



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



Greyce Yane Honorato Sampaio

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS BIODEGRADÁVEIS PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDOS CARTILAGINOSOS**

Campina Grande, 2012

Greyce Yane Honorato Sampaio

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS BIODEGRADÁVEIS PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDOS CARTILAGINOSOS**

Trabalho de dissertação apresentado à banca
examinadora do Programa de Pós Graduação em
Ciências e Engenharia de Materiais da
Universidade Federal de Campina Grande, Área de
Concentração: Polímeros, como exigência final para
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Campina Grande, 2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCEG

S192d Sampaio, Greyce Yane Honorato

Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos / Greyce Yane Honorato Sampaio. – Campina Grande, 2012.

142 f.: il. col.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Referências.

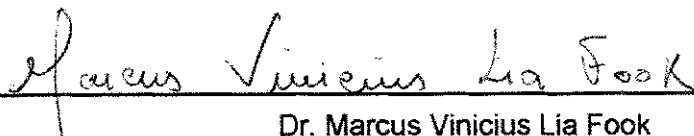
1. Quitosana. 2. Genipina. 3. Engenharia de Tecidos. 4. Arcabouço. 5. Cartilagem Articular. I. Título.

CDU 557.144.4 (043)

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS BIODEGRADÁVEIS PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDOS CARTILAGINOSOS**

Greyce Yane Honorato Sampaio

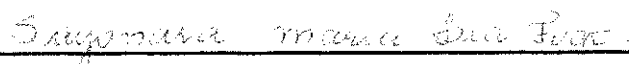
Dissertação Aprovada em 29/02/2012 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Drª. Renata de Sousa Coelho Soares
(Examinadora Externa)
UFCG



Drª. Sayonara Maria Lia Fook
(Examinadora Externa)
CCBS/UEPB

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha família, em
especial aos meus pais Lina e Francisco
Sampaio (*in memoriam*), e aos meus irmãos
Pablo e Franklin Sampaio.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida que me deu e que renova em mim todos os dias. A **Jesus e Nossa Senhora da Conceição** pelo sustento e conforto em todos os momentos.

Aos meus pais, **Lina e Francisco Sampaio**, pelo amor e dedicação incondicionais e todo esforço em demonstrar o exemplo de uma vida digna.

À toda minha família, representada nas pessoas de **Francisca Honorato e Antônia Sampaio**, minhas queridas avós, pelo companherismo e alegria, por representarem o meu eu em completude.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinicius Lia Fook** pelas oportunidades concedidas e tudo o que a convivência diária proporcionou de aprendizado para vários segmentos da vida.

À **CAPES**, pela bolsa cedida.

Às Prof^{as} Dr^a **Renata de Sousa Coelho Soares**, Dr^a **Roberta Oliveira Pinto** e Dr^a **Sayonara Maria Lia Fook**, pela disponibilidade e contribuições de grande valor para o desenvolvimento desse trabalho.

Às Prof^{as} Dr^a **Luci Cristina de Oliveira Vercik** e Dr^a **Eliana Cristina da Silva Rigo**, por todas as contribuições ao longo do trabalho.

À Prof^a Dr^a **Iracilda Zeppone Carlos e Marisa Polesi** pela dedicação e hospitalidade durante os quatro meses de intercâmbio, e toda equipe do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular de Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara – SP, em especial a **Thaís, Djamilé, Pâmela, Livia e Daniele**.

A **TODOS** os companheiros do grupo **CERTBIO** pela amizade e tantos momentos compartilhados nesta batalha diária. Em especial a **Ana Carolina, Anna Sylvia, Glória, Hugo, Isabel, Ítalo, Maria Eduarda, Rossemberg e Thiago**. Também agradeço a **Adriana, Aracele, Carmem, Chirlaine, Emanuel, Eva, Hygo, Klaidson, Katylaine, João Paulo, Márcio, Magna, Roberta, Rita, Rosemary, Waldênia e Wladymyr**. E aos técnicos e funcionários **Adriana, Geanne, Germano, Geraldo e S. Sérgio**.

Ao corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais pelo empenho e apoio.

Aos grandes amigos da turma de Desenho Industrial, por tudo o que representam para a minha formação, **Ana Flávia, Vanucia, Deborah, Joseanne, Milena, Uyara, Rafael, Nivaldo, Washington, Itamar e Efraim**.

À Alethea, Anna Sylvia, Angelina, Cleide, Dávila, Dora, Jacqueline, Larissa, Lays, Maria e Patrícia pelo apoio indispensável.

Aos meus amigos de infância, que representam minha base e crescimento, André, Camila, Carolina, Felipe, João e Ricardo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta etapa.

“Se tivéssemos de escolher entre conhecimento e virtude, a última seria sem dúvida a melhor escolha, pois é mais valiosa. O bom coração, que é fruto da virtude, é por si só um grande benefício para a humanidade. O mero conhecimento, não.

Dalai-Lama

RESUMO

A Engenharia Tecidual nasceu, em grande parte, da necessidade de pesquisadores de voltar-se para abordagens multidisciplinares em busca de soluções específicas para questões na medicina. Nesse campo de investigação são empregados métodos através dos quais as células em estudo podem proliferar e organizar sua Matriz Extracelular (ECM) em arcabouços, constituídos de um biomaterial. Recentemente, houve uma introdução de conceitos da engenharia tecidual no reparo da cartilagem articular. A cartilagem, uma vez danificada, apresenta pouca ou nenhuma capacidade regenerativa e determinadas lesões podem evoluir para alterações degenerativas bastante graves nas articulações. Nesse contexto, as pesquisas apontam o biopolímero Quitosana, como uma das alternativas para aplicação como suporte poroso devido, principalmente, ao seu baixo custo e disponibilidade para obtenção, e à sua biodegradabilidade. A presente dissertação teve como objetivo desenvolver e caracterizar arcabouços biodegradáveis de Quitosana e Quitosana-Genipina para regeneração de tecidos cartilaginosos através da técnica de *freeze drying*. A Genipina, agente de reticulação natural, foi escolhida por apresentar eficácia em vários estudos realizados. Os arcabouços foram produzidos em variadas concentrações e diferentes taxas de congelamento. Em seguida, os arcabouços foram submetidos a ensaios físico-químicos de caracterização, por Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO) e Ensaio do Grau de Intumescimento (GI) e ensaios biológicos para Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos (MTT) e Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO). Através das análises por FTIR foram reveladas todas as bandas características de um polissacarídeo para todas as concentrações, e a efetividade da reticulação. As análises por DRX mostraram arcabouços com padrão típico de Quitosana, com aspectos menos amorfos conforme o aumento da concentração da solução e do agente reticulante. As análises por MEV mostraram a elevada influência da taxa de congelamento das soluções e da introdução da Genipina, com formação de poros de tamanho e morfologia diferentes para cada variável. Observou-se, por MO, a efetividade da reticulação com Genipina e, por GI, a influência da taxa de congelamento das soluções, da concentração da quitosana e da reticulação na capacidade de absorção dos arcabouços. Os Ensaio Biológicos demonstraram, nas condições analisadas, que os arcabouços apresentam biocompatibilidade. Os arcabouços, produzidos e avaliados, apresentaram resultados promissores para a preparação de biomaterias a serem utilizados na regeneração de tecidos cartilaginosos.

Palavras - chave: Quitosana. Genipina. Engenharia de Tecidos. Arcabouço. Cartilagem Articular.

ABSTRACT

Tissue Engineering was created by the needed for researchers to turn to multidisciplinary approaches in search specific solutions to issues in medicine. In this field of research are employed methods which cells can proliferate and organize their extracellular matrix (ECM) in scaffolds, constituted of a biomaterial. Recently, has been an introduction of concepts of tissue engineering in the repair of articular cartilage. The cartilage, once damaged, has little or no regenerative capacity and certain lesions may progress, cause degeneration and very severe changes in articulation. In this context, studies showed the biopolymer chitosan as favorable candidate for use as a porous support, mainly, for low cost and availability for obtaining, and their biodegradability. Thus, this dissertation purposed to develop and characterize biodegradable scaffolds of Chitosan and Chitosan-Genipina for regeneration of cartilaginous tissue using the technique of freeze drying. Genipin, natural crosslinking agent, was chosen for presenting efficiency in several studies. The scaffolds were produced at varying concentrations and different freezing rates and were submitted to physico-chemical characterization by Spectroscopy in the Region of Fourier Transform Infrared (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical microscopy (OM) and test the degree of swelling (GI), and biological assays for the Assessment of Cell Viability of macrophages (MTT) and Determination of the Production of Nitric Oxide (NO). The FTIR analysis revealed all characteristic bands of a polysaccharide for all concentrations, and the effectiveness of the crosslinking. XRD analysis showed typical pattern of chitosan, amorphous with the less with increasing concentration of the solution and the crosslinking agent. Analysis by SEM showed the influence of high freezing rate of the solutions and the introduction of Genipin, with formation of different pore size and morphology for each variable. Analysis by MO indicated the effectiveness of the crosslinking Genipin and, by GI, the influence of the rate of freezing of the solution and the concentration of chitosan and crosslinking on the swelling capacity of the scaffolds. The biological tests have shown, under the conditions studied, the biocompatibility of scaffolds. The scaffolds were produced and evaluated, showed promising results for the preparation of biomaterial to be used in the regeneration of cartilaginous tissues.

Keywords: 1. Chitosan. 2. Genipin. 3. Tissue Engineering. 4. Scaffold. 5. Articular Cartilage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução do transplante de órgãos e tecidos entre os anos de 2001 e 2011	26
Figura 2: Diferentes estruturas para os arcabouços utilizados na engenharia tecidual. (A) espuma porosa; (B) matriz de fibras nanométricas; (C) hidrogel; (D) microesferas porosas	34
Figura 3: Arcabouços combinados com dispositivos de cultura de células (bioreator)	35
Figura 4: Organização da cartilagem articular	40
Figura 5: Esquema das estratégias da engenharia tecidual aplicadas à cartilagem articular, desde a coleta de células do indivíduo, semeadura em arcabouços e implante no paciente	42
Figura 6: Estrutura da quitina	49
Figura 7: Representação esquemática das estruturas polimórficas da quitina	50
Figura 8: Conversão da quitina e os produtos resultantes da reação	51
Figura 9: Estrutura da quitosana	52
Figura 10: Estrutura de soluções de quitosana formadas por (a) quitosana reticulada com suas próprias cadeias, (b) redes poliméricas híbridas, (c) redes de polímeros semi-interpenetrantes e (d) reticulação iônica da quitosana com suas próprias cadeias	59
Figura 11: Gardênia: (a) Flor; (b,c) Fruto	61
Figura 12: Estrutura química do (a) geniposídeo e (b) genipina	62
Figura 13: Ataque nucleofílico da quitosana ao carbono C-3 da genipina. R=Quitosana	63
Figura 14: Reação da genipina com quitosana para formar amida secundária. R=Quitosana	64
Figura 15: Fluxograma representativo da metodologia experimental	67
Figura 16: Etapas de dissolução e filtragem da quitosana	68
Figura 17: Liofilizador e moldes utilizados para as amostras congeladas por nitrogênio líquido na Etapa I	71
Figura 18: Liofilizador e moldes utilizados para as amostras da Etapa II	72
Figura 19: Condições de ajuste de pH experimentadas após 1 hora de imersão. (1) Solução 1M NaOH; (2) Solução 1M NaOH/Álcool etílico 99,5°GL; (3) 1M	73

NaOH/Álcool etílico 70°; (4) Álcool etílico 99,5°C

Figura 20: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana 1 %, 1,5 % e 2 %, através do congelamento com nitrogênio líquido em moldes tubulares 81

Figura 21: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana 1,5 %, 2 % e 3 %, através do congelamento em *freezer* à -20 °C (taxa muito lenta, abaixo de 0,01 °C/s) em placas de Petri (Ø = 60 mm, altura = 15 mm) 82

Figura 22: Espectro vibracional de IV da quitosana em pó (fabricante Polymar S.A.) 84

Figura 23: Espectro vibracional de IV dos arcabouços de quitosana QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO, QTP2-NITRO 85

Figura 24: DRX da quitosana em pó (fabricante Polymar S.A.) 87

Figura 25: DRX dos arcabouços de quitosana QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO, QTP2-NITRO 87

Figura 26: Micrografias (MEV) da seção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-300x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s) 89

Figura 27: Micrografias (MEV) da seção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-800x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento lento (-20°C, taxa de 0,01 °C/s a 0,06 °C/s) 90

Figura 28: Micrografias (MEV) da seção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-800x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento rápido (-196°C, taxa de 0,06 °C/s a 50 °C/s) 92

Figura 29: Micrografias (MEV) dos arcabouços liofilizados fabricados a partir do congelamento de solução de quitosana com concentração de 1,5 % (a-100x, b-300x, c-800x), 2 % (d-100x, e-300x, f-800x) e 3 % (g-100x, h-500x, i-1500x), à temperatura de -20°C (taxa muito lenta, abaixo de 0,01 °C/s) 94

Figura 30: Micrografias (MEV) de secções de arcabouços com concentração de quitosana 2 % liofilizados, antes e após serem submetidos às condições de ajuste de pH, em solução 1M NaOH (a-antes-100x,b-100x,c-500x), 1M NaOH/Etanol 99,5°GL (d-antes-100x,e-100x,f-500x) e Etanol 99,5°GL (g-antes-100x,h-500x,i-1000x) 96

