



COPPE/UFRJ

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITO DUPLA-CAMADA À BASE DE
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM RECONSTRUÇÃO TECIDUAL**

Cristiane Xavier Resende

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Glória de Almeida Soares

Rio de Janeiro
Agosto de 2010

DESENVOLVIMENTO DE COMPOSITO DUPLA-CAMADA À BASE DE
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM RECONSTRUÇÃO TECIDUAL

Cristiane Xavier Resende

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:



Prof.ª Glória de Almeida Soares, D.Sc.



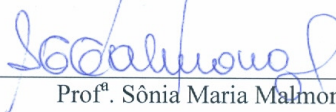
Prof.ª Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.



Prof.ª Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc.



Prof. Alex Balduino de Souza, D.Sc.



Prof.ª Sônia Maria Malmonge, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

AGOSTO DE 2010

Resende, Cristiane Xavier

Desenvolvimento de Compósito Dupla-Camada à base de Quitosana para Aplicação em Reconstrução Tecidual/
Cristiane Xavier Resende – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

XIII, 103 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Glória de Almeida Soares

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 92-103.

1. Quitosana. 2. Hidroxiapatita. 3. Cartilagem. 4. Compósito. I. Soares, Glória de Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (DSc.)

DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITO DUPLA-CAMADA À BASE DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM RECONSTRUÇÃO TECIDUAL

Cristiane Xavier Resende

Agosto/2010

Orientadora: Glória de Almeida Soares

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Arcabouços compostos por duas camadas distintas foram desenvolvidos objetivando o reparo de defeitos osteocondrais. A primeira camada é composta por quitosana (Quit) enquanto a segunda é composta por hidroxiapatita e quitosana (QuitHA); cada camada tem propriedades específicas e são propostas para reparar a cartilagem e o osso, respectivamente. A caracterização físico-química dos arcabouços foi realizada por espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura, entre outras. Com o objetivo de controlar a degradabilidade do arcabouço dupla-camada, ele foi reticulado com tripolifosfato, sendo essa reticulação essencial para mantê-lo até 28 dias em solução de lisozima (1,5 mg/mL). A HA foi incorporada na matriz polimérica sem aglomeração, mantendo a estrutura de poros interconectados da quitosana. Além disso, as propriedades biológicas dos arcabouços foram avaliadas e três parâmetros relacionados com as funções celulares foram considerados. Estes resultados indicaram que os arcabouços são citocompatíveis. Além disso, a camada QuitHA estimulou a proliferação e diferenciação celular. Os resultados acima sugerem que o arcabouço dupla-camada pode ter um grande potencial para ser usado na engenharia tecidual.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF BILAYER COMPOSITE BASED IN CHITOSAN FOR APPLICATION IN TISSUE RECONSTRUCTION

Cristiane Xavier Resende

August/2010

Advisor: Glória de Almeida Soares

Department: Metallurgy and Materials Engineering

Scaffolds composed by two distinct layers were developed aiming to repair the osteochondral defects. The first layer is composed by chitosan (Ch) while the second is composed by hydroxyapatite and chitosan (ChHA) and they are supposed to repair the cartilage and the bone, respectively. The physico-chemical characterization of scaffolds was performed by Fourier-transformed infrared spectroscopy, X-ray diffraction and scanning electron microscopy, among other techniques. In order to control the scaffolds degradability, they were crosslinked with tripolyphosphate. This crosslinking was essential to increase the degradation time of both layers after immersion in a lysozyme solution (1,5mg/mL) up to 28 days. In regarding ChHA scaffolds, we can say that HA was incorporated in the polymeric matrix without agglomeration, maintaining its interconnected porous structure. Furthermore, the biological properties of scaffolds were evaluated and three parameters related to cells functions were evaluated. These results indicate that scaffolds are cytocompatible. Additionally, ChHA layer stimulated cell proliferation and differentiation, measured by alkaline phosphatase activity. All the above results suggest that the bilayer scaffolds can have a great potential to be used in tissue engineering.

INDICE GERAL

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	5
REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1- Biomateriais para Defeitos Osteocondrais	5
2.2- Polissacarídeos	13
2.2.1- Quitina e Quitosana	13
2.3- Fosfatos de Cálcio	17
2.4- <i>Arcabouços</i>	20
2.4.1-Arcabouço de Quitosana e Fosfatos de Cálcio	21
2.4.2- Porosidade do Arcabouço	23
2.4.3- Reticulação	25
CAPÍTULO 3	29
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA TESE	29
CAPÍTULO 4	31
METODOLOGIA	31
4.1- Materiais	32
4.1.1- Caracterização da Quitosana	32
4.1.2- Produção e Caracterização da Hidroxiapatita	33
4.2- Arcabouço de Quitosana Monocamada	33

4.2.1- Produção e Caracterização	33
4.2.3-Teste de Absorção de Água.....	36
4.2.4- Biodegradação in vitro	36
4.3- Arcabouço QuitHA monocamada	37
4.3.1- Proporção Quit:HA	37
4.3.2- Degradação em Meio de Cultura (DMEM).....	38
4.4- Arcabouço Dupla-Camada.....	38
4.4.1- Produção e Caracterização	38
4.4.2- Ensaio de Bioatividade.....	39
4.4.3-Teste de Degradação in vitro.....	40
4.4.3- Teste de Citotoxicidade	40
4.4.4- Cultura de Células	42
CAPÍTULO 5.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.1- Caracterização da Quitosana	45
5.1.2- Caracterização da Hidroxiapatita	49
5.2- Arcabouço de Quitosana Monocamada	51
5.2.1- Caracterização	51
5.2.2- Reticulação	52
5.2.3-Efeito da Reticulação no Intumescimento dos Arcabouços	55
5.2.4- Efeito da Reticulação na Biodegradação in vitro	57
5.3- Compósito Quitosana com Hidroxiapatita (QuitHA).....	61
5.3.1- Proporção Quit:HA	61

5.3.2- Degradação em Meio de Cultura (DMEM).....	66
5.4- Arcabouço Dupla-Camada (Quit/QuitHA)	68
5.4.1- Caracterização	68
5.4.2- Ensaio de Bioatividade.....	72
5.4.3-Influência da HA na Degradação in vitro.....	74
5.4.3- Teste de Citotoxicidade	77
5.4.4- Cultura de células	83
CAPÍTULO 6.....	89
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1- Representação do tecido da cartilagem articular (MICHELON, 2008).....	8
Figura 2. 2 - Levantamento de trabalhos científicos que utilizam a quitosana em um período de tempo determinado (Base de dados da Elsevier-science direct).....	14
Figura 2. 3 - Reação de desacetilação da quitina (a) para obter quitosana (b).	15
Figura 2. 4 – Solubilidade dos fosfatos em condições específicas de pH e [Ca].	19
Figura 2. 5 - Estrutura da hidroxiapatita. Em que, (cálcio), (oxigênio) e (fósforo).(BROWN et al., 1987).....	20
Figura 2. 6 - Reação do glutaraldeído com a quitosana. (WEBSTER et al., 2007).	26
Figura 2. 7 - Interação da quitosana com o tripolifosfato (LAUS et al., 2006).....	28
Figura 4. 1 - Resumo das principais etapas realizadas.	31
Figura 5. 1 – Difratoograma de raios-X da quitosana em pó.	45
Figura 5. 2 – Espectro de FTIR da quitosana em pó.	46
Figura 5. 3 - Curva de titulação da quitosana (a), e as suas derivadas (b).....	47
Figura 5. 4 - Termograma de TGA e DTG da quitosana em pó obtido a uma taxa de aquecimento de 10° C/min.....	48
Figura 5. 5 - Difratoograma de DRX da hidroxiapatita.....	50
Figura 5. 6 - Espectro de FTIR da hidroxiapatita sintetizada a pH 8,0 e a temperatura de 70 oC.....	50
Figura 5. 7 - Micrografia obtida no MEV da seção transversal do arcabouço de quitosana 2% (m/v). A seta indica a superfície do arcabouço.....	52
Figura 5. 8 – Espectros dos arcabouços de quitosana (Quit) e quitosana reticulada (QuitR) com TPNa 1% (m/v).	53

Figura 5. 9 - Difratoograma de DRX do arcabouço de quitosana e quitosana reticulada (a) e EDS da quitosana reticulada (b).	54
Figura 5. 10 – Imagem de microscopia da seção transversal do arcabouço de quitosana após reticulação com TPNa 1% (m/v).	55
Figura 5. 11 - Taxa de inchamento para ambos os arcabouços, Quit e QuitR, em solução de PBS.	56
Figura 5. 12 - Variação da perda de massa dos arcabouços Quit e QuitR em função do tempo de imersão na solução de PBS contendo lisozima (1,5 mg/mL).	58
Figura 5. 13 - Micrografias dos arcabouços após teste de degradação.....	60
Figura 5. 14 - Imagens de MEV com diferentes aumentos (a) e EDS (b) do arcabouço 70Quit30HA. A seta indica a presença de HA.	62
Figura 5. 15 - Difratoograma de DRX do arcabouço 70Quit30HA.	63
Figura 5. 16 - Imagens obtidas no MEV do arcabouço 50Quit50HA com diferentes aumentos (a) e o seu respectivo EDS (b).....	64
Figura 5. 17 - Espectro de infravermelho do arcabouço 50Quit50HA.....	66
Figura 5. 18 - Concentração de cálcio na solução de DMEM antes e após imersão do arcabouço 50Quit50HA no meio por 24 horas ($p \leq 0,05$).	67
Figura 5. 19 - Difratoograma de DRX do arcabouço 50Quit50HA após neutralização e posterior reticulação.	68
Figura 5. 20 - Macrografia do arcabouço dupla-camada, Quit/QuitHA.....	69
Figura 5. 21 - Imagens de MEV e EDS do arcabouço dupla-camada mostrando a região da interface.	70
Figura 5. 22 - Micrografias obtidas no MEV da região da interface do arcabouço dupla-camada.	71
Figura 5. 23 - Micrografias do arcabouço QuitHA após 15 dias de imersão em SBF. ..	72

Figura 5. 24 - Espectros de FTIR do arcabouço 50Quit50HA após imersão em SBF...	73
Figura 5. 25 - Difratoograma de DRX do arcabouço QuitHA após imersão na SBF por 15 dias.....	74
Figura 5. 26 - Perda de massa do arcabouço QuitHA após imersão na solução de PBS-lisozima (1,5 mg/mL).	76
Figura 5. 27 - Micrografias obtidas no MEV dos arcabouços após teste de degradação em solução de lisozima.....	76
Figura 5. 28 - Viabilidade celular de osteoblastos sobre os arcabouços de quitosana e quitosana-hidroxiapatita reticulados ($p \leq 0,05$).	80
Figura 5. 29 - Viabilidade celular de fibroblastos sobre o arcabouço de quitosana reticulado ($p \leq 0,05$).	83
Figura 5. 30 - MEV dos arcabouços de quitosana reticulada após 14 dias em cultura de osteoblastos.....	85
Figura 5. 31 - Viabilidade celular e proliferação da STRO+1A sobre o arcabouço de QuitHA determinado por MTT.....	86
Figura 5. 32 - Diferenciação celular após 7 e 14 dias de cultivo sobre os arcabouços QuitHA.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Espectroscopia por energia dispersiva	EDS
Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	FTIR
Espectroscopia no ultravioleta-visível	UV-Vis
Espectroscopia de absorção atômica	AAS
Difração de raios-X	DRX
Fluido corpóreo simulado	SBF
Fosfato de cálcio	CaP
Fosfato octacálcico	OCP
Fosfato de cálcio amorfo	ACP
Grau de acetilação	GA
Grau de desacetilação	GD
Hidroxiapatita	HA
Hidroxiapatita deficiente em cálcio	CDHA
Hidróxido de sódio	NaOH
Hidrogenofosfato de cálcio anidro	DCPA
Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado	DCPD
Hidrogeno fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4
Microscopia eletrônica de varredura	MEV
Quitosana	Quit
Quitosana-hidroxiapatita	Quit-HA
Razão cálcio-fósforo	Ca/P

Reflectância total atenuada	ATR
Solução salina tamponada com fosfato	PBS
Tripolifosfato de sódio	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$
β -fosfato tricálcico	β - TCP
α -fosfato tricálcico	α - TCP

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a sociedade tem assistido a um grande progresso na área de transplantes, o que foi possível devido ao avanço nas técnicas cirúrgicas e de agentes imunossupressores. Apesar do avanço dessa área, o principal problema está relacionado com a elevada demanda de tecidos ou órgãos doadores, a qual está distante de ser suprida. Esta questão tornou-se mais evidente com o passar dos anos, pois o crescimento populacional associado com o surgimento de tratamentos mais eficazes e, consequente, envelhecimento populacional, geram mais candidatos para o transplante de órgãos ou reparo tecidual. A partir do exposto acima, justifica-se o aumento na pesquisa de materiais que possam substituir tecidos lesionados, parte integrante da engenharia tecidual (SALTZMAN, 2004b).

A engenharia tecidual é uma área multidisciplinar que está fundamentada nos princípios da engenharia e das ciências da vida. A proposta da engenharia tecidual consiste na produção de órgãos ou tecidos que possam ser combinados com células, ou ainda que estimulem a produção dessas células após serem introduzidos no paciente (BARRÈRE *et al.*, 2008). Todos os materiais que possuem essas características são denominados arcabouços, os quais devem ser compatíveis com as células, guiando assim suas atividades. A maioria dos arcabouços são, ou deveriam ser, biodegradados ou reabsorvidos à medida que as células proliferam e remodelam o novo tecido.

Inicialmente, o foco da engenharia tecidual consistia na terapia celular; depois surgiram outras perspectivas como a produção de um compósito constituído de

colágeno e glicosaminoglicanos para regeneração dérmica. Nesse contexto, foram desenvolvidos os primeiros arcabouços poliméricos sintéticos e altamente porosos, facilitando a proliferação celular com conseqüente neoformação e regeneração tecidual.

Desde então, materiais que atendam as necessidades da engenharia tecidual têm sido desenvolvidos para várias aplicações, tais como, cartilagem, osso, tendão, fígado, músculos cardíacos e tecido neural. Devido à diferença de complexidade destes tecidos nem todas as áreas têm sido desenvolvidas igualmente. No presente trabalho, serão abordados os problemas relacionados com o tecido ósseo e cartilaginoso, designadamente, os defeitos osteocondrais. Esses normalmente são ocasionados por traumas ou osteocondrite dissecante e estão associados com instabilidade mecânica do joelho ou cotovelo, podendo assim induzir a osteoartrite degenerativa (MICHELON, 2008, MARTIN *et al.*, 2007). Estima-se que população com mais de 40 anos apresente um perda de massa óssea no joelho, sendo que a minoria sente dor e perda das funções. Além disso, atletas que praticam esporte de arremesso ou que estão sujeitos a atividades de corrida são susceptíveis também a apresentarem esse tipo de problema (NETO *et al.*, 1996).

O defeito osteocondral merece atenção devido a sua dificuldade de regeneração, a qual está relacionada com a impossibilidade de neovascularização da cartilagem. Como consequência desse defeito o tecido ósseo, região subcondral, pode ser lesionado, havendo assim a necessidade de arcabouço que favoreçam sua regeneração. Nesse contexto, os materiais poliméricos e as cerâmicas podem desempenhar algumas funções que favoreçam o processo de regeneração do tecido lesionado.

A hidroxiapatita (HA) é uma das biocerâmicas mais usadas como substituto ósseo. Dentre as características interessantes da HA, se destacam: composição química

próxima a da fase mineral óssea, superfície reativa (bioativa) e a sua biocompatibilidade (DOROZHKIN, 2010).

Biomateriais poliméricos de origem natural, como os polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, têm se destacado em relação aos polímeros sintéticos, devido a suas características de biodegradabilidade e atividade biológica. Os polímeros naturais apresentam uma vasta aplicação, desde que os grupamentos químicos presentes nas cadeias poliméricas possam ser alterados facilmente pela incorporação de outras moléculas ou até mesmo pela remoção de moléculas existentes. Essa facilidade de alterar a estrutura polimérica pode render características específicas, de forma a melhorar as propriedades finais da matriz polimérica e, conseqüentemente, o tipo de aplicação (ORÉFICE *et al.*, 2008). Além disso, a facilidade de conformação dos polímeros em várias formas como fibras, filmes e soluções viscosas deve ser salientada como ponto positivo.

O polímero que será utilizado nesse estudo é a quitosana, um material semicristalino derivado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. A quitina é encontrada em animais marinhos, fungos e insetos, e constitui cerca de 1,4 % do peso destes últimos. As cascas de insetos apresentam na sua composição, comumente, 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteína e 40 a 55% de carbonato de cálcio (CANELLA e GARCIA, 2001).

Assim, o desenvolvimento de um compósito com dupla-camada que possa auxiliar o processo de regeneração de defeitos osteocondrais é de grande significância. Um compósito laminar é formado pela união de dois ou mais materiais, onde as propriedades finais do produto possuam características físico-químicas otimizadas, em relação a seus componentes. Neste trabalho, foram produzidos e caracterizados

arcabouços tridimensionais (3D) constituídos de um polímero, quitosana, e fosfato de cálcio, hidroxiapatita, com o objetivo de mimetizar a ligação cartilagem-osso.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo é dividido em vários tópicos objetivando inserir o contexto do presente trabalho. Inicialmente, será apresentada uma introdução sobre os biomateriais usados para reparar o tecido cartilaginoso e os problemas relacionados com o mesmo, os quais podem ser originados de processos traumáticos ou doenças degenerativas. Ainda, nesse tópico, serão expostos alguns tipos de materiais que têm sido desenvolvidos e avaliados com o propósito de solucionar esses problemas. Em seguida, serão enfatizados os materiais poliméricos e cerâmicos, tais como, quitosana e hidroxiapatita, os quais serão usados no presente trabalho. Também será realizada uma descrição dos principais trabalhos referentes à produção de compósitos à base de quitosana e fosfato de cálcio, bem como os principais parâmetros que são determinantes nas propriedades do compósito.

2.1- Biomateriais para Defeitos Osteocondrais

Os biomateriais são definidos como substâncias (com exceção de drogas ou fármacos) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética. Durante um período de tempo indeterminado podem ser empregados como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais (WILLIAMS, 1987). Os biomateriais podem ser produzidos a partir de metais, cerâmicas, polímeros ou pela combinação de materiais distintos dando origem a um material compósito. Nesse trabalho são reportados os biomateriais propostos para reparar o tecido cartilaginoso.

A cartilagem é constituída por uma matriz extracelular e pelos condrócitos – células especializadas que produzem e mantêm a matriz extracelular. Essa matriz é composta basicamente pelo colágeno tipo II e os agregados de proteoglicanos. Esse último é constituído por um eixo protéico e por uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos, sendo o *hialuronam*, sulfato de condroitina e o sulfato queratam os tipos encontrados na cartilagem (CARVALHO e COLLARES-BUZATO, 2005). Juntas, essas substâncias mantêm um nível adequado de água na matriz, o que garante a resistência à compressão do tecido.

Além das funções estruturais da cartilagem ela também desempenha funções dinâmicas, como é o caso da cartilagem de crescimento e da cartilagem articular. Em relação à cartilagem de crescimento, ela é responsável pelas mudanças contínuas das células e da matriz extracelular, em que o processo final é caracterizado pela substituição da cartilagem pelo tecido ósseo. Enquanto isso, a cartilagem articular funciona como “suspensão” para dispersar forças de compressão e promover um deslizamento suave entre os ossos, evitando assim, o atrito entre as superfícies ósseas (CARVALHO e COLLARES-BUZATO, 2005).

A principal função da cartilagem articular é unir dois ou mais ossos próximos. O osso é um compósito natural constituído basicamente por uma matriz orgânica que contém colágeno (~ 30% em peso), água (10%), e uma fase mineral contendo hidroxiapatita multissubstituída, também chamada de apatita biológica. Esse último componente está presente em torno de 60% em peso do osso (SALTZMAN, 2004a). As principais funções do tecido ósseo são: armazenamento e liberação de cálcio, fosfato e outros íons importantes; proteção dos órgãos vitais; geração de células brancas e vermelhas para imunoproteção e oxigenação de outros tecidos (SALTZMAN, 2004a). Esta diversidade das funções ósseas torna o sistema de remodelação bastante complexo.

Isso justifica a dificuldade encontrada por diversos grupos de pesquisa em projetar um material sintético com o intuito de substituir adequadamente esse tecido.

As células que constituem o tecido ósseo são as células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A matriz orgânica contém os fatores de crescimento e osteocondutividade necessários ao crescimento contínuo do osso e seu reparo (SALTZMAN, 2004a).

Em geral, os principais tipos de lesões apresentadas pela cartilagem podem ser classificados em: degradação da matriz, defeito da camada parcial e defeito da camada total. As lesões do tipo degradação da matriz ocasionam danos na matriz extracelular, mas se a lesão não for intensa, os condrócitos remanescentes aumentarão a sua atividade para reparar o tecido. O defeito do tipo camada parcial apresenta uma degradação na superfície da cartilagem, mas não se estende ao osso subcondral, então as células que estão próximas ao defeito proliferam de forma a preenchê-lo. No último tipo de lesão, camada total, o defeito atravessa toda a camada da cartilagem e penetra até o osso subcondral, sendo denominado defeito osteocondral. Esse tipo de defeito é difícil de ser regenerado sem que haja a necessidade de uma intervenção cirúrgica (TEMENOFF e MIKOS, 2000).

O defeito do tipo camada total, osteocondral, está mais propenso a conduzir atritos entre os ossos, com conseqüente perda óssea localizada. Assim, o reparo desse tipo de defeito continua sendo um grande desafio clínico e científico, principalmente, porque a cartilagem não dispõe de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Logo, os condrócitos são nutridos por difusão dos nutrientes através de sua matriz. Isso dificulta o processo de regeneração quando há lesões osteocondrais decorrentes de diversos fatores (SUH e MATTHEW, 2000, TEMENOFF e MIKOS, 2000). Por mais de dois séculos acreditou-se que a cartilagem, uma vez danificada, não podia mais ser reparada,

por causa de sua natureza avascular. Essa percepção da resposta de cura ineficiente e incompleta da cartilagem suscitou o interesse profissional em todo e qualquer método que pudesse facilitar o processo de reparo. Dentre os tratamentos propostos, como enxertos, transplantes de cartilagem, transplantes de células, tratamentos a laser, ou estímulos elétricos, a engenharia tecidual está entre as mais promissoras (TEMENOFF e MIKOS, 2000).

Na Figura 2.1 é apresentado um esquema ilustrativo da região da cartilagem.

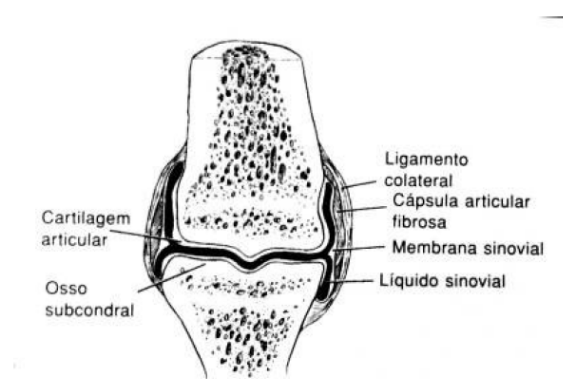


Figura 2. 1- Representação do tecido da cartilagem articular (MICHELON, 2008)

Apesar de várias tentativas terapêuticas terem sido desenvolvidas com o propósito de tratar esse tipo de defeito nenhuma delas têm provado ainda a sua eficácia. Segundo MARTIN *et al.* (2007) os tipos de materiais que estão sendo estudados para substituir o defeito osteocondral podem ser classificados em:

- 1- Arcabouço para o componente ósseo, o qual está distante de se aproximar da cartilagem articular.
- 2- Arcabouço diferente para o osso e para a cartilagem
- 3- Arcabouço compósito heterogêneo

4- Arcabouço homogêneo para ambos os componentes

Esses materiais que têm sido propostos podem ou não estar combinados com células ou fatores de crescimento.

De acordo com essa classificação, podemos inferir que a produção de arcabouço heterogêneo (multi-camadas) é a que mais se aproxima das condições reais da cartilagem, pois as propriedades do sistema osso subcondral/cartilagem articular são bastante diferenciadas em termos biológicos, bioquímico e biomecânico.

Assim, o projeto de um arcabouço heterogêneo obtido pela combinação de distintas camadas, porém integradas, é baseado no conhecimento de que os materiais para atuar no defeito osteocondral devem apresentar diferentes requerimentos para regenerar separadamente o osso e a cartilagem.

Estudos realizados por MARTIN *et al.* (2007) indicam que o compósito desenvolvido para esse tipo de reparo deve ser rígido suficiente para estabilizar o defeito, devendo apresentar um módulo de Young próximo de 50 MPa.

Vários materiais têm sido estudados para essa aplicação dentre esses se destacam o poli-ácido glicólico (PLG), poli-ácido láctico (PLA) e colágeno. Os arcabouços osteocondrais com dupla-camada foram inicialmente produzidos com poli-ácido láctico combinado com componentes de cerâmica, parte essa que correspondia à região do osso subcondral.

Dois tipos de materiais dupla-camada foram desenvolvidos por FRENKEL *et al.* (2005). Ambos os materiais apresentam uma camada em comum constituída por ácido poli-láctico que corresponde à região do osso. A segunda camada dos materiais era diferenciada, um material possuía a segunda camada composta por quitosana e ácido hialurônico e o outro de colágeno tipo I. Esses materiais com dupla-camada foram

implantados em coelhos e suas respostas foram avaliadas. A regeneração do tecido cartilaginoso e do tecido ósseo foi melhor para os materiais sintéticos, quando comparado com o controle. Contudo, nenhuma diferença estatística foi observada entre o compósito com colágeno e o com ácido hialurônico/quitosana, porém houve diferença estatística entre ambos os compósitos em relação ao controle, coelho sem enxerto. Esses resultados indicam possibilidade de sucesso com o uso desses compósitos heterogêneos.

TAMPIERI *et al.* (2008) produziram um compósito com três camadas, (i) colágeno, (ii) ácido hialurônico e colágeno e por último (iii) colágeno e hidroxiapatita substituída com magnésio. Esse arcabouço foi avaliado em termos de tempo de degradação e atividade com as células da cartilagem, condrócitos. Ele apresentou uma taxa de degradação muito rápida, 3,5 horas para a fase (ii), devido à presença do colágeno que é bastante instável. Após promover a reticulação na estrutura do colágeno essa fase degradou em 7 horas. Em relação a fase (iii) ela degradou após 38 horas, porém quando reticulada a degradação ocorreu após 78 horas. Esses resultados mostram a importância de promover a reticulação, uma vez que o material não-reticulado degrada tão rápido que seria inviável a realização de um estudo mais detalhado, *in vivo*. Após 2 semanas de cultura com condrócitos observou-se que a distribuição de células em todas as fases era bastante dispersa, não uniforme, sendo que na região óssea a densidade de células foi menor se comparado com a região cartilaginosa. Ainda pôde-se observar a formação de um tecido cartilaginoso.

