RC, o efeito de espalhamento apresentará um pico mais alargado na RC σ_1 em relação à curva de calibração σ_0 (Fig. B.5a). O efeito de refração será observado quando a RC deslocar de θ_0 para θ_1 em relação à sua posição (Fig. B.5b). No efeito de absorção a RC apresentará um pico mais estreito de I_0 para I_1 (Fig. B.5c).

O efeito do índice de refração é direcional, enquanto que o espalhamento a baixo ângulo é simétrico acima e abaixo do plano. Essa diferença permite que esses efeitos sejam separados um do outro através da aquisição de imagens do objeto para pontos simétricos da *Rocking Curve*. O índice de refração pode ser separado completamente dos efeitos de espalhamento a baixo ângulo pela subtração das imagens de alta e baixo ângulo com um fator de normalização apropriado [136]. Separadamente o espalhamento ocorre no pico da curva e a refração de raios X diminuirá de intensidade independente da direção da refração, acarretando numa imagem de aparente absorção.

Referências Bibliográficas

- [1] Emico Okuno e Elisabeth Mateus Yoshimura. *Física das radiações*. São Paulo: Oficina de textos, 2010.
- [2] David S. Gierada; Shahin Hakimian; Richard M. Slone and Roger D. Yusen. Mr analysis of lung volume and thoracic dimensions in patients with emphysema before and after lung volume reduction surgery. *AJR*, 170(3):707–714, 1998.
- [3] Ruijiang Li; John H. Lewis; Xun Jia; Xuejun Gu; Michael Folkerts; Chunhua Men; William Y. Song and Steve B. Jiang. 3 D tumor localization through real-time volumetric x-ray imaging for lung cancer radiotherapy. *Med. Phys.*, 38(5):2783–2794, 2011.
- [4] Levitzky M.G. *Pulmonary Physiology*. New York. McGraw Hill, 7 edition, 2007.
- [5] Buckler A. J.; Mozley P. D.; Schwartz L.; Petrick N.; McNitt-Gray M.; Fenimore C.; O'Donnell K.; Hayes W.; Kim H. J.; Clarke L. and Sullivan D. Volumetric ct in lung cancer: An example for the qualification of imaging as a biomarker. *Acad Radiol*, 17(1):107–115, 2010.
- [6] E. Osmanagic; A. L. Sukstanskii; J. D. Quirk; J. C. Woods; R. A. Pierce; M. S. Conradi; E. R. Weibel and D. A. Yablonskiy. Quantitative assessment of lung microstructure in healthy mice using an MR-based ³He lung morphometry technique. *J Appl Physiol*, 109(6):1592–1599, 2010.
- [7] Rivera-Garcia; White C. S. and Templeton P. A. Lung cancer: value of various imaging modalities. *Clinical Lung cancer*, 1(2):130–136, 1999.
- [8] Qiaoli Li and Jouni Uitto. Mineralization/anti-mineralization networks in the skin and vascular connective tissues. *The American Journal of Pathology*, 183(1):10–18, 2013.
- [9] Elisabeth Mateus Yoshimura. Radiation physics: interaction of radiation with matter. *Revista Brasileira de Física Médica*, 3(1):57–67, 2009.
- [10] Adolf Friedrich Fercher. Optical coherence tomography - development, principles, applications. *Z. Med. Phys.*, 20(4):251–276, 2010.
- [11] Nicolas D. Prionas; Shonket Ray and John M. Boone. Volume assessment accuracy in computed tomography: a phantom study. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 11(2):1–9, 2010.
- [12] U. Sukiowsk; F. Schubert; D. Grosenick and H. Rinneberg. Preparation of solid phantoms with defined scattering and absorption properties for optical tomography. *Phys Med Biol*, 41(9):1823–1844, 1996.

- [13] A.H. Ng; K.H. Ng; H. Dharmendra and A.C. Perkins. A low-cost phantom for simple routine testing of single photon emission computed tomography (SPECT) cameras. *Applied Radiation and Isotopes*, 67(10):1864–1868, 2009.