Figura 31: Micrografias (MEV) de secções de arcabouços com concentração de quitosana 2 % liofilizados, após serem submetidos às condições de ajuste de pH em solução 1M NaOH/Etanol 99,5°GL (a,b) e 1M NaOH/Etanol 70° (c,d), com 98

lavagem posterior em água destilada

Figura 32: Viabilidade de macrófagos de camundongos *Swiss* na presença dos arcabouços. A – QTP2%-Solução1MNaOH, B – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL, C – QTP1,5%-Etanol 99,5°GL, D – QTP2%- Etanol 99,5°GL, E – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL+lavagem, F – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 70°+lavagem, LPS – controle positivo, CN – controle negativo 100

Figura 33: Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos *Swiss* na presença dos arcabouços. A – QTP2%-Solução1MNaOH, B – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL, C – QTP1,5%-Etanol 99,5°GL, D – QTP2%-Etanol 99,5°GL, E – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL+lavagem, F – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 70°+lavagem, LPS – controle positivo, CN – controle negativo 102

Figura 34: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana com concentração de 1,5 % e 2 %, através de taxas de congelamento variadas, à -20 °C e -196 °C 105

Figura 35: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana-genipina com concentração de quitosana 1,5 % e 2 % e de genipina 0,15% e 0,3%, congeladas à temperatura de -20 °C (taxa muito lenta) e -196 °C (taxa rápida) 106

Figura 36: Espectro vibracional de IV da quitosana em pó (fabricante Sigma-Aldrich) 109

Figura 37: Espectro vibracional de IV dos arcabouços QTS1,5-FREE, QTS2-FREE, QTS2-NITRO e QTS2-NITRO Neutralizado 109

Figura 38: Espectro vibracional de IV da genipina 110

Figura 39: Espectro vibracional de IV dos arcabouços QTS1,5-GE15-FREE, QTS1,5-GE3-FREE, QTS2-GE15-FREE, QTS2-GE3-FREE, todos neutralizados 112

Figura 40: DRX da quitosana em pó (fabricante Sigma-Aldrich) 114

Figura 41: DRX dos arcabouços de quitosana QTS1,5-NITRO, QTS2-FREE, QTS2-NITRO e QTS2-NITRO Neutralizado (fabricante Sigma-Aldrich) 115

Figura 42: DRX dos arcabouços de quitosana QTS1,5-GE15-FREE, QTS1,5-GE3-FREE, QTS2-GE15-FREE, QTS2-GE3-FREE e QTS2-FREE, todos neutralizados (fabricante Sigma-Aldrich) 116

Figura 43: Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 1,5 %, submetidos a taxas de congelamento muito lento (a-300x), lento (b-300x) e rápido (c-300x) e de 2 % (d-300x), (e-300x) e f (300x) submetidos à taxas de congelamento semelhantes 118

Figura 44: Média do diâmetro dos poros dos arcabouços de quitosana com concentração de 1,5 % e 2 %, congelados através de taxa muito lenta (abaixo de 119

0,01 °C/s), lenta (entre 0,01 °C/s e 0,06 °C/s) e rápida (entre 0,06 °C/s e 50 °C/s), calculados através das micrografias (MEV) obtidas

Figura 45: Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana-genipina liofilizados com concentração de Quitosana 1,5 % e concentrações de genipina 0,15% (a-100x, b-300x, c-800x) congelado à -20 °C (muito lento), genipina 0,3% (d-100x, e-300x, f-300x) congelado à 20 °C (muito lento) e genipina 0,15 % (g-100x, h-300x, i-800x) congelado à -196 °C 120

Figura 46: Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana-genipina liofilizados com concentração de Quitosana 2 % e concentrações de genipina 0,15% (a-100x, b-300x, c-800x) congelado à -20 °C (muito lento), genipina 0,3% (d-100x, e-300x, f-300x) congelado à 20 °C (muito lento) e genipina 0,15 % (g-100x, h-300x, i-800x) congelado à -196 °C 121

Figura 47: Média do diâmetro dos poros dos arcabouços de quitosana-genipina com concentração de 1,5 % e 2 %, e genipina 0,15 % e 2 %, congelados através de taxa muito lenta (abaixo de 0,01 °C/s) e rápida (entre 0,06 °C/s e 50 °C/s), calculados através das micrografias (MEV) obtidas 123

Figura 48: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana com concentração de 1,5 % (a-280x, b-420x) e 2% (c-280x, d-420x) submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s) 124

Figura 49: Microscopia ótica (MO) 3D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana com concentração de 1,5 % (a) e 2% (b) submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s) 125

Figura 50: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana-genipina com concentração QTS1,5-GE15 (a-280x), QTS1,5-GE3 (b-280x) e QTS2-GE15 (c-280x), QTS2-GE3 (d-280x), submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s) 126

Figura 51: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana-genipina com concentração QTS1,5-GE15 (a), QTS1,5-GE3 (b) e QTS2-GE15 (c), QTS2-GE3 (d), submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s) 127

Figura 52: Porcentagem de intumescimento dos arcabouços de quitosana QTS1,5 e QTS2, submetidos a estágios de congelamento muito lento (-20 °C, taxa abaixo de 0,01 °C/s), lento (-20 °C, taxa entre 0,01 °C/s e 0,06°C/s) e rápido (0,06 °C/s a 50 °C/s) 129

Figura 53: Porcentagem de intumescimento dos arcabouços de quitosana-genipina QTS1,5-GE15, QTS1,5-GE3, QTS2-GE15 e QTS2-GE3, submetidos a estágios de congelamento muito lento e rápido 130

Figura 54: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos 131

arcabouços. A – QTP2%FREE, B – QTP2%GE015%FREE e C –
QTP2%GE0,3%FREE, LPS – controle positivo, CN – controle negativo

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Dados de transplante de órgãos, tecidos e células para o primeiro semestre de 2011	25
Quadro 2: Dados de transplante de órgãos, tecidos e células para 2010 e primeiro semestre de 2011, realizados pelo Sistema Único de Saúde	27
Quadro 3: Parâmetros cristalográficos para os polimorfos α - e β -quitina	50
Quadro 4: Relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana	53
Quadro 5: Algumas aplicações da genipina na área biomédica	62
Quadro 6: Relação entre a concentração de quitosana e a massa de genipina	69
Quadro 7: Identificação das amostras fabricadas na ETAPA I	70
Quadro 8: Identificação das amostras sem reticulação fabricadas na Etapa II	71
Quadro 9: Identificação das amostras reticuladas fabricadas na Etapa II	72
Quadro 10: Descrição das condições de ajuste de pH experimentadas	73
Quadro 11: Vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de IV da quitosana em pó	84
Quadro 12: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença dos seis tipos de amostra estudados, e para os controles positivo e negativo.	101
Quadro 13: Médias e desvio-padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença dos seis tipos de amostra estudados, e para os controles positivo e negativo, em comparação com a porcentagem de células viáveis	103
Quadro 14: Efeito da temperatura e tempo de reação na aparência física das soluções de quitosana-genipina, com concentração de quitosana-genipina fixa. A área destacada se refere à temperatura e ao tempo utilizados neste trabalho	107
Quadro 15: Vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de IV da genipina em pó	111

SÍMBOLOS

nm	Nanometro
NaOH	Hidróxido de sódio
NH	Amina
OH	Hidroxila
°C	Graus Celcius
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
Å	Ångström
kV	Quilovolt
mA	Microampere
Cu	Cobre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Θ	Theta
L	Litro
g	grama
C=O	Carboxila
Pa	Pascal
V	Volume
H	Hidrogênio
μm	Micrometro
3T3	Linhagem celular de fibroblastos

ABREVIações

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ECM	Extracellular matrix (Matriz Extracelular)
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
SUS	Sistema Único de Saúde
AO	Osteoartrose
PLLA	<i>Poly (L-lactic acid)</i>
PGA	<i>Poly (glicolic acid)</i>
PLGA	<i>Poly (lactico-glucolic acid)</i>
NIPAAm	<i>N-isopropylacrylamide</i>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais
UAEm	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
cm	Centímetro
Dema	Departamento de Engenharia de Materiais
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas (°INPM= % em massa)
°GL	graus Gay Lussac (°GL= % em volume)
DRX	Difração de Raios X
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GAG	Glucosaminoglicano
PM	Peso Molecular
GD	Grau de desacetilação

Ge	Genipina
GI	Grau de Intumescimento
h	Hora
s	segundo
M	Molar
MO	Microscopia Ótica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mi	Massa intumescida
MS	Massa seca
MTT	brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
PBS	(Phosphate buffered saline) – Tampão fosfato salino
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura)
RPMI-C	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura completo)
QTP	Quitosana (fabricante Polymar S.A.)
QTS	Quitosana (fabricante Sigma-Aldrich)
FREE	Congelamento em <i>freezer</i> , taxa muito lenta
FREEL	Congelamento em <i>freezer</i> , taxa lenta
NITRO	Congelamento em nitrogênio líquido, taxa rápida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2.1	OBJETIVOS	24
2.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	24
2.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	24
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	Dados acerca dos transplantes no Brasil	25
3.2	Engenharia de Tecidos	28
3.2.1	<i>Arcabouços x Matriz Extracelular (ECM).....</i>	30
3.2.2	<i>Estratégias utilizadas na Engenharia de Tecidos</i>	34
3.3	<i>Técnica de Freeze drying ou Pré congelamento e Liofilização</i>	36
3.4	Tecido cartilaginoso	38
3.5	Biomateriais	42
3.5.1	<i>Biocompatibilidade, Biodegradabilidade, Bioabsorção</i>	43
3.6	Polímeros na Engenharia de Tecidos Cartilaginosos	46
3.7	Biopolímeros	47
3.7.1	<i>Quitina e Quitosana</i>	48
3.7.1.1	<i>Quitosana na Engenharia de Tecidos Cartilaginosos</i>	55
3.7.1.2	<i>Arcabouços de quitosana</i>	56
3.7.1.3	<i>Reticulação da quitosana</i>	57
3.8	Agente reticulante natural: Genipina	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1	Local da Pesquisa	65
4.1.1	<i>Obtenção e caracterização físico-química e microestrutural</i>	65
4.1.2	<i>Caracterização biológica</i>	65
4.2	Materiais.....	65
4.3	Procedimento experimental	66

4.3.1	<i>Etapas de realização do trabalho</i>	66
4.3.2	<i>Preparação das Soluções de Quitosana e Quitosana-Genipina</i>	68
4.3.3	<i>Fabricação dos Arcabouços de Quitosana e Quitosana-Genipina</i>	69
4.3.4	<i>Ajuste e controle de pH dos arcabouços</i>	72
4.4	<i>Caracterização dos arcabouços</i>	74
4.4.1	<i>Caracterização Físico-química e Microestrutural</i>	74
4.4.1.1	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	74
4.4.1.2	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	75
4.4.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	75
4.4.1.4	<i>Microscopia Ótica (MO)</i>	76
4.4.1.5	<i>Grau de Intumescimento (GI)</i>	76
4.4.2	<i>Caracterização Biológica</i>	77
4.4.2.1	<i>Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos</i>	78
4.4.2.2	<i>Determinação da Produção de Óxido Nítrico</i>	79
5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	81
5.1	<i>ETAPA I – Etapa Exploratória do método de fabricação</i>	81
5.1.1	<i>Fabricação dos arcabouços porosos de quitosana</i>	81
5.1.2	<i>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	83
5.1.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	86
5.1.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	88
5.1.5	<i>Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos</i>	99
5.1.6	<i>Determinação da Produção de Óxido Nítrico</i>	102
5.1.7	<i>Parâmetros determinados a partir dos resultados da ETAPA I</i>	104
5.2	<i>ETAPA II – Etapa de desenvolvimento e investigação dos</i>	

	arcabouços	105
5.2.1	<i>Fabricação dos arcabouços porosos de quitosana-genipina</i>	105
5.2.2	<i>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	108
5.2.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	113
5.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	117
5.2.5	<i>Microscopia Ótica (MO)</i>	123
5.2.6	<i>Grau de Intumescimento</i>	128
5.2.7	<i>Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos</i>	131
6	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS	135

1 INTRODUÇÃO

Devido aos traumas, malformações congênitas e processos decorrentes de diversas doenças, o dano e/ou perda de um órgão ou tecido do corpo, é uma das problemáticas mais enfáticas e de alto custo relacionadas aos cuidados com a saúde. Tendo em vista a necessidade da população relacionada com o aumento da expectativa de vida, são empregados principalmente dois procedimentos que visam suprir a falta dos tecidos e órgãos comprometidos, o implante e o transplante (SENEDESE, 2011).

A técnica de transplante de tecidos tem sido extensivamente empregada para sua substituição e/ou regeneração, e os métodos aplicados utilizam principalmente autoenxertos e aloenxertos, porém, autoenxertos são associados a limitações como morbidade do doador, enquanto aloenxertos podem provocar uma resposta imunológica intensa, e levar ao uso de drogas imunossupressoras, além do risco de transmissão de doenças (SANTOS JR; WADA, 2007; SENEDESE, 2011).