Em outros trabalhos, arcabouços constituídos por poli-DL láctico e diferentes proporções de quitosana, grau de desacetilação (GD) = 83,9%, foram produzidos. Os poros foram obtidos pela combinação da técnica de extração do solvente, separação de fase e liofilização. A razão em massa de quitosana/láctico estudadas foram 10/90, 30/70 e 50/50 em massa. Esses três arcabouços, além dos arcabouços de poli-DL láctico puro

e o de quitosana, foram estudados em meio de cultura de condrócitos e as respostas foram avaliadas em termos da produção de glicosaminoglicanos e colágeno, além do número de células presentes nos materiais. A quantidade de glicosaminoglicanas está relacionada com a formação do tecido cartilaginoso, assim pôde-se inferir que o arcabouço com maior quantidade de quitosana favoreceu a produção de glicosaminoglicanas e colágeno. O arcabouço de quitosana pura estimulou a produção de colágeno, glicosaminoglicanos e condrócitos em relação ao arcabouço de poli-DL láctico, resultado esse estatisticamente significativo (WU *et al.*, 2008).

LEE *et al.* (2004) produziram compósito tridimensional constituído de glicosaminoglicanas, quitosana e colágeno. Microesferas de quitosana encapsulando fatores de crescimento foram injetadas dentro do compósito. Além disso, células responsáveis pela formação da cartilagem foram cultivadas no compósito. Segundo os autores, a liberação desses fatores favoreceu a regeneração da cartilagem, e a presença da quitosana diminuiu o tempo de degradação do colágeno, melhorando assim as propriedades mecânicas.

BAVARESCO *et al.* (2008) produziram dois tipos de materiais que foram avaliados *in vivo* quanto a sua capacidade de reparar defeitos osteocondrais. Os testes *in vivo* foram realizados em cachorros. O primeiro material estudado foi o polietileno de ultra-alto peso molecular, UHMWPE, revestido com poli(2-hidroxietil metacrilato)-poli(metacrilato de metil acrílico co-acido), pHEMA-[MMA-co-AA]. O segundo material era constituído de fosfato tricálcico (β -TCP) também revestido com o pHEMA-[MMA-co-AA]. A presença de um tecido conjuntivo denso, sem a formação de cartilagem, foi observada em ambos os materiais depois de implantados, entretanto, somente o sistema composto pelo β -TCP sofreu degradação.

Esses trabalhos mostraram uma possível aplicação desses arcabouços heterogêneos na regeneração do tecido com defeito osteocondral. Ainda, pôde-se observar a influência positiva da quitosana no processo de regeneração, embora existam algumas contradições na literatura com relação ao uso desse polímero na área biomédica (MARIAPPAN *et al.*, 1999). Também fica claro que há um longo caminho a ser percorrido visando adequar as propriedades dos arcabouços às necessidades de degradação e compatibilidade.

Apesar da existência de várias publicações nessa área, somente um material está disponível comercialmente para reparar os defeitos osteocondrais (GOMOLL *et al.*, 2010), e ele é composto de poli (D, L-ácido láctico-co-ácido glicólico)- PLGA, cujo nome comercial é TRUFIT. Estudos com esse polímero têm sido realizados visando a mesma aplicação, sendo que ele é comumente associado com outro material, como colágeno, glicosaminoglicanos, quitosana, dentre outros. Essa combinação objetiva melhorar a interação com as células, visto que a característica hidrofóbica da superfície do PLGA não é tão favorável para adesão celular (SATO *et al.*, 2001, DAI *et al.*, 2010).

Baseado no conhecimento das propriedades dos materiais, bem como as vantagens e desvantagens das matrizes utilizadas como arcabouço, fica mais fácil selecionar materiais para projetar um biomaterial para aplicações específicas na engenharia tecidual. Nos próximos tópicos serão apresentadas as principais propriedades dos materiais de interesse nesse estudo, sendo o polímero e a cerâmica as classes de materiais selecionadas.

2.2- Polissacarídeos

Os polissacarídeos são definidos como polímeros de alto peso molecular que apresentam na sua estrutura unidades repetitivas denominadas de monossacarídeos, os quais estão conectados por ligações glicosídicas. A maioria dos polissacarídeos, que ocorrem naturalmente, como a celulose, dextran, alginato ácido, agar e agarose são de natureza ácida ou neutra, ao contrário da quitosana e quitina que são altamente alcalinas (RAVI KUMAR, 2008).

2.2.1- Quitina e Quitosana

Um aumento crescente da utilização da quitosana na área biomédica, farmacêutica, cosméticos, alimentícia, e como adsorventes na remoção de poluentes tem sido observado. Isso se deve as características desse material, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, estrutura química favorável a carrear fármacos, facilidade de obtenção da mesma, baixo custo e abundância da matéria prima. A seguir, Figura 2.2, é apresentado um levantamento de trabalhos científicos que utilizam a quitosana desde 1980 a 2008, nas mais diversas áreas.

É importante salientar que essa busca foi realizada no dia 26/06/2008 na base de dados da Elsevier, e foi utilizada como palavra chave apenas *chitosan* e o ano de interesse. Assim, pode-se afirmar que a busca se refere a utilização da quitosana nas mais diversas áreas. E ainda, que a utilização da mesma teve um aumento significativo a partir do século XXI.

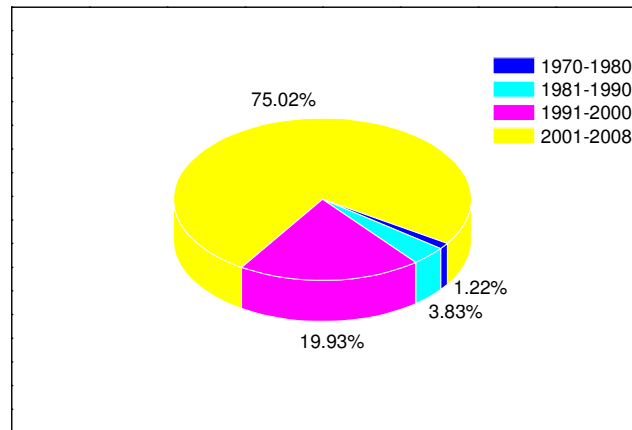


Figura 2. 2 - Levantamento de trabalhos científicos que utilizam a quitosana em um período de tempo determinado (Base de dados da Elsevier-science direct).

Apesar do aumento significativo no número de publicações nos últimos dez anos, existe a necessidade de estudos detalhados em relação a utilização da quitosana na área biomédica. Desse modo, uma ampla caracterização de suas propriedades físico-químicas e biológicas pode conduzir a uma possível aplicação desse material para reparo osteocondral.

A quitina, que foi identificada pela primeira vez em 1884, é um dos componentes estruturais de artrópodes estando presente na forma de fibrilas. Ela pode ser encontrada em casca de caranguejo, camarão e de lagosta, sendo sua principal função manter a estrutura desses seres. A quitina é obtida em escala industrial por meio de reações sucessivas de reagentes apropriados com cascas de camarões e outros crustáceos, que são consideradas as principais fontes desse polímero (RAVI KUMAR, 2008).

A quitosana pode ser encontrada em pequenas quantidades em alguns fungos, sendo que a sua extração torna-se inviável em virtude da pequena quantidade de material (CAMPANA e SIGNINI, 2001). Contudo, a obtenção da quitosana em escala

apreciável ocorre, geralmente, por meio da reação de um solvente apropriado com a quitina, que é considerada a maior fonte de quitosana.

Comumente, o solvente utilizado é o hidróxido de sódio, o qual reage com a quitina. Assim, soluções de NaOH com concentrações na faixa de 40-50% são utilizadas nessa etapa (CANELLA e GARCIA, 2001). As reações envolvidas nesse processo são apresentadas a seguir, Figura 2.3, para um melhor entendimento do mesmo.

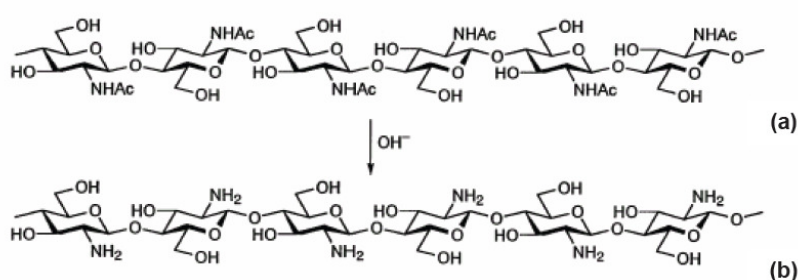


Figura 2. 3 - Reação de desacetilação da quitina (a) para obter quitosana (b).

Como observado na Figura 2.3, o que difere a quitosana da quitina é a presença de grupos funcionais acetilados na estrutura dessa última, ao contrário da quitosana que apresenta grupos aminos. O processo de obtenção da quitosana é caracterizado pela reação de hidrólise, onde os grupos acetilados presentes na quitina são praticamente removidos, desse modo, a quitosana é obtida com um percentual de grau de desacetilação (GD) que depende da quantidade de grupos acetilados removidos. Usualmente, a quitosana comercial possui grau de desacetilação variando entre 70 e 95% (CANELLA e GARCIA, 2001).

Alguns parâmetros podem influenciar a eficiência da reação de desacetilação da quitina e, assim, interferir nas propriedades físico-químicas da quitosana final. Dentre esses parâmetros se destacam a concentração da base, temperatura e tempo de reação (CAMPANA e SIGNINI, 2001).

A solubilidade da quitina é muito baixa, devido a sua alta cristalinidade que está relacionada, principalmente, com as ligações de hidrogênio com os grupos acetamidos, o que tem limitado as aplicações da quitina. Ao contrário da quitina, a quitosana é solúvel na maioria das soluções diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos. Entretanto, a sua solubilidade é difícil de controlar, pois ela está relacionada com o grau de acetilação, concentração iônica, pH, natureza do ácido utilizado para protonação. Além disso, a distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia tem uma grande influência na solubilidade devido às ligações de hidrogênio e o caráter hidrofóbico desse grupamento (RINAUDO, 2006).

Diante do exposto, pode-se perceber que na estrutura da quitosana sempre haverá unidades monoméricas de acetilamida provenientes da quitina. Assim, por conveniência definiu-se que quando a quantidade de grupos acetilados é superior a 50% teremos a quitina, do contrário teremos a quitosana (KHOR e LIM, 2003).

Devido à sua característica catiônica, quando em solução ácida, a quitosana forma um eletrólito, podendo, dessa forma, atuar como um agente quelante ao interagir com polímeros e metais. Essa característica confere à quitosana a capacidade de funcionalizar moléculas biológicas como DNA, proteínas, além de interagir com os glicosaminoglicanos (MARTINO *et al.*, 2005). As principais aplicações desses sistemas são como agente antitrombogênico, liberação controlada de drogas, imobilização de enzimas e células (KIM *et al.*, 2008). A quitosana é um polímero facilmente moldável podendo ser utilizada na forma de hidrogéis, esponjas, filmes e fibras. Apesar da quitosana ser mais fácil de processar do que a quitina, ela é mais instável devido a sensibilidade ao pH e ao caráter hidrofílico (SHI *et al.*, 2006). No sentido de melhorar as propriedades mecânicas e químicas desse polímero alguns tratamentos são realizados, os quais serão discutidos mais adiante, como, por exemplo, a reticulação.

Quando inserida no organismo vivo a quitosana pode ser degradada pelas enzimas, sendo a lisozima a principal enzima responsável por isso. A reação de degradação ocorre via hidrólise dos grupos acetilados residuais e a taxa de degradação diminui com o aumento do grau de acetilação e cristalinidade do polímero (MARTINO *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos mostram a influência do grau de desacetilação em teste *in vitro* com células, podendo ser esse um parâmetro diferenciador no processo de interação biomaterial/célula. Amaral *et. al* (2007) observaram uma taxa de proliferação celular alta nos filmes de quitosana com GD entre 70 - 87%, diferentemente da observada para os filmes com GD= 51%, que foi considerada baixa. TIGH, KARAKECILI e GUMUSDERELIOGLU (2007) também avaliaram a influência do grau de desacetilação nas propriedades biológicas de arcabouços de quitosana. A resposta celular, fibroblastos, é dependente do GD, sendo que os arcabouços de quitosana com GD mais altos apresentam uma taxa de crescimento celular superior aos arcabouços com GD menores.

Diante do exposto observa-se a importância de informar o grau de acetilação ou desacetilação da quitosana, tendo em vista, que esse influencia na resposta celular, muito embora o mecanismo não seja completamente entendido. Talvez, esse parâmetro seja o principal responsável pelas divergências que surgiram na literatura quanto ao uso da quitosana na área biomédica.

2.3- Fosfatos de Cálcio

Alguns fosfatos de cálcio têm sido muito utilizados nas últimas décadas como biomateriais porque muitas das suas fases químicas estão presentes em alguns tecidos

como, por exemplo, nos ossos e dentes. Dentre os fosfatos de cálcio mais importantes para aplicações biomédicas e que são precipitados em meio aquoso estão o hidrogenofosfato de cálcio dihidratado $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, DCPD], hidrogenofosfato de cálcio anidro $[\text{CaHPO}_4]$, DCPA], fosfato de cálcio amorfo [ACP], fosfato octacálcico $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, OCP] e hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, HA], sendo que esta última pode ter algumas substituições iônicas ou catiônicas na sua estrutura dando origem à diversas apatitas. O nome hidroxiapatita é composto de duas palavras em que o termo hidroxi refere-se a presença de grupos hidroxil observados na sua estrutura química e apatita que refere-se a um mineral. A apatita pode ser bem representada pela seguinte fórmula (AOKI, 1994):



Vários componentes de apatita diferem em composição e podem ser preparados pela substituição de elementos nos seguintes sítios, M, Z e X. Em que:

M= Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K e etc.

Z= P, CO_3 , V, As, S, Si, Ge, Cr, B, etc.

X= OH, CO_3 , O, BO_2 , F, Cl, Br e etc.

Neste trabalho, o fosfato de interesse é a hidroxiapatita (HA), que é obtida em meio aquoso contendo íons cálcio e fosfato. Durante a síntese de obtenção dos fosfatos, alguns parâmetros influenciam no tipo de fosfato obtido, dentre esses estão: temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P, dentre outros. Neste contexto, os diagramas de fases são úteis para ilustrar o mecanismo pelo qual a HA se forma por meio das reações de precipitação/dissolução e expressam a variação da solubilidade

molar do componente mais relevante em função do pH. No caso dos fosfatos, a variação da solubilidade é expressa em termos do íon comum a todos os componentes, neste caso, o íon cálcio (BROWN, 1999). Além disso, este tipo de gráfico pode prever a fase de fosfato de cálcio mais estável sob condições específicas de pH e grau de supersaturação dos íons cálcio e fósforo. Como exemplo, podemos observar a estabilidade dos fosfatos de cálcio à temperatura ambiente (25 °C) em soluções aquosas no sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ como ilustra a Figura 2.4.

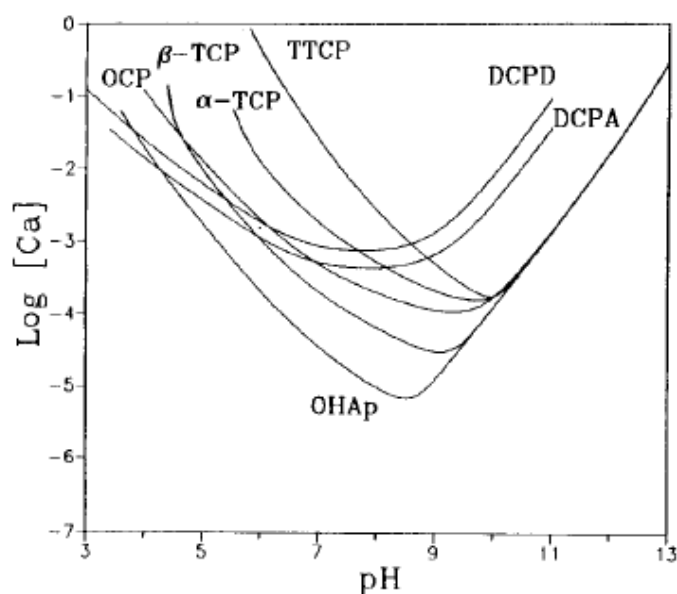


Figura 2. 4 – Solubilidade dos fosfatos em condições específicas de pH e [Ca].

A hidroxiapatita, estrutura apresentada na Figura 2.5, é considerada a fase mais estável em ambiente fisiológico, sendo, portanto, o componente que apresenta uma composição química mais próxima do tecido mineral ósseo, possuindo propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Dessa forma, ela é capaz de favorecer o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutividade), estabelecer ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade), permitindo assim a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras), as quais não a

distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial (JARCHO, 1992).

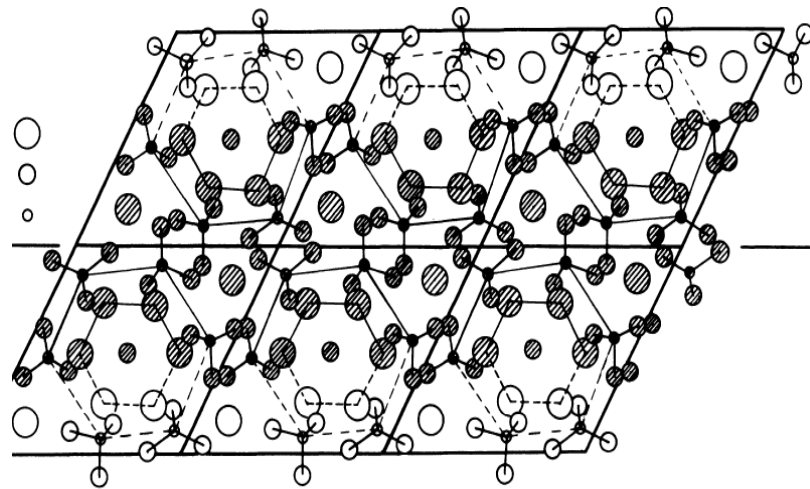


Figura 2. 5 - Estrutura da hidroxiapatita. Em que, $\bigcirc$ (cálcio), $\bigcirc$ (oxigênio) e $\circ$ (fósforo). (BROWN et al., 1987).

Uma das propriedades dos fosfatos que os diferenciam é a sua solubilidade. A hidroxiapatita é uma das fases menos solúvel e, conseqüentemente, a que leva mais tempo para ser degradada após ser implantada. Assim, vários trabalhos tentam aumentar a solubilidade dessa fase combinando a HA com outro fosfato mais solúvel, como é o caso do fosfato tricálcico (α -TCP ou β -TCP) ou ainda utilizando outras fases de fosfatos mais solúveis.

2.4- Arcabouços

Como mencionado previamente na introdução, uma das principais abordagens da engenharia tecidual envolve o uso de um arcabouço como suporte, sobre o qual as células podem se organizar e se desenvolver em um ambiente adequado para implantação. O arcabouço fornece subsídios para o novo tecido até que as células possam produzir sua própria matriz extracelular. Este arcabouço define o espaço

tridimensional para a formação de um novo tecido com estrutura e função apropriada. Características da superfície do arcabouço como a composição química e molhabilidade influenciam a adesão, o espreadimento e a proliferação celular, enquanto a estrutura do arcabouço influencia a organização espacial celular e a transmissão de sinais mecânicos e bioquímicos. Estes sinais podem incluir moléculas de adesão celular e fatores de crescimento (KIM *et al.*, 2008).

O material que constituirá o arcabouço vai depender do tipo de aplicação final. Os arcabouços para desempenhar as funções almejadas pela engenharia tecidual devem apresentar as seguintes características:

- Ser compatível e reunir fatores biológicos e nutricionais necessários às populações celulares;
- Ser reprodutível na forma tridimensional complexa;
- Ser altamente poroso e estruturado para permitir uma adequada distribuição celular e permitir a difusão de elementos nutricionais durante o cultivo;
- Ser altamente vulnerável com relação às suas propriedades química, física e mecânica.
- Ter biodegradabilidade compatível com a formação do novo tecido.

Aqui, serão enfatizados os arcabouços à base de fosfatos de cálcio e quitosana.

2.4.1-Arcabouço de Quitosana e Fosfatos de Cálcio

Estudos com arcabouços de quitosana têm aumentado significativamente nos últimos anos, sendo produzido, geralmente, pela mistura física do fosfato de cálcio com

a quitosana. Contudo, dois grupos independentes SHEN *et al.* (2007) e KONG *et al.* (2006) propuseram um método de precipitação direta para obtenção desses arcabouços. Maiores detalhes sobre esses trabalhos são apresentados a seguir:

KONG *et al.* (2006) adicionaram lentamente uma solução de nitrato de cálcio 0,1 M à solução de quitosana, que estava sob agitação constante. Posteriormente, a solução de hidrogenofosfato de amônio foi adicionada lentamente. A solução final foi congelada a -20°C e submetida a liofilização, assim o arcabouço foi obtido. Para neutralizar o arcabouço, o mesmo foi imerso em solução de NaOH 10% (m/m) durante 10 horas. Em seguida, o material foi lavado com água e novamente liofilizado. A morfologia da quitosana foi mantida no compósito e o tamanho dos poros ficou em torno de 20-60 μm . Segundo esses autores os osteoblastos conseguem migrar em uma estrutura com porosidade maior que 20 μm , e a interconectividade desses poros é alcançada quando o tamanho de poros é maior que 30 μm .

SHEN *et al.* (2007) propuseram um método de precipitação *in situ* para produzir arcabouços de quitosana e apatita. Para obtenção do compósito, a quitosana foi dissolvida em solução de ácido cítrico sob agitação constante e em seguida foram adicionados 0,31 g de $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$ e 0,92g $\text{Ca}(\text{NO})_2$. Depois disso, o compósito foi imerso em uma solução de NH_4OH para permitir a precipitação da apatita dentro do hidrogel. O compósito resistiu a uma maior tensão se comparado com o a quitosana pura.

GRANJA *et al.* (2004) produziram microesferas composta de quitosana e hidroxiapatita. Esse material, designado de compósito, foi preparado pela adição do pó de hidroxiapatita em diferentes proporções (1 a 30 % m/v) na solução de quitosana, sob agitação constante para facilitar a homogeneização. As esferas foram obtidas gotejando a mistura em uma solução de tripolifosfato de sódio (TPNa). As amostras foram

congelas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e depois liofilizadas. Os íons tri-polifosfatos e OH^- na solução de TPNa difundem dentro da quitosana durante o processo de cura, reagindo com NH_3^+ , por meio da desprotonação ou ligação de reticulação iônica.

Arcabouços constituídos de quitosana e fosfato de cálcio foram também produzidos em duas etapas por MANJUBALA *et al.* (2006). Inicialmente o arcabouço polimérico foi obtido e em seguida uma etapa de mineralização foi conduzida. Para tanto, o arcabouço foi posto na parte central de uma câmara composta por duas partes. De um lado da câmara ficava uma solução de cloreto de cálcio e no outro uma solução de hidrogeno fosfato de sódio. Essas soluções fluíam através do arcabouço. Assim, o arcabouço com fosfato de cálcio foi obtido. Os arcabouços mineralizados e não-mineralizados foram colocados em meio de cultura com células osteoblastos. Ambos os materiais não apresentaram efeito tóxico em meio de cultura, no entanto, a quantidade de proteína e a atividade enzimática de fosfatase alcalina foram maior para o arcabouço de quitosana mineralizado.

Outros trabalhos foram realizados por meio da mistura da quitosana com diferentes tipos de fosfatos de cálcio. (ZHANG e ZHANG, 2001, ZHAO *et al.*, 2006).

2.4.2- Porosidade do Arcabouço

A obtenção de um arcabouço poroso é um dos pré- requisitos para atender às necessidades da engenharia tecidual, pois a presença de poros na sua estrutura permite que as células migrem e promovam a neovascularização. Com o objetivo de obter um material poroso, vários métodos têm sido estudados. Aqui são apresentados alguns dos métodos que podem ser usados com a quitosana.

Agentes porogênicos

CHOW e KHOR (2000) desenvolveram um método para obter uma estrutura porosa na matriz de quitina. Este método consiste em adicionar carbonato de cálcio (CaCO_3) na solução polimérica e, em seguida uma solução de ácido clorídrico (HCl). Da reação proveniente do CaCO_3 , presente na estrutura do gel, com o HCl haverá formação do gás de dióxido de carbono, que serão expelidos gradativamente com conseqüente formação dos poros na estrutura do gel. O tamanho de poros ficou na faixa de 100-500 μm quando 3% em massa de carbonato de cálcio foi utilizado em uma solução polimérica 5%.

Freeze Gelation

Esse processo desenvolvido por HO *et al.* (2004) consiste em congelar a solução polimérica, que depois é imersa em uma solução coagulante. No caso da quitosana, utiliza-se hidróxido de sódio dissolvido em etanol/água. Essa solução ajusta o pH do meio, além de permitir que a solução polimérica fique no estado gelatinoso a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O líquido contido no gel foi removido após secagem à temperatura ambiente. A distribuição de poros do arcabouço ficou em torno de 60-150 μm .

Liofilização

O processo de liofilização consiste em congelar o material a ser liofilizado e em seguida submetê-lo a uma secagem a uma pressão e temperatura muito baixa para evitar que a fase rica em polímero dissolva. Isso promove a sublimação do solvente, em geral a água que passa diretamente do estado sólido para vapor. Assim, os espaços antes contidos pelas moléculas de água, ou solvente, originam a estrutura porosa no material.

Alguns parâmetros podem influenciar a estrutura dos poros. TAMPIERI *et al.* (2008) mostraram que a temperatura de congelamento e a quantidade de água influenciam a porosidade do material. Quando a temperatura de congelamento ficou em torno de -25 °C poros mais largos e anisotrópicos foram obtidos quando comparado com a temperatura de -40 °C.

2.4.3- Reticulação

As ligações cruzadas influenciam a resistência, a taxa de degradação e a biocompatibilidade dos biomateriais. A finalidade de promover ligações cruzadas, inter e/ou intra molecular, nas cadeias poliméricas se deve, principalmente, ao aumento da rigidez da matriz polimérica e, conseqüentemente, uma melhora nas propriedades mecânica do material. Por outro lado, o polímero perde a sua fluidez e, portanto, a sua capacidade de ser moldável.

Os métodos utilizados para promover ligações cruzadas, na cadeia polimérica, se dividem em dois grupos, podendo ser eles químicos ou físicos (BERGER *et al.*, 2004), sendo o método químico o reportado nesse trabalho.

As ligações cruzadas obtidas por meio de ligações químicas só serão favoráveis se a cadeia polimérica dispuser de grupos funcionais, aniônicos ou catiônicos, que possam interagir com o agente reticulador: moléculas de baixo peso molecular introduzidas durante o processo de reticulação. Na estrutura da quitosana, grupos funcionais, tais como, -OH e -NH₂, podem ser utilizados para promover as ligações cruzadas com agentes reticuladores.

É importante salientar que esse tipo de interação é dependente de algumas condições reacionais, como pH do meio, temperatura e solvente. Os agentes

reticuladores que têm sido utilizados são: glutaraldeído, formaldeído, composto de poliepoxi, isocianatos e carboimidas. Esses devem ser selecionados de acordo com o tipo de material a ser reticulado.