- [14] C. B. Chiarot; J. H. Siewerdsen; T. Haycocks; D. J. Moseley and D. A. Jaffray. An innovative phantom for quantitative and qualitative investigation of advanced X-ray imaging technologies. *Physics in Medicine and Biology*, 50(21):287–297, 2005.
- [15] Rojano Kashani; Kwok Lam; Dale Litzenberg and James Balter. A deformable phantom for dynamic modeling in radiation therapy. *Med. Phys.*, 34(1):199–201, 2007.
- [16] Jeremy C. Hebden; Ben D. Price; Adam P. Gibson and Gary Royle. A soft deformable tissue-equivalent phantom for diffuse optical tomography. *Phys. Med. Biol.*, 7(51):5581–5590, 2006.
- [17] Karthik Krishnan; Luis Ibanez; Wesley D. Turner; Julien Jomier and Ricardo S. Avila. An open-source toolkit for the volumetric measurement of CT lung lesions. *OSA*, 18(14):15256–15266, 2010.
- [18] International Commission on Radiation Units and Measurements. *Tissue substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement*. ICRU Report 44, 1989.
- [19] Arthur Soares Souza Jr.; César de Araújo Neto; Dany Jasinovodolinsky; Édson Marchiori; Jorge Kavakama; Klaus L. Irion; Luiz Felipe Nobre; Marcelo Funari; Marcelo Chaves; Mário Terra Filho e Pedro Dalstro. Terminologia para a descrição de tomografia computadorizada do tórax. *Radiologia Brasileira*, 35(2):1–5, 2002.
- [20] E. Pisano; R. Johnson; D. Chapman; J. Geraarts M. Iacobca; C. Livasy; D. Washburn D. Sayers; Z. Zhong; M. Kiss and W. Thomlinson. Human breast cancer specimens: Diffraction enhanced imaging with histologic correlation-improved conspicuity of lesion detail compared to digital radiography. *Radiology*, 214(1):895–901, 2000.
- [21] J. Keryläinen; M. Fernández; S. Fiedler; A. Bravin; M. Karjalainen-Lindsberg; P. Virkkunen; E. Elo; M. Tenhunen; P. Suortti and W. Thomlinson. Visualization of calcifications and thin collagen strands in human breast tumour specimens by the diffraction-enhanced imaging technique: a comparison with conventional mammography and histology. *European Journal of Radiology*, 53(1):226–237, 2005.
- [22] S. Fiedler; A. Bravin; J. Keyrilainen; M. Fernandez; P. Suortti; W. Thomlinson; M. Tenhunen; P. Virkkunen M. and Karjalainen-Lindsberg. Imaging lobular breast carcinoma: comparison of synchrotron radiation DEI-CT technique with clinical CT, mammography and histology. *Physics in Medicine and Biology*, 49(2):175–188, 2004.
- [23] Bruce M. Koeppen and Bruce A. Stanton. *Berne and Levy Physiology*. Rio de Janeiro, 6 edition, 2009.
- [24] Marcelo Souto Nacif; Alair Augusto S. M. D. Dos Santos e Edson Rubio Marchiori. *Aparelho Respiratório*. Radiologia e Diagnóstico por Imagem, 2004.

- [25] P. A. de Jong; F. R. Long; J. C. Wong; P. J. Merkus; H. A. Tiddens; J. C. Hogg and H. O. Coxson. Computed tomographic estimation of lung dimensions throughout the growth period. *European Respiratory Journal*, 27(2):261–267, 2006.
- [26] Frank H. Netter. *Atlas de Anatomia Humana*. Porto Alegre. Artmed, 2 edition, 2000.
- [27] Samuel Schurch; Martin Lee and Peter Gehr. Pulmonary surfactant: Surface properties and function of alveolar and airway surfactant. *Pure and Appl. Chem.*, 64(11):1745–1750, 1992.