A escassez de doadores para transplante, que envolve também questões éticas e religiosas, se tornou um problema de grandes proporções para a saúde pública, inclusive de ordem socioeconômica. Entre outros fatores que dificultam essa terapia, está o alto custo do processo, desde a coleta até a implantação do órgão ou tecido. Nesse contexto, associada à necessidade, há a motivação econômica que incentiva os países desenvolvidos a investirem fortemente em terapias promissoras e no desenvolvimento de substitutos biológicos sem a necessidade de doadores de tecidos e órgãos (SANTOS JR; WADA, 2007; SENEDESE, 2011).

A Engenharia Tecidual nasceu, em grande parte, da necessidade de pesquisadores de voltar-se para abordagens multidisciplinares em busca de soluções específicas para questões na medicina, levando ao progresso em diagnóstico, monitoramento e surgimento de dispositivos implantáveis e enxertos de tecido. Essa área presenciou um crescimento exponencial na última década, e tem sua base, principalmente, na mimetização do ambiente vivo *in vitro*, para obtenção de crescimento tecidual favorável. Para isso são empregados métodos através dos

quais as células em estudo podem proliferar e organizar sua matriz extracelular (ECM) em uma rede tridimensional (3D), constituída de um biomaterial, para formar um tecido vivo clinicamente funcional, exibindo histoquímica, propriedades químicas e biomecânicas semelhantes às do tecido saudável (AUSTIN, 2007; KIM *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008).

Recentemente, houve uma introdução de conceitos da Engenharia Tecidual no reparo da cartilagem articular. A cartilagem é um tecido avascular e que possui basicamente dois tipos celulares, os condrócitos e os condroblastos. A cartilagem, uma vez danificada, apresenta pouca ou nenhuma capacidade regenerativa e determinadas lesões podem evoluir para alterações degenerativas bastante graves nas articulações. Os resultados de pesquisas na área mostraram que implantes porosos puderam guiar o crescimento vascular para dentro da região lesada, indicando os princípios da Engenharia Tecidual como viáveis para obtenção de resultados significativos (SANTOS JR; WADA, 2007).

O desenvolvimento, fabricação e avaliação de novos biomateriais constitui em uma área chave de investigação no domínio da engenharia de tecidos. Ainda, o estudo da relação biomaterial x células é fundamental no sentido de favorecer ou possibilitar a reconstrução natural do tecido. Os requisitos básicos para biomateriais utilizados na fabricação de arcabouços são biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades de superfície apropriadas para favorecer a adesão, proliferação e diferenciação celular (SHI, 2006; LIU *et al.*, 2007; WILLIAMS, 2008).

De acordo com esses requisitos, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e passíveis de modificações químicas que os assemelham mecânica e quimicamente aos materiais biológicos. Estes materiais podem ser de origem natural ou sintética, com recente atenção para aqueles de origem natural, devido à sua semelhança com a estrutura dos tecidos humanos que se pretende substituir. Como base para a composição de um novo tecido, os polímeros bioreabsorvíveis vêm sendo amplamente estudados para uma melhor compreensão dos fatores que influenciam sua biodegradação, bioreabsorção e a forma com que interagem com os elementos biológicos (URAGAMI; TOKURA, 2006; SHI, 2006; WILLIAMS, 2008).

Nesse contexto, as pesquisas apontam a quitosana, polissacarídeo derivado da quitina, como uma das alternativas para aplicação como suporte poroso, devido principalmente, ao seu baixo custo e disponibilidade para obtenção, e à sua biodegradabilidade, com produtos de degradação atóxicos. No entanto, observa-se a necessidade de melhoria das propriedades mecânicas e estabilidade química dos suportes produzidos. A estrutura química da quitosana permite inúmeras modificações, dentre elas a reticulação, que proporciona a formação de redes mais estáveis. Os pesquisadores têm voltado seus estudos para a descoberta de agentes de reticulação menos citotóxicos e, dessa forma, a genipina foi introduzida como um agente de reticulação eficaz (BISPO, 2009; DASH *et al.*, 2011; GONSALVES *et al.*, 2011).

A estrutura química da quitosana é semelhante à dos glicosaminoglicanos, principal elemento da matriz extracelular do osso e cartilagem, característica que a torna um material passível de mimetizar funcionalmente a cartilagem articular. As matrizes porosas de quitosana podem ser obtidas através de processo de congelamento e liofilização ou *freeze drying*, que gera uma microestrutura porosa com alto grau de interconectividade entre os poros, a depender das variáveis de processamento determinadas (URAGAMI; TOKURA, 2006).

O desenvolvimento de novas técnicas e aprimoramento daquelas já em aplicação para a Engenharia de Tecidos é de grande importância, tendo em vista aliar o processamento viável do material à inclusão de fatores de crescimento celulares e propriedades biofuncionais específicas. Tomando esses fatores como parâmetros, surge a necessidade e importância de investigar o processo de desenvolvimento de suportes porosos com base na quitosana, através da técnica de pré congelamento e liofilização, para aplicação na reconstituição de tecidos cartilaginosos, com foco na cartilagem articular.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e caracterizar arcabouços biodegradáveis de quitosana e quitosana reticulada com genipina para regeneração de tecidos cartilagosos.

2.2 Específicos

- Analisar comparativamente as condições de processamento para obtenção de arcabouços de quitosana com e sem reticulação através da técnica de *freeze drying*;
- relacionar as propriedades físico-químicas e morfológicas de acordo as variáveis de processamento definidas para a obtenção dos arcabouços e verificar aquelas com características mais favoráveis à utilização para regeneração tecidual;
- avaliar a citotoxicidade dos arcabouços.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dados acerca dos transplantes no Brasil

De acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), no primeiro semestre de 2011 foram realizados, no Brasil, um número total de transplantes de órgãos, tecidos e células que chegou a 23.149, como apresenta o Quadro 1.

Quadro 1: Dados de transplante de órgãos, tecidos e células para o primeiro semestre de 2011

TRANSPLANTES REALIZADOS				
órgãos	vivo	falecido	total	%
Coração	0	84	84	2,6%
Fígado	47	665	712	21,7%
Intestino	0	0	0	0,0%
Pâncreas	0	102	102	3,1%
Pulmão	0	15	15	0,5%
Rim	774	1591	2365	72,1%
TOTAL	821	2457	3278	100,0%

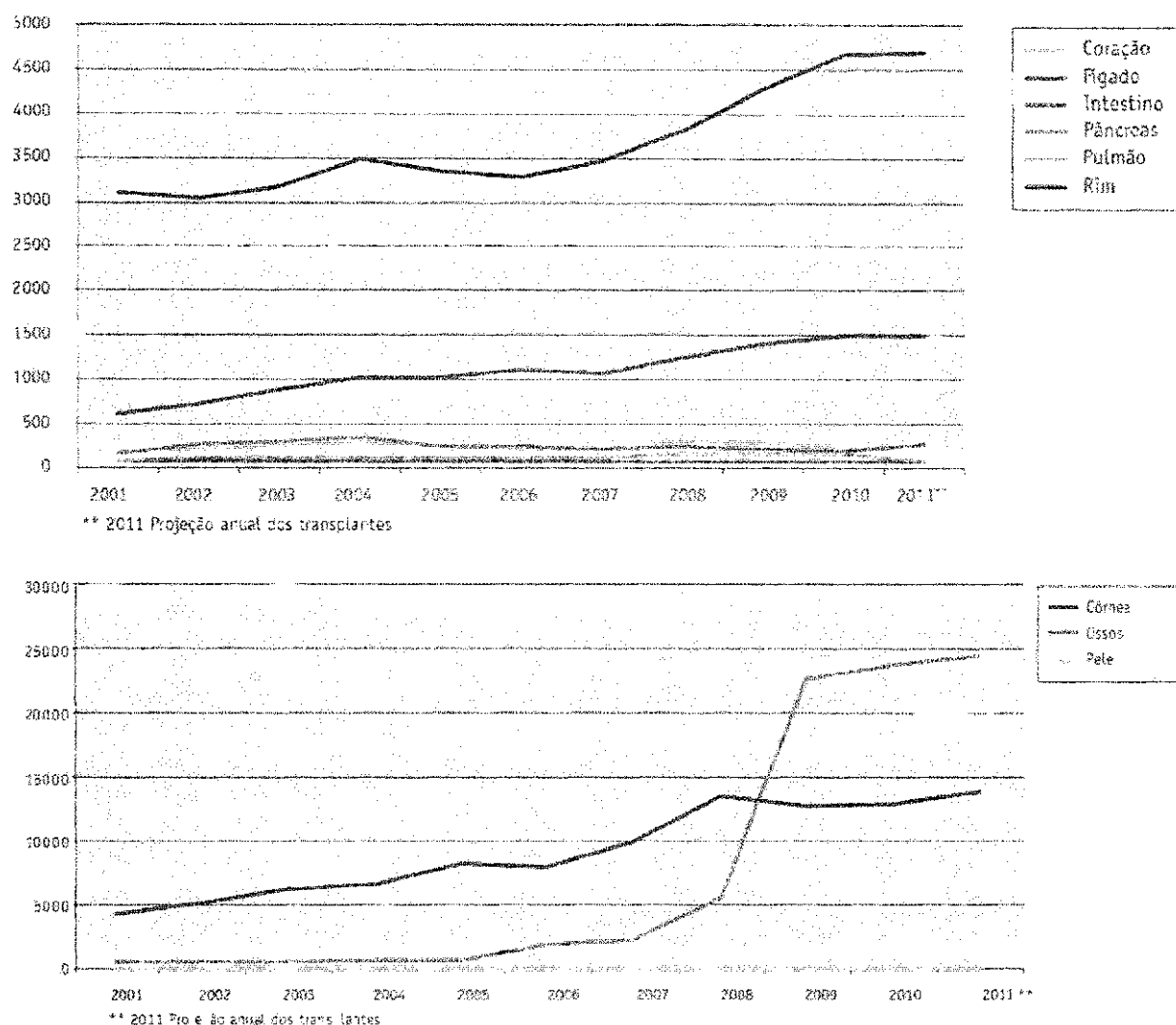
TRANSPLANTES REALIZADOS		
Tecidos	Falecidos	%
Córnea	6891	36,1%
Ossos	12185	63,9%
Pele	2	0,0%
TOTAL	19078	100,0%

TRANSPLANTES REALIZADOS			
Células	Autólogo	Allogênico	TOTAL
Medula Óssea	469	324	793

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2011

A evolução dos transplantes de órgãos e tecidos no Brasil entre os anos de 2001 e 2011 é ilustrada na Figura 1. Dados semelhantes relacionados ao transplante de medula óssea ainda não foram disponibilizados.

Figura 1: Evolução do transplante de órgãos e tecidos entre os anos de 2001 e 2011



Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2011.

Os gráficos apresentam um aumento significativo para os transplantes de fígado, rim, córnea e ossos. De acordo com a ABTO (2011), o número total de transplantes de órgãos, tecidos e células para o ano de 2010 corresponde a 44.039. Comparando esse número com o obtido para o primeiro semestre de 2011, que corresponde a 23.149, tem-se um valor maior que a metade do registrado em 2010.

Esses dados podem ser comparados com os números obtidos pelo Ministério da Saúde para os transplantes mais realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 2010 e primeiro semestre de 2011, que estão no Quadro 2.

Quadro 2: Dados de transplante de órgãos, tecidos e células para 2010 e primeiro semestre de 2011, realizados pelo Sistema Único de Saúde

LISTA DOS TRANSPLANTES MAIS REALIZADOS PELO SUS - AMBULATÓRIO E HOSPITALAR		
TRANSPLANTES REALIZADOS	2010	2011
CÓRNEA	5.802	3.318
RIM (ÓRGÃO DE DOADOR FALECIDO)	2.516	1.313
RIM (ÓRGÃO DE DOADOR VIVO)	1.335	707
FÍGADO (ÓRGÃO DE DOADOR FALECIDO)	1.114	573
TRANSPLANTE AUTOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE PERIFÉRICO	583	281
TRANSPLANTE AUTOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA	347	141
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA - APARENTADO	306	149
CÓRNEA (EM CIRURGIAS COMBINADAS)	743	293
CÓRNEA (EM REOPERAÇÕES)	408	236
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE PERIFÉRICO - APARENTADO	220	88
CORACAO	160	66
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA - NÃO APARENTADO	88	56
TRANSPLANTE SIMULTÂNEO DE PÂNCREAS E RIM	77	67
FÍGADO (ÓRGÃO DE DOADOR VIVO)	72	38
PULMÃO - UNILATERAL	52	8
ESCLERA	58	17
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE NÃO APARENTA	33	13
PÂNCREAS	33	20
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE PERIFÉRICO - NÃO APARENTADO	18	4
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE APARENTADO	2	3
PULMÃO - BILATERAL	1	6
TOTAL	13.968	7.397

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011

De acordo com o Ministério da Saúde (2011), o número de transplantes em 2010 correspondeu a 13.968, e os valores do primeiro semestre de 2011 corresponderam a 7.397. Dessa forma, os transplantes realizados até junho de 2011 equivalem a mais da metade daqueles realizados durante 2010. Essas informações indicam um contínuo crescimento para os transplantes no país.

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2011), no Brasil, existem seis bancos de ossos, entre eles os do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), que tem capacidade para realizar duas captações por dia ou 700 por ano. No entanto, apesar dos investimentos do instituto, a falta de doadores faz com que a unidade opere bem abaixo de sua capacidade. Com relação ao transplante de medula óssea, foi previsto para 2010 um investimento de R\$ 16 milhões para a ampliação de centros de transplantes.