Em geral, a quitosana apresenta reações típicas das aminas, de forma específica as reações do tipo base de Schiff. Essa reação pode ser exemplificada pela reticulação da quitosana com glutaraldeído, Figura 2.6.

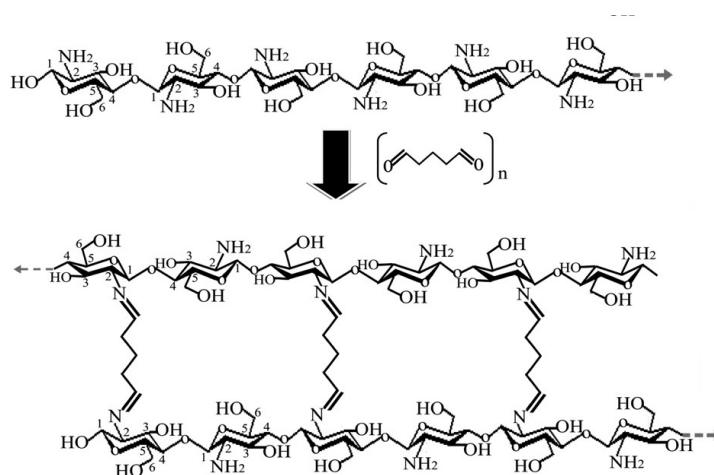


Figura 2. 6 - Reação do glutaraldeído com a quitosana. (WEBSTER et al., 2007).

A interação do glutaraldeído com a cadeia polimérica ocorre com os grupos aminas de cada glucosamina presente na cadeia da quitosana. Estes grupos atuam como sítios reativos que promovem uma aminação redutiva com o glutaraldeído e, por conseguinte, há formação de uma imina ligada entre as cadeias lineares da quitosana.

O uso do glutaraldeído tem sido extensivamente questionado na comunidade científica devido as suas propriedades cancerígenas. Apesar desse inconveniente, ele é o agente reticulador mais amplamente usado, cujos resultados mecânicos são bastante promissores (GUPTA e JABRAIL, 2006) e diversos produtos com glutaraldeído tem aprovação no FDA. Outro problema relacionado com o uso do glutaraldeído é a sua

capacidade de autopolimerizar e subsequente hidrolisar, o que acarretará na liberação indesejada do mesmo para o organismo. A sua liberação pode causar calcificação em regiões indesejáveis.

Com a finalidade de substituir o glutaraldeído, reagentes como, a carbodiimida (EDS) e epícloridrina (C_3H_5ClO) podem ser usados. Contudo, inexistem na literatura trabalhos que mostrem o efeito desses reagentes alternativos em testes *in vitro* ou *in vivo*. Em geral, o sucesso do processo de reticulação química vai depender do tipo do agente reticulador usado, podendo ele ser tóxico ou não.

LIN *et al.* (2007) produziram arcabouços de quitosana, que foram reticulados com tri-polifosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$) cuja reação pode ser observada na Figura 2.7. A solução de quitosana foi congelada e, em seguida, liofilizada durante 2 dias. Depois, as amostras liofilizadas foram imersas durante 4 horas em uma solução de $Na_5P_3O_{10}$ 5% para promover as ligações cruzadas. Em seguida, os arcabouços foram lavados durante 1 dia com água destilada e novamente liofilizados. Quatro tipos de arcabouço à base de quitosana foram estudados, a saber: quitosana pura, quitosana tratada com 10 μ L de colágeno, quitosana com condroitina e quitosana tratada com plasma de argônio. Com dois dias de cultura de células todos os materiais apresentaram números de células similares, entretanto, com 6 e 8 dias de cultura a quantidade de células foi maior na quitosana, quitosana com colágeno e no controle.

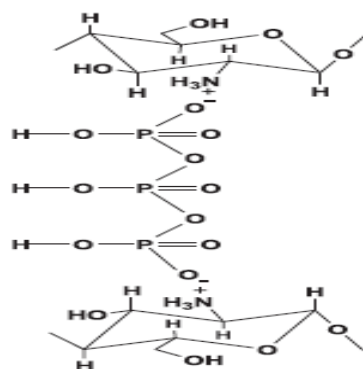


Figura 2. 7 - Interação da quitosana com o tripolifosfato (LAUS et al., 2006).

O tipo de reação envolvida no processo de reticulação da quitosana com tripolifosfato é do tipo ligação iônica, como observado acima, onde os grupos protonados da quitosana interagem com os íons tripolifosfatos.

De acordo com o exposto neste capítulo pôde-se ter uma visão do contexto em que esse estudo está inserido. Além da importância de desenvolver materiais que possam atuar em regiões que apresentam defeitos osteocondrais.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA TESE

A hidroxiapatita e os demais fosfatos de cálcio apresentam vastas aplicações como substitutos ósseos. A capacidade que esses materiais possuem de se integrarem com o tecido vivo após serem implantados é indiscutível. Apesar dessas características, a maioria dos fosfatos de cálcio apresenta algumas limitações para determinadas aplicações, dentre as quais podemos citar a baixa taxa de degradação *in vivo* quando comparada com a taxa de neoformação óssea. Essa baixa taxa de reabsorção está relacionada com a alta cristalinidade decorrente da maioria dos processos utilizados na fabricação dos produtos à base de fosfatos de cálcio. Nesse sentido, a combinação do biopolímero, quitosana, com a hidroxiapatita parece ser um caminho promissor para promover a regeneração óssea localizada, especificamente em uma das regiões do defeito osteocondral.

O defeito osteocondral se caracteriza por uma perda da função da cartilagem, que acaba comprometendo também o tecido ósseo. Embora vários grupos de pesquisas venham estudando diversos tratamentos que possam auxiliar no reparo desses defeitos, somente um produto comercializável é encontrado na literatura (GOMOLL *et al.*, 2010). Baseado no exposto, o principal **objetivo do presente trabalho é obter um compósito com dupla-camada e dupla funcionalidade**. O compósito será constituído por uma camada de quitosana-hidroxiapatita e a segunda camada por quitosana. A primeira camada objetiva regenerar parte do osso subcondral, enquanto a segunda camada poderia auxiliar na reparação da cartilagem articular.

Os objetivos específicos são:

- Definir uma rota de obtenção do compósito quitosana-hidroxiapatita;
- Selecionar as melhores condições de reticulação do polímero;
- Estudar a biodegradação dos arcabouços na presença de lisozima;
- Avaliar a bioatividade da camada QuitHA;
- Avaliar a citotoxicidade dos arcabouços.

CAPÍTULO 4

METODOLOGIA

Esse capítulo apresenta os materiais que foram usados durante a realização desse trabalho, bem com as metodologias utilizadas na fabricação dos arcabouços e as técnicas de caracterização empregadas. De forma resumida, é apresentado um fluxograma com as principais etapas realizadas nesse trabalho, Figura 4.

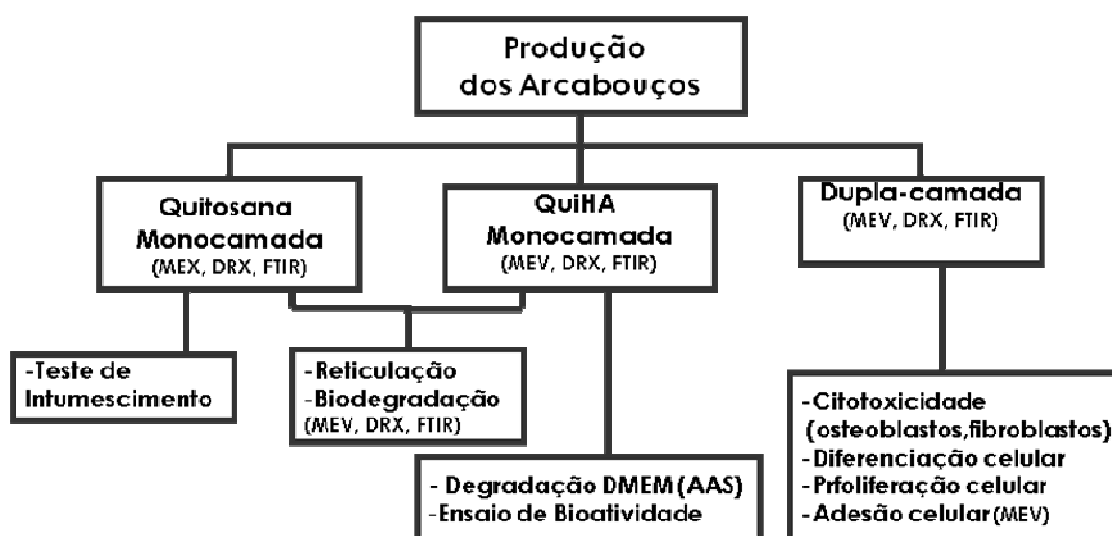


Figura 4. 1 - Resumo das principais etapas realizadas.

4.1- Materiais

4.1.1- Caracterização da Quitosana

A quitosana usada nesse trabalho foi da SIGMA (lote- 417963 e viscosidade 200 cps) e o seu grau de desacetilação (GD) não foi especificado. A determinação do grau de desacetilação constitui uma das primeiras etapas a ser realizada quando se trabalha com a quitosana, já que o mesmo influencia as propriedades físico-químicas, grau de cristalinidade e hidrofobicidade da mesma. Os métodos mais comumente usados para determinação do GD são: titulação potenciométrica, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H), titulação condutimétrica, espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (CANELLA e GARCIA, 2001), além da espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (LIU *et al.*, 2006). Nesse trabalho, o GD da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica. Além da análise para determinação do GD, a quitosana também foi caracterizada por difração de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA).

Titulação Potenciométrica

A determinação do GD por titulação potenciométrica consistiu em dissolver a amostra de quitosana em uma solução de ácido clorídrico, HCl, em excesso. Em seguida, esse material foi titulado com uma solução de NaOH, padronizada anteriormente, usando um pHmetro. Com os valores de pH e volumes de NaOH correspondentes obtêm-se um gráfico com duas inflexões, onde a diferença de volume (ΔV) é proporcional a quantidade de grupos aminos titulados, que são característicos da quitosana. Com os resultados extraídos do gráfico é possível determinar o GD da quitosana por meio da relação apresentada a seguir:

$$GD(\%) = \frac{161[base](V_2 - V_1)100}{m} \quad (4.1)$$

Sendo: 161 - massa molar da unidade monomérica da quitosana (g/mol)

m- massa da amostra (mg)

V_2 - volume da base usada para neutralizar os grupos da quitosana protonados (mL) e V_1 -volume de NaOH usado para neutralizar o excesso de HCl (mL).

4.1.2- Produção e Caracterização da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi precipitada quando uma solução de hidrogeno fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) foi adicionada lentamente, com o auxílio de bombas peristálticas, a uma solução de acetato de cálcio a 70 °C e pH 8,0. O pH da solução foi ajustado com hidróxido de amônio e os reagentes utilizados na síntese foram da MERCK.

Após o término da reação, o material ficou sob digestão durante três horas na mesma temperatura da síntese. Posteriormente, o precipitado foi filtrado e lavado com água Ultrapura. O material obtido foi seco a 50 °C e caracterizado por difração de Raios-X para identificação da fase obtida e também por FTIR. A quantificação de cálcio e fósforo na HA foi realizada por fluorescência de Raios-X.

4.2- Arcabouço de Quitosana Monocamada

4.2.1- Produção e Caracterização

O arcabouço de quitosana pura foi obtido pela sua dissolução a 2% em massa em solução de ácido acético 1 % durante 24 horas e sob agitação constante. O material obtido foi colocado em moldes cilíndricos de aproximadamente 10 mm de diâmetro,

congelados e liofilizados (equipamento L101 da Liobras) durante 48 horas. A espessura e o diâmetro dos arcabouços liofilizados ficaram em torno de 2,7 mm e 7,0 mm, respectivamente.

A investigação morfológica dos arcabouços produzidos antes e após reticulação foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSM 6460, JEOL) acoplado a um sistema de análise espectroscópica por energia dispersiva de raios-X (EDS). As amostras provenientes dos testes de degradação também foram analisadas por MEV. Imagens da seção transversal do arcabouço foram obtidas após o corte das amostras com gillette. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro para obtenção das imagens no MEV e uma voltagem de 15 ou 20 kV foi aplicada.

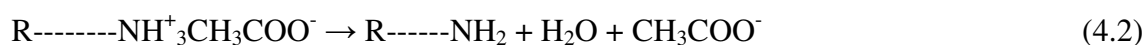
As amostras também foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, utilizando o equipamento da Perkin Elmer (Spectrum 100). Algumas amostras foram analisadas no modo de refletância total atenuada (ATR), enquanto outras foram previamente prensadas com KBr, com o objetivo de trabalhar em uma faixa mais ampla de comprimento de onda. Para isso, 2 mg da amostra foram trituradas e misturadas com 200 mg de KBr para obtenção da pastilha após prensagem. Os espectros foram obtidos com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras (scans).

A técnica de difração de raios-X (DRX) é amplamente utilizada para obter informações sobre estrutura, fases, orientação cristalográfica, e outros parâmetros estruturais, como cristalinidade. Nesse estudo, ela foi usada para caracterização das fases presentes, bem como para visualização de possíveis mudanças após imersão dos arcabouços em SBF e também após a reticulação dos arcabouços. A depender da análise, 2θ sofreu uma variação de 3 a 70° , e a velocidade de varredura foi de $3^\circ/\text{min}$. O

equipamento usado foi XDR-6000 (Shimadzu, Japão) com radiação de $\text{CuK}\alpha$. A identificação das fases cristalinas presentes nos espectros de DRX foi possível por comparação com espectros das fichas de padrões contidas no JCPDS - International Center for Diffraction Data (2000).

4.2.2- Reticulação

Antes do processo de reticulação, todos os arcabouços foram neutralizados com solução de NaOH (0.1% m/v) até a estabilização do pH e, em seguida, eles foram lavados abundantemente com água Ultrapura. Essa etapa é necessária, pois, o arcabouço obtido, é, na verdade, um sal de quitosana. E esse é formado pela interação dos íons acetatos (oriundos do ácido acético) com os íons NH_3^+ da quitosana. A reação de neutralização é apresentada a seguir.



Acetato de quitosana

Quitosana

Após a etapa de neutralização, os arcabouços foram reticulados com o tripolifosfato de sódio, sendo que, as condições de reticulação, tais como, concentração, pH e tempo de reticulação foram escolhidas de acordo com um planejamento de experimento do tipo 2^3 . A resposta usada no planejamento foi o tempo de degradação em ambas as soluções, PBS e DMEM. As amostras ficaram imersas nessas soluções até 28 dias.

De acordo com os resultados do planejamento de experimento, foi selecionada a seguinte condição para a reticulação: tripolifosfato de sódio 1% m/v, 3 horas e 37 °C. As amostras foram imersas individualmente em 2 mL dessa solução na temperatura e tempo selecionado, depois elas foram lavadas abundantemente com água bidestilada

para remover o excesso do reticulador. Durante a lavagem o pH do meio foi monitorado. Depois dessa etapa, as amostras foram congeladas e liofilizadas durante 24 horas.

4.2.3-Teste de Absorção de Água

Estudos de absorção de água são bastante relevantes para entender o comportamento dos materiais biodegradáveis, que após serem implantados, inevitavelmente estarão na presença de fluidos corpóreos que se difundirão dentro do bulk do polímero dando início ao processo de degradação. Assim, o comportamento de inchamento dos arcabouços de quitosana pura e de quitosana reticulada foi avaliado usando uma solução de PBS, previamente filtrada, a pH 7,4 e a temperatura ambiente. O peso seco dos arcabouços (m_i) foi medido antes do início dos ensaios. Os períodos de tempos de imersão foram 5, 10, 30 e 60 minutos. Depois de atingido cada tempo, o excesso de água foi removido com um papel de filtro e o arcabouço foi pesado novamente (m_f). O teste foi realizado em triplicata e a variação de massa foi quantificada. Para determinar a quantidade de água absorvida utilizou-se a seguinte relação:

$$Absorçãodeágua = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \cdot 100 \quad (4.3)$$

4.2.4- Biodegradação in vitro

O teste de degradação enzimática foi realizado com os arcabouços de quitosana pura e reticulados. A solução foi preparada pela dissolução de lisozima (96381 U/mg) da Fluka analytical (Sigma-Aldrich), em 500 mL de PBS a pH 7,4, de forma que a concentração de lisozima ficou em 1,5 mg/mL. Segundo JIN *et al.* (2009) esta concentração é próxima a da matriz extracelular da cartilagem humana. As amostras

foram incubadas em tubos de polietileno contendo a solução de lisozima, com a razão do arcabouço para a solução de lisozima igual a 1mg/mL. O teste foi realizado a 37 °C durante 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Atingido o tempo de incubação, as amostras eram removidas da solução, lavadas cuidadosamente com água ultrapura, congeladas e novamente liofilizadas. Com o objetivo de medir a taxa de degradação, a perda de massa foi determinada. Além disso, o pH da solução foi medido após cada tempo. O ensaio foi realizado em triplicata e o número total de arcabouços usados foi 36.

4.3- Arcabouço QuitHA monocamada

4.3.1- Proporção Quit:HA

O propósito dessa etapa foi avaliar a melhor metodologia de preparação do arcabouço QuitHA que pudesse se adequar ao processo de formação dos arcabouços com dupla camada (QuitHA/Quit). Dentre os processos usados para a produção de compósitos QuitHA, os métodos de precipitação e mistura física foram testados nessa etapa. O método de precipitação apresentou algumas desvantagens, principalmente em relação à homogeneidade da HA sobre a matriz polimérica. Sendo, portanto, o método de mistura física escolhido, o qual está descrito a seguir.

Para obter os arcabouços constituídos por quitosana mais hidroxiapatita, essa última foi peneirada de forma que o tamanho das partículas resultantes fosse inferior a 125 µm. As partículas de HA foram dispersas em uma solução de quitosana 2% (m/v) sob agitação magnética e deixada no ultrasson durante 5 minutos. As proporções em massa de quitosana em relação a HA avaliadas foram (70:30 e 50:50). Os compósitos obtidos foram analisados em relação a homogeneidade das partículas de HA sobre a matriz polimérica. As diferentes misturas foram colocadas em moldes cilíndricos e

congeladas a aproximadamente 18 °C. Em seguida, as amostras foram liofilizadas durante 48 horas, sendo que nessa etapa, a água cristalizada é sublimada e os poros são formados. O diâmetro e a espessura do arcabouço foi de 8 e 3,7 mm, respectivamente. Para determinar o tamanho de poros do arcabouço 50Quit50HA foi realizada uma análise de imagem (6 imagens) no programa Image-Pro Plus.

4.3.2- Degradação em Meio de Cultura (DMEM)

A estabilidade dos arcabouços (50Quit50HA) foi avaliada pela imersão desses em uma solução de DMEM durante 24 horas. A liberação de cálcio pelo arcabouço foi quantificada por espectroscopia de absorção atômica modelo AA 6800. A análise foi realizada com chama de acetileno e o comprimento de onda foi de 442,7 nm. De forma sucinta, foi preparada uma curva de calibração (0,5 - 3ppm) a partir de uma solução padrão de cálcio (MERCK). As amostras analisadas foram diluídas e as suas absorbâncias foram determinadas.

4.4- Arcabouço Dupla-Camada

4.4.1- Produção e Caracterização

As partículas de hidroxiapatita foram dispersas em uma solução de quitosana 2% (m/v) para obter a primeira camada do arcabouço, cuja proporção Quit:HA foi de 50:50 (%m/m). Essa mistura foi vertida em moldes e então deixada no congelador até atingir um ponto ótimo, o qual foi definido a partir de alguns testes preliminares. Depois disso, a segunda camada foi obtida pela adição da solução de quitosana pura 2% (m/v) sobre a primeira camada. Em seguida, o arcabouço dupla-camada foi congelado a aproximadamente 18 °C durante 24 horas e liofilizado durante 48 horas. Esses arcabouços foram neutralizados e reticulados utilizando as mesmas condições definidas

para o arcabouço de quitosana. O diâmetro e a espessura do arcabouço dupla-camada foi de 5 e 7,4 mm, respectivamente.

Para realização dos testes a seguir, cada camada do arcabouço foi avaliada individualmente, o que nos permitirá entender, por exemplo, a influência da fase mineral no processo de degradação, bem como na resposta citotóxica. Outros autores também têm estudado ambos os arcabouços individualmente com o objetivo de entender cada camada do sistema (TAMPIERI *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2006).

4.4.2- Ensaio de Bioatividade

Este teste avalia a bioatividade de um material por sua capacidade de servir de substrato para a precipitação de um fosfato de cálcio amorfo, a partir dos íons contidos numa solução ao que o material é imerso por diferentes tempos. A composição da solução empregada nesse ensaio está apresentada na Tabela 4.1 e todos os reagentes usados foram de grau analítico. O pH foi ajustado com solução de HCl 1,0M. Depois de preparada, a solução foi filtrada com uma membrana de tamanho de poro 0,2 µm, antes de ser utilizada no teste de bioatividade. As amostras cilíndricas com peso da ordem de 6 mg foram imersas, individualmente, em 10 mL dessa solução durante 15 dias. A solução usada foi 1,5x mais concentrada que a SBF convencional, cujo objetivo foi acelerar o processo de avaliação da bioatividade, além disso, a solução foi trocada a cada 3 dias. Soluções com concentrações superiores a SBF convencional têm sido usadas com o mesmo propósito (BARRERE *et al.*, 2002).

Tabela 4.1- Reagentes usados para preparar um litro da SBF 1,5x.

Reagentes	Quantidade (g)	Pureza (%)
NaCl	12,052	99,5
NaHCO ₃	0,532	99,5
KCl	0,338	99,5
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,346	99,0
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,466	98,0
CaCl ₂	0,438	95,0
Na ₂ SO ₄	0,108	99,0

Os ensaios foram realizados em triplicada e em condições fisiológicas, ou seja, a 37 °C e pH em torno de 7,4. Depois de atingido o tempo pré-determinado, as amostras foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura, congeladas e liofilizadas durante 24 horas. As amostras foram analisadas por MEV, FTIR e DRX.

4.4.3-Teste de Degradação in vitro

O teste de degradação da camada QuitHA reticulada foi similar ao dos arcabouços de quitosana pura e reticulada. O ensaio foi realizado usando uma solução de PBS contendo lisozima 1,5 mg/mL. As amostras foram imersas nessa solução durante 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. O peso delas foi determinado antes e após imersão na solução.

4.4.3- Teste de Citotoxicidade

Dentre os métodos de esterilização reportados na literatura para a quitosana, como óxido de etileno, álcool etílico e radiação gama, esse último foi o escolhido e a dose foi de 25 kGy.

Três diferentes funções das células foram analisadas: integridade lisosomal e permeabilidade membranas, atividade dihidrogenase; principalmente mitocondrial e o

DNA. A combinação desses três parâmetros fornece uma maior confiabilidade dos resultados. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas ISO 10993-12 (1996) e ISO 10993-5 (1999).

Osteoblastos

Ambas as camadas do arcabouço dupla-camada, quitosana reticulada e QuitHA reticulada, foram avaliadas individualmente. O ensaio foi conduzido em quintuplicata, totalizando 10 arcabouços. Inicialmente, os extratos dos arcabouços foram obtidos após imersão dos mesmos em meio de cultura e incubação durante 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. A razão área da amostra/volume da solução foi de 3cm²/mL, de acordo com a norma ISO 10993-12 (1996) para compósitos de espessura maior que 0,5mm. Em paralelo, osteoblastos de ratos MC3T3 (CRL 2594 – ATCC) foram semeados em placas de cultura (1x10⁴ células/poço) e cultivados em DMEM contendo NaHCO₃ (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L) suplementado com soro fetal bovino 10% durante 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, o extrato dos arcabouços, 180µl, e 20µl SFB foram, individualmente, adicionados em cada poço contendo 1x10⁴ células durante 24 horas. Decorrido esse tempo, os extratos foram removidos e o grau de citotoxicidade foi avaliado com um kit comercial (Cytotox, Xenometrix, Germany), o qual permite avaliar três parâmetros diferentes na mesma amostra: XTT, vermelho neutro (NR) e cristal violeta (CV).

O princípio do XTT baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais converterem o sal de tetrazolio XTT em um composto de formazan, de coloração laranja, com leitura a 480nm. O equipamento usado foi um leitor de microplacas UV/Vis (PowerWave MS2, BioTek Instruments, USA). NR baseia-se na habilidade das células vivas em incorporar o corante vermelho neutro em seus

lisossomos, acumulando-se em células com membrana intacta; a quantidade de corante incorporado foi monitorada a 540 nm. A incorporação de CV avalia a densidade celular pela sua incorporação do DNA; após a eliminação do excesso de corante, a absorbância a 540 nm é proporcional à quantidade de células. Como controle positivo e negativo utilizou-se, respectivamente, uma solução de fenol a 1% e titânio em pó.

Fibroblastos

O ensaio de citotoxicidade com fibroblastos Balb/ c 3T3 procedeu de forma similar ao realizado com osteoblastos. Entretanto, o controle negativo usado foi o poliestireno de alta densidade e somente a camada Quit reticulada foi avaliada. Essa análise também foi realizada por NR, XTT e CV.

4.4.4- Cultura de Células

4.4.4.1- Arcabouço Quit

Células do tipo osteoblastos (2×10^5) foram cultivadas sobre o arcabouço de Quit reticulada durante 14 dias. Após esse tempo de cultura, as amostras foram fixadas com uma solução de Karnovsky e analisadas no MEV.

4.4.4.2- Arcabouço QuitHA

Os testes de proliferação (MTT) e de diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina - ALP) foram realizados no ICSI/CNRS.

Proliferação celular- MTT

A quantificação das células viáveis sobre o arcabouço de QuitHA foi realizada pela determinação da atividade mitocondrial da célula usando o método de MTT. Esse método se baseia na redução do sal tetrazolico dentro das mitocôndrias formando um sal de formazan que absorve na região de 570 nm. Para realização desse ensaio, células osteoprogenitoras (5×10^5) do tipo STRO+1A foram cultivadas sobre o arcabouço QuitHA durante 7, 14 e 21 dias.

Diferenciação celular – (Atividade ALP)

Células osteoprogenitoras do tipo STRO+1A (5×10^5 células) foram cultivadas sobre os arcabouços reticulados de QuitHA, durante 7, 14 e 21 dias. Atingido o tempo de cultura, a atividade da enzima fosfatase alcalina foi avaliada. Essa enzima, em meio alcalino, catalisa a transferência do grupo fosfato do p-nitrofenilfosfato (solução incolor) para a dietanolamina liberando o p-nitrofenol (solução amarela). Portanto, a atividade de fosfatase é proporcional a produção do p-nitrofenol.