- [28] Sami I. Said; Mary Ellen Avery; Ronald K. Davis; Chandra M. Banerjee and M. El-Gohary. Pulmonary surface activity in induced pulmonary edema. *Journal of Clinical Investigation*, 44(3):458–464, 1965.
- [29] Mountain C. F. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 111(6):1710–1717, 1997.
- [30] Raul Lopes Ruiz Júnior; Lídia Raquel de Carvalho and Antonio José Maria Cataneo. Compensatory lung growth: protein, DNA and RNA lung contents in undernourished trilobectomized rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20(3):219–224, 2005.
- [31] International Commission on Radiation Units and Measurements. *Tissues Substitutes, Phantoms and Computation Modelling in Medical Ultrassounds*. ICRU Report 61, 1999.
- [32] Jina Chang; Tae-Suk Suh and Dong-Soo Lee. Development of a deformable lung phantom for the evaluation of deformable registration. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 11(1):281–286, 2010.
- [33] Rafaela A.D. Cerqueira; Ana F. Maia; Bruno M. Conceição; Carlos H.C. Teixeira; Cleber D. Mota and Tania M.A. Rodriguez. Development of an anthropomorphic thorax phantom for image quality control measurements in diagnostic radiology. *Revista Brasileira de Física Médica*, 4(3):3942, 2011.
- [34] Sompol Permpongkosol; Theresa L. Nicol; Richard E. Link; Loannis Varkarakis; Hema Khurana; Qihui Jim Zhai; Louis R. Kavoussi and Stephen B. Solomon. Differences in ablation size in porcine kidney, liver, and lung after cryoablation using the same ablation protocol. *AJR*, 188(4):1028–1032, 2007.
- [35] G. A. Sandison; E. Papiez; C. Bloch and J. Morphis. Phantom assessment of lung dose from proton arc therapy. *Radiation Oncology Biol. Phys.*, 38(4):891–897, 1997.
- [36] G. Gambarini; E. Vanossi; G. Bartesaghi; M. Carrara; M. Mariani; A. Negri; J. Burian; L. Viererbl; V. Klupak and J. Rejchrt. Dose imaging in a thorax phantom with lung-equivalent volume at the epithermal neutron beam of LVR-15 reactor. *Apradiso*, 67:S214–S217, 2009.
- [37] T. Luque; E. Melo; E. Garreta; J. Cortiella; J. Nichols; R. Farré and D. Navajas. Local micromechanical properties of decellularized lung scaffolds measured with atomic force microscopy. *Acta Biomaterialia*, 9(6):6852–6859, 2013.

- [38] Marios A. Gavrielides; Lisa M. Kinnard; Kyle J. Myers; Jennifer Peregoy; William F. Pritchard; Rongping Zeng; Juan Esparza; John Karanian and Nicholas Petrick. A resource for the assessment of lung nodule size estimation methods: database of thoracic CT scans of an anthropomorphic phantom. *Optics Express*, 18(14):15244–15255, 2010.
- [39] International Commission on Radiation Units and Measurements. *Phantom and Computational Models in Therapy, Diagnosis and Protection*. ICRU Report 48, 1992.
- [40] George C. Lee and Andrew Franku. Elasticity properties of lung parenchyma derived from experimental distortion data. *BioPhysical Journal*, 15(5):481–493, 1975.
- [41] Seyed Fakhreddin Hosseini; Masoud Rezaei; Mojgan Zandi and Farhid Farahmand Ghavi. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4):1490–1495, 2013.
- [42] Qizhi Chen; Shuling Liang and George A. Thouas. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Science Direct*, 38(3-4):584–671, 2013.
- [43] Ratner B.D.; Hoffman A.S.; Schoen F.J. and Lemons J.E. *An Introduction to Materials in Medicine*. Biomaterials Science, 2 edition, 2004.