As filas de espera para receber as doações de órgãos (considerando coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim) são grandes em todo o país, totalizando 39.534 pessoas em 2009. Muitas vezes a longa espera por doações culmina na situação drástica de venda e tráfico de órgãos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010; SENEDESE, 2011).

3.2 Engenharia de Tecidos

A disparidade entre o número de pacientes que aguardam transplante e o número de tecidos e órgãos disponíveis se tornou um problema de grandes proporções para a saúde pública. De acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, em outubro de 2010, mais de 109 000 pessoas no país aguardavam o transplante de órgãos. No entanto, entre janeiro e outubro de 2010, pouco menos de 17 000 pacientes receberam os órgãos, enquanto mais de 5.500 chegaram a falecer. Estes números indicam uma situação de ordem mundial e apontam para o objetivo principal da engenharia de tecidos: amenizar a escassez crônica de tecidos e órgãos (PECK *et al.*, 2011; SENEDESE, 2011).

De acordo com Williams (2008), a Engenharia de Tecidos foi definida conceitualmente como a persuasão do corpo para curar-se, através da distribuição de sinais moleculares, células e/ou estruturas de suporte para os locais apropriados. Seguindo uma abordagem mais prática, essa definição pode ser colocada como a criação de novos tecidos para a reconstrução terapêutica do corpo humano, através

do estímulo deliberado e controlado das células alvo selecionadas através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos.

Segundo Shi (2006), a engenharia tecidual pode ser considerada como a segunda geração da ciência biomimética. Biomimética (de “bios”, que significa vida, e “mimesis”, que significa imitar) é uma nova disciplina que estuda as construções da natureza em todos os seus aspectos estéticos e funcionais, e procura reproduzir estes projetos e processos no desenvolvimento de soluções para os problemas humanos. A Biomimética introduz uma era baseada não naquilo que pode-se extrair dos organismos e de seus ecossistemas, mas naquilo que pode ser aprendido com eles (BENYUS, 2002).

A engenharia tecidual, no entanto, não se limita a produzir sistemas sintéticos similares aos encontrados nos sistemas biológicos, mas procura regenerar tecidos e órgãos com resultados análogos àqueles provenientes de indivíduos saudáveis, como uma renovação da vida. Esse campo une os princípios fundamentais de áreas como Medicina, Biologia, Fisioterapia, Matemática, Física, Química e Engenharias. É baseada principalmente na mimetização do ambiente vivo *in vitro*, para obter um crescimento tecidual ideal, com formação de estruturas complexas para posterior reimplante (SHI, 2006; KIM *et al.*, 2008; SENEDESE, 2011).

A melhoria da engenharia de tecidos com relação à ciência dos biomateriais tradicional é a combinação de componentes artificiais e biológicos. Em resumo, as abordagens fundamentais dessa área consistem na obtenção de partes de tecidos vivos, a serem dissociadas em uma suspensão de células e expandidas a uma determinada concentração. As células são semeadas em arcabouços compatíveis, que devem basicamente fornecer forças dinâmicas benéficas para as células, favoráveis para formação de tecidos e órgãos artificiais com a arquitetura anatomicamente desejada e funções biológicas normais (SHI, 2006; SANTOS JR; WADA, 2007).

3.2.1 Arcabouços x Matriz Extracelular (ECM)

Entre os aspectos mais críticos da engenharia de tecidos está a fabricação de arcabouços tridimensionais porosos que se assemelhem àqueles produzidos naturalmente pelo corpo para organização das células nos tecidos, as matrizes extracelulares (ECM). A principal função da matriz extracelular no desenvolvimento de tecidos é o seu papel como substrato fisiológico para adesão celular, servindo também para organizar as células espacialmente, o que garante uma regeneração precisa de estruturas pré existentes (TABATA, 2005).

A matriz extracelular é um tecido composto de uma variedade de macromoléculas, que podem ser agrupadas em quatro classes principais, responsáveis por características específicas da ECM. São elas os colágenos, os proteoglicanos, as glicoproteínas celulares interativas e as fibras elásticas. Além disso, embora todos as ECMs apresentem esses componentes, sua organização, forma e propriedades mecânicas podem variar muito para diferentes tecidos, dependendo da composição química e organização tridimensional das macromoléculas (TABATA, 2005; FARACH-CARSON *et al.*, 2007; VEISEH *et al.*, 2008).

O colagénio é a proteína mais comum no corpo humano, compondo cerca de 30% do mesmo, encontrando-se particularmente em todo o tecido conectivo e diferenciando-se em 28 tipos diferentes. É uma proteína em tripla-hélice produzida pelos fibroblastos. Proteoglicanos, no entanto, são macromoléculas complexas que contêm uma proteína central, com uma ou mais ligações laterais covalentes de glicosaminoglicanos (GAGs). Devido às suas propriedades elásticas, os proteoglicanos definem um espaço no qual as células podem mover-se e diferenciar-se, formando novas matrizes (FARACH-CARSON *et al.*, 2007; HARRISON, 2007; VEISEH *et al.*, 2008).

Dentro da ECM, existem domínios específicos contendo sequências de aminoácidos chamadas de glicoproteínas, que são reconhecidas como receptores da superfície celular. Essas sequências de polipeptídeos servem como sinais de reconhecimento para adesão. Adesão celular é fundamental para a construção de

células em tecidos e para a manutenção de sua integridade. A fim de formar uma estrutura tridimensional, as células devem aderir, não só umas às outras, mas também à superfície da estrutura de suporte subjacente. A quarta classe de macromoléculas da ECM é formada por fibras elásticas, que fornecem a flexibilidade ao tecido (HARRISON, 2007; VEISEH *et al.*, 2008).

Dessa forma, os arcabouços desempenham um papel vital no desenvolvimento de novos tecidos, exercendo funções, que incluem:

- Promoção de uma estrutura de apoio temporário para o tecido que se pretende substituir, servindo como substrato para a adesão, crescimento, proliferação, migração e diferenciação das células e como um veículo, facilitando a retenção e distribuição das células e nutrientes na região onde o crescimento de tecido novo é desejado;
- servir como delimitadores do espaço para que ocorra a vascularização, formação e remodelagem de novo tecido, evitando a ocupação de tecidos da vizinhança no local afetado.

Para isso, essas estruturas devem obedecer a alguns requisitos básicos:

- Ser biocompatível;
- ser biodegradável;
- degradar a uma taxa proporcional ao crescimento do novo tecido;
- possuir propriedades mecânicas consistentes com o tecido que será substituído;
- ter as propriedades de superfície desejadas para formação da matriz extracelular;
- apresentar em sua arquitetura propriedades adequadas em termos de tamanho dos poros, porosidade e interconectividade entre os poros;
- ser permeável. (LIU *et al.*, 2007; KARANDE; AGRAWAL, 2008).

De acordo com esses requisitos, se faz necessário o comportamento favorável dos arcabouços:

a) Quanto à biocompatibilidade

Considerando que a chave para alcançar a biocompatibilidade de sistemas através de qualquer material se direciona para a mimetização de uma função física ou mecânica do corpo, sem obter qualquer resposta anormal do tecido relevante, com os arcabouços o ponto principal é que o material deve ser concebido para realmente provocar uma tal resposta (WILLIAMS, 2008).

b) Quanto à biodegradabilidade

O arcabouço deve exercer gradualmente a função de suporte de carga e apoio ao tecido recém crescente, especialmente em aplicações músculo esqueléticas, nas quais os suportes são geralmente sujeitos a cargas mais elevadas. Idealmente, a taxa de biodegradação deve coincidir com a taxa de regeneração de novos tecidos para proporcionar uma transição quase perfeita de carga do suporte para o novo tecido em desenvolvimento, sem comprometer a integridade do implante. Se a taxa de desintegração do arcabouço é alta, o tecido recém-formado será subitamente exposto a maiores forças do que as que ele pode tolerar, sendo prejudicado. Por outro lado, se a taxa de degradação é extremamente lenta, pode resultar em uma tensão compressiva sobre o tecido em crescimento, formando uma barreira entre ele e as forças que se destinam a fortalecê-lo durante o seu desenvolvimento (BURG; ORR, 2008; KARANDE; AGRAWAL, 2008).

c) Quanto à adesão celular

A adesão celular ao arcabouço é necessária para que ocorra uma boa interação entre ele e a matriz extracelular. A semelhança físico química entre matriz extracelular e arcabouço não é obrigatória para que ocorra essa adesão, mas é desejável para a interação eficaz no local de implantação (SENEDESE, 2011).

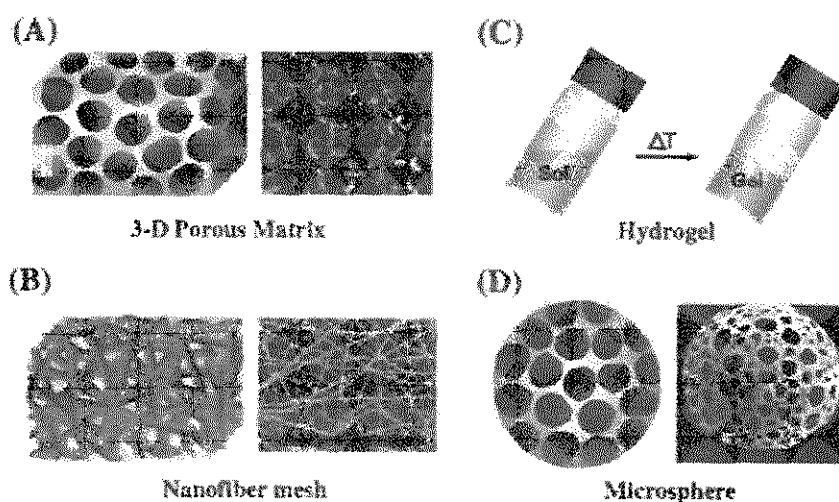
d) Quanto à porosidade

Porosidade é definida como a porcentagem de espaço vazio em um sólido. Vários estudos têm reiterado a importância de uma porosidade adequada e de uma elevada superfície de contato para promover a distribuição uniforme de células e o crescimento dos tecidos, bem como de uma interconexão entre esses poros para que ocorra difusão de nutrientes e resíduos. Além disso, a construção da arquitetura do arcabouço deve considerar a linhagem celular com a qual irá interagir (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005; NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009; SENEDESE, 2011).

Além disso, a seleção do suporte leva em consideração tanto o tipo do tecido a ser reconstituído e o local da lesão, quanto a sua extensão, seguindo basicamente duas estratégias de aplicação. Na primeira estratégia, o arcabouço é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, desde a inoculação até o reimplante no organismo hospedeiro. O implante do conjunto suporte e células ocorre com um tecido prematuro formado e o arcabouço é remodelado pela degradação *in vivo*. Na segunda estratégia, o implante ocorre com tecido maduro formado. O suporte é projetado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção em um bioreator, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Assim, a consideração dos vários parâmetros relacionados com um arcabouço deve ser cuidadosa. Os arcabouços podem ser processados em diferentes estruturas, que incluem: malha de fibras, hidrogéis, microesferas porosas e espumas (Figura 2). O material e o processo de manufatura identificados devem estar em consonância com todas essas variáveis. Para o material, dureza, elasticidade, resistência mecânica, balanço adequado entre hidrofiliabilidade/hidrofobicidade e disposição de cargas elétricas devem ser considerados, entre outras características (BARBANTI *et al.*; 2005; CHUNG; PARK; 2007; KARANDE; AGRAWAL, 2008).

Figura 2: Diferentes estruturas para os arcabouços utilizados na engenharia tecidual. (A) espuma porosa; (B) matriz de fibras nanométricas; (C) hidrogel; (D) microesferas porosas



Fonte: CHUNG; PARK, 2007.

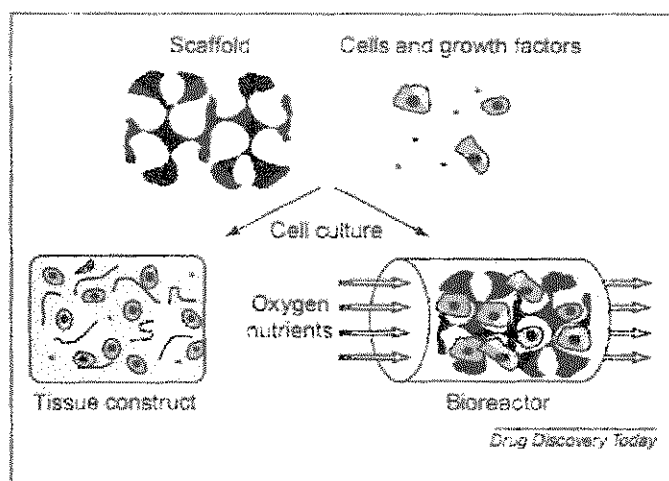
3.2.2 Estratégias utilizadas na Engenharia de Tecidos

Algumas estratégias possíveis na engenharia tecidual são:

- o arcabouço com ou sem células e/ou moléculas biológicas sinalizadoras (fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e genes) é aplicado a um defeito corporal para induzir a regeneração *in vivo* (I);
- um sistema de liberação controlada de fármacos que permite que moléculas biológicas auxiliem na sinalização celular e na eficácia terapêutica *in vivo*; (II)
- arcabouços utilizados para a fixação e proliferação celular, combinados com dispositivos de cultura de células (por exemplo, um bioreator) para crescimento eficiente do tecido maturado e posterior reimplante (III);
- inserção de uma barreira física feita de um biomaterial, que mantém as células funcionais transplantadas isoladas do ataque imunológico e mantém um espaço para indução à regeneração (IV).