Atingido o tempo de cultura, as amostras foram retiradas do meio de cultura, lavadas três vezes com tampão PBS e, em seguida, permeabilizadas com uma solução aquosa de TRITON X-100 0,5% por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução substrato (20mM p-nitrofenil-fosfato, 100mM dietanolamina, 10mM cloreto de magnésio, pH 9,5) e incubou-se o sistema a 37°C por 30 minutos. Passado este tempo adicionou-se a solução “stop” (0,1 M EDTA, 1M NaOH) e leu-se a absorbância em 405nm. Foi utilizado como controle (branco) uma solução de 0,5% de TRITON X-100 em água.

4.5- Análise Estatística

Todos os dados foram apresentados com a sua respectiva média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância *one way* seguida do teste de Tukey foi aplicada nos dados de degradação em DMEM, degradação *in vitro* e de citotoxicidade. Para todas as análises, diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Materiais

5.1.1- Caracterização da Quitosana

O difratograma de raios-X da quitosana assim como o seu espectro no infravermelho (FTIR) são apresentados na Figura 5.1 e 5.2, respectivamente.

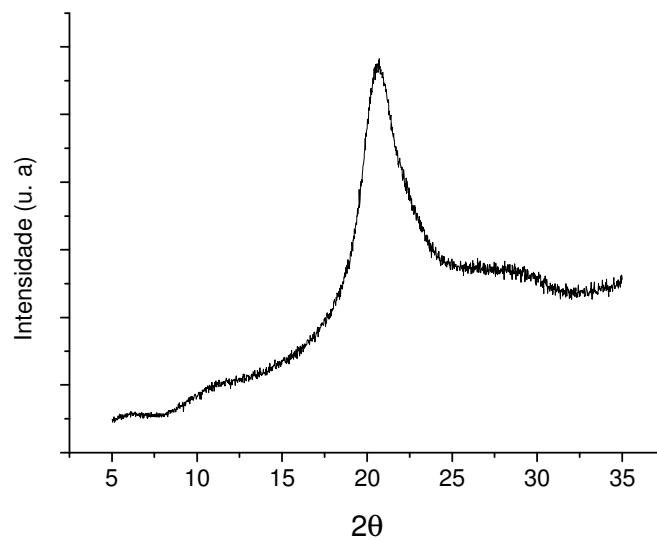


Figura 5. 1 – Difratograma de raios-X da quitosana em pó.

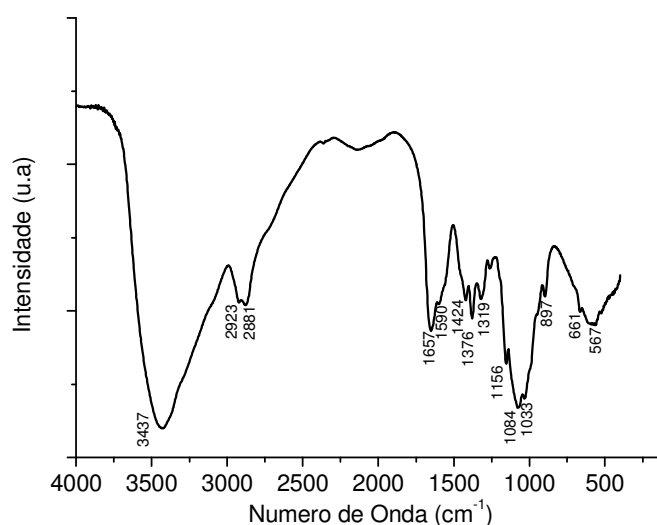


Figura 5. 2 – Espectro de FTIR da quitosana em pó.

De acordo com a literatura a quitosana é um polímero semicristalino e, por isso, apresenta um pico definido e um halo amorfo quando submetido à análise de DRX. Na Figura 5.1, em torno de 20° , foi observado um pico característico da quitosana, sendo que resultados similares foram apresentados nos trabalhos de CHOI *et al.* (2007), TUZLAKOGLU e REIS (2007a).

No espectro de infravermelho (Figura 5.2) observa-se uma banda na região de 1657 cm^{-1} referente ao modo vibracional da amida I, característica da quitina. Banda na frequência da vibração do grupo carboxílico foi detectada a 1417 cm^{-1} . O estiramento da ligação C-O foi evidenciado a 1084 cm^{-1} e 897 cm^{-1} , enquanto que a frequência de vibração da ligação C=O foi observada a 1033 cm^{-1} . Banda de amida III foi detectada a 1319 cm^{-1} . Deformação da ligação C-H foi observada a 1424 e 2880 cm^{-1} . Também foi evidenciada uma banda do estiramento antissimétrico do C-O-C a 1156 cm^{-1} referente a ligação glicosídica β (1-4). A banda da amina se encontra na região de 1600 cm^{-1} e pode ter sido sobreposta pela banda da amida (SANTOS, 2004, MANJUBALA *et al.*, 2006).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana é dado em função da percentagem de grupos amino desacetilados em relação aos grupos acetilados. Além de influenciar as propriedades da quitosana, ele ainda a diferencia da quitina, sendo que a quitosana deve apresentar grau de desacetilação superior a 50%. Na Figura 5.3 são apresentados os gráficos da quitosana titulada, experimento realizado em duplicata, e o da solução de ácido clorídrico sem quitosana, bem como as derivadas dos mesmos.

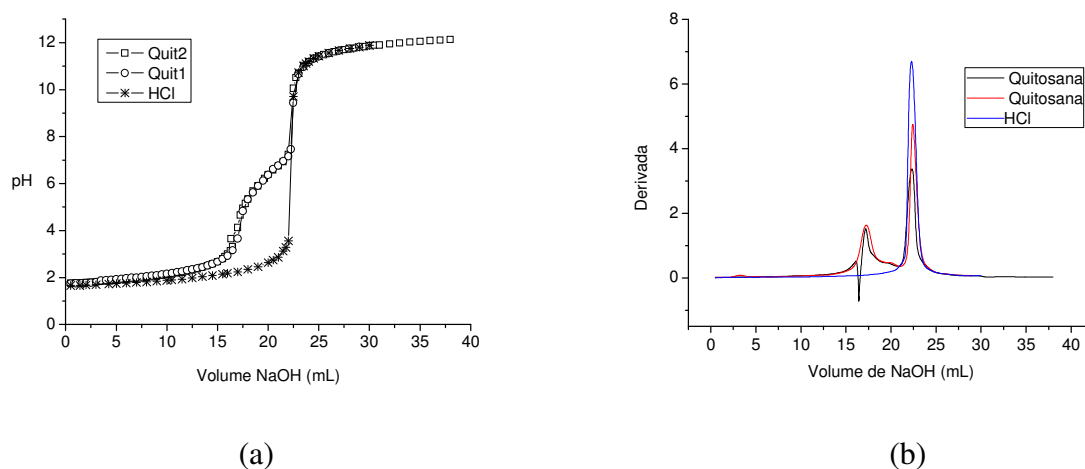


Figura 5. 3 - Curva de titulação da quitosana (a), e as suas derivadas (b).

O cálculo da derivada permitiu uma maior precisão na determinação dos volumes da solução de NaOH usados para titular os grupos aminos e o excesso de ácido clorídrico. Conhecendo os volumes e fazendo uso da Equação 4.1 pôde-se determinar o GD médio que foi de 70%.

AMARAL *et al.* (2007) mostraram que filmes de quitosana com GD igual ou superior a 70% favoreceram a proliferação celular em comparação aos filmes com GD inferiores. Ainda, os autores acreditam que uma elevação nas taxas de adesão e proliferação com o aumento do GD se deve a interação entre a fibronectina e grupos aminos presente na estrutura da quitosana, embora as características hidrofílicas e

catiônicas tenham contribuído para tal. Diante do exposto, pode-se inferir que o grau de acetilação e/ou desacetilação influencia os três estágios de crescimento das células.

Com o propósito de conhecer a temperatura de degradação da quitosana, utilizada neste trabalho, foi obtida a curva termogravimétrica (TGA) a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Essa etapa foi necessária para informar sobre a temperatura máxima que o polímero deve suportar durante a síntese do compósito, isto é, da precipitação de fosfato de cálcio em meio contendo o polímero. Na Figura 5.4 podemos observar o perfil da curva de TGA, bem como a sua derivada, DTG.

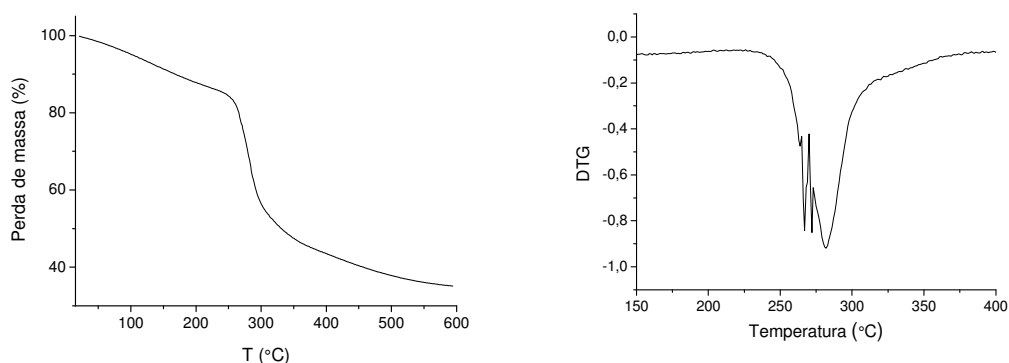


Figura 5. 4 - Termograma de TGA e DTG da quitosana em pó obtido a uma taxa de aquecimento de 10° C/min.

Pode-se observar dois estágios na curva de TGA, o primeiro refere-se a perda de água e corresponde a 23% de massa. A 100 °C somente 2 - 7 % de água foram liberadas. Essas moléculas de água, observadas na estrutura da quitosana, são provenientes da sua interação com os grupos hidroxilas e aminos, presente na estrutura do polímero, via ligações por ponte de hidrogênio. Embora a quitosana seja insolúvel em água, quando em presença de solvente aquoso (por exemplo, uma solução de ácido acético) há a formação de um hidrogel, uma vez que a quitosana consegue interagir com as moléculas

de água sem se dissolver. A degradação do polímero ocorre no segundo estágio da curva que é bastante pronunciado e, portanto, característico do processo de degradação. ZOHURIAAN e SHOKROLAHI (2003) afirmam que o processo de degradação da quitosana é governado por três estágios: desidratação, despolimerização e decomposição pirolítica, os quais dão origem às moléculas de água, dióxido de carbono, metano e amônia.

Com a curva de DTG foi possível determinar com mais precisão a temperatura máxima de degradação do polímero, que ficou em torno de 280 °C. Baseado nesses resultados pode-se inferir que a temperatura usada durante o processamento do polímero deve ser inferior a 100 °C de forma a garantir a manutenção da sua estrutura, sem grandes perdas de água.

5.1.2- Caracterização da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita sintetizada por via úmida, a partir dos reagentes hidrogeno fosfato de sódio monobásico e acetato de cálcio, foi submetida à análise de difração de raios-X para identificação da fase e/ou fases presentes, Figura 5.5. Um tripleto característico da HA foi detectado a 31.7, 32.2 e 32.9°, cujos planos correspondentes a esses ângulos de difração são (211), (112) e (612), respectivamente. Os picos menos intensos também foram identificados como sendo dessa fase e, dessa forma, pode-se afirmar que a hidroxiapatita é o único componente presente. Ademais, um teste colorimétrico também foi realizado e nenhum traço de CaO foi evidenciado, sugerindo que a reação ocorreu de forma satisfatória sem nenhum resíduo. A Figura 5.6 apresenta o espectro de infravermelho da hidroxiapatita sintetizada.

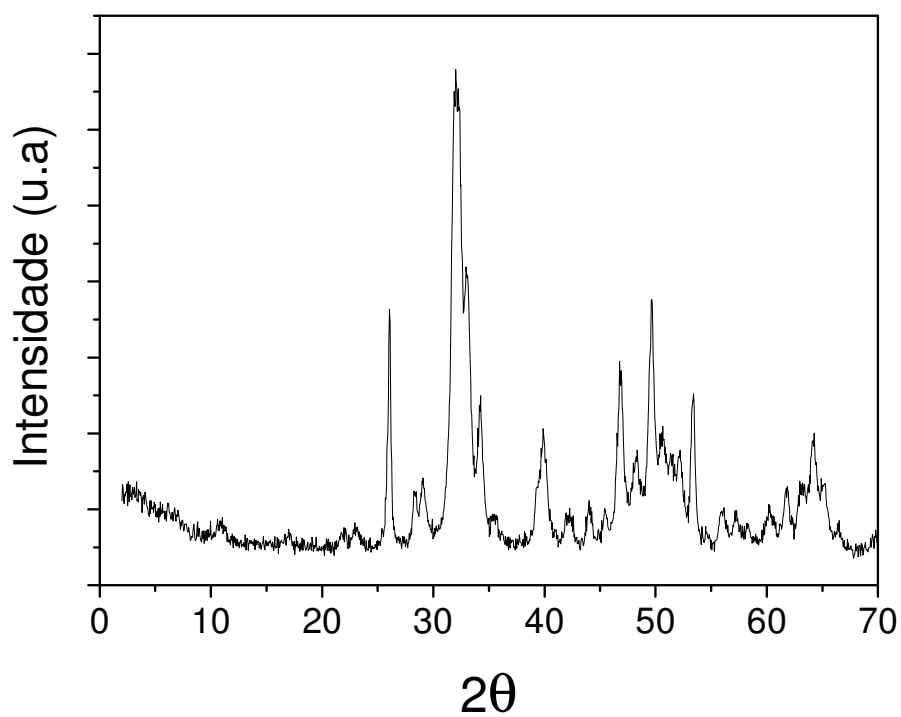


Figura 5. 5 - Difratoograma de DRX da hidroxiapatita.

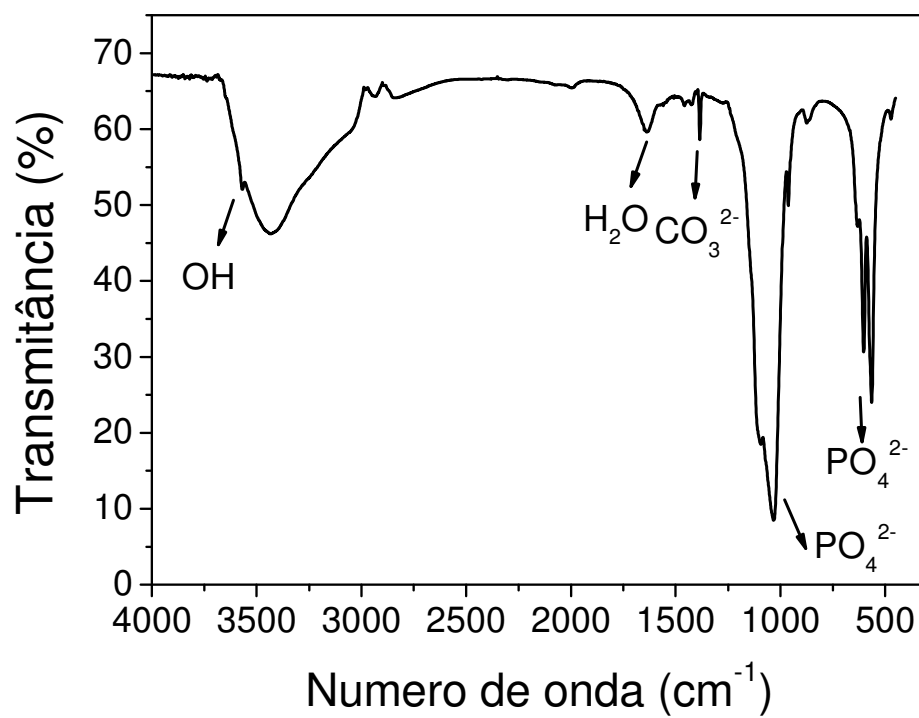


Figura 5. 6 - Espectro de FTIR da hidroxiapatita sintetizada a pH 8,0 e a temperatura de 70 °C.

De acordo com o espectro de FTIR observou-se o surgimento de uma banda na região 1379 cm^{-1} , que é atribuída ao modo vibracional do grupo carbonato, indicando a sua incorporação na rede da apatita com substituição do tipo B. Há relatos de que a presença de íons carbonato nas apatitas sintéticas influencia o comportamento de decomposição, solubilidade e reatividade biológica. Eles provocam uma diminuição na cristalinidade e um aumento na solubilidade, tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *in vivo* (SLOSARCZYK *et al.*, 2005, LANDI *et al.*, 2004). Bandas na região de $1039\text{--}1093\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao modo vibracional da molécula do PO_4^{3-} na frequência de ressonância (ν_3). Também as bandas na região de $603\text{ e }564\text{ cm}^{-1}$ são características do modo de ligação do PO_4^{3-} com ν_4 . A existência das bandas de absorção na região $3573\text{ e }635\text{ cm}^{-1}$ é característica do grupo OH^- presente na HA. Ainda, uma banda localizada a 1638 cm^{-1} foi identificada como sendo da molécula de água.

Por meio da análise química de fluorescência de raios-X pôde-se quantificar o fósforo e o cálcio presente na hidroxiapatita, na forma dos seus respectivos óxidos. A HA produzida possui uma razão cálcio/fósforo igual a 1,5, caracterizando, assim, uma HA deficiente em cálcio e, por conseguinte, mais solúvel que a estequiométrica. Ainda, observou-se a presença de traços de sódio, correspondendo a 0,432% em massa, o qual é proveniente do reagente de partida (hidrogeno fosfato de sódio).

5.2- Arcabouço de Quitosana Monocamada

5.2.1- Caracterização

A micrografia do arcabouço de quitosana é apresentada na Figura 5.7. O arcabouço de quitosana apresenta uma estrutura de poros interconectados e com tamanho bastante variado. Essa imagem representa a seção transversal do arcabouço, contudo, a imagem da superfície do mesmo também apresenta uma estrutura porosa.

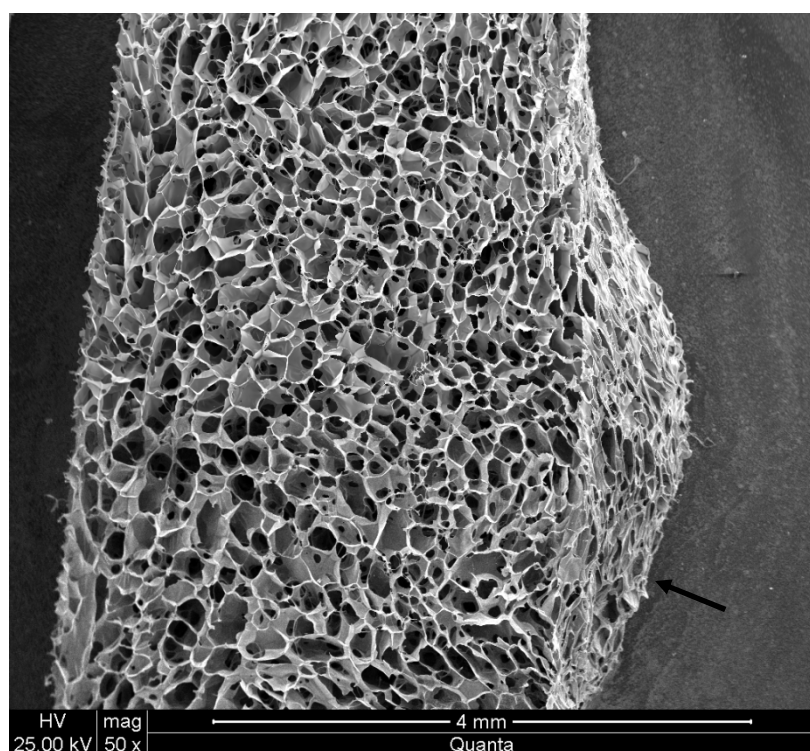


Figura 5. 7 - Micrografia obtida no MEV da seção transversal do arcabouço de quitosana 2% (m/v). A seta indica a superfície do arcabouço.

5.2.2- Reticulação

A reação de reticulação da quitosana com o TPNa foi apresentada na revisão da literatura, Figura 2.7. Os espectros dos arcabouços de quitosana sem e com reticulação (1%TPNa/ 3 horas/ 37°C) podem ser observados a seguir, Figura 5.8, mostrando as suas vibrações moleculares. De acordo com o espectro de FTIR, pode-se observar que após a reticulação há um deslocamento da banda localizada a 1655 cm^{-1} para a região espectral a 1645 cm^{-1} e na região em torno de 1554 cm^{-1} a banda se torna mais definida. As mudanças evidenciadas no espectro acima podem ser atribuídas à ligação entre os íons fosfóricos do reticulante e grupamento amônia da quitosana. Resultados similares foram apresentados por XU e DU (2003) e KNAUL *et al.* (1999) em que nanopartículas e

filmes de quitosana foram tratados com esse mesmo reticulante. De forma geral, podemos perceber que a mudança no espectro da quitosana reticulada foi sutil, provavelmente, isso se deve a baixa concentração do agente reticulante. Mudanças acentuadas no modo de vibração foram detectadas quando a concentração do agente reticulante foi de 5% (dados do planejamento de experimento - não apresentados) corroborando os resultados de LIN *et al.* (2007) ao usar essa mesma concentração. Devido as limitações da técnica de FTIR para identificação mais eficiente da reação de reticulação, outras técnicas auxiliares foram empregadas, tais como, DRX e EDS, Figura 5.9 (a) e (b), respectivamente.

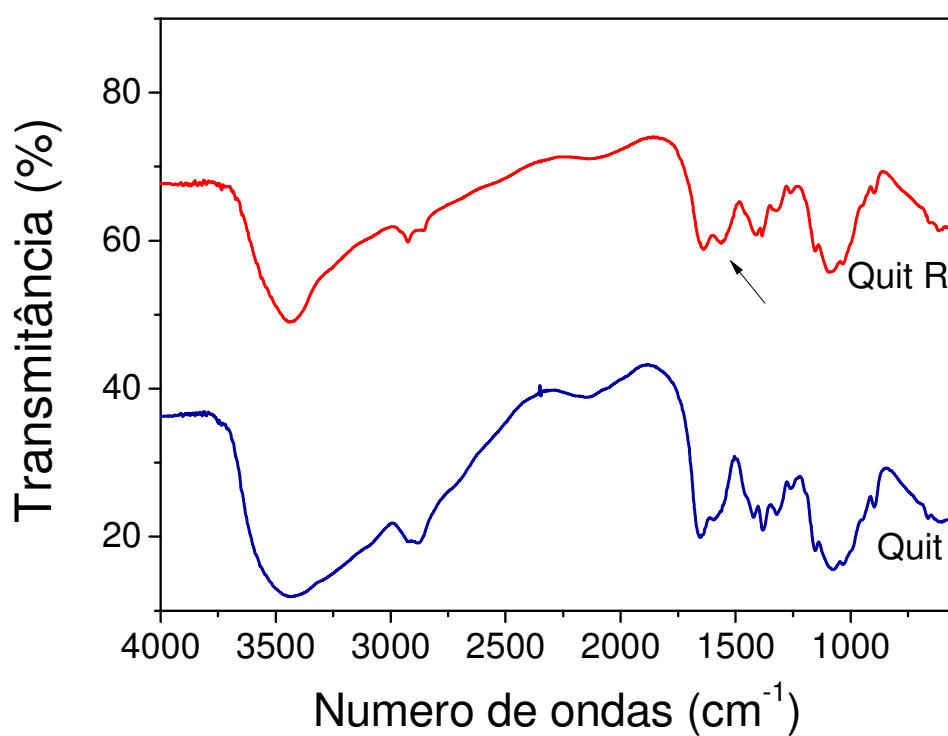
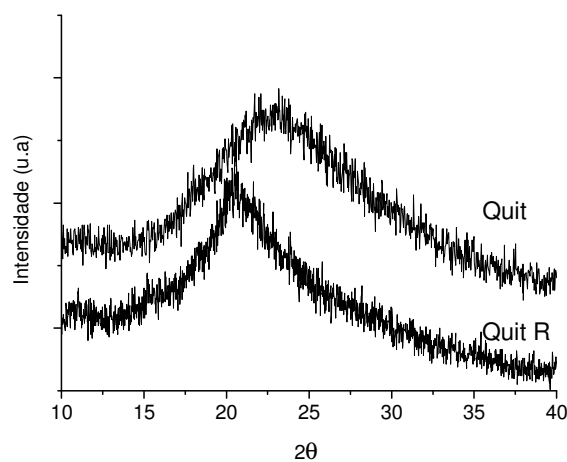
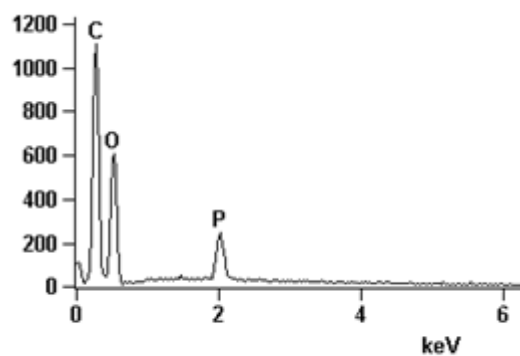


Figura 5. 8 – Espectros dos arcabouços de quitosana (Quit) e quitosana reticulada (QuitR) com TPNa 1% (m/v).

Comparando o difratograma de DRX de ambos os arcabouços, quit pura e quit reticulada, nota-se uma diferença na cristalinidade do polímero, Figura 5.9 (a). Isso sugere que após a reticulação a cadeia polimérica se tornou mais cristalina. Ainda, vale ressaltar que nenhum pico característico do reticulante foi detectado.



(a)



(b)

Figura 5. 9 - Difratograma de DRX do arcabouço de quitosana e quitosana reticulada (a) e EDS da quitosana reticulada (b).

Pela análise de espectroscopia de energia dispersiva foi possível identificar os elementos presentes no arcabouço da quitosana reticulada. Sendo o carbono oriundo do

polímero, o oxigênio proveniente tanto do reticulante quanto do polímero e, por último, o fósforo que é procedente do reticulante, confirmando, assim, a reticulação. Nenhum resíduo catiônico, sódio, do reticulante foi detectado, o que sugere que a etapa de lavagem do arcabouço foi eficiente.

As amostras reticuladas foram analisadas também por microscopia eletrônica de varredura, Figura 5.10.

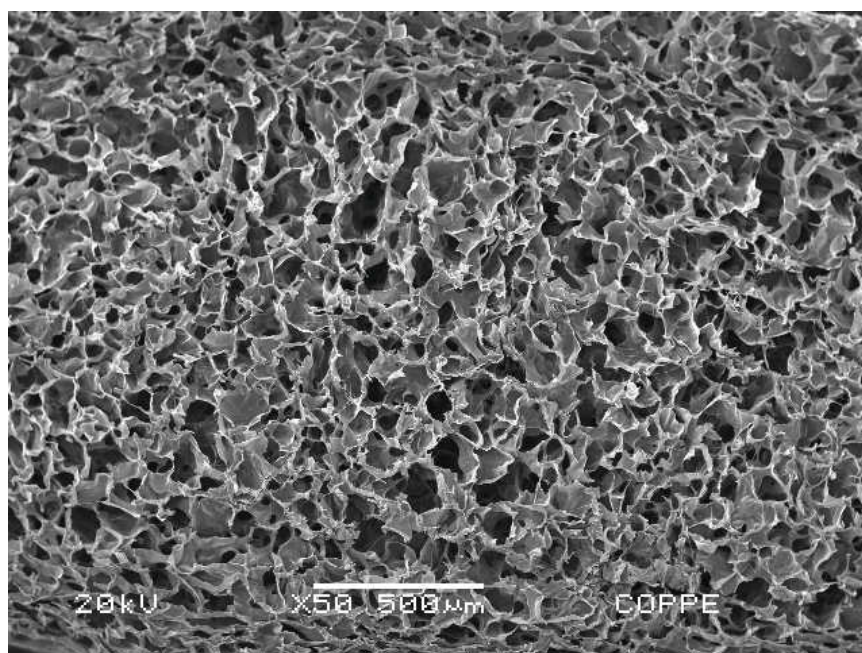


Figura 5. 10 – Imagem de microscopia da seção transversal do arcabouço de quitosana após reticulação com TPNa 1% (m/v).