- [44] Joseph D. Bronzino. *Biomedical Engineering Fundamentals*. CRC Press, 3 edition, 1987.
- [45] Jiao Yu; Keisuke Takanari; Yi Hong; Kee-Won Lee; Nicholas J. Amoroso; Yadong Wang; William R. Wagner and Kang Kim. Non-invasive characterization of polyurethane-based tissue constructs in a rat abdominal repair model using high frequency ultrasound elasticity imaging . *Biomaterials*, (34):2701–2709, 2013.
- [46] Fergal J. O'Brien. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Science Direct*, (14):88–95, 2011.
- [47] Forrest M. Kievit; Stephen J. Florkzyk; Matthew Leung; Omid Veiseh; James O. Park; Mary L. Disis and Miqin Zhang. Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. *Biomaterials*, 31(22):5903–5910, 2010.
- [48] M. Dash; F. Chiellini; R.M. Ottenbrite and E. Chiellini. Chitosan: A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8):981–1014, 2011.
- [49] Peter Atkins e Loretta Jones. *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. Porto Alegre - RS: Bookman, 3 edition, 2006.
- [50] Jen Ming Yang and Hsien Chih Chiu. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/ chitosan blended membrane for alkaline direct methanol fuel cells. *Journal of Membrane Science*, 419-420:65–71, 2012.
- [51] Mathew Peter; Nitya Ganesh; N. Selvamurugan; S. V. Nair; T. Furuike; H. Tamura and R. Jayakumar. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3):687–694, 2010.

- [52] S. A. Chaves; D. C. Bezerra; M. V. Lia Fook; A. C. F. M. Costa e V. V. C. Azevedo. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2(3):27–34, 2007.
- [53] Miranda S. C.; Silva G. A.; Hell R. C.; Martins M. D.; Alves J. B. and Goes A. M. Three-dimensional culture of rat bmmscs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Arch Oral Biol.*, 56(1):1–15, 2011.
- [54] K.C. Basavaraj; T. Damappa and S. K. Rai. Preparation of chitosan and its miscibility studies with gelatin using viscosity, ultrasonic and refractive index. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 2006.
- [55] Zakhem E.; Raghavan S.; Gilmont R. R. and Bitar K. N. Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials*, 19(33):4810–4817, 2012.
- [56] Suh J.K. and Matthew H.W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, (24):2589–2598, 2000.
- [57] M. C. Gómez-Guillén; B. Giménez; M. E. López-Caballero and M. P. Montero. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8):1813–1827, 2011.
- [58] Nosal W. H.; Thompson D. W.; Yan L.; Sarkar S.; Subramanian A. and Woollam J. A. Uv-vis-infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 43(3-4):131–137, 2005.
- [59] Marguerite Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polim. Science*, 31(7):603–632, 2006.
- [60] Prashant Agrawal; Gustav J. Strijkers and Klaas Nicolay. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1):42–58, 2010.
- [61] Dinesh K. Singh and Alok R. Ray. Characterization of grafted chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, (36):251–255, 1998.
- [62] Chien-Yang Hsieh; Sung-Pei Tsai; Da-Ming Wang; Yaw-Nan Chang and Hsyue-Jen Hsieh. Preparation of gamma-pga/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials*, (28):5617–5623, 2005.
- [63] Aleksandra Balicka Ramisz; Anna Wojtasz-Pajak; Bogumila Pilarczyk; Alojzy Ramisz and Lukasz Laurans. Antibacterial and antifungal activity of chitosan. *ISAH, Warsaw-Poland*, 2(1):406–408, 2005.
- [64] Ling Yien Ing; Noraziah Mohamad Zin; Atif Sarwar and Haliza Katas. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012(1):1–9, 2012.
- [65] Rejane C. Goy; Douglas de Britto and Odilio B. G. Assis. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polymers: Science and Technology*, 19(3):241–247, 2009.