Em processos de biofabricação, algumas etapas biológicas são importantes sendo elas a sobrevivência das células, a sequencial auto estruturação do conjunto arcabouço e células aderidas, a vascularização e o amadurecimento do tecido. A estratégia III é a mais comumente utilizada, e está ilustrada na Figura 3 (BARBANTI *et al.*, 2005; TABATA, 2005; SENEDESE, 2011).

Figura 3: Arcabouços combinados com dispositivos de cultura de células (bioreator)



Fonte: TABATA, 2005.

As células utilizadas na engenharia de tecidos podem ser extraídas de várias fontes, incluindo tecidos primários ou secundários. As células primárias podem ser xenogênicas (de diferentes espécies), alogênicas (de diferentes membros da mesma espécie, havendo código genético compatível), singênicas (de indivíduos geneticamente idênticos) ou autólogas (do mesmo indivíduo). A maioria das construções em engenharia tecidual empregam células primárias autólogas para obtenção de uma resposta mais favorável (HARRISON, 2007; SENEDESE, 2011).

Os métodos aplicados nessa área se tratam de procedimentos eficazes, mas ainda apresentam algumas limitações que incluem baixa capacidade de integração entre o implante e o hospedeiro, causando morbidade na área doadora de tecido e reações imunológicas em potencial, e escassez no fornecimento de células,

direcionando os estudos da área para o atendimento dos requisitos essenciais definidos para os arcabouços (YANG *et al.*, 2008).

3.3 Técnica de *Freeze drying* ou Pré congelamento e Liofilização

Uma série de tecnologias para fabricação de arcabouços foram desenvolvidas ou adaptadas de outras áreas para a engenharia de tecidos. Estas técnicas incluem *fiberbonding*, evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal (*solvent casting – particulate leaching*), inversão de fases, injeção de gás, *fused deposition modeling* (FDM), *freeze drying* e outras, que têm sido propostas e utilizadas para o processamento de materiais poliméricos (BARBANTI *et al.*, 2005; YOON; FISHER, 2007; SHI, 2006).

Entre as técnicas apontadas, a de *freeze drying* tem atraído bastante atenção. A descoberta do congelamento como um meio para secagem foi descrita por Gerrit de Veer em 1595, quando alimentos foram armazenados para uma expedição. O atual processo de congelamento e liofilização foi testado e utilizado em 1890 em Leipzig, na Alemanha. Esse método foi de grande importância durante a Segunda Guerra Mundial, quando a Cruz Vermelha canadense teve que realizar uma distribuição semanal de até 2000 unidades de plasma de sangue humano. Durante a década de 1950, a liofilização começou a ser utilizada rotineiramente pelas indústrias de alimentos e medicamentos. Nas duas últimas décadas vários textos sobre esse processo foram publicados, alguns deles focados nessas indústrias (FRANKS, 2007).

A técnica de *freeze drying* permite a obtenção de estruturas altamente porosas, geralmente com características esponjosas ou de pó, por meio de congelamento da solução de um determinado polímero em temperaturas que podem variar entre -20°C e -196°C , seguido pela remoção do solvente através de sua sublimação em um equipamento denominado liofilizador. Assim, durante a liofilização, o espaço ocupado pelo cristais de gelo formados se torna vazio após a sublimação, originando os poros (CORRELO *et al.*, 2007; FRANKS, 2007).

Normalmente, esse equipamento, entre outras funções, deve controlar a temperatura da amostra e do condensador de gelo. Além disso, o local onde a amostra será mantida para a secagem, chamado de "câmara de vácuo", deve ser mantida a uma baixa pressão (menos de 100 mTorr), geralmente por mais de 24 horas, para permitir a completa sublimação do solvente. Apesar do tempo e energia consumidos no processo, quando comparada com outras metodologias mais econômicas, exibe a principal vantagem de conseguir reter a estrutura porosa final do produto obtido, evitando a sua desintegração. Outra grande vantagem é a possibilidade de adaptação do material final em estruturas semelhantes, variando os parâmetros experimentais, entre eles: a concentração da solução polimérica, a temperatura e velocidade de congelamento, o solvente utilizado e a incorporação de agentes porogênicos (CORRELO *et al.*, 2007; FRANKS, 2007).

A etapa de congelamento é de extrema importância para o processo pois é nessa etapa que o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo são definidos. Dependendo do tempo de congelamento e de como ele se processa, têm-se diferentes velocidades de congelamento e taxas de congelamento resultantes. Como a taxa de congelamento induz a formação de cristais de gelo de diferentes tamanhos, após a liofilização o espaço ocupado por esses cristais ficará vazio e, conseqüentemente, afetará a geometria e tamanho dos poros no material seco. Com uma baixa velocidade de resfriamento, haverá mais tempo para formação e crescimento dos cristais de gelo, que poderão atingir um maior tamanho em relação aqueles formados através de um congelamento rápido. Essas taxas juntamente com a temperatura também podem ser combinadas dividindo-se o congelamento em etapas (CHAVES; MARQUES; FREIRE, 2009; CORRELO *et al.*, 2007; HSHIEH *et al.*, 2007).

Pitombo (1989) em seu estudo, estabeleceu escalas para a velocidade de congelamento em termos de °C/s: muito lento (abaixo de 0,01 °C/s), lento (de 0,01 °C/s a 0,06 °C/s), rápido (0,06 °C/s a 50 °C/s) e super-rápido (acima de 50°C/s). Chaves, Marques, Freire (2009) realizou o estudo das curvas de congelamento em freezer convencional (-20 °C) e em nitrogênio líquido ($\approx$ - 196 °C), no intuito de determinar as taxas de congelamento proporcionadas por esses métodos. A

pesquisa indicou o congelamento em nitrogênio líquido como rápido ($0,06^{\circ}\text{C/s}$ a 50°C/s) e o congelamento em *freezer* como muito lento (abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$).

A técnica de *freeze drying* tem sido universalmente escolhida para o processamento de produtos farmacêuticos estáveis devido a aspectos favoráveis aos campos tecnológico e econômico. As baixas temperaturas protegem o material durante o processamento, sem que haja perda ou dano às suas características intrínsecas, é um processo aprovado pelas autoridades reguladoras, pode ser realizada sob condições estéreis, o produto seco pode ser rapidamente reidratado, e o formato do produto acabado é reconhecido e aceito pelos usuários finais, associados com qualidade e simples execução (FRANKS, 2007).

Para a engenharia de tecidos, é possível obter arcabouços com diferentes densidades, formas, porosidade, e forma e distribuição de tamanho dos poros. A porosidade obtida pode ser superior a 90 %, com tamanhos de poro que geralmente variam entre 15-200 μm , altamente interconectados. A técnica permite a incorporação de células termossensíveis, como fatores de crescimento, diretamente no suporte poroso sem detrimento ao seu comportamento, auxiliando na construção de sistema de liberação de fármacos. Há uma limitação quanto às propriedades mecânicas dos produtos finais, devido à alta porosidade alcançada, que pode ser superada através da utilização de agentes apropriados (SHI, 2006; CORRELO *et al.*, 2007).

3.4 Tecido Cartilaginoso

Cartilagem é um tecido conjuntivo altamente especializado composto por condrócitos dispersos embutidos em uma rica matriz extracelular. A matriz, composta principalmente de proteoglicanos (22 a 28 %), colágeno tipo II (48 a 62%) e água, é diretamente responsável pelas propriedades funcionais únicas desse tecido e promove forma, resiliência e resistência contra a compressão e cisalhamento. Apesar da estrutura relativamente simples, a cartilagem apresenta pouca capacidade para a reparação e regeneração devido a vários fatores como a

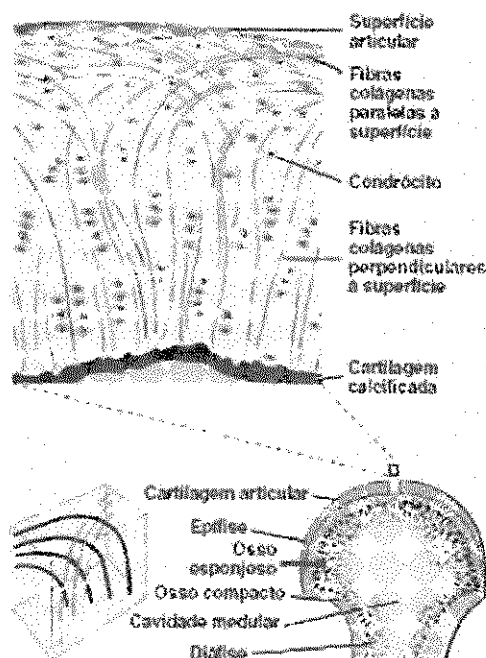
falta de células progenitoras e vascularização, uma população de células esparsas e altamente diferenciadas, e uma regeneração da matriz lenta (SUH; MATTHEW, 2000; YANG; ELISSEEFF, 2007; BITTENCOURT, 2008; MOROZ, 2009).

Existem três tipos de cartilagem: a cartilagem hialina, cartilagem elástica e fibrocartilagem. Cada tipo tem diferentes propriedades funcionais e, portanto, diferentes conteúdos bioquímicos. Cartilagem hialina é rica em colágeno tipo II e proteoglicanos e é encontrada principalmente na superfície das articulações, onde serve como um amortecedor. Cartilagem elástica é constituída por fibras elásticas, não exclusivamente o colágeno. As fibras elásticas dão a este tipo de cartilagem a capacidade de se deformar e voltar à forma. Exemplos de cartilagem elástica incluem o ouvido externo, a epiglote, e a porção superior da laringe. Fibrocartilagem é rica em colágeno tipo I e é encontrada em tecidos que estão sujeitos a forças de tração, tais como o disco intervertebral (GOUGH, 2007; YANG; ELISSEEFF, 2007; MOROZ, 2009).

A cartilagem hialina, que reveste a superfície das articulações sinoviais pode medir no adulto de 2 a 4 mm de espessura, os condrócitos apresentam-se em disposição zonal, a matriz é composta de 68 a 85% de água, o que confere elasticidade ao tecido cartilaginoso. Macroscopicamente, a cartilagem articular é brilhante, lisa, branca e semi-rígida. Microscopicamente, a cartilagem articular divide-se em várias zonas, como ilustra a Figura 4 (GOUGH, 2007; BITTENCOURT, 2008).

A cartilagem apresenta a menor densidade celular se comparada com qualquer tecido do corpo, com menos de 5% de células por volume. Sob compressão, se comporta como um material poroelástico, segundo o qual a sua resposta a cargas de compressão é de frequência e tensão dependentes (HARRISON, 2007).

Figura 4: Organização da cartilagem articular



Fonte: BITTENCOURT, 2008.

A osteoartrite, doença articular degenerativa, artrose ou osteoartrose (OA), como ainda é designada, acomete grande parte da população acima dos 45 anos. Entre as alterações morfológicas, a cartilagem articular perde sua natureza homogênea e é rompida e fragmentada, com fibrilação, fissuras e ulcerações. Quando se trata da histologia do tecido a OA está associada a alterações do colágeno, de proteoglicanas, da síntese de condrócitos, da hidratação e das propriedades mecânicas da cartilagem (BITTENCOURT, 2008).

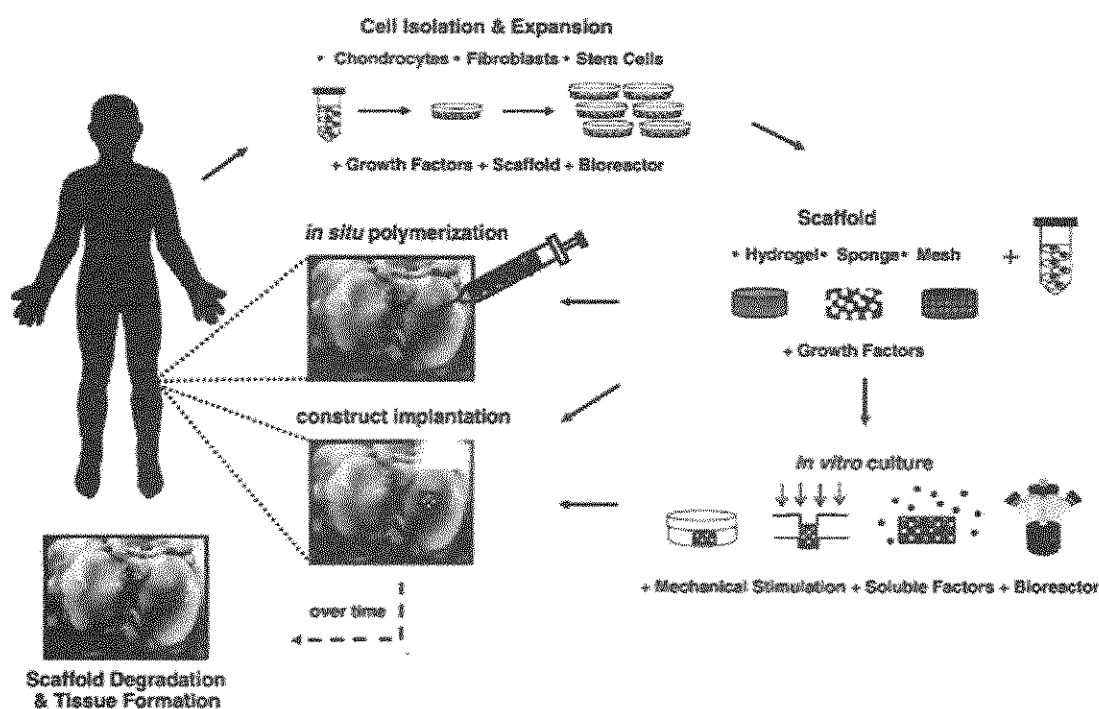
Mais de 1 milhão de procedimentos cirúrgicos nos Estados Unidos envolvem a substituição de cartilagem. Terapias convencionais incluem perfuração e desbridamento, transplante autólogo de cartilagem, e implantação de polímeros artificiais ou próteses metálicas. A perfuração e desbridamento pode fornecer alívio imediato dos sintomas, mas geralmente resulta na produção de um tecido fibrocartilaginoso com resultado desfavorável a longo prazo. O transplante pode ser um tratamento eficaz para pacientes com pequenos defeitos, mas sua aplicação é limitada devido à oferta insuficiente de doadores de tecidos, à morbidade do sítio

doador, e às dificuldades técnicas para moldar o tecido transplantado em formas tridimensionais complexas no hospedeiro. Próteses artificiais podem ser uma fonte de infecção, com deposição de proteína indesejada e fortes respostas imunológicas, sem capacidade de adaptação a pressões decorrentes da movimentação muscular (YANG; ELISSEEFF, 2007; MOROZ, 2009).