A imagem de MEV mostra que a reticulação não alterou substancialmente a estrutura de poros interconectados do arcabouço de quitosana quando comparada ao arcabouço de Quit sem reticulação (Figura 5.7). Adicionalmente, as técnicas compreendendo a de FTIR, DRX e EDS também confirmaram a sua reticulação.

5.2.3-Efeito da Reticulação no Intumescimento dos Arcabouços

A taxa de inchamento de ambos os arcabouços de quitosana, com e sem reticulação, na solução de PBS a pH 7,4 é apresentada na Figura 5.11. Essa solução foi selecionada para realização desse ensaio por ser um meio bastante usado em estudos com cultura e também por apresentar um pH levemente alcalino.

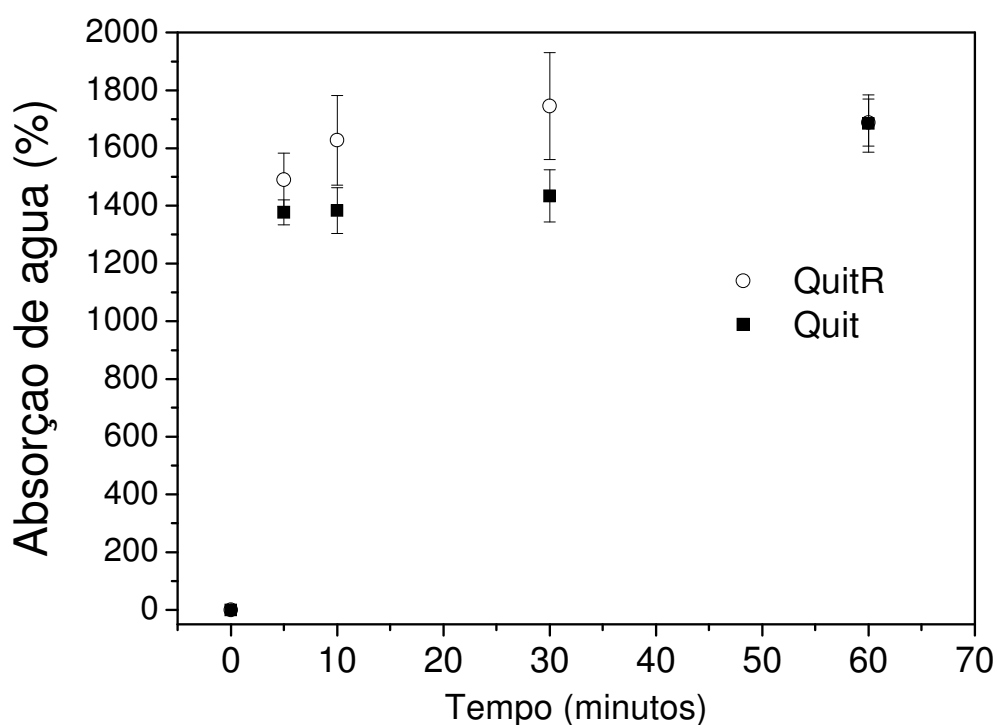


Figura 5. 11 - Taxa de inchamento para ambos os arcabouços, Quit e QuitR, em solução de PBS.

A difusão da água dentro de ambos os arcabouços aconteceu rapidamente, isso se deve a sua hidrofiliabilidade e, como consequência, o equilíbrio de retenção de água foi alcançado no início do teste. Ambos os arcabouços (com e sem reticulação) apresentaram comportamento equivalente em relação à retenção de líquido no equilíbrio que foi em torno de 1600%. Valores similares foram apresentados por THEIN-HAN e

MISRA (2009). Por outro lado, JIN *et al.* (2009) encontraram valores superiores para o sistema contendo quitosana-ácido glicólico.

Os sítios na cadeia da quitosana responsáveis pela ligação com as moléculas de água são os grupos aminos e hidroxílicos. Estes resultados apresentados para ambos os arcabouços são bastante interessantes para aplicações na região da cartilagem, uma vez que a cartilagem é um tecido com alta quantidade de água intersticial (60-80%) e somente 20-40 % correspondem a componentes orgânicos, tais como colágeno e proteoglicanos (BERBERAT *et al.*, 2009).

Adicionalmente, amostras com alto grau de inchamento terão uma maior razão área/volume. Isso facilita o transporte de nutrientes, de forma mais efetiva, através do arcabouço, o que favorece o crescimento das células sobre o mesmo.

5.2.4- Efeito da Reticulação na Biodegradação *in vitro*

A lisozima é a principal enzima responsável por degradar a quitosana e a quitina no corpo, portanto, esta solução é a mais apropriada para estudar a degradabilidade desses polímeros *in vitro*. Embora muitos trabalhos realizem o teste de degradação na ausência da lisozima (OLIVEIRA *et al.*, 2006), o seu efeito tem sido intensamente evidenciado (JIN *et al.*, 2009, HONG *et al.*, 2007). Hidrogéis contendo quitosana na sua estrutura apresentaram somente 10% de perda de massa após imersão em PBS durante 21 dias, enquanto que na presença de lisozima (1,0 mg/mL) na mesma solução, uma perda de massa em torno de 60% foi detectada (JIN *et al.*, 2009).

No presente trabalho, os arcabouços de quitosana com e sem reticulação foram imersos na solução contendo lisozima, por diferentes tempos, e os seus perfis de degradação foram investigados, Figura 5.12. A perda de massa de ambos os arcabouços, quitosana e quitosana reticulada, é comparável até 7 dias, apesar do arcabouço não-

reticulado ter se apresentado menos resistente durante a sua manipulação. O arcabouço de quitosana não-reticulado demonstrou uma perda de massa drástica por volta de 70 e 90% após 14 e 21 dias, respectivamente, e estas amostras se mostraram bastante frágeis. Consequentemente, no fim do experimento elas não puderam ser recuperadas. Por outro lado, a perda de massa para os arcabouços de quitosana reticulados diminuiu lentamente, e mais que 70% do seu peso original permaneceu inalterado até 28 dias de imersão. Ainda, vale ressaltar que durante os ensaios de degradação o pH da solução de lisozima permaneceu invariável, mostrando o efeito tamponante do PBS. Esses resultados corroboram os dados apresentados por LIN *et al.* (2007), uma vez que os arcabouços reticulados degradaram mais lentamente que os não reticulados.

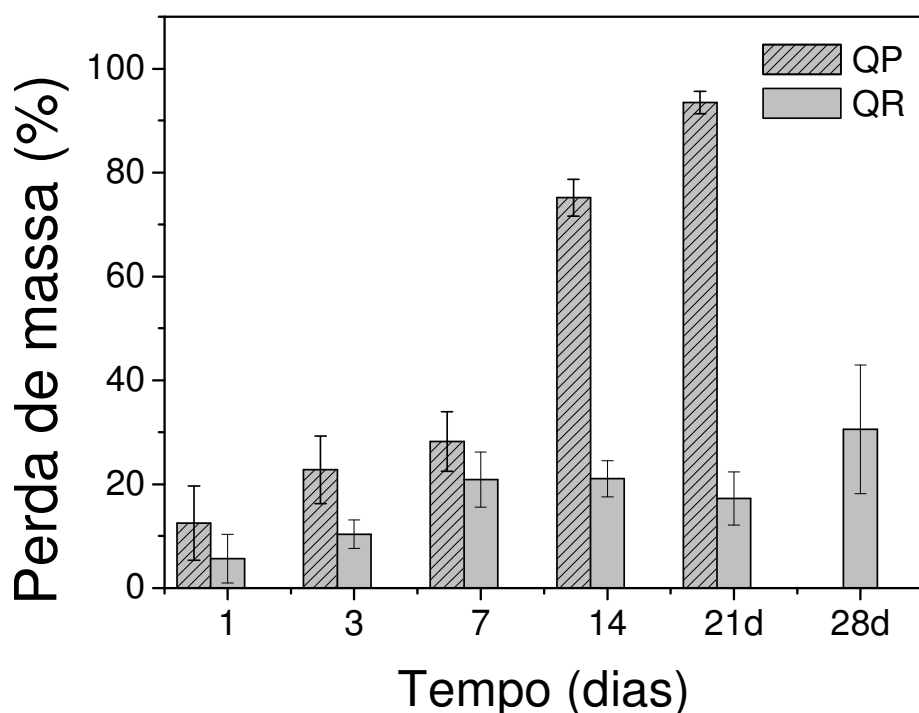
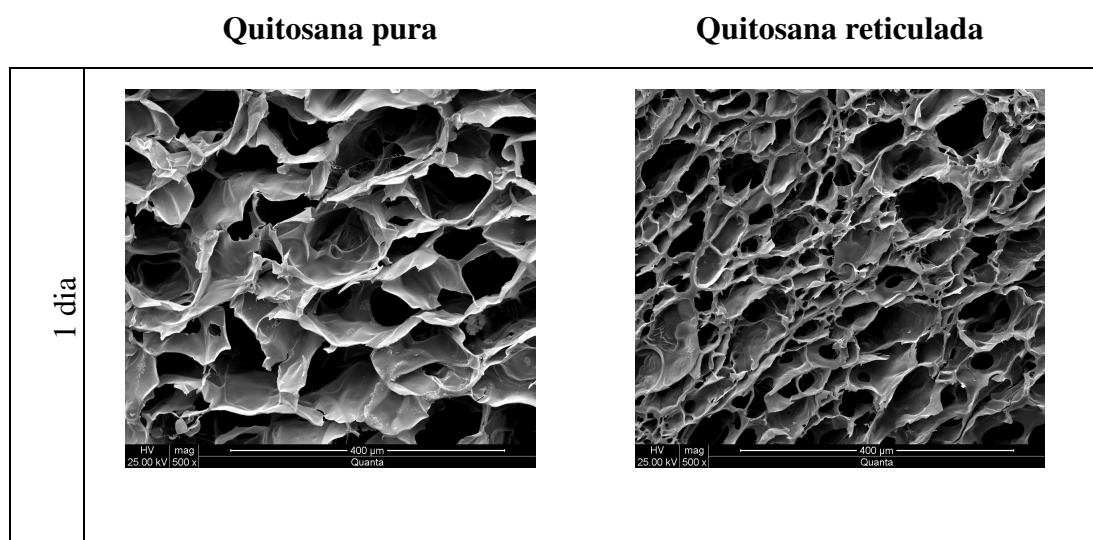


Figura 5. 12 - Variação da perda de massa dos arcabouços Quit e QuitR em função do tempo de imersão na solução de PBS contendo lisozima (1,5 mg/mL).

REN *et al.* (2005) demonstraram a dependência da taxa de degradação da quitosana em relação ao GD, pela ação da lisozima. As matrizes de quitosana com GD de 62, 56 e 52% experimentaram uma perda de massa de 15, 40 e 70 %, respectivamente, após 21 dias. Eles propuseram o mecanismo de degradação para a quitosana, o qual compreende dois estágios: no primeiro há o inchamento da matriz polimérica com a penetração de água e, paralelamente a hidratação, há quebra de ligações dando início ao processo de degradação. Já no segundo estágio, a amostra já encontrou o equilíbrio de inchamento, a degradação continua e a matriz tende a ficar menos espessa.

As micrografias das amostras imersas na solução contendo lisozima são apresentadas na Figura 5.13. Elas corroboram os dados de perda de massa apresentados anteriormente. Por exemplo, com 7 dias de imersão, a amostra de Quit pura já se encontra bastante frágil, caracterizando uma perda na sua integridade. Por outro lado, as amostras de Quit reticulada resistiram até 28 dias, embora uma perda de massa considerável tenha sido verificada.



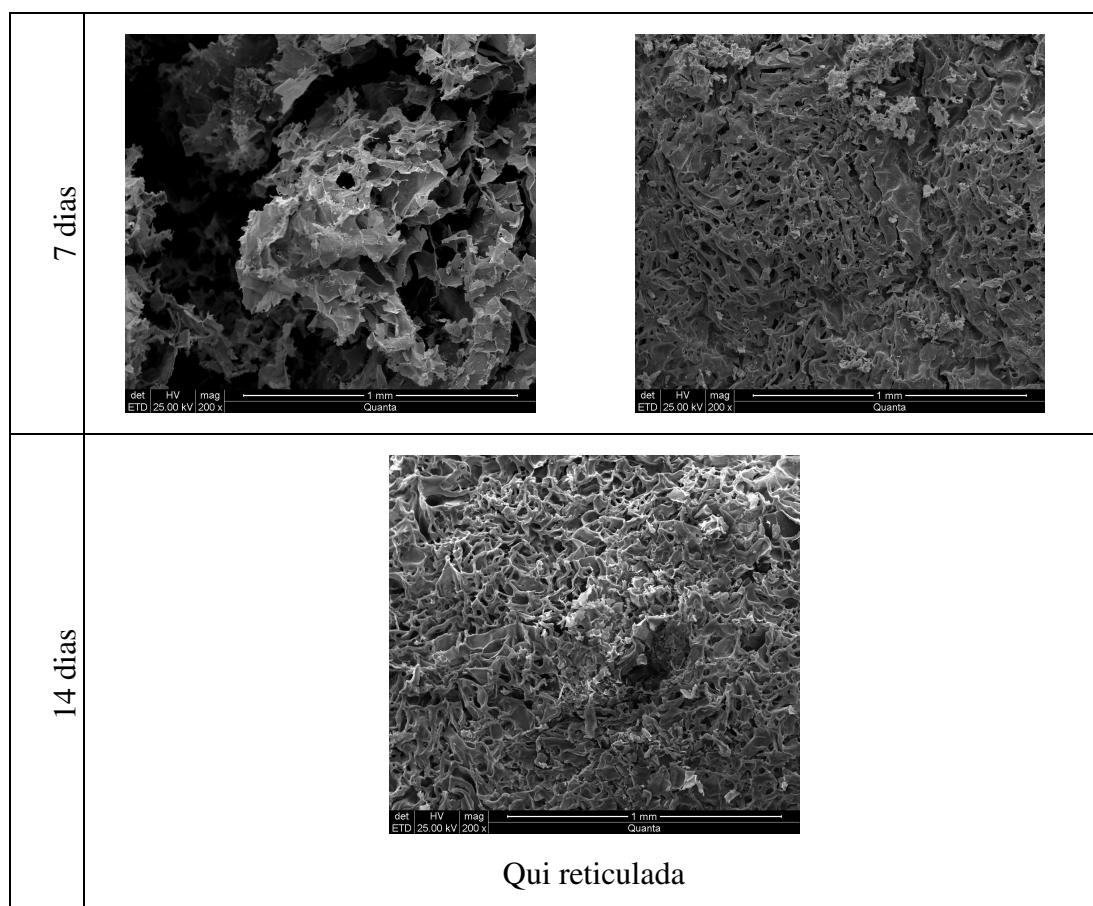


Figura 5. 13 - Micrografias dos arcabouços após teste de degradação.

Esses resultados mostraram a eficiência do agente reticulante, TPNa, na estabilização da estrutura dos arcabouços de Quit. Uma possível explicação para isso deve estar relacionada com o aumento da cristalinidade, observada no difratograma, Figura 5.8 (a), uma vez que a região cristalina da cadeia polimérica degrada mais lentamente que a amorfa. Ainda, é reportado na literatura que o produto da degradação da quitosana e quitina é natural e não acumula no corpo, pois a lisozima a hidroliza convertendo-a em N-acetil glucosamino, um açúcar amino comumente encontrado no corpo (LIN *et al.*, 2007), caracterizando-os como polímeros biodegradáveis.

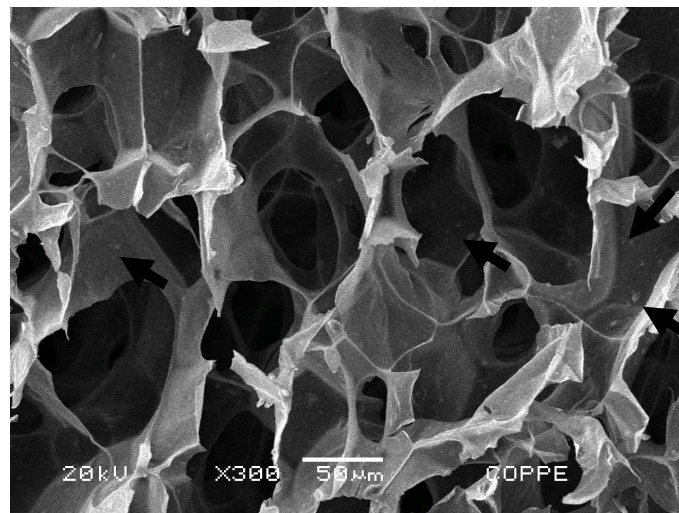
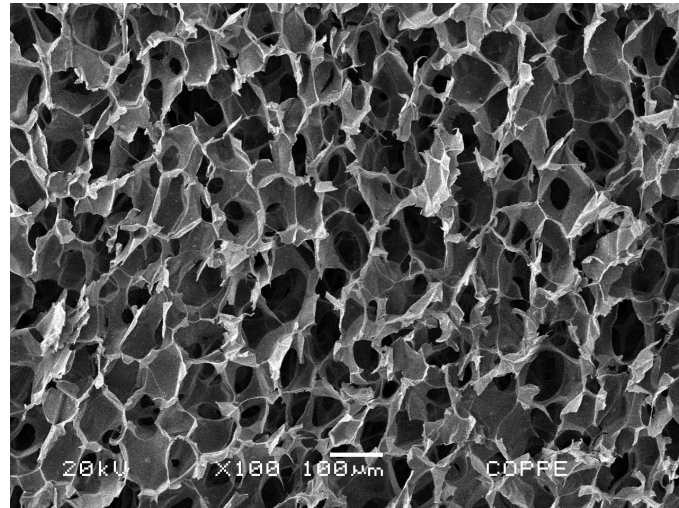
5.3- Compósito Quitosana com Hidroxiapatita (QuitHA)

5.3.1- Proporção Quit:HA

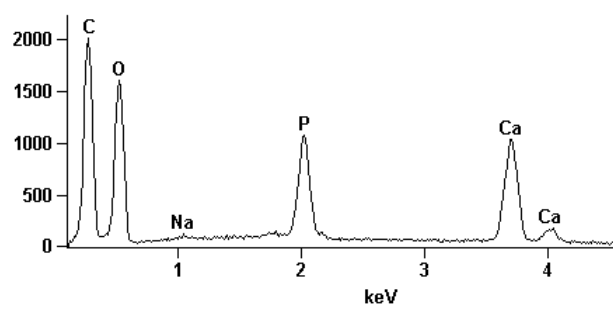
O sucesso do compósito de quitosana-fosfato de cálcio depende da interação desses dois materiais ou ainda da dispersão desse último sobre a matriz polimérica. Segundo SHEN *et al.* (2007), a interação entre os materiais pode melhorar as propriedades mecânicas do produto final. Sobretudo, uma melhora na atividade e viabilidade celular sobre os compósitos QuitHA tem sido observada após a adição da hidroxiapatita (HA). MA *et al.* (2001) observaram que a HA não só aumentou a osteocondutividade do compósito poroso de PLLA-HA como também a sua capacidade de adsorção de proteínas. Adicionalmente às vantagens da HA mencionadas acima, ainda podemos destacar a sua bioatividade.

A produção de um compósito com proporção mais próxima a do tecido ósseo seria a de 30 % em massa de quitosana e 70% em massa de hidroxiapatita (30Quit70HA), entretanto, essa proporção foi descartada, baseado no estudo realizado por SENA (2004) para o sistema colágeno-hidroxiapatita, em que foi observado um excesso de partículas inorgânicas soltas. Isso pode comprometer o desempenho do produto final, gerando, na maioria das vezes, um efeito citotóxico para as células.

Assim, as proporções mássicas de QuitHA estudadas foram: 70Quit30HA e 50Quit50HA. As micrografias e EDS do compósito 70Quit30HA são apresentados na Figura 5.14 (a) e (b), respectivamente, enquanto o seu difratograma é mostrado na Figura 5.15.



(a)



(b)

Figura 5. 14 - Imagens de MEV com diferentes aumentos (a) e EDS (b) do arcabouço 70Quit30HA. A seta indica a presença de HA.

Baseado nas micrografias pode-se afirmar que a estrutura de poros interconectados foi mantida após adição de 30% em peso de HA. Além disso, pode-se observar que as partículas de HA estão bem dispersas na matriz polimérica e bem aderidas. A quitosana é referida na literatura quanto às suas propriedades adesivas, o que a torna susceptível como ligantes para as cerâmicas (HU *et al.*, 2004). Os principais elementos característicos da quitosana foram identificados no espectro de EDS, são eles carbono e oxigênio. Ademais, cálcio e fósforo que são típicos do fosfato de cálcio também foram identificados.

No difratograma de DRX observa-se uma área amorfa característica do polímero a 20°. Também o pico principal relacionado à HA em 31° foi detectado, sendo que os demais não estão bem definidos, o que caracteriza a baixa cristalinidade do compósito.

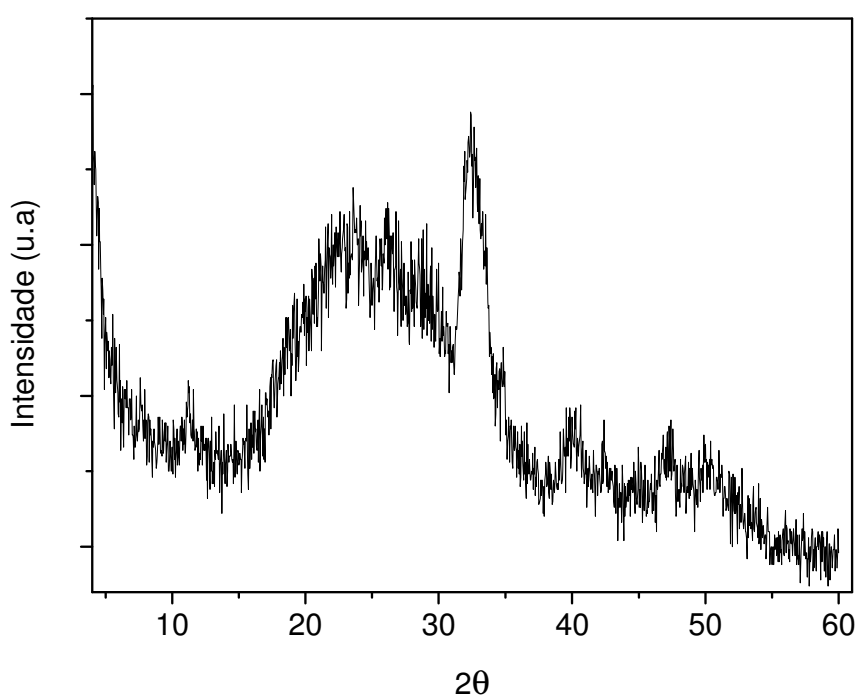
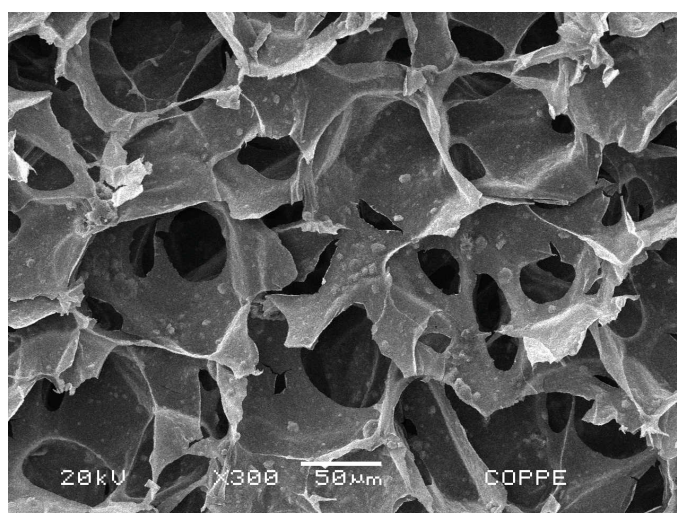
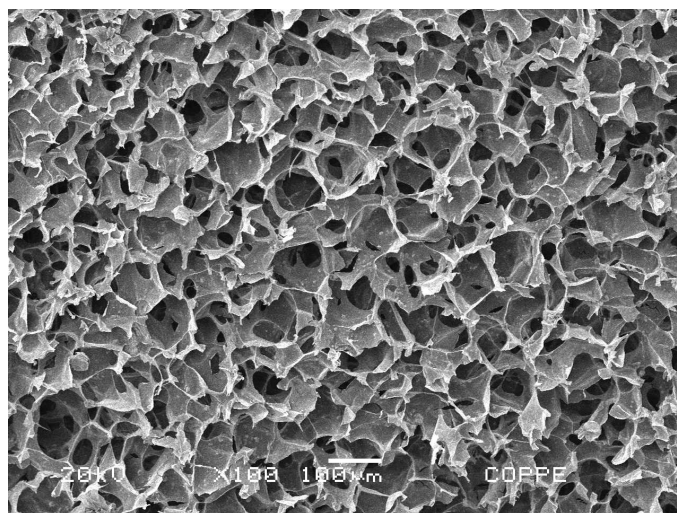
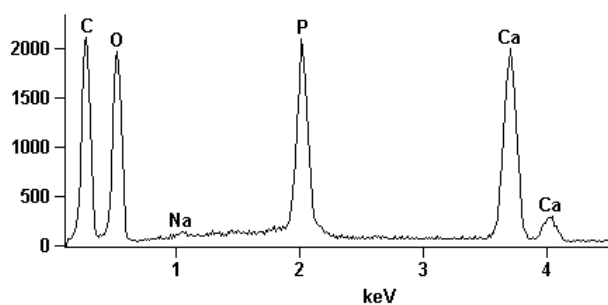


Figura 5. 15 - Difratograma de DRX do arcabouço 70Quit30HA.

A Figura 5.16 apresenta as imagens obtidas no MEV do arcabouço 50Quit50HA com o seu respectivo EDS.



(a)



(b)

Figura 5. 16 - Imagens obtidas no MEV do arcabouço 50Quit50HA com diferentes aumentos (a) e o seu respectivo EDS (b).