- [66] M.L. Duarte; M.C. Ferreira; M.R. Marvao and Joao Rocha. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1-3):1–8, 2002.
- [67] Stephan Beil; Anna Schamberger; Wolfgang Naumann; Susanne Machill and Karl-Heinz van Pee. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87(1):117–122, 2012.
- [68] Claudio Airoldi. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e bioplolímeros na remoção catiônica. *Química Nova*, 31(1), 2008.
- [69] Barros F. C. F.; Cavalcante R. M.; Carvalho T. V.; Dias F. S.; Queiroz D. C.; Vasconcellos L. C. G. e Nascimento R. F. *Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente.*, volume 7. Revista Iberoamericana de polímero, 2006.
- [70] Florence Croisier and Christine Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. 49(4):780–792, 2013.
- [71] S. Rivero; M.A. García and A. Pinotti. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4):531–539, 2009.
- [72] F.A. de Wolf. Collagen and gelatin. *Progress in Biotechnology*, 23(1):133–218, 2003.
- [73] Sha Huang and Xiaobing Fu. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release*, 142(2):148–159, 2010.
- [74] Chai C.S. and Ben-Nissan B. Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 10(8):465–9, 1999.
- [75] A. C. F. M. Costa; M. G. Lima; L. H. M. A. Lima; V. V. Cordeiro; K. M. S. Viana; C.V. Souza e H. L. Lira. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 4(3):29–38, 2009.
- [76] Anusha Ashokan; Deepthy Menon; Shantikumar Nair and Manzoor Koyakutty. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multi-modal contrast agent. *Biomaterials*, (9):2606–2616, 2010.
- [77] Carolien Claeys; Yves De Deene; Bart Truyens and Carlos De Wagter. Study of density and stability of a lung-equivalent gel. *J. Physics*, 56(149):149–152, 2006.
- [78] J. Gómez-Estaca; M.C. Gómez-Guillén; F. Fernández-Martín and P. Montero. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatine-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(1):1461–1469, 2011.
- [79] Silverstein R. M. e Webster F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 67-134. Ed.LTC S.A.. Livros Técnicos e Científicos, 6 edition, 2010.

- [80] Fabiano Okumura; Éder T. G. Cavalheiro and Joaquim A. Nóbrega. Simple flame photometric experiments to teach principles of atomic spectrometry in undergraduate analytical chemistry courses. *Quím. Nova*, 27(5):832–836, 2004.
- [81] Luo S.; Zhang E.; Su Y.; Cheng T. and Shi C. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*, 32(29), 2011.
- [82] S. Bruni; F. Cariati; F. Casadio and L. Toniolo. Spectrochemical characterization by micro-ftir spectroscopy of blue pigments in different polychrome works of art. *Vibrational Spectroscopy*, (20):15–25, 1999.
- [83] Ye Jin; Haiying Ding; Xuesong Liu; Xinmin Wan; Lianjun Luan and Yongjiang Wu. Investigation of an on-line detection method combining near infrared spectroscopy with local partial least squares regression for the elution process of sodium aescinate. *Spectrochimica Acta Part : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (109):68–78, 2013.
- [84] Pavia D. L.; Lampman G. M.; Kriz G. S. e Vyvyan J. R. *Introdução à Espectroscopia*. 15-99. Ed. Cengage Learning, 2010.
- [85] H. Bolton. *Australian Dictionary of Biography*. Melbourne University Press, 1 edition, Melbourne, 1983.
- [86] J. P. Gordon; R. C. C. Leite; R. S. Moore; S. P. S. Porto and J. R. Whinnery. Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples. *Journal of Applied Physics*, 36(3):3–8, 1965.
- [87] G. Sreelekha; G. Vidya; P. Radhakrishnan; C. P. G. Vallabhan and V. P. N. Nampoori. Measurement of thermal diffusivity of meh-ppv in different organic solvents using laser induced thermal lens technique. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 124(17):3138–3141, 2013.