Dada a importância clínica da lesão da cartilagem e os resultados desfavoráveis para as terapias convencionais utilizadas, as pesquisas atuais procuram abordagens diferenciadas para melhorar o tratamento desse tecido, encontrando possíveis soluções na utilização de estratégias da engenharia tecidual. Avanços significativos têm sido alcançados devido à sua estrutura relativamente simples, porém as funções mecânicas exclusivas do tecido requerem composições moleculares distintas com arquitetura otimizada. Várias considerações devem ser feitas no intuito de minimizar a tendência de condrócitos a se diferenciarem em células semelhantes aos fibroblastos, mas que não possuam os atributos físico mecânico ideais (HARRISON, 2007; YANG e ELISSEEFF, 2007).

A cultura de condrócitos permite identificar condições sob as quais o reparo da cartilagem ocorre e descobrir meios específicos para a prevenção de danos ou mesmo a interrupção de sua destruição e aumentar a celularidade para possível implante. Vários sistemas de cultura são usados na expansão dos condrócitos, entre eles: a denominada cultura de condrócitos em monocamadas, cultura em sistema tridimensional em esponjas, ilustrada na Figura 5 (BITTENCOURT, 2008).

Figura 5: Esquema das estratégias da engenharia tecidual aplicadas à cartilagem articular, desde a coleta de células do indivíduo, semeadura em arcabouços e implante no paciente



Fonte: CHUNG; BURDICK, 2008.

3.5 Biomateriais

A definição inicial que considera os biomateriais como aqueles materiais capazes de tratar, aumentar ou substituir, qualquer tecido, órgão ou função do corpo está em constante evolução, agrupando as funções e conceitos que os novos campos propõem. No entanto, algumas características já foram delimitadas por diversos pesquisadores a exemplo da interdisciplinaridade, da afinidade que os cientistas da área devem demonstrar com as ciências dos materiais, do desenvolvimento dos dispositivos de biomateriais (envolvendo desde a identificação da necessidade, desenvolvimento, manufatura, implantação e remoção do dispositivo no paciente), da magnitude da necessidade e do campo comercial (que envolve questões comerciais e éticas pertinentes) (LIMA, 2010).

Sendo assim, de acordo com uma abordagem geral para os dispositivos médicos em evolução, os biomateriais podem ser descritos como materiais artificiais

utilizados para reparar, auxiliar ou substituir tecidos ou órgãos danificados. Para que um determinado material possa ser considerado um biomaterial, deve satisfazer certos requisitos com relação ao seu comportamento físico, mecânico e químico, e também ser biocompatível. Por exemplo, o material deve ser forte o suficiente para suportar cargas fisiológicas, ser resistente à degradação indesejável ou à corrosão, não ser carcinogênico ou mutagênico, entre outras propriedades. Muitos fatores, tais como tamanho, forma, composição, rugosidade e carga exercem influência decisiva, de acordo com a aplicação desejada (SHI, 2006; WILLIAMS, 2008).

Atualmente os biomateriais têm sido utilizados em vastas aplicações como biosensores, implantes, sistema para liberação controlada de drogas, lentes intraoculares, arcabouços para a regeneração de tecidos, etc. para solucionar problemas que abragem todos os sistemas do corpo. Para atender às solicitações específicas para cada aplicação são utilizados materiais metálicos, poliméricos e cerâmicos. A cada ano são desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer novas opções de tratamento para diversas enfermidades (AIMOLI, 2007; BARBOSA, 2011).

3.5.1 Biocompatibilidade, Biodegradabilidade, Bioabsorção

O fator mais importante que distingue um biomaterial de qualquer outro material é a sua capacidade de estar em contato com os tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de danos. Os materiais e os tecidos podem interagir de várias maneiras diferentes, de tal forma que esta coexistência pode ser comprometida, e a investigação de biomateriais capazes de fornecer um melhor desempenho para os dispositivos é indispensável (SHI, 2006; WILLIAMS, 2008).

Nesse contexto, Williams (2008) coloca que a chave para a compreensão da biocompatibilidade é a determinação de quais mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos ou de outra ordem se tornam operativos e porquê, de acordo com as condições específicas associadas ao contato entre os biomateriais e os tecidos do corpo, e quais as consequências dessas interações. Dessa forma, a

biocompatibilidade se refere à habilidade de um material de desenvolver uma resposta biológica apropriada em uma situação específica. Uma série de fatores contribuem para o tipo de resposta do tecido gerado pelo biomaterial, incluindo a forma e o tamanho do implante, a sua reatividade química, o mecanismo, a taxa e subprodutos de degradação; local de implantação, e as espécies hospedeiras (KARANDE; AGRAWAL, 2008).

Para a engenharia tecidual, a biocompatibilidade é o principal requisito para qualquer tipo de arcabouço. É necessário que através deste seja obtida uma resposta benéfica das células semeadas e uma resposta imune apropriada do tecido hospedeiro em implantação. As interações que ocorrem entre o arcabouço, células e tecidos devem ser favoráveis, sem qualquer potencial de dano devido à citotoxicidade induzida, à geração de uma resposta imunológica adversa, ou à ativação das vias de coagulação do sangue. Dentre os materiais biomcompatíveis estão aqueles classificados como biodegradáveis, bioreabsorvíveis e bioabsorvíveis. (KARANDE; AGRAWAL, 2008).

O termo biodegradação é utilizado quando um agente biológico, tal como uma enzima ou um micróbio, é um componente dominante no processo de degradação de dispositivos sólidos e os subprodutos dessa degradação podem ser removidos do local de ação mas não necessariamente remodelados no corpo humano (BARBANTI *et al.*, 2005; BURG; ORR, 2008). De acordo com Arshady (*apud* CAMERON e KAMVARI-MOGHADDAM, 2008), a biodegradação pode ser considerada como a desintegração, erosão, decomposição e/ou quebra de cadeia de um material em fragmentos metabolizáveis ou excretáveis, no corpo humano, em modelos animais, ou em ambientes *ex vivo* ou *in vitro*, que representam ou mimetizam o ambiente corporal.

Existem diversas definições sobre os pormenores que envolvem a degradação, com questionamentos direcionados a pontos como o nível de eliminação do material, o processo de degradação, a geometria dos componentes e o local do implante (BURG; ORR, 2008; WILLIAMS, 2008).

A biodegradabilidade de um arcabouço apresenta um papel importante no desempenho a longo prazo de um material para engenharia de tecidos, pois afeta

vários processos celulares que envolvem principalmente a resposta do hospedeiro. No caso da localização do implante deve-se considerar a vascularização local e a solicitação mecânica. Se o material é implantado em um sítio de alta vascularização (grande atividade vital), sua velocidade de degradação será mais rápida em relação à uma região menos vascularizada, de funções passivas. Locais de grande solicitação mecânica também têm sido descritos como aceleradores da degradação (BARBANTI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008).

A bioreabsorção é um termo aplicado àqueles materiais cujos produtos de degradação (compostos de baixo peso molecular) são removidos totalmente através de atividade celular em ambiente biológico. Geralmente, a bioreabsorção é percebida como um sinônimo de absorção, porém os materiais absorvíveis podem ser considerados como um subconjunto biológico especializado dentro do grupo classificado como materiais degradáveis (BARBANTI *et al.*, 2005; ARSHADY *apud* CAMERON e KAMVARI-MOGHADDAM, 2008).

Materiais bioabsorvíveis são aqueles que dissolvem (ou dispersam) em biofluidos, e são eliminados do corpo sem que haja uma desintegração ou colapso de sua estrutura. Múltiplos mecanismos químicos e biológicos são acionados no corpo durante a degradação e bioreabsorção de um material (BARBANTI *et al.*, 2005; BURG; ORR, 2008; WILLIAMS, 2008).

Entre os fatores que determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis, além daqueles relacionados ao tecido em questão, tem-se: massa molar, distribuição da massa molar, composição química/esterioisométrica, cristalinidade, morfologia, envolvendo o tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga de superfície, pH, presença de aditivos e outros (BARBANTI *et al.*, 2005).

3.6 Polímeros na Engenharia de Tecidos Cartilaginosos

Os polímeros são constituídos de macromoléculas orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas, que possuem unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominadas meros (VISSER *et al.*, 1996). Canevarolo Jr (2002) define um polímero como uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição denominadas meros, unidos por ligações covalentes. Quimicamente, eles têm como base o carbono, hidrogênio e outros elementos não metálicos (CALLISTER, 2002).

Polímeros são sintetizados por um processo denominado polimerização, e o número de vezes que o mero se repete nas moléculas do polímero é denominado de grau de polimerização. O grau de polimerização é bastante variável podendo ir da ordem de algumas unidades (oligômeros) até milhares e milhões de unidades de repetição, e é um dos fatores que influencia a sua vasta aplicabilidade (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; STEVES, 1999).

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como biomateriais para a fabricação de dispositivos médicos e arcabouços na engenharia de tecidos. Os polímeros utilizados como biomateriais podem ser classificados como aqueles de origem natural (biopolímeros, biodegradáveis) e de origem sintética (biodegradáveis e não-biodegradáveis). Polímeros sintéticos representam a maioria dos biomateriais poliméricos desenvolvidos, utilizados principalmente devido às suas propriedades físico mecânicas, com limitações quanto à compatibilidade e degradabilidade em relação àqueles de origem natural. Polímeros de origem natural, também chamados de biopolímeros consistem em uma classe importante dos biomateriais devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradação e disponibilidade abundante (SHI, 2006).

O conceito de engenharia de tecidos relacionado ao reparo de cartilagem foi proposto pela primeira vez por Green em 1977, enquanto a incorporação de arcabouços poliméricos para regeneração de tecidos ocorreu no início da década de 80. Recentemente, os conceitos dessa área têm sido aplicados para a cartilagem articular. Uma grande variedade de materiais poliméricos, de origem natural e

sintética, biodegradáveis e não-biodegradáveis tem sido introduzidas no reparo dessa cartilagem (SUH; MATTHEW, 2000; YOON e FISHER, 2007).

Os polímeros sintéticos atualmente explorados para a reparação da cartilagem incluem: poli α -hidroxi ácidos (PLLA, PGA e PLGA), PEG, poli (NIPAAm), poli (propileno fumaratos), e poliuretanos. No entanto, na maioria dos casos, esses polímeros não provocam interações célula-arcahouço favoráveis ao desenvolvimento saudável da matriz extracelular. Além disso, os subprodutos de degradação podem ser tóxicos ou induzir uma resposta inflamatória mais intensa. (CHUNG; BURDICK, 2008; MOROZ, 2008).

Entre os principais materiais de origem natural utilizados para a fabricação das esponjas com resultados favoráveis para a cartilagem pode-se citar o colágeno, a fibrina, o gel de agarose, o hidrogel de alginato e a quitosana. Polímeros naturais podem interagir com as células através de receptores de superfície celular, e regular ou dirigir as funções da célula. No entanto, devido a esta interação, podem também estimular uma resposta do sistema imune. Os polímeros naturais apresentam, no geral, propriedades mecânicas baixas. Em ambos os casos, propriedades físicas e químicas desses polímeros podem ser modificadas no intuito de alterar as propriedades mecânicas e de degradação dos arcahouços (MOROZ, 2008; GOUGH, 2007).

3.7 Biopolímeros

Segundo Johnson, Mwaikambo, Tucker (2003), os biopolímeros são polímeros biológicos (não fósseis) em sua origem, ou suscetíveis à digestão por microorganismos ou decomposição química no ambiente (por exemplo, hidrólise e oxidação). Idealmente, um biopolímero apresenta as duas características. A existência de tais materiais incita a crítica sobre os polímeros sintéticos usualmente empregados. Apesar de atingirem aos requisitos práticos a que são chamados, são produzidos a partir de matérias primas fósseis insubstituíveis e, apesar de duráveis, são de difícil eliminação ao final de sua vida útil.