Pelas micrografias observa-se que a matriz polimérica suportou a HA, mostrando que as suas partículas parecem estar bem dispersas e aderidas. Durante as análises de MEV, várias amostras foram avaliadas e para cada amostra foram obtidas imagens de ambas as superfícies, superior e inferior, além de imagens de seção transversal, algumas dessas últimas foram expostas anteriormente. A média do tamanho de poros para o arcabouço 50Quit50HA reticulado ficou em torno de 43-70 μm , a depender do lado da amostra analisado.

A técnica de espectroscopia de FTIR é bastante útil para examinar a interação polimérica com partículas. Assim, o espectro do arcabouço 50Quit50HA é mostrado na Figura 5.17. Comparando o espectro do arcabouço QuitHA com o de quitosana pura e HA, nós podemos observar bandas de ambos os materiais (Quit e HA) presentes no arcabouço QuitHA. No compósito surgem duas novas bandas a 569 cm^{-1} e 1104 cm^{-1} , correspondente ao modo vibracional do P-O. Essas observações sugerem que a quitosana não apenas serve como matriz para as partículas de HA, mas também promove um sítio de ancoramento para as partículas na sua estrutura, ligando elas no compósito. A quitosana apresenta uma alta afinidade pela HA, o que promove uma distribuição homogênea dessa última quando em solução de quitosana.

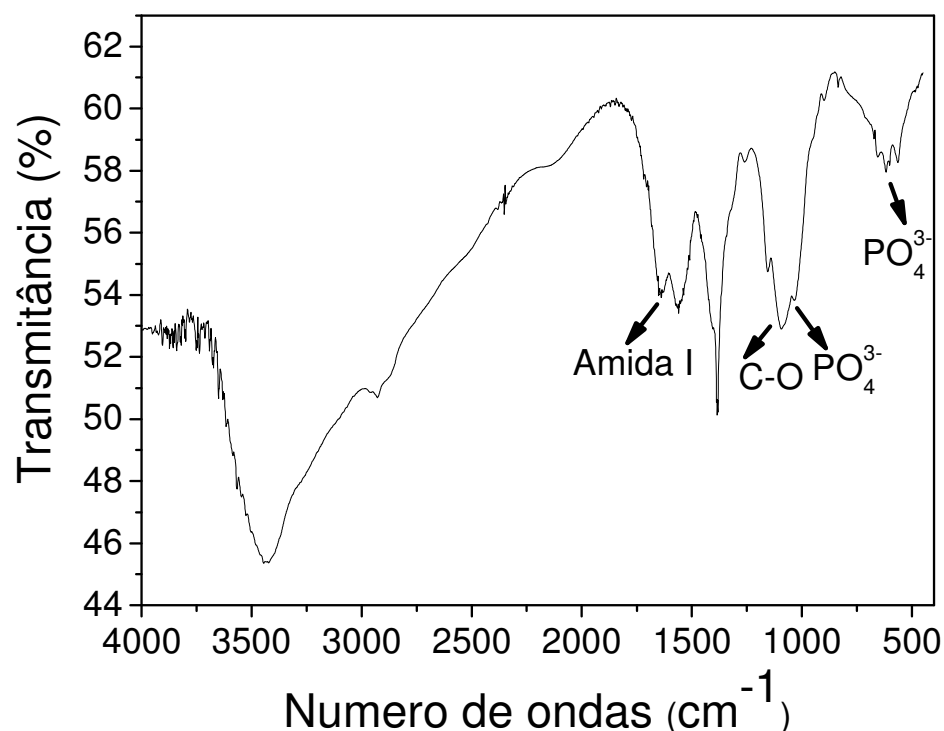


Figura 5. 17 - Espectro de infravermelho do arcabouço 50Quit50HA.

5.3.2- Degradação em Meio de Cultura (DMEM)

Para complementar os dados de MEV e assim poder selecionar a proporção do arcabouço de forma mais segura, um ensaio preliminar de degradação em DMEM foi realizado com o arcabouço 50Quit50HA. Dessa forma podemos avaliar se as partículas de HA estão sendo liberadas para o meio, visto que temos uma quantidade maior de HA nessa composição. A Figura 5.18 mostra a liberação de cálcio referente à fase inorgânica, hidroxiapatita, em meio de cultura. Pode-se observar que, praticamente, a concentração de cálcio na solução de DMEM antes e após contato com o arcabouço não varia. Isso sugere que o fosfato de cálcio, HA, não está liberando partículas para o meio. A massa percentual do arcabouço remanescente foi de $77,76 \pm 3,08$. Assim, pode-se

inferir que a integridade do arcabouço está relacionada à fase orgânica, polimérica. Dessa forma, tornou-se imprescindível a reticulação da quitosana para manutenção do arcabouço no meio, haja vista que a HA não conseguiu reforçar o mesmo. Ademais, as imagens do MEV em conjunto com esse ensaio preliminar de degradação, sugeriram que essa proporção pode ser usada para produzir os arcabouços com dupla-camada, desde que o mesmo seja reticulado.

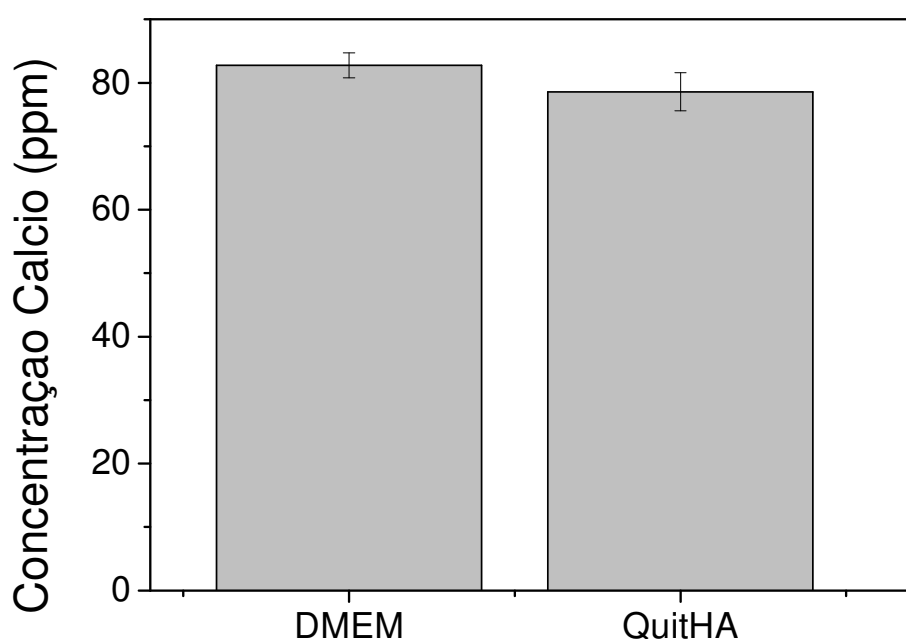


Figura 5. 18 - Concentração de cálcio na solução de DMEM antes e após imersão do arcabouço 50Quit50HA no meio por 24 horas ($p \leq 0,05$).

Após a reticulação do arcabouço 50Quit50HA o seu DRX foi obtido, Figura 5.19.

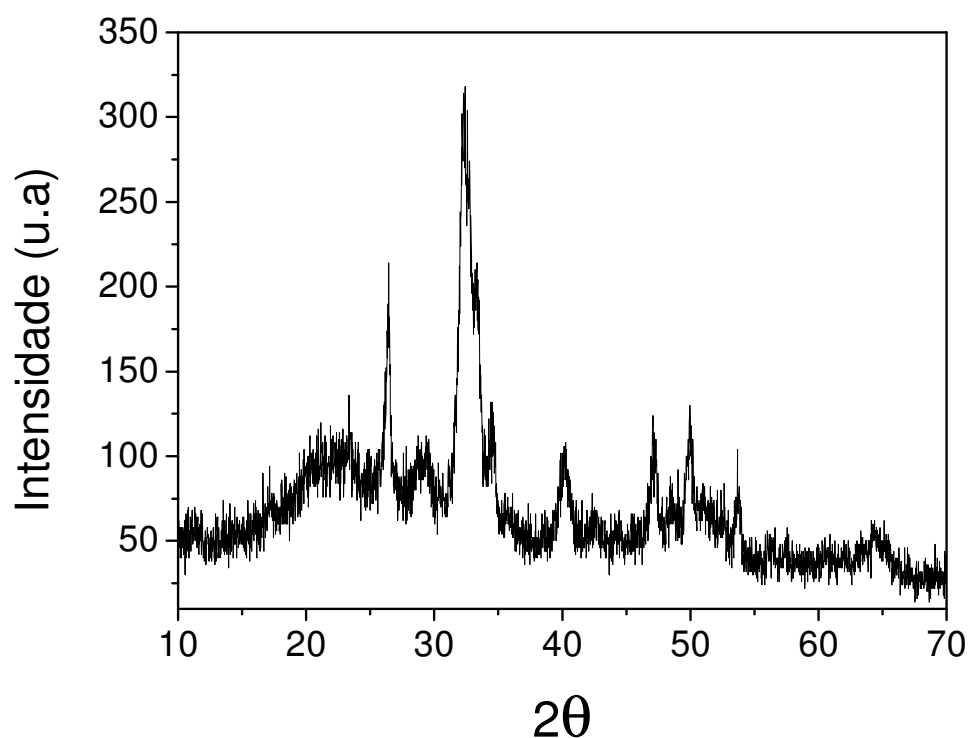


Figura 5. 19 - Difratoograma de DRX do arcabouço 50Quit50HA após neutralização e posterior reticulação.

Nenhum pico característico do agente reticulante ou do próprio neutralizador (NaOH) foi detectado com essa análise, sugerindo, desse modo, que o arcabouço foi reticulado de forma satisfatória.

5.4- Arcabouço Dupla-Camada (Quit/QuitHA)

5.4.1- Caracterização

Com alguns parâmetros já pré-estabelecidos para os arcabouços com uma única camada, como concentração da fase polimérica e inorgânica, assim como a concentração do reticulante, partiu-se para o sistema mais complexo: arcabouço dupla-camada (quitosana+hidroxiapatita/quitosana). A sua macrografia é apresentada na Figura 5.20.

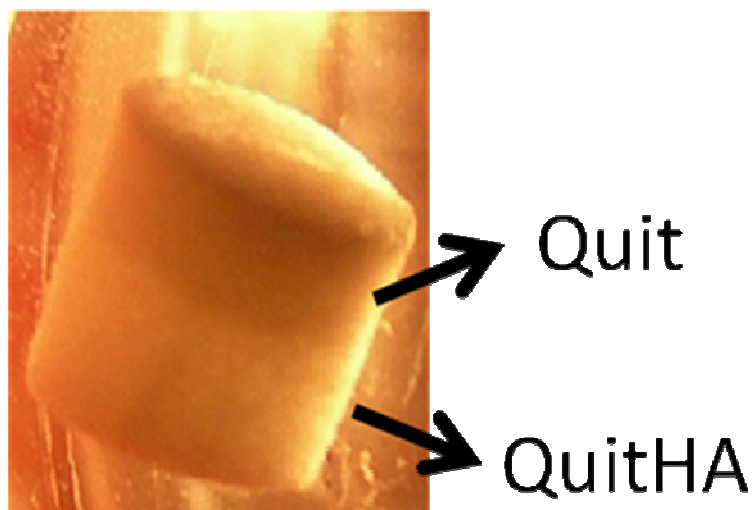


Figura 5. 20 - Macrografia do arcabouço dupla-camada, Quit/QuitHA.

Visualmente, pode ser notada a distinção entre as duas camadas e maiores detalhes sobre a sua microestrutura são mostrados na Figura 5.21, bem como o mapeamento dos seus elementos por EDS. Na micrografia, 30x, estão demarcadas três regiões, as quais são distinguíveis quando observadas com maiores aumentos e, inclusive, a interface entre ambas as camadas pode ser observada.

Nos espectros de EDS também foi possível distinguir ambas as camadas, sendo observada a presença do cálcio e fósforo na camada do compósito, que são provenientes da HA.

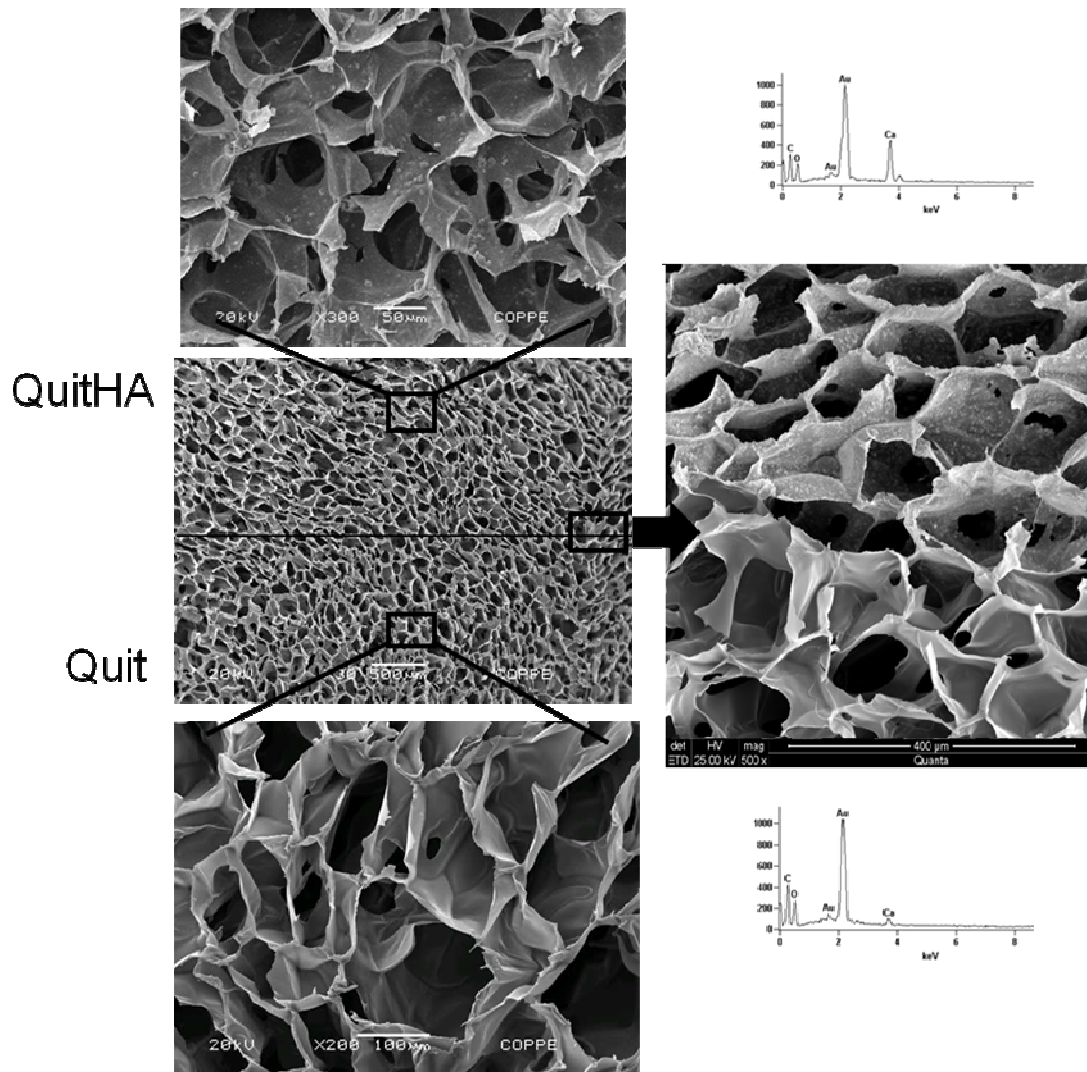


Figura 5. 21 - Imagens de MEV e EDS do arcabouço dupla-camada mostrando a região da interface.

Na Figura 5.22 são apresentadas as micrografias da região de interface do arcabouço dupla-camada. Pode-se observar que as partículas de hidroxiapatita estão bem dispersas na matriz polimérica, camada QuitHA. Além disso, ambas as camadas pode ser visualizadas apresentando uma microestrutura diferenciada.

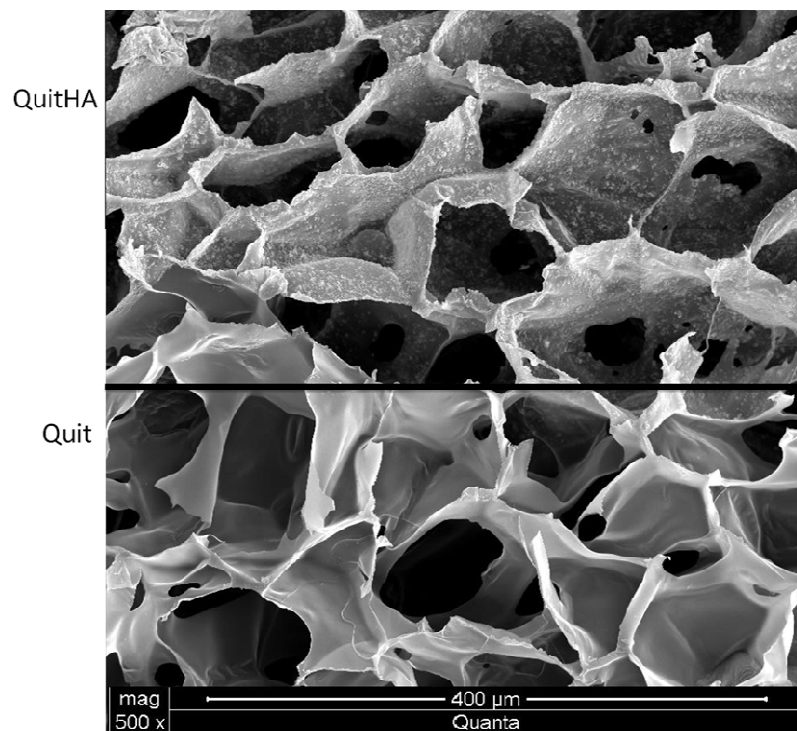
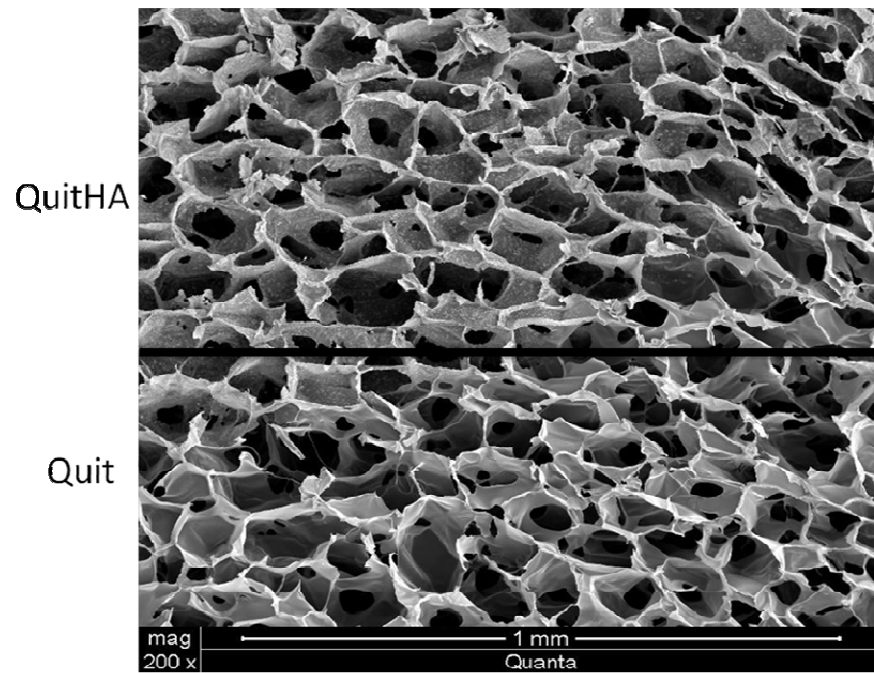


Figura 5. 22 - Micrografias obtidas no MEV da região da interface do arcabouço dupla-camada.

5.4.2- Ensaio de Bioatividade

A Figura 5.23 apresenta as micrografias do arcabouço após imersão em SBF 1,5x. É notável a presença de aglomerados esféricos característicos do processo de mineralização nessa solução, o que foi também confirmado pela análise de FTIR, Figura 5.24, em que as bandas de absorção do grupamento fosfato estão bem mais definidas e intensas em relação à amostra não mineralizada.

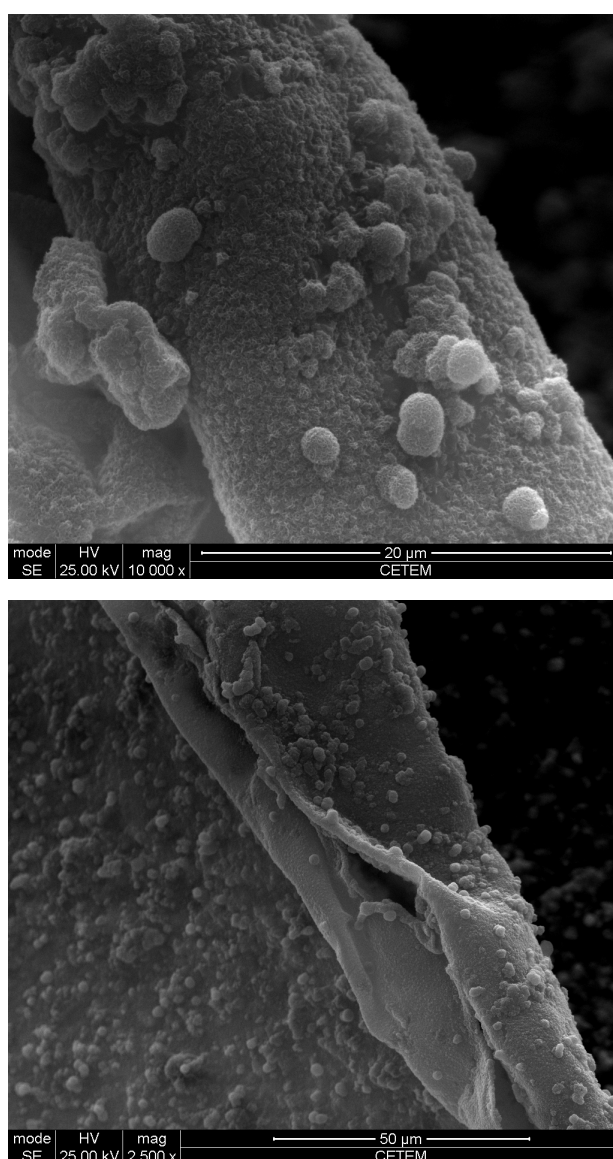


Figura 5. 23 - Micrografias do arcabouço QuitHA após 15 dias de imersão em SBF.

Os aglomerados esféricos mineralizados, como observado no MEV, são característicos da apatita depositada em SBF (BARRERE *et al.*, 2002). Ainda, pode-se afirmar que a camada QuitHA não sofreu degradação após exposição na SBF por 15 dias, podendo ser manipulada sem qualquer problema de perda de massa, embora a mesma não estivesse reticulada. A mineralização foi observada, até mesmo, dentro dos poros dos arcabouços. KONG *et al.* (2006) estudaram a biomineralização de arcabouço de quitosana e do compósito 88Quit12HA. Eles observaram a mineralização em ambos os arcabouços. Entretanto, eles notaram uma maior precipitação nos arcabouços compósitos.

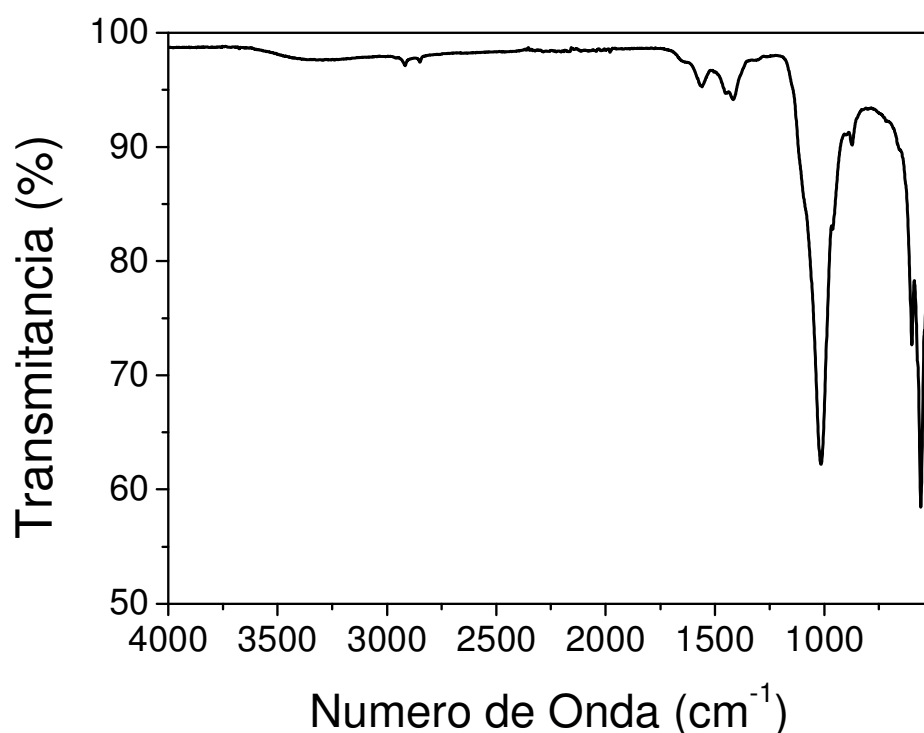


Figura 5. 24 - Espectros de FTIR do arcabouço 50Quit50HA após imersão em SBF.

O difratograma de DRX do arcabouço 50Quit50HA após imersão em SBF é apresentado a seguir, Figura 5.25. Os principais picos estão localizados a 32,36, 32,8 e 33,4°, os quais são típicos da apatita. Outro pico, menos intenso, localizado a 26,5°

também foi identificado como da apatita. Ainda, pode-se perceber o mascaramento do halo do polímero localizado a 20° após imersão em SBF, dado que confirma mais uma vez a deposição da camada de apatita, visto que, esse halo era observado antes da imersão nessa solução (Figura 5.19). O surgimento do pico cristalino localizado a $20,6^\circ$ sugere a presença de uma outra fase, provavelmente NaCl, proveniente da solução, a qual poderia ter sido eliminada com lavagem abundante do arcabouço.