- [88] R. A.Cruz; M. C. Filadelpho; M. P. P. Castro; A. A. Andrade; C. M. M. Souza and T. Catunda. Very low optical absorptions and analyte concentrations in water measured by optimized thermal lens spectrometry. *Talanta*, 85(2):850–858, 2011.
- [89] Harry H. Pennes. Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm. *Journal of Applied Physiology*, 1(2):93–122, 1948.
- [90] S. J. Sheldon; L. V. Knight and J. M. Thorne. Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model. *Applied Optics*, 21(9):1663–1669, 1982.
- [91] John R. Whinnery. Laser measurement of optical absorption in liquids. *Acc. Chem. Res.*, 7(7):225–231, 1974.
- [92] John J. Friel. *X-Ray and Image Analysis in Electron Microscopy*. Princeton Gamma-Tech, Inc. princeton, NJ 08542, 2 edition, 2003.
- [93] B. A. Dedavid; C. I. Gomes e G. Machado. *Microscopia Eletrônica de Varredura. Aplicação e Preparação de Amostras - Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores*. EDIPUCRS. Porto Alegre. EDIPUCRS, 2007.

- [94] Antunes A.; Safatle A. M.; Barros P. S. and Morelhão S.L. X-ray imaging in advanced studies of ophthalmic diseases. *Med Phys*, 33(7):2338–2343, 2006.
- [95] Jun Li; Zhong Zhong; Roy Lidtke; Klaus E. Kuettner; Charles Peterfy; Elmira Aliyeva and Carol Muehleman. Radiography of soft tissue of the foot and ankle with diffraction enhanced imaging. *J. Anat.*, 202(5):463–470, 2003.
- [96] Donepudi V. Rao; Medasani Swapna; Roberto Cesareo; Antonio Brunetti; Zhong Zhong; Takao Akatsuka; Tetsuya Yuasa; Tohoru Takeda and Giovanni E. Gigante. Use of synchrotron-based diffraction-enhanced imaging for visualization of soft tissues in invertebrates. *Applied Radiation and Isotopes*, 68(9):1687–1693, 2010.
- [97] R. A. Lewis; C. J. Hall; A. P. Hufton; S. Evans; R. H. Menk; F. Arfelli; L. Rigon; G. Tromba; D. R. Dance; I. O. Ellis; A. Evans; E. Jacobs; S. E. Pinder and K. D. Rogers. X-ray refraction effects: application to the imaging of biological tissues. *The British Journal of Radiology*, 76(905):301–308, 2003.
- [98] William R. Hendee. *Emerging Imaging Technologies in Medicine*. Taylor & Francis Group, 2012.
- [99] N. Zhu; Y. J. Guan; X. B. Chen; L. D. Chapman and T. W. Wysokinski. Diffraction-enhanced X-ray imaging of biomaterial scaffolds. *Canadian Light Source*, 1267(1):174–175, 2009.
- [100] S. Dubsky; S. B. Hooper; K. K. Siu and A. Fouras. Synchrotron-based dynamic computed tomography of tissue motion for regional lung function measurement. *J R Soc Interface*, 9(74):2213–2224, 2012.
- [101] M. Bech; A. Tapfer; A. Velroyen; A. Yaroshenko; B. Pauwels; J. Hostens; P. Bruynndonckx; A. Sasov and F. Pfeiffer. In-vivo dark-field and phase-contrast X-ray imaging. *Scientific Reports*, 3(3209):1–3, 2013.
- [102] Felix G. Meinel; Felix Schwab; Andre Yaroshenko; Astrid Velroyen; Martin Bech; Katharina Hellbach; Jeanette Fuchs; Thorsten Stiewe; Ali Ö. Yildirim; Fabian Bamberg; Maximilian F. Reiser; Franz Pfeiffer and Konstantin Nikolaou. Lung tumors on multimodal radiographs derived from grating-based X-ray imaging e a feasibility study. *Physica Medica*, 30(3):352–357, 2014.