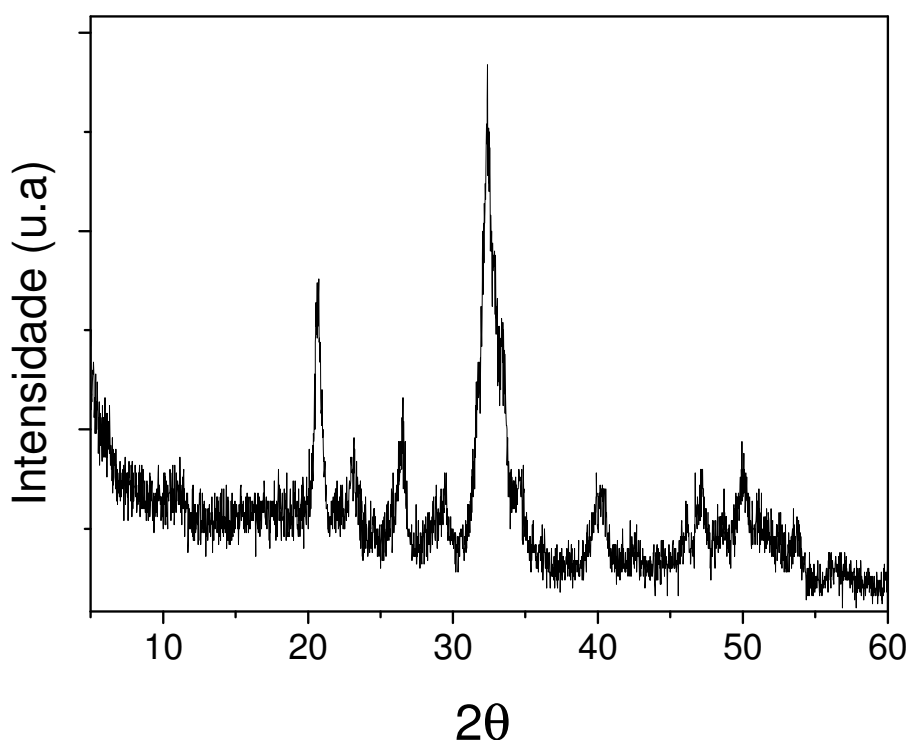


Figura 5. 25 - Difratoograma de DRX do arcabouço QuitHA após imersão na SBF por 15 dias.

5.4.3-Influência da HA na Degradação in vitro

O perfil de degradação do arcabouço referente a camada 50Quit50HA é apresentado a seguir, Figura 5.26 . Nos primeiros dias de imersão a perda de massa corresponde a aproximadamente 15% e um equilíbrio é atingido entre 14 e 21 dias de imersão, sendo que o arcabouço permaneceu com 70% do seu peso inicial. A sua

integridade estrutural permaneceu inalterada, uma vez que o mesmo foi manipulado sem maiores problemas. Essa estabilidade do arcabouço em meio contendo lisozima é atribuída, principalmente, a interação intermolecular entre a quitosana e o reticulante, bem como a boa dispersão da HA sobre a matriz polimérica. O efeito da quantidade de HA no processo de degradação do arcabouço QuitHA foi estudado por THEIN-HAN e MISRA (2009), que mostraram uma diminuição na taxa de degradação com o aumento da fase inorgânica, indicando que a fase cerâmica atuaria como reforço para a matriz polimérica. Comparando a taxa de degradação do arcabouço de quitosana e QuitHA, ambos reticulados, (Figuras 5.12 e 5.26, respectivamente), observou-se, que não houve diferença entre ambos os arcabouços após 28 dias de imersão e, portanto, nenhum efeito da fase inorgânica foi verificado. As micrografias do arcabouço após 1 e 7 dias de imersão na solução PBS/lisozima são apresentadas na Figura 5.27. Pode-se observar a manutenção da estrutura do arcabouço, o que condiz com os dados de perda de massa discutidos acima. Para os demais tempos, dados não apresentados, a microestrutura é similar e nenhuma informação adicional foi revelada.

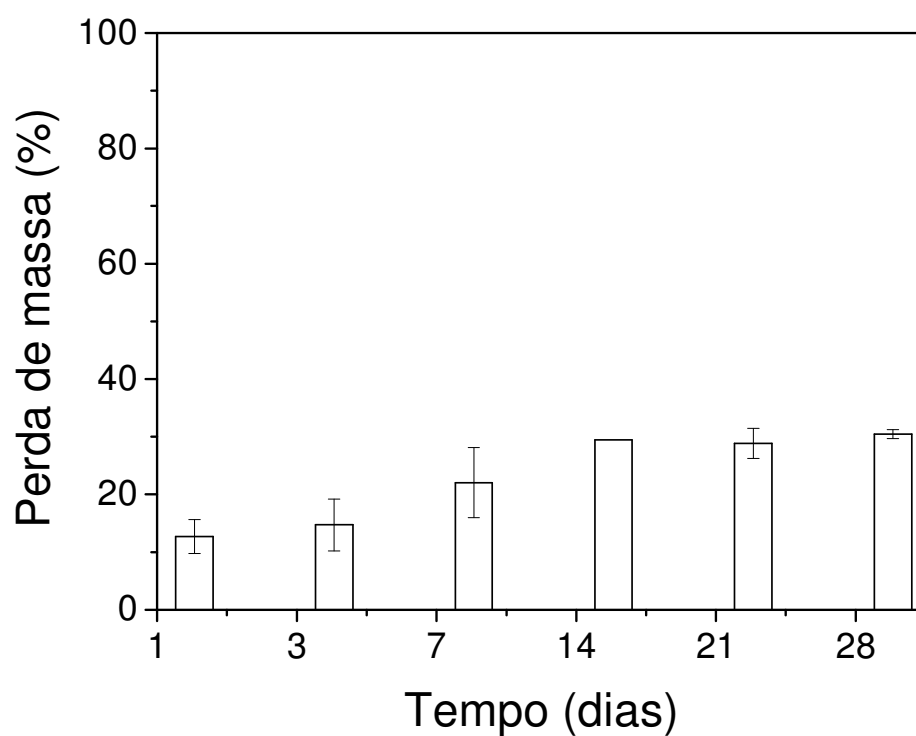


Figura 5. 26 - Perda de massa do arcabouço QuitHA após imersão na solução de PBS-lisozima (1,5 mg/mL).

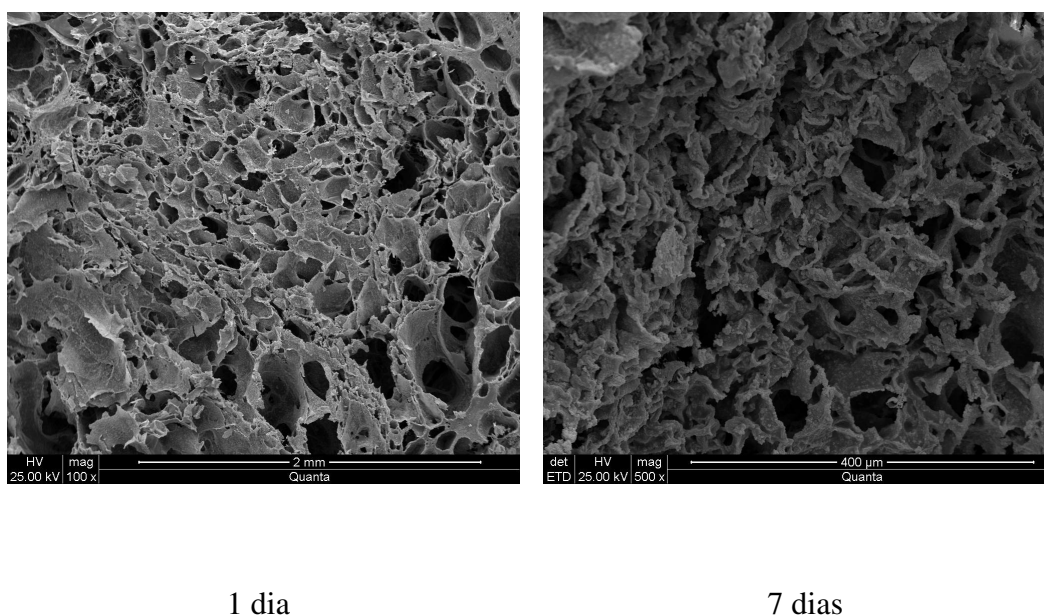


Figura 5. 27 - Micrografias obtidas no MEV dos arcabouços após teste de degradação em solução de lisozima.

5.4.3- Teste de Citotoxicidade

Osteoblastos

Tem sido reportado que, dependendo do tipo de ensaio de citotoxicidade empregado, os resultados podem diferir entre si (CHIBA *et al.*, 1998) e segundo a ISO 10993-5 (1999), um único teste não é capaz de detectar a citotoxicidade dos biomateriais. Assim, mais de um tipo de ensaio deve ser realizado para assegurar a viabilidade celular *in vitro*, como forma de aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. Nesse trabalho, a citocompatibilidade dos arcabouços dupla-camada foi avaliada usando três diferentes ensaios: NR (vermelho neutro), XTT e CV (cristal violeta). Assim, três parâmetros relacionados com as funções da célula foram avaliados, são eles: integridade lisosomal e permeabilidade membranar, atividade dihidrogenase; principalmente mitocondrial e o DNA. As camadas foram avaliadas separadamente, sendo previamente neutralizadas, reticuladas e esterilizadas.

A Figura 5.28 apresenta a absorbância, a qual está relacionada com o número de células, osteoblastos, dos grupos experimentais avaliados. Em relação ao ensaio de vermelho neutro, ambas as camadas Quit e QuitHA apresentaram viabilidade celular e nenhuma diferença significativa foi observada entre elas, embora a quantidade de células tenha sido superior no arcabouço de Quit. Ademais, o perfil do controle negativo foi similar ao de ambos os arcabouços. Por outro lado, todos os materiais testados são estatisticamente diferentes do controle positivo, fenol. Um perfil similar foi notado para o teste de XTT, o que significa dizer que a atividade mitocondrial foi similar em ambas as camadas, Quit e QuitHA.

No teste de cristal violeta foi observado um comportamento diferente, por exemplo, o número de células sobre o arcabouço de quitosana diminuiu em relação aos

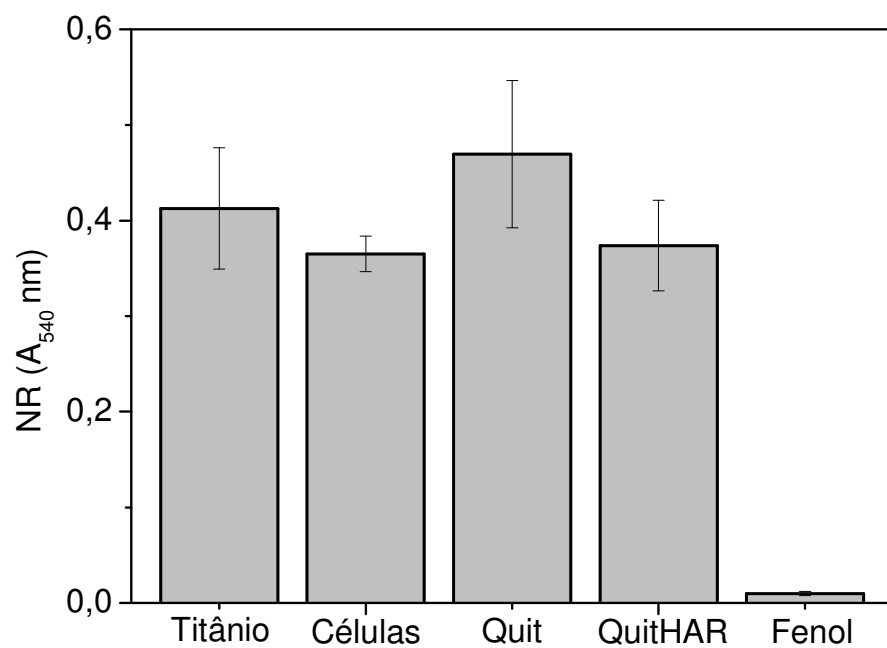
testes de XTT e NR. E a sua viabilidade celular foi de apenas 52%, além disso, foi observada uma diferença significativa da Quit em relação ao titânio e as células. Uma correlação entre o ensaio de XTT e NR também tem sido observada em trabalhos de outros autores. Por outro lado, existe uma discrepância desses últimos, XTT e NR, em relação ao ensaio de CV (CHIBA *et al.*, 1998; KORTING *et al.*, 1994 e VIAN *et al.*, 1995), o que corrobora os dados aqui apresentados.

Recentemente, TUZLAKOGLU e REIS (2007b) relataram que a atividade metabólica e o número de células foram superiores sobre as fibras de quitosana revestidas com fosfato de cálcio que sobre as fibras não revestidas. Contrariamente, conforme dados da Figura 5.28, nenhuma diferença foi notada entre os arcabouços de Quit e os de QuitHA, ambos reticulados.

Em outro estudo, MALAFAYA e REIS (2009) produziram arcabouços de quitosana com hidroxiapatita, os quais foram reticulados com glutaraldeído. Os autores reportaram que os arcabouços apresentaram citotoxicidade e sugeriram que este efeito se deve à presença da hidroxiapatita não sinterizada. No entanto, eles observaram uma quantidade menor de cálcio no meio quando a HA não estava sinterizada em relação ao compósito de QuitHA sinterizado. A baixa liberação de cálcio pelo arcabouço está de acordo com os dados apresentados no nosso trabalho (Figura 5.18), entretanto, nenhum efeito citotóxico foi observado para o arcabouço QuitHA reticulado com TPNa. Isso sugere que nem a HA (não sinterizada) e tão pouco o reticulante (TPNa) estão provocando um efeito indesejável para as células. Ainda, é importante enfatizar que esses autores usaram apenas um teste de citotoxicidade, ao contrário desse estudo, em que três diferentes funções celulares foram avaliadas.

Geralmente, os polímeros avaliados como biomateriais devem ser reticulados, entretanto, quase todos os agentes reticulantes apresentam uma resposta citotóxica

indesejável. No entanto, nós podemos afirmar que o tripolifosfato usado como reticulante na concentração de 1% não provocou qualquer resposta citotóxica comparado com o controle negativo, mantendo as funções mitocondriais e lisossomais intactas.



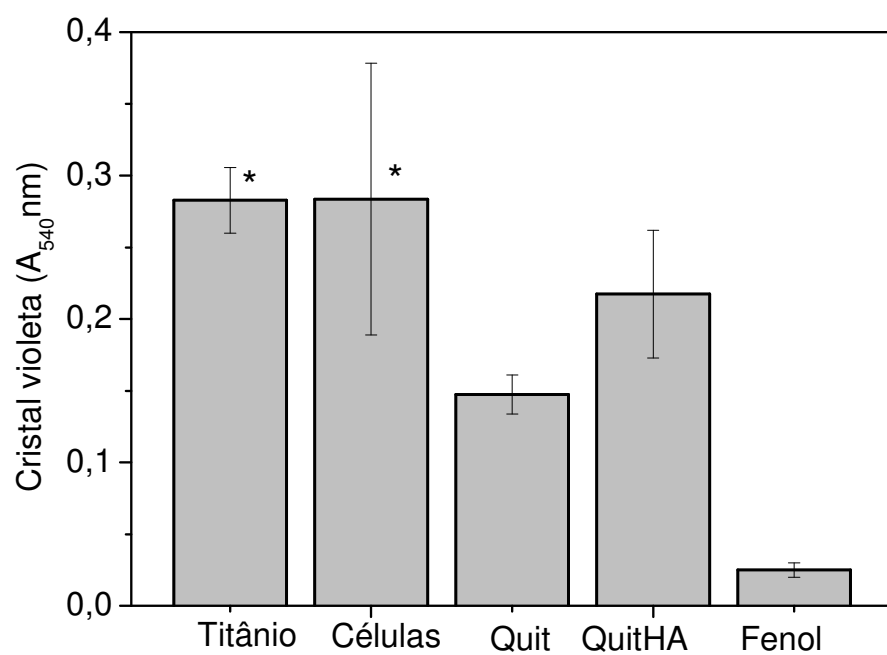
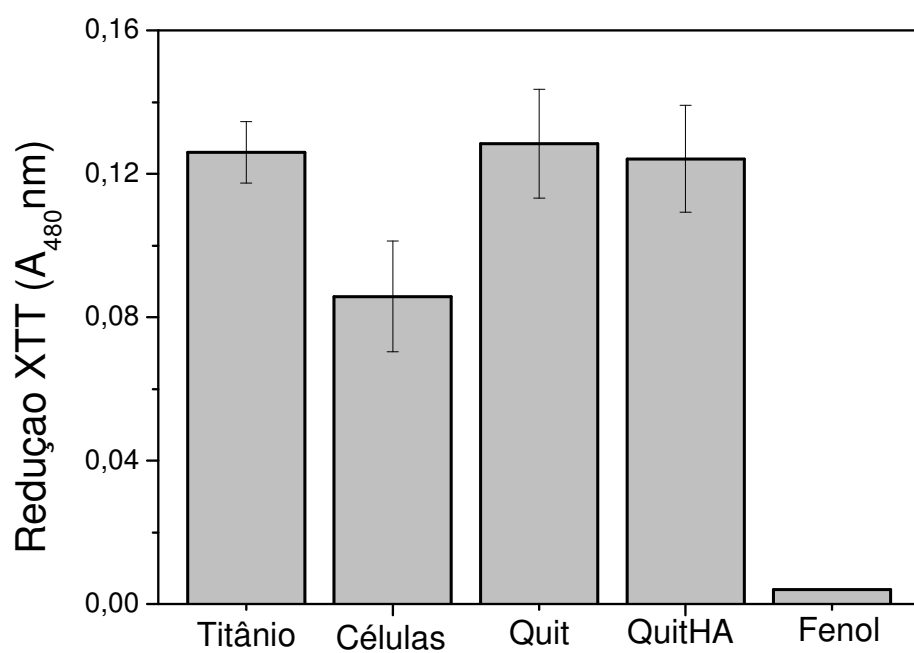


Figura 5. 28 - Viabilidade celular de osteoblastos sobre os arcabouços de quitosana e quitosana-hidroxiapatita reticulados ($p \leq 0,05$).

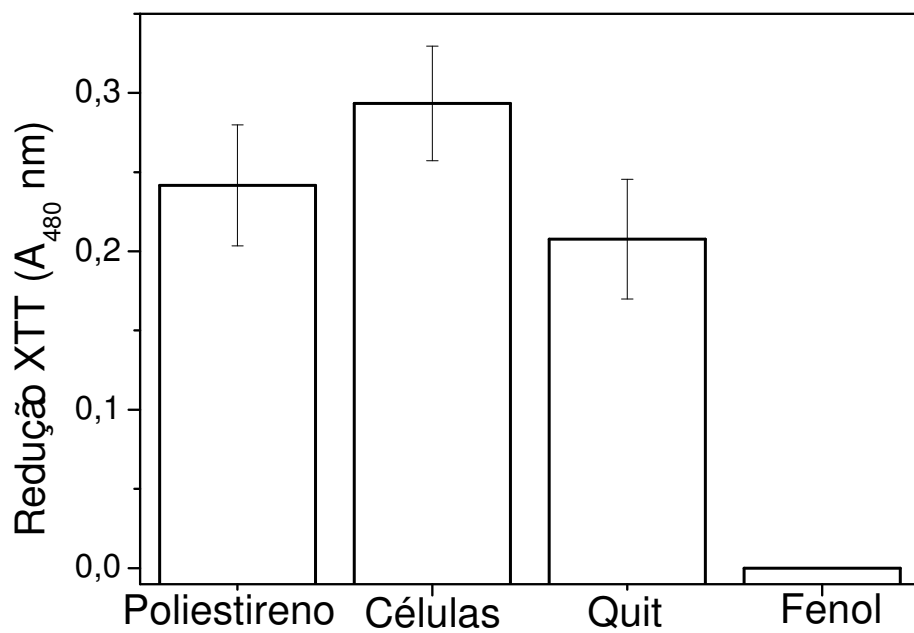
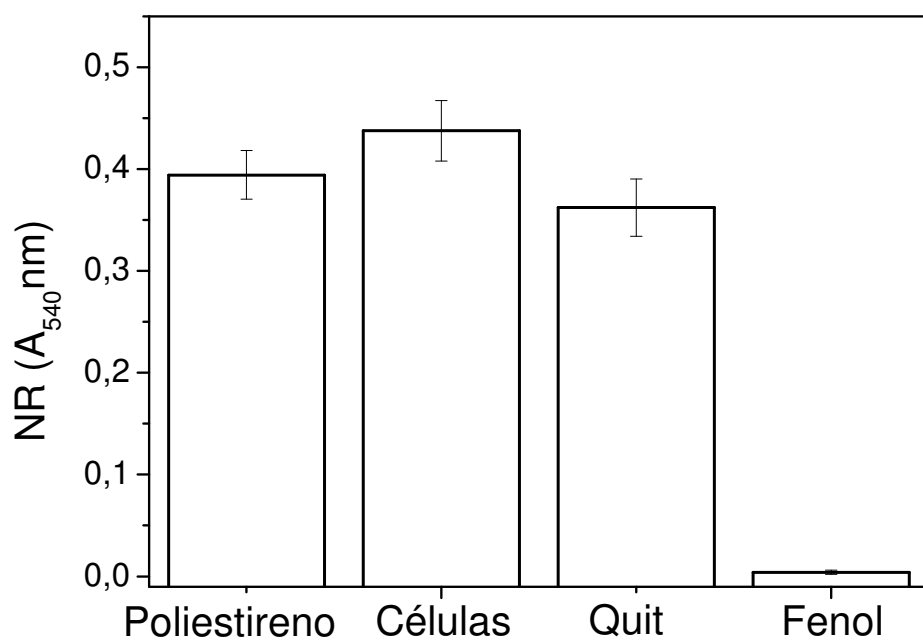
*Indica que há diferença significativa em relação ao arcabouço de quitosana.

Fibroblastos

Fibroblastos têm sido usados como uma fonte de células na regeneração da cartilagem (CHUNG e BURDICK, 2008). Assim, a viabilidade de fibroblastos sobre os arcabouços de quitosana reticulada também foi avaliada, Figura 5.29. O controle negativo usado foi o poliestireno de alta densidade. No teste de NR, a quantidade de células observadas no controle negativo foi próxima a do arcabouço de quitosana, sugerindo uma atividade normal das células, além disso, não houve diferença entre os grupos avaliados, contudo, todos são diferentes do fenol. Perfil similar foi notado no teste de XTT, no qual as células produziram uma quantidade significativa do produto (conversão do corante), o que indica uma atividade mitocondrial normal das células. Ainda, uma maior absorbância foi observada para o controle negativo e as células, embora nenhuma diferença significativa em relação ao arcabouço de quitosana tenha sido verificada. Diferentemente, no ensaio de CV o arcabouço da quitosana foi estatisticamente diferente do controle negativo e, mais uma vez, a quantidade de células sobre ele foi menor em relação ao ensaio de NR e XTT.

NEAMNARK *et al.* (2008) produziram fibras de quitosana-hexanoil (modificada) e avaliaram o seu efeito citotóxico, através do ensaio de MTT, em meio com fibroblastos. As fibras não apresentaram qualquer efeito citotóxico, além disso, elas promoveram a adesão e proliferação celular.

O mecanismo de interação da quitosana com fibroblastos não é bem estabelecido, contudo, acredita-se que ela interaja com fatores de crescimento presente no meio, protegendo esses fatores de uma possível degradação, ou ainda, estimulando a proliferação das células (HOWLING *et al.*, 2001).



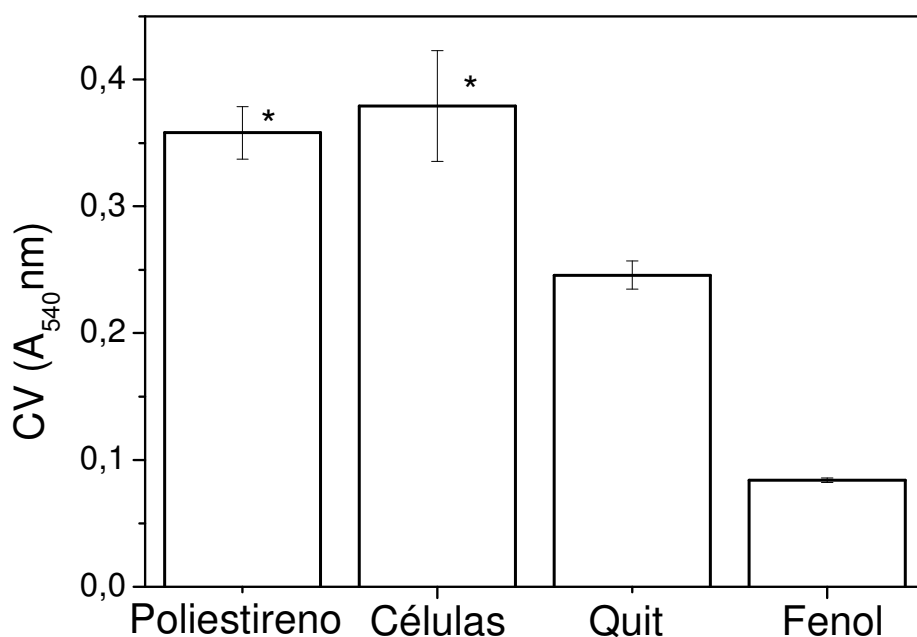


Figura 5. 29 - Viabilidade celular de fibroblastos sobre o arcabouço de quitosana reticulado ($p \leq 0,05$).

*Indica que há diferença significativa em relação ao arcabouço de quitosana.

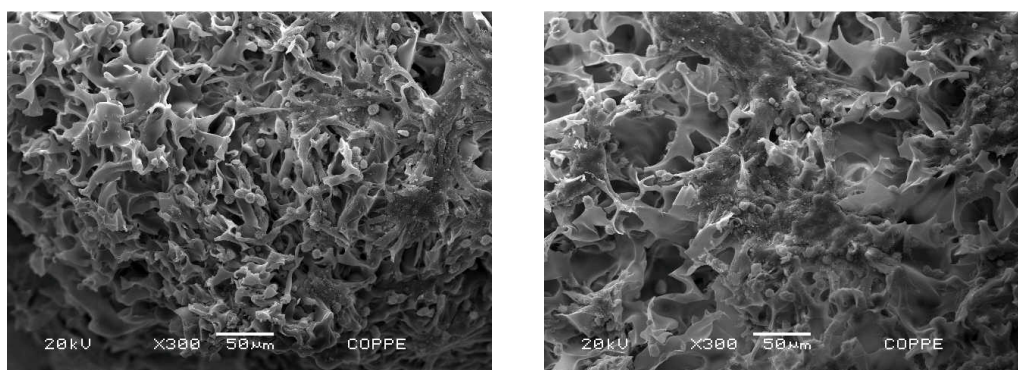
5.4.4- Cultura de células

5.4.4.1- Arcabouço Quit

As micrografias do arcabouço de quitosana após cultura de osteoblastos durante 14 dias são apresentadas na Figura 5.30. Pelas imagens do MEV pode-se observar que as células estão bem aderidas no arcabouço de quitosana reticulado. Além disso, é nítida a presença de regiões distintas ao longo do arcabouço: há regiões que as células se aderiram e proliferaram, e por outro lado ainda há células com formato esférico apresentando filopodias na sua extremidade. Com aumentos superiores a 1000 x pode-se visualizar as células migrando para dentro dos poros do arcabouço. Estes resultados, em

conjunto com os dados de citotoxicidade, indicam que o arcabouço de quitosana reticulado é citocompatível e susceptível a adesão e proliferação celular, como observado nas micrografias anteriormente descritas. Além disso, a integridade estrutural do arcabouço permaneceu inalterada, o que favoreceu a sua manipulação após o período de cultura, 14 dias. Há indicações de que mais células foram observadas em arcabouços com tamanho de poros menores (40 μm), enquanto a migração celular foi favorecida em arcabouços com poros mais largos, 100 μm , sendo que o tamanho do osteoblasto varia de 10 a 30 μm .

A característica catiônica da quitosana é conhecida por promover a adesão, espreadimento e crescimento celular devido à presença de interações entre as suas cargas positivas com a superfície das células que são carregadas negativamente. Além disso, a quitosana tem sido reportada por estimular fatores de crescimento e por contribuir com a manutenção do fenótipo condrogênico, especialmente em relação a sua morfologia (MARTINO *et al.*, 2005; GRIFFON *et al.*, 2006).



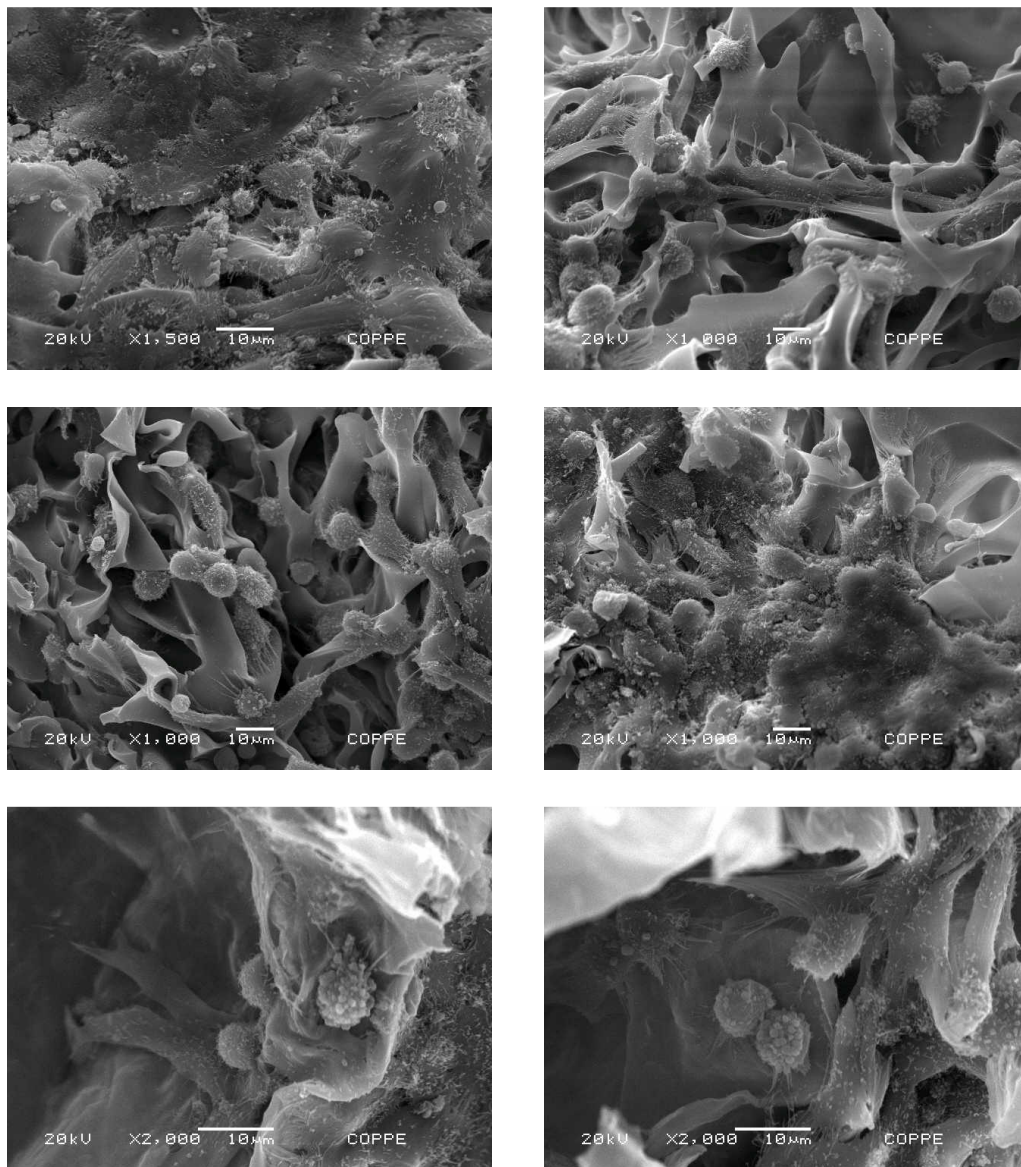


Figura 5. 30 - MEV dos arcabouços de quitosana reticulada após 14 dias em cultura de osteoblastos.

5.4.4.2- Arcabouço QuitHA

Avaliação Quantitativa- MTT

A quantidade de células presente no arcabouço QuitHA após 7, 14 e 21 dias de cultura é apresentada na Figura 5.31. Observa-se um aumento significativo na atividade celular, proliferação, no intervalo de 7-14 dias. Dessa forma, um aumento de 60% na

proliferação foi verificado. Não obstante, após 14 dias de cultura, nenhuma mudança significativa no número de células foi notada, certamente as células atingiram o estágio de confluência.

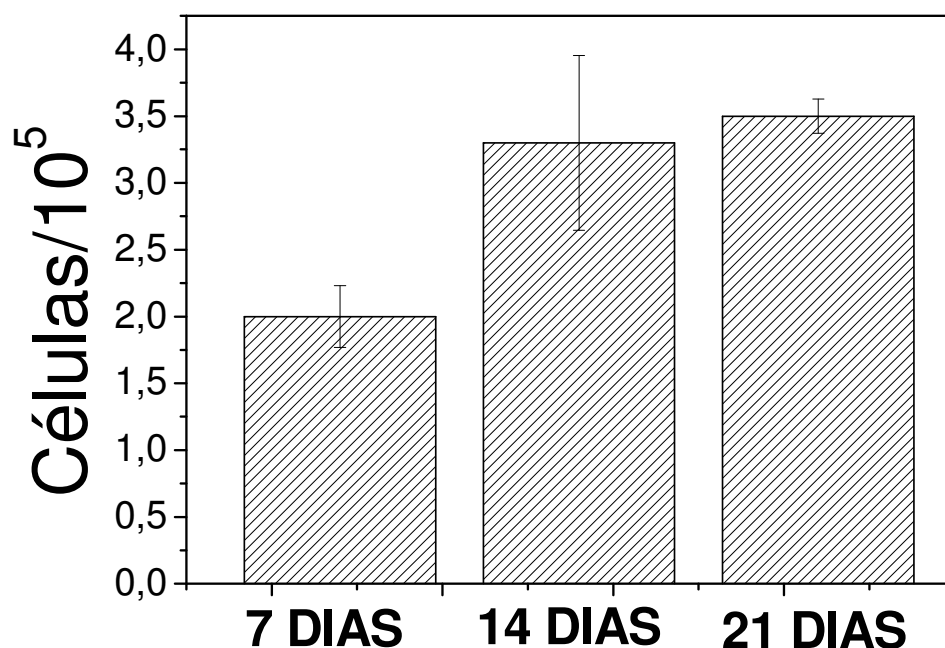


Figura 5. 31 - Viabilidade celular e proliferação da STRO+1A sobre o arcabouço de QuitHA determinado por MTT.

Diferenciação celular – (Atividade ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) é um dos parâmetros característicos da diferenciação de osteoblastos ativos. Devido a isso, essa enzima (fosfatase alcalina) serve como um marcador do fenótipo osteogênico, sendo produzida pelos osteoblastos durante o processo de mineralização do tecido ósseo (KONG *et al.*, 2006, BJERRE *et*

al., 2008). O perfil da diferenciação dos osteoblastos cultivados sobre os arcabouços QuitHA pode ser observado na Figura 5.32. A produção dessa enzima parece ter atingido o seu ápice com 7 dias de cultura sobre o arcabouço QuitHA, uma vez que nenhuma diferença significativa foi observada entre 7 e 14 dias. Esses dados sugerem o possível potencial desse arcabouço QuitHA como arcabouço temporário em defeitos ósseos, pois ele foi capaz de induzir a diferenciação celular. Além disso, vale ressaltar que a introdução do agente reticulante, TPNa, não mostrou qualquer resposta indesejável. A influência da adição da quitosana em revestimentos de fosfatos de cálcio foi estudada por WANG *et al.* (2008) e um aumento na atividade de ALP foi verificado. Eles acreditam que, além de outros fatores, a quitosana deve interagir com proteoglicanos e favorecer a adsorção de citocinas e fatores de crescimento secretados pelas células. Ainda, a quitosana foi referida por induzir um aumento na quantidade da proteína morfogênica óssea (BMP2), na proliferação celular e na atividade ALP (OHARA *et al.*, 2004). A BMP2 é responsável por iniciar a diferenciação osteogênica e induzir a atividade de ALP.

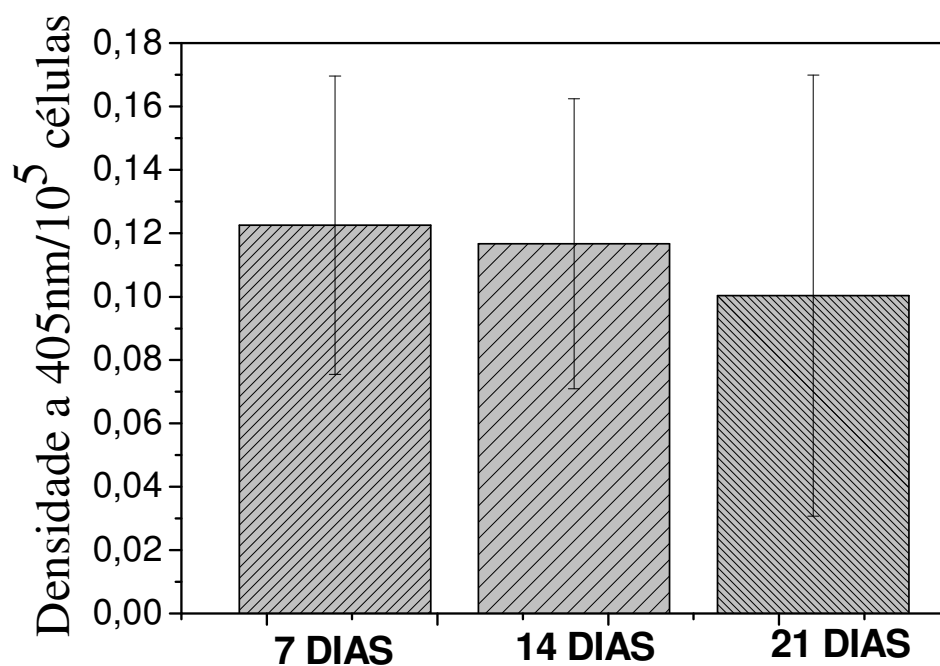


Figura 5. 32 - Diferenciação celular após 7 e 14 dias de cultivo sobre os arcabouços QuitHA.

Os resultados de MTT somados aos da atividade ALP, é um indicativo de que as células foram bem aderidas ao arcabouço, pois essa etapa é fundamental para promover a proliferação e diferenciação celular. Ainda, o processo de diferenciação também depende da alta confluência das células no arcabouço (BJERRE *et al.*, 2008), o que também foi observado pelos dados quantitativos de MTT.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, as seguintes conclusões podem ser explicitadas.

- 1- O método de mistura física foi selecionado para obtenção do compósito QuitHA, visto que, as partículas de HA se apresentaram mais dispersas sobre a matriz polimérica em comparação ao processo de síntese.
- 2- Baseado no planejamento de experimento definiu-se as condições de reticulação: concentração do tripolifosfato (1% m/v), temperatura (37 °C) e tempo de reticulação (3 horas).
- 3- Em relação à reticulação de ambas as camadas (quitosana-Quit e quitosana com hidroxiapatita-QuitHA) do arcabouço dupla-camada com solução de tripolifosfato 1%:
 - A introdução do reticulante não modificou o perfil de intumescimento do arcabouço de Quit reticulado quando comparado com o de quitosana sem reticulação.
 - A presença do reticulante foi fundamental para garantir a estabilidade dos arcabouços, Quit e QuitHA, em solução de PBS contendo lisozima (1,5mg/mL) no período de tempo estudado, até 28 dias.
- 4- Em relação a camada QuitHA:

- A fase inorgânica apresentou-se bastante dispersa e aderida na superfície da matriz polimérica, como pôde ser observado nas micrografias de MEV, sem alterar significativamente a porosidade original do arcabouço.

- Essa camada induziu a biomineralização após exposição em solução de SBF 1,5x por 15 dias. Os aglomerados esféricos mineralizados, observados no MEV, são característicos da apatita depositada em SBF e sua presença foi confirmada também por difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho.

5- O arcabouço dupla-camada foi obtido de forma satisfatória e a interface entre ambas as camadas, Quit e QuitHA, apresentou-se bastante aderida como pôde ser visualizada por MEV.

6- Em relação aos testes com células:

- A análise simultânea dos três ensaios de citotoxicidade (vermelho neutro, cristal violeta e XTT) permitiu avaliar a integridade membranar, DNA e a atividade mitocondrial dos osteoblastos, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as camadas, Quit e QuitHA, são citocompatíveis. Adicionalmente, essa análise simultânea foi também realizada na camada de Quit com fibroblastos e os resultados indicaram viabilidade celular.

7- A camada de quitosana reticulada do arcabouço dupla-camada promoveu a adesão e proliferação de osteoblastos no período de 14 dias, os quais migraram, parcialmente, para dentro dos poros do arcabouço.

- A camada QuitHA reticulada do arcabouço dupla-camada estimulou a diferenciação celular, medida pela atividade da fosfatase alcalina, no período 7, 14 e 21 dias.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1- Avaliar a camada proposta para reparar a cartilagem, quitosana reticulada, em meio de cultura contendo condrócitos.
- 2- Estudar por microscopia eletrônica de varredura a adesão e proliferação de osteoblastos sobre a camada QuitHA.
- 3- Estudar a influência da reticulação nas propriedades mecânicas dos arcabouços de Quit e QuitHA.
- 4- Realização de um estudo *in vivo* para avaliar o potencial do arcabouço dupla-camada, (Qui/QuitHA), no reparo de defeitos osteocondrais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, I.F., CORDEIRO, A.L., SAMPAIO, P. *et al.* 2007, "Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation", *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v. 18, n. 4, pp. 469-485.
- AOKI, H., 1994, "What is Hydroxyapatite?". *Medical Applications of Hydroxyapatite*, chapter 1, St. Louis, Missouri, USA,
- BARRÈRE, F., MAHMOOD, T.A., GROOT, K. *et al.* 2008, "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions", *Materials Science and Engineering R*, v. 59, pp. 38-71.
- BARRERE, F., VAN BLITTERSWIJK, C.A., DE GROOT, K. *et al.* 2002, "Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF¹⁵ solution: influence of magnesium", *Biomaterials*, v. 23, n. 10, pp. 2211-2220.
- BAVARESCO, V.P., GARRIDO, L., BATISTA, N.A. *et al.* 2008, "Mechanical and morphological evaluation of osteochondral implants in dogs", *Artificial Organs*, v. 32, n. 4, pp. 310-316.
- BERBERAT, J.E., NISSI, M.J., JURVELIN, J.S. *et al.* 2009, "Assessment of interstitial water content of articular cartilage with T-1 relaxation", *Magnetic Resonance Imaging*, v. 27, n. 5, pp. 727-732.

- BERGER, J., REIST, M., MAYER, J.M. *et al.* 2004, "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, pp. 19-34.
- BJERRE, L., B³NGER, C.E., KASSEM, M. *et al.* 2008, "Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds", *Biomaterials*, v. 29, n. 17, pp. 2616-2627.
- BROWN, P.W., 1999, "Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates", *Cement and Concrete Research*, v. 29, n. 8, pp. 1167-1171.
- BROWN, W.E., EIDELMAN, N., TOMAZIC, B., 1987, "Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation", *Adv Dent Res*, v. 2, n. 1, pp. 306-313.
- CAMPANA, S.P., SIGNINI, R., 2001, "Efeito de aditivos na desacetilação de quitina", *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 11, n. 4, pp. 169-173.
- CANELLA, K.M.N.C., GARCIA, R.B., 2001, "Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente", *Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 13-17.
- CARVALHO, H.F., COLLARES-BUZATO, C.B., 2005, "Condrócitos". *Células Uma abordagem multidisciplinar*, Editora Manole Ltda ed., chapter 2, Barueri, SP,
- CHIBA, K., KAWAKAMI, K., TOHYAMA, K., 1998, "Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells", *Toxicology in Vitro*, v. 12, n. 3, pp. 251-258.

- CHOI, S.Y., KIM, S.B., PAK, P.K. *et al.* 2007, "Effects of N-acylation on structure and properties of chitosan fibers", *Carbohydrate Polymers*, v. 68, pp. 122-127.
- CHOW, K.S., KHOR, E., 2000, "Novel Fabrication of open-pore chitin matrixes", *Biomacromolecules*, v. 1, pp. 61-67.
- CHUNG, C., BURDICK, J.A., 2008, "Engineering cartilage tissue", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 2, pp. 243-262.
- DAI, W., KAWAZOE, N., LIN, X. *et al.* 2010, "The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering", *Biomaterials*, v. 31, n. 8, pp. 2141-2152.
- DOROZHKIN, S.V., 2010, "Bioceramics of calcium orthophosphates", *Biomaterials*, v. 31, n. 7, pp. 1465-1485.
- FRENKEL, S.R., BRADICA, G., BREKKE, J.H. *et al.* 2005, "Regeneration of articular cartilage - Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants", *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 13, n. 9, pp. 798-807.
- GOMOLL, A., MADRY, H., KNUTSEN, G. *et al.* 2010, "The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management", *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 18, n. 4, pp. 434-447.
- GRANJA, P.L., SILVA, A.I.N., BORGES, J.P. *et al.* 2004, "Preparation and characterization of injectable chitosan-hydroxyapatite microspheres", *Key Engineering Materials*, v. 254, pp. 573-576.

- GRIFFON, D.J., SEDIGHI, M.R., SCHAEFFER, D.V. *et al.* 2006, "Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering", *Acta Biomaterialia*, v. 2, n. 3, pp. 313-320.
- GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H., 2006, "Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres", *Carbohydrate Polymers*, v. 66, pp. 43-54.
- HO, M., KUO, P., HSIEH, H. *et al.* 2004, "Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods", *Biomaterials*, v. 24, pp. 129-138.
- HONG, Y., SONG, H., GONG, Y. *et al.* 2007, "Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation", *Acta Biomaterialia*, v. 3, n. 1, pp. 23-31.
- HOWLING, G.I., DETTMAR, P.W., GODDARD, P.A. *et al.* 2001, "The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro", *Biomaterials*, v. 22, n. 22, pp. 2959-2966.
- HU, Q., LI, B., WANG, M. *et al.* 2004, "Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture", *Biomaterials*, v. 25, n. 5, pp. 779-785.
- ISO 10993-12, 1996, "Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials", *International Organization for Standardization*.

- ISO 10993-5, 1999, "Biological evaluation of medical devices. Part 5: test for cytotoxicity: In vitro methods", *International Organization for Standardization*.
- JARCHO, M., 1992, "Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications", *Dent.clin.north.am.*, v. 36, n. 21, pp. 19-26.
- JIN, R., MOREIRA TEIXEIRA, L.S., DIJKSTRA, P.J. *et al.* 2009, "Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering", *Biomaterials*, v. 30, n. 13, pp. 2544-2551.
- KHOR, E., LIM, L.Y., 2003, "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*, v. 24, n. 13, pp. 2339-2349.
- KIM, I.Y., SEO, S.J., MOON, H.S. *et al.* 2008, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 1, pp. 1-21.
- KNAUL, J.Z., HUDSON, S.M., CREBER, K.A.M., 1999, "Improved mechanical properties of chitosan fibers", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 72, n. 13, pp. 1721-1732.
- KONG, L., GAO, Y., LU, G. *et al.* 2006, "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *European Polymer Journal*, v. 42, n. 12, pp. 3171-3179.
- KORTING, H.C., SCHINDLER, S., HARTINGER, A. *et al.* 1994, "MTT-assay and neutral red release (NRR)-assay: Relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactants", *Life Sciences*, v. 55, n. 7, pp. 533-540.

- LANDI, E., TAMPIERI, A., CELOTTI, G. *et al.* 2004, "Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite", *Biomaterials*, v. 25, n. 10, pp. 1763-1770.
- LAUS, R., LARANJEIRA, M.C.M., MARTINS, A.O. *et al.* 2006, "Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão", *Química Nova*, v. 29, n. 1, pp. 34-39.
- LEE, J.E., KIM, K.E., KWON, I.C. *et al.* 2004, "Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold", *Biomaterials*, v. 25, n. 18, pp. 4163-4173.
- LIN, H.R., CHEN, K.S., CHEN, S.C. *et al.* 2007, "Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by Na₅P₃O₁₀", *Materials Science and Engineering: C*, v. 27, n. 2, pp. 280-284.
- LIU, D., WEI, Y., YAO, P. *et al.* 2006, "Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards", *Carbohydrate Research*, v. 341, n. 6, pp. 782-785.
- MA, P.X., ZHANG, R.Y., XIAO, G.Z. *et al.* 2001, "Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 54, n. 2, pp. 284-293.
- MALAFAYA, P.B., REIS, R.L., 2009, "Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro

- cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor", *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 2, pp. 644-660.
- MANJUBALA, I., SCHELER, S., BOSSERT, J. *et al.* 2006, "Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique", *Acta Biomaterialia*, v. 2, n. 1, pp. 75-84.
- MARIAPPAN, M.R., ALAS, E.A., WILLIAMS, J.G. *et al.* 1999, "Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collage-fibroblast interactions", *Wound Repair and Regeneration*, v. 7, n. 5, pp. 400-406.
- MARTIN, I., MIOT, S., BARBERO, A. *et al.* 2007, "Osteochondral tissue engineering", *Journal of Biomechanics*, v. 40, n. 4, pp. 750-765.
- MARTINO, A., SITTINGER, M., RISBUD, M.V., 2005, "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue- engineering", *Biomaterials*, v. 26, pp. 5983-5990.
- MICHELON, F.A., 2008, "Artroscopia: ferramenta diagnóstica e terapêutica na clínica cirúrgica de equinos atletas", *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 2, n. 19, pp. 222-.
- NEAMNARK, A., SANCHAVANAKIT, N., PAVASANT, P. *et al.* 2008, "In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts", *European Polymer Journal*, v. 44, n. 7, pp. 2060-2067.

- NETO, A.A.F., FILHO, A.A.F., FILHO, A.Z. *et al.* 1996, "Tratamento cirúrgico da osteocondrite dissecante do cotovelo em atletas adolescentes", *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 31, n. 12, pp. 985-989.
- OHARA, N., HAYASHI, Y., YAMADA, S. *et al.* 2004, "Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide", *Biomaterials*, v. 25, n. 10, pp. 1749-1754.
- OLIVEIRA, J.M., RODRIGUES, M.T., SILVA, S.S. *et al.* 2006, "Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells", *Biomaterials*, v. 27, n. 36, pp. 6123-6137.
- ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S., 2008, *Biomateriais Fundamentos & Aplicações.*,
- RAVI KUMAR, M.N.V., 2008, "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, pp. 1-27.
- REN, D., YI, H., WANG, W. *et al.* 2005, "The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation", *Carbohydrate Research*, v. 340, n. 15, pp. 2403-2410.
- RINAUDO, M., 2006, "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 603-632.

- SALTZMAN, W.M., 2004a, "Cell and Tissue Mechanics". In: Oxford University Press, I. (eds), *Tissue Engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*, chapter 5.
- SALTZMAN, W.M., 2004b, "Tissue Exchange and Tissue Development". In: Oxford University Press, I. (eds), *Tissue Engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*, chapter 1.
- SANTOS, J.E., 2004, *Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre*, Universidade Federal de São Carlos.
- SATO, T., CHEN, G., USHIDA, T. *et al.* 2001, "Tissue-engineered cartilage by in vivo culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge", *Materials Science and Engineering: C*, v. 17, n. 1-2, pp. 83-89.
- SENA, L.A., 2004, "Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas", *Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*.
- SHEN, X., TONG, H., JIANG, T. *et al.* 2007, "Homogeneous chitosan/carbonate apatite/citric acid nanocomposites prepared through a novel in situ precipitation method", *Composites Science and Technology*, v. 67, n. 11-12, pp. 2238-2245.
- SHI, C.M., ZHU, Y., RAN, X.Z. *et al.* 2006, "Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine", *Journal of Surgical Research*, v. 133, n. 2, pp. 185-192.

- SLOSARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, "FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods", *Journal of Molecular Structure*, v. 744, pp. 657-661.
- SUH, J.K.F., MATTHEW, H.W.T., 2000, "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review", *Biomaterials*, v. 21, n. 24, pp. 2589-2598.
- TAMPIERI, A., SANDRI, M., LANDI, E. *et al.* 2008, "Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds", *Biomaterials*, v. 29, n. 26, pp. 3539-3546.
- TEMENOFF, J.S., MIKOS, A.G., 2000, "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage", *Biomaterials*, v. 21, n. 5, pp. 431-440.
- THEIN-HAN, W.W., MISRA, R.D.K., 2009, "Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 4, pp. 1182-1197.
- TIGH, R.S., KARAKECILI, A., GUMUSDERELIOGLU, M., 2007, "In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 18, pp. 1665-1674.
- TUZLAKOGLU, K., REIS, R.L., 2007a, "Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh by a biomimetic spraying process", *Journal Materials Science: materials in Medicine*, v. 18, pp. 1279-1286.

- TUZLAKOGLU, K., REIS, R.L., 2007b, "Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 18, n. 7, pp. 1279-1286.
- VIAN, L., VINCENT, J., MAURIN, J. *et al.* 1995, "Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation", *Toxicology in Vitro*, v. 9, n. 2, pp. 185-190.
- WANG, J., DE BOER, J., DE GROOT, K., 2008, "Proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on calcium phosphate/chitosan coatings", *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 7, pp. 650-654.
- WEBSTER, A., HALLING, M.D., GRANT, D.M., 2007, "Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative", *Carbohydrate Research*, v. 342, pp. 1189-1201.
- WILLIAMS, D.F., 1987, "Definitions in Biomaterials", *Elsevier, Ed.Amsterdam*.
- WU, H., WAN, Y., CAO, X. *et al.* 2008, "Proliferation of chondrocytes on porous poly(DL-lactide)/chitosan scaffolds", *Acta Biomaterialia*, v. 4, n. 1, pp. 76-87.
- XU, Y., DU, Y., 2003, "Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, n. 1, pp. 215-226.
- ZHANG, Y., ZHANG, M., 2001, "Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates", *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 282, n. 2-3, pp. 159-164.

ZHAO, F., GRAYSON, W.L., MA, T. *et al.* 2006, "Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development", *Biomaterials*, v. 27, pp. 1859-1867.

ZOHURIAAN, M.J., SHOKROLAHI, F., 2003, *Thermal studies on natural and modified gums*.