- [103] Mei-Chin Chen; Hsiang-Fa Liang; Ya-Ling Chiu; Yen Chang; Hao-Ji Wei and Hsing-Wen Sung. A novel drug-eluting stent spray coated with multi-layers of collagen and sirolimus. *Journal of Controlled Release*, 108(1):178–189, 2005.
- [104] A. Lauto; M. Ohebshalom; M. Esposito; J. Mingin; P. S. Li; D. Felsen; M. Goldstein and D. P. Poppas. Self-expandable chitosan stent: design and preparation. *Biomaterials*, 22(13):1869–1874, 2001.
- [105] Xiaoguang Li; Zhaoyang Yang; Aifeng Zhang; Tailing Wang and Weichang Chen. Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats. *Biomaterials*, 30(6):2009, 2009.

- [106] Li Xiaoguang; Yang Zaoyang and Yang Yi. Studies on repairing of hemisected thoracic spinal cord of adult rats by using a chitosan tube with alginate fibers. *Progress in natural science*, 16(10):1051–1055, 2006.
- [107] Lai J. Y.; Lin P. K.; Hsiue G. H.; Cheng H. Y.; Huang S. J. and Li Y. T. Low bloom strength gelatin as a carrier for potential use in retinal sheet encapsulation and transplantation. *Biomacromolecules*, 10(2):310–319, 2009.
- [108] Prashant K. V. H. and Tharanathan R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18:117–131, 2007.
- [109] W. Arguelles-Monal; F. M. Goycoolea; C. Peniche and I. Higuera-Ciapara. Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system. *Polymer Gels and Networks*, 6:429–440, 1998.
- [110] M. Cheng; J. Deng; F. Yang; Y. Gong; N. Zhao and X. Zhang. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24:2871–2880, 2003.
- [111] S. X. Yuan and T. T. Wei. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 19:467–479, 2004.
- [112] H. T. V. L. Bindu; M. Vidyavathi; K. Kavitha; T. P. Sastry and S. R. V. Kumar. Preparation and evaluation of ciprofloxacin loaded chitosan-gelatin composite films for wound healing activity. *International Journal of Drug Delivery*, 2:173–182, 2010.
- [113] John Gearinga; Kiran P. Malik and Paul Matejtschuk. Use of dynamic mechanical analysis DMA to determine critical transition temperatures in frozen biomaterials intended for lyophilization. *Cryobiology*, 61(1):27–32, 2010.
- [114] J. W. Valvano; J. R. Cochran and K. R. Diller. Thermal conductivity and diffusivity of biomaterials measured with self-heated thermistors. *International Journal of Thermophysics*, 6(3):301–311, 1985.
- [115] Alexis I. Farrer; Henrik Odéen; Joshua de Bever; Brittany Coats; Dennis L. Parker; Allison Payne and Douglas A. Christensen. Characterization and evaluation of tissue-mimicking gelatin phantoms for use with MRg FUS. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 3(9):1–11, 2015.
- [116] D. Dadarlat; H. Visser and D. Bicanic. An improved inverse photopyroelectric cell for measurement of thermal effusivity: application to fatty acids and triglycerides. *Measurement Science and Technology*, 6(8):1215, 1995.
- [117] F. P. Incropera and D. P. Witt. *Introduction to Heat Transfer*. John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- [118] Paz Elia; Einat Nativ-Roth; Yehuda Zeiri and Ze'ev Porat. Determination of the average pore-size and total porosity in porous silicon layers by image processing of sem micrographs. *Microporous and Mesoporous Materials*, 225:465–471, 2016.

- [119] Bruce Alberts; Alexander Johnson; Julian Lewis; Martin Raff; Keith Roberts and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 4 edition, 2002.
- [120] In-Yong Kim; Seog-Jin Seo; Hyun-Seuk Moon; Mi-Kyong Yoo; In-Young Park; Bom-Chol Kim and Chong-Su Cho. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1):1–21, 2008.
- [121] Hooshang Nikjoo; Shuzo Uehara and Dimitris Emfietzoglou. *Interaction of Radiation with Matter*. Taylor & Francis Group, 2012.
- [122] Frank Herbert Attix. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley-VCH, 1986.
- [123] Robley D. Evans. *The Atomic Nucleus*. Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, 1955.
- [124] Davisson C. M. and Evans R. D. Gamma-ray absorption coefficients. *Rev. Mod. Phys.*, 24(1):79–107, 1952.
- [125] J. H. Hubbell. Review and history of photon cross section calculations. *Phys. Med. Biol.*, 51(1):R245–R262, 2006.
- [126] C. C. Ferreira; R. E. Ximenes; C. A. B. Garcia; J. W. Vieira and A. F. Maia. Total mass attenuation coefficient evaluation of ten materials commonly used to simulate human tissue. *Journal of Physics: Conference Series*, 249(1):1–5, 2010.
- [127] Yan A. and Wu X. Apparent linear attenuation coefficients in phase contrast X-ray tomography. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269(16):1841–1843, 2011.
- [128] Shu-Ang Zhou and Anders Brahme. Development of phase-contrast X-ray imaging techniques and potential medical applications. *Physica Medica*, 24(3):129–148, 2008.
- [129] M. O. Hasnah; Z. Zhong; C. Parham; H. Zhang and D. Chapman. Compositional images from the diffraction enhanced imaging technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 572(2):953–957, March 2007.
- [130] L. Tauhata; I. P. A. Salati; R. Di. Prinzipio e M. A. R. R. Di. Prinzipio. *Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos*. Rio de Janeiro - IRD/CNEN, 2003.
- [131] Otto Oldenberg e Wendell G. Holladay. *Introdução à Física Atômica e Nuclear*. Edgard Blucher, 1971.
- [132] Robert Eisberg e Robert Resnik. *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. Campus, 9 edition, 1994.
- [133] Paul Claude Diemoz; Paola Coan; Christian Glaser and Alberto. Absorption, refraction and scattering in analyzer-based imaging: comparison of different algorithms. *Optics Express*, 18(4):3494, 2010.

- [134] S. Crittell; M. Ibisona; K. C. Cheung; R. Hodgson; D. Gould; C. Hall; P. J. Nolan and R. D. Page. Quantitative analysis of diffraction enhanced images. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 580(2):1131–1133, 2007.
- [135] B. D. Cullity; S. R. Stock; Bernard Dennis Cullity and S. R. Stock. *Elements of X-Ray Diffraction*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2001.
- [136] D. Chapman; W. Thominson; R. E. Johnston; D. Washburn; E. Pisano; N. Gmür; Z. Zhong; R. Menk; F. Arfelli and D. Sayers. Diffraction enhanced X-ray imaging. *Phys. Med. Biol.*, 42(11):2015–2025, 1997.
- [137] Gocha Khelashvili; Jovan G Brankov; Dean Chapman; Mark A. Anastasio; Yongyi Yang; Zhong Zhong and Miles N. Wernick. A physical model of multiple image radiography. *Physics in Medicine and Biology*, 51:221–236, 2006.
- [138] M. N. Wernik; O. Wirjadi; D. Chapman; O. Z. Zhong; N. Galatsanos; Y. Yang; J. G. Brankov; O. Oltulu; M. A. Anastasio and C. Muehleman. Multiple-image radiography. *Physics in Medicine and Biology*, 48:3875–3895, 2003.
- [139] Dean M. Connor and Zhong Zhong. Diffraction-enhanced imaging. *Current Radiology Reports*, 55:1–11, 2014.
- [140] Oral Oltulu; Zhong Zhong; Moumen Hasnah; Miles N. Wernick and Dean Chapman. Extraction of extinction, refraction and absorption properties in diffraction enhanced imaging. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(17):2152, 2003.