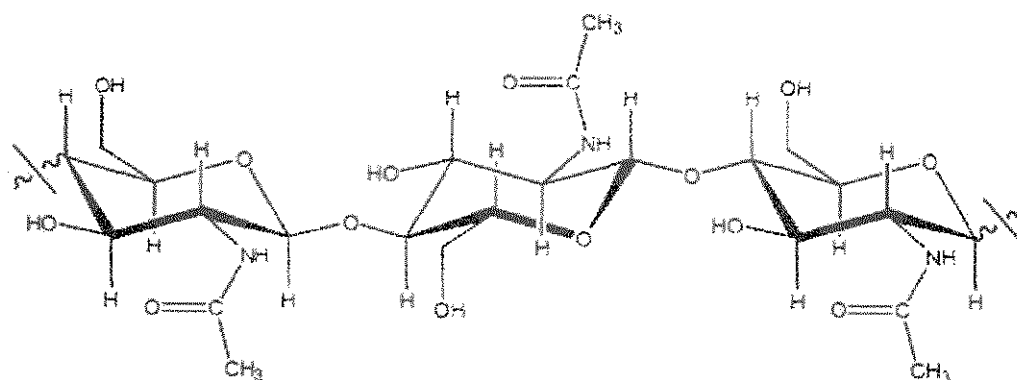
A maioria dos materiais formados na natureza durante os ciclos de vida das plantas, animais, bactérias e fungos são polímeros ou compósitos de matriz polimérica. Biopolímeros incluem os polissacarídeos, como celulose, amido e quitina, os polímeros provenientes de carboidratos produzidos por bactérias e fungos e à base de proteínas animais como gelatina e colágeno (JOHNSON; MWAIKAMBO; TUCKER, 2003; AUSTIN, 2007).

Os polímeros naturais estão sendo extensivamente utilizados como biomateriais, em grande parte, porque sua estrutura apresenta semelhanças químicas e biológicas com o tecido humano que se pretende substituir, atendendo aos requisitos de biodegradabilidade e biocompatibilidade exigidos para tais aplicações. Suas cadeias estruturais podem ser modificadas por métodos específicos através da variação de seus grupos funcionais, alterando suas características, o que proporciona versatilidade de processamento e uso. Além disso, esses materiais estão disponíveis na natureza em grandes quantidades e por um custo mais baixo (SHI, 2006; AUSTIN, 2007).

3.7.1 Quitina e Quitosana

A quitina, um polissacarídeo abundante na natureza, pode ser encontrada como microfibrilas cristalinas ordenadas formando componentes estruturais em muitos organismos aquáticos, terrestres e alguns microorganismos, sendo sua principal fonte de obtenção o exoesqueleto de crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris). Esse polissacarídeo é constituído por uma sequência linear de açúcares monoméricos formada por unidades 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose ligadas através de ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ possuindo, assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose. A diferença estrutural entre estas duas fibras polissacarídeas se deve aos grupos hidroxila, localizados na posição dois, que são substituídos na quitina por grupos acetamino. A estrutura da quitina é ilustrada na Figura 6 (URAGAMI; TOKURA, 2006; AIMOLI, 2007; FIOROTTI, 2009).

Figura 6: Estrutura da quitina

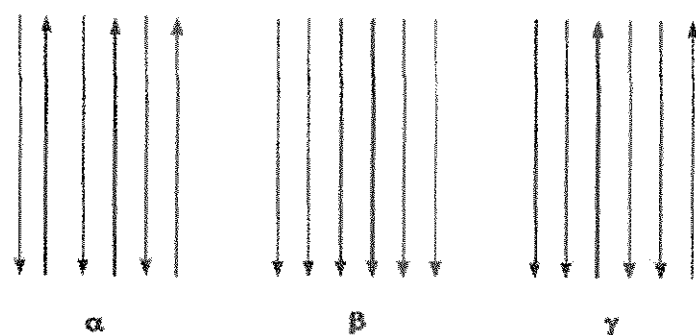


Fonte: FIOROTTI, 2009.

A fase cristalina da quitina é ordenada e, através de análises por Difração de Raios X, três formas polimórficas da quitina foram encontradas: α , β e γ -quitina, as quais diferem no arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas, como ilustra a Figura 7. Os parâmetros cristalográficos para os polímeros α - e β -quitina podem ser comparados pelo Quadro 3. A α -quitina é a mais estável e também a mais abundante, uma vez que ambas β - e γ -polímeros são irreversivelmente convertidas em α -quitina através de tratamentos adequados. Sua célula unitária é ortorrômbica, no seu arranjo as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são favorecidas, e as folhas antiparalelas são responsáveis pela insolubilidade. Apresenta grau de cristalinidade acima de 85% (RINAUDO, 2006; URAGAMI; TOKURA, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A ocorrência da β -quitina é muito menor em relação à α -quitina. Nesse arranjo, as folhas paralelas não favorecem as ligações de hidrogênio exibindo maior reatividade, intumescimento em água e solubilidade; sua célula unitária é monoclinica, apresenta grau de cristalinidade de aproximadamente 72%, e um empacotamento menos denso que o da α -quitina. A γ -quitina é composta por duas cadeias de disposição antiparalela intercalada por uma cadeia paralela, considerada uma combinação entre a α - e β -quitina (RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Figura 7: Representação esquemática das estruturas polimórficas da quitina



Fonte: CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007.

Quadro 3: Parâmetros cristalográficos para os polimorfos α - e β -quitina

	a (nm)	b (nm)	c (nm)	γ (°)	Grupo Espacial
α -quitina	0.474	1.886	1.032	90	$P2_12_12_1$
β -quitina	0.485	0.926	1.038	97.5	$P2_1$

Fonte: Adaptado de RINAUDO, 2006.

Durante o processamento industrial, a quitina é extraída através de tratamento com ácido para dissolver o carbonato de cálcio, seguido de extração alcalina para solubilização das proteínas. Além disso, é realizada, muitas vezes, a descoloração para a remoção de restos de pigmentos e obtenção de um produto incolor. Estes tratamentos são adaptados para cada fonte de quitina. A quitina resultante deve ser caracterizada em termos de pureza e cor, já que proteínas residuais e pigmentos podem ocasionar problemas durante sua utilização, especialmente para produtos biomédicos (RINAUDO, 2006).

Ao fim das etapas de pré-tratamento obtém-se um material sólido, polímero de estrutura irregular e natureza semicristalina. A quitina quando pura pode ser caracterizada como um pó de coloração amarelada, de estrutura irregular, semicristalina, insolúvel em água, solvente orgânico e em alguns ácidos e bases

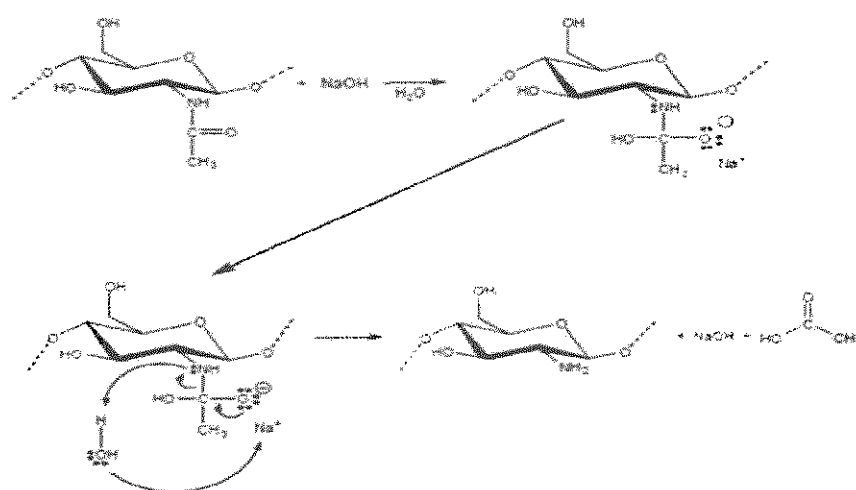
diluídas, sendo somente solúvel em soluções de N-Dimetilacetamida/Cloreto de Lítio. Em ácidos minerais concentrados ocorre degradação da cadeia polimérica (FIOROTTI, 2009).

A quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição. Este novo produto foi denominado "quitina modificada" e, mais tarde, em 1894, Hoppe-Seyler designou-o pela primeira vez com o nome "quitosana". Seu estudo e aplicação só vieram a intensificar-se por volta de 1970. É o derivado mais importante da quitina em termos de aplicações, cujo grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria prima e dos métodos de preparação aplicados (URAGAMI; TOKURA, 2006; FIOROTTI, 2009).

De acordo com os estudos apresentados por Hennig (2009), a diferença entre a quitosana e a quitina é a eliminação do grupamento acetil ligado ao grupo acetamino na posição 2. A quitina pode ser convertida em quitosana por meios enzimáticos ou por desacetilação alcalina, sendo esse último o método mais utilizado. Durante o curso da desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil são rompidas com a formação de unidades D-glucosamina, que contém um grupo amínico livre. A reação de desacetilação da quitina, produzindo quitosana, hidróxido de sódio e ácido acético, é ilustrada na Figura 8.

Segundo Hennig (2009), a quitosana pode ser considerada uma poliamina na qual os grupos amino estão disponíveis para reações químicas (preparação de derivados) e formação de sais com ácidos.

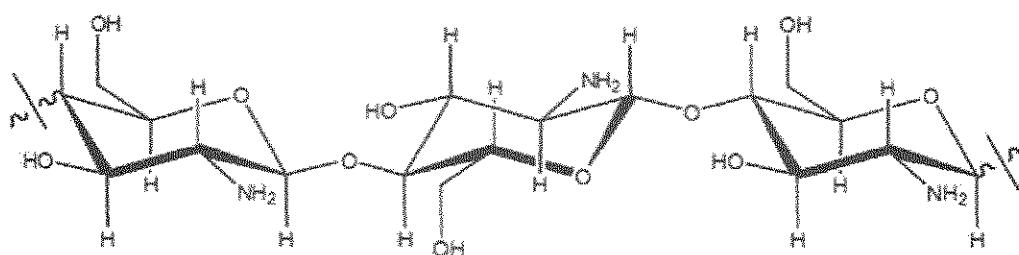
Figura 8: Conversão da quitina e os produtos resultantes da reação



Fonte: HENNIG, 2009.

Segundo Antonino (2007), a quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose e 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicopirranose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas unidades também são unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (Figura 9). Quatro cadeias de quitosana e oito moléculas de água são empacotadas em uma célula unitária ortorrômbica ($P2_12_12_1$) com as seguintes dimensões: $a = 0.895$ ($a = 0.807$ nm), $b = 1.697$ ($b = 0.844$ nm), $c = 1.034$. (URAGAMI; TOKURA, 2006).

Figura 9: Estrutura da quitosana



Fonte: FIOROTTI, 2009.

Em geral, quando o número de unidades N-glucosaminas é igual ou superior a 50%, o biopolímero é denominado quitosana. Dessa forma, quitosana é um nome genérico que representa uma família de quitina N-desacetilada, com diferentes graus de desacetilação (AIMOLI, 2007; FIOROTTI, 2009).

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de unidades de glicosamina nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero (Quadro 4). Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes de entrecruzamento, solubilidade e viscosidade de suas soluções (GONSALVES *et al.*, 2011).

Quadro 4: Relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana

PROPRIEDADE	CARACTERÍSTICA ESTRUTURAL ^a
Solubilidade	↑ GD
Cristalinidade	↓ GD
Biodegradabilidade	↓ GD ↓ Peso Molecular
Viscosidade	↑ GD
Biocompatibilidade	↑ GD
Mucoadesão	↑ GD ↑ Peso Molecular
Analgesica	↑ GD
Antimicrobiana	↑ GD
Antioxidante	↑ GD ↓ Peso Molecular
Hemostática	↑ GD

^a ↑ diretamente proporcional à propriedade

↓ inversamente proporcional à propriedade

Fonte: Adaptado de DASH *et al.*, 2011.

O seu peso molecular pode variar de 300 g/mol a mais de 1000000 g/mol. A quitosana apresenta três tipos de grupos funcionais reativos em sua cadeia: um grupo amino e grupos hidroxila primário e secundário nos carbonos (2), (3) e (6), respectivamente. Sua alta hidrofiliabilidade é resultado do grande número desses grupos, que permitem modificações químicas que resultam na formação de inúmeros derivados, úteis para aplicações específicas (AIMOLI, 2007; KIM *et al.*, 2008).

A quitosana é somente solúvel em soluções aquosas de ácidos fracos com pH<6 (ácidos orgânicos e inorgânicos). Sua solubilidade depende da distribuição dos grupos amino livres e dos grupos N-acetil. Em meios fracamente ácidos, a solubilização ocorre por protonação do grupos amino livres (da posição C-2), quando o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito. Após dissolução em meio ácido, os grupos amino livres da quitosana tornam-se protonados ($-NH_3^+$), o que facilita sua solvatação em água. Essa é a razão pela qual o biopolímero passou a ser classificado como um polieletrólito catiônico e também o principal motivo para a

modificação da quitina em quitosana. Outras modificações podem ser realizadas na estrutura macromolecular tanto da quitina quanto da quitosana para ampliar o espectro de solubilidade (GONSALVES *et al.*, 2011; RINAUDO, 2006; URAGAMI; TOKURA, 2006).

Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como ácido nítrico, clorídrico, perclórico ou fosfórico podem ser utilizados para preparação de soluções de quitosana. Sua solubilidade é normalmente investigada através da dissolução em ácido acético, um ácido orgânico, a 1%; estudos demonstraram que esse ácido reduz a viscosidade da solução de quitosana mais que outros ácidos (AIMOLI, 2007; FIOROTTI, 2009; DASH *et al.*, 2011).

A quitosana se destaca como um ótimo candidato para um amplo espectro de aplicações, apresentando propriedades biológicas únicas, que incluem: biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, notável afinidade a proteínas, ação antibacteriana, hemostática, fungistática e propriedades antitumorais. A quitosana é um produto natural, de baixo custo e renovável, de grande importância econômica e ambiental. (AZEVEDO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008).

Devido a suas excelentes propriedades de processamento e quando em interação com o corpo humano, a quitosana vem sendo testada para aplicação em uma variedade de formas, tais como hidrogéis, fibras, membranas, micro esferas e arcabouços porosos. Este biopolímero tem sido investigado principalmente em dois campos biomédicos: tem sido utilizado em conjunto com a quitina no tratamento de feridas, úlceras e queimaduras, de acordo com suas propriedades hemostáticas e seu efeito cicatrizante; e dada sua afinidade celular e biodegradabilidade, tem sido aplicada na regeneração e restauração de tecidos, incluindo a sua utilização como um material estrutural na engenharia de tecidos (MELO, 2009; NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009).

3.7.1.1 Quitosana na Engenharia de Tecidos Cartilaginosos

Estudos sobre a quitosana como biomaterial para aplicação na engenharia de tecidos foram intensificados durante os últimos 25 anos. A biocompatibilidade da quitosana minimiza inflamações locais adicionais, além de atuar como acelerador da reparação tecidual por aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento (KIM *et al.*, 2008; DASH *et al.*, 2011).

O conhecimento das estruturas (física e química) e propriedades físico-químicas é essencial para a compreensão das propriedades biológicas dos biomateriais concebidos com a quitosana. É particularmente importante que se estabeleça uma relação entre as estruturas e as respostas biológicas (DOMARD, 2011).

A natureza catiônica da quitosana e sua alta densidade de carga em solução permitem a formação de complexos insolúveis iônicos ou coacervados com uma grande variedade de polímeros solúveis em água, além de interações eletrostáticas com glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos distribuídos amplamente por todo corpo. Esta propriedade é uma das mais importantes para aplicação na engenharia de tecidos, principalmente para a regeneração de tecido cartilaginoso articular, já que os glucosaminoglicanos desempenham um papel crucial na modulação da morfologia, diferenciação e função dos condrócitos (SUH; MATTHEW, 2000; URAGAMI; TOKURA, 2006; DASH *et al.*, 2011).

De fato, a biocompatibilidade, a atividade antibacteriana intrínseca, o reconhecimento de fatores de crescimento, e a capacidade de processamento em uma variedade de formas macro e nano torna a quitosana um material para arcabouços de destaque para a cartilagem, mas o estudo da quitosana para essa aplicação é bastante recente (DUTTA; DUTTA, 2011).

3.7.1.2 Arcabouços de quitosana

Uma das características mais promissoras da quitosana é sua excelente habilidade para ser processada em estruturas porosas com poros interconectados para formação de arcabouços, que podem ser moldadas em diversas formas como membranas, blocos, fibras e microesferas. As propriedades mecânicas e biológicas dos arcabouços produzidos dependem das propriedades da quitosana utilizada, tais como peso molecular e grau de desacetilação (GD), e do método de preparação (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009).

As estruturas de quitosana porosa podem ser facilmente fabricadas pelo método de *freeze drying*. A tecnologia *freeze drying* é bastante utilizada para soluções de quitosana-ácido acético, através do congelamento e liofilização em moldes apropriados. A separação do acetato de quitosana a partir da fase do cristal de gelo e a subsequente remoção do gelo por liofilização geram um material poroso cujo tamanho médio de poros pode ser controlado variando-se a velocidade de congelamento. Além disso, as propriedades dos arcabouços podem ser controladas pela mudança de concentração da quitosana e temperatura e velocidade de congelamento (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; YANG *et al.*, 2010).

A compreensão e controle da taxa de degradação desses dispositivos é de grande interesse uma vez que essa propriedade é requerida para a regeneração tecidual. Existem poucos estudos envolvendo a degradação *in vivo* da quitosana. Estes apontam a lisozima como a principal enzima responsável por sua degradação *in vivo*, e seus produtos de degradação consistem em oligossacarídeos (N-acetil-D-glicosamina) de cadeias de variados tamanhos, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, são totalmente absorvíveis pelo organismo (REN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008; NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009; DASH *et al.*, 2011).

Estudos previamente realizados demonstram que a degradação aumenta à medida que diminui o grau de desacetilação (GD). Também foi observado que a cinética de degradação parece ser inversamente proporcional ao grau de

cristalinidade que é controlado principalmente pelo GD. A distribuição dos grupos acetil também parecem afetar a biodegradabilidade (DASH *et al.*, 2011).

A disposição dos grupos acetil e sua distribuição homogênea (aleatória, em vez de blocos) resulta em taxas muito baixas de degradação enzimática. No entanto, vários estudos relataram que a taxa de degradação é afetada também pelo comprimento das cadeias (massa molecular). Taxas de degradação muito rápidas da quitosana causam um acúmulo de aminossacarídeos que podem produzir uma resposta inflamatória. Basicamente, em condições e tempo adequados, a quitosana, na maioria dos casos, degrada o suficiente para ser excretada (KIM *et al.*, 2008; NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009; DASH *et al.*, 2011).

Com o aumento do grau de desacetilação (GD) do polímero, as interações entre a quitosana e as células aumentam devido à presença de grupos amino livres e, conseqüentemente, a adesão e proliferação celular, dependendo do tipo de célula, também variam com o GD (DASH *et al.*, 2011).

Os arcabouços de quitosana, quando aplicados, geralmente apresentam grande adsorção de água, que pode facilitar a retenção de fluidos corporais e nutrientes necessários ao crescimento do tecido. A presença do grupamento amino primário ($-NH_2$) e do grupo hidroxila ($-OH$) não só aumenta a afinidade do material com a água, como também forma ligações de hidrogênio (YANG *et al.*, 2010).

De acordo com os estudos de Hsieh *et al.* (2007), quando a concentração da solução de quitosana é menor que 1 %, a viscosidade da solução resultante é muito baixa para a formação de espumas porosas, enquanto a concentração da solução em valores acima de 3 %, resulta em redução da homogeneidade do sistema e viscosidade muito alta.

3.7.1.3 Reticulação da quitosana

A quitosana é um biopolímero que apresenta sítios reativos disponíveis para modificações químicas, o que a torna uma biomacromolécula de grande interesse para pesquisadores de diversos ramos da ciência. Na literatura são descritos

diversos métodos para obtenção de derivados estruturais da quitosana, que promovem a reticulação das cadeias poliméricas desse biopolímero, estratégia que confere às quitosanas modificadas propriedades diferenciadas, como por exemplo, maior resistência à dissolução em meio ácido, menor hidrofília, fabricação de estruturas poliméricas densas ou porosas e redução da reatividade química do material preparado (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MUZZARELLI, 2009; GONSALVES *et al.*, 2011).

Apesar da maioria das modificações químicas da quitosana ocorrer em seus grupos amino, as hidroxilas em C-3 e C-6 das unidades estruturais do biopolímero também são susceptíveis a reações. As modificações químicas nos grupos hidroxila ocorrem preferencialmente naqueles posicionados em C-6, uma vez que os localizados em C-3 são menos reativos e mais estericamente impedidos. Ao considerar apenas as unidades de glucosamina da quitosana, a ordem decrescente de reatividade química é $C-2 > C-6 > C-3$ referindo-se, respectivamente, aos carbonos onde estão ligados os grupos amino, hidroxila primário e secundário. Nesse último centro, há necessidade de um forte agente de desprotonação para torná-lo pré-disponível a reações subseqüentes (LIMA; RIBEIRO; AIROLDI, 2006; GONSALVES *et al.*, 2011).

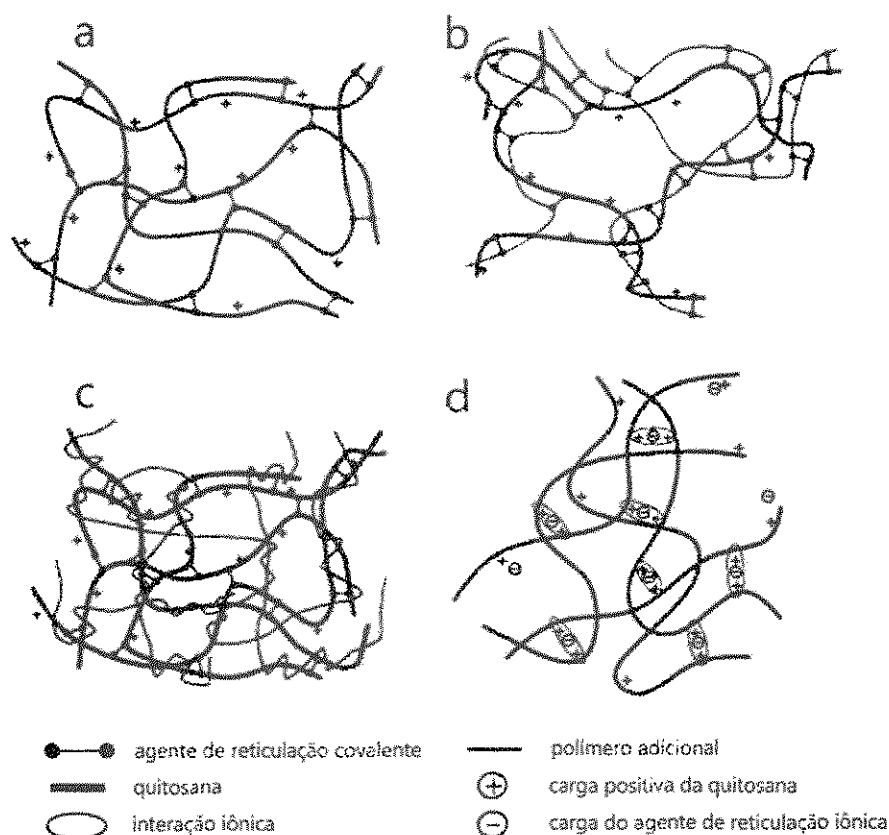
A reticulação das cadeias poliméricas da quitosana, também nomeado de reação de entrecruzamento (*crosslinking*), é um tipo de modificação química com objetivo de unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros. Essa modificação ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da quitosana e alguns agentes reticulantes. Dependendo da natureza do agente de reticulação as principais interações na formação da cadeia são covalentes ou iônicas (MAGALHÃES JÚNIOR, 2007; GONSALVES *et al.*, 2011).

As reações com formação de ligações covalentes são as mais empregadas para a quitosana. Essas reações ocorrem unindo de forma permanente sítios reativos das cadeias poliméricas em questão. As reticulações via interações físicas (iônicas) consistem em atrações eletrostáticas fortes que passam a ocorrer entre os grupos amino protonados ($-NH_3^+$) da quitosana, e os sítios aniônicos do agente de

reticulação empregado, ou no caso dos complexos polieletrônicos entre cadeias poliméricas de carga oposta. As pesquisas descrevem que a estrutura reticulada ionicamente é muito sensível a alterações de pH e às forças iônicas do meio, características vantajosas para aplicações específicas como a liberação controlada de fármacos (FIDÉLES, 2010; GONSALVES *et al.*, 2011; HOLANDA, 2011).

De acordo com Berger (2004), soluções de quitosana reticuladas covalentemente podem ser classificadas em três tipos, de acordo com o comportamento da estrutura: (I) quitosana reticulada com suas próprias cadeias; (II) redes poliméricas híbridas, nas quais a quitosana se liga às cadeias de outros polímeros; e (III) redes de polímeros semi ou totalmente interpenetrantes (IPN). A estrutura I é considerada a mais simples e foco deste trabalho (Figura 10).

Figura 10: Estrutura de soluções de quitosana formadas por (a) quitosana reticulada com suas próprias cadeias, (b) redes poliméricas híbridas, (c) redes de polímeros semi-interpenetrantes e (d) reticulação iônica da quitosana com suas próprias cadeias



Fonte: Adaptado de BERGER, 2004.

As reações de reticulação geralmente modificam propriedades do biopolímero, tais como: estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, capacidade de imobilização proteica e celular e outras (MAGALHÃES JÚNIOR, 2007; GONSALVES *et al.*, 2011).

O processo de reticulação é influenciado por características físico-químicas da quitosana utilizada e pelas condições adotadas para a reação. Sendo assim, o grau de desacetilação, massa relativa, temperatura e tempo reacional elevados, em geral, favorecem as reações e conseqüentemente causam o aumento do grau de reticulação. As reticulações também são influenciadas pelo tipo e pela concentração do agente de reticulação utilizado. Geralmente, com o aumento do grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (BERGER, 2004; MUZARELLI, 2009; BISPO, 2009).

A reticulação química da quitosana para aplicações farmacêuticas (sistemas de liberação controlada) ou biomédicas (engenharia de tecidos e culturas celulares) tem como limitação o uso de reticulantes químicos que são, em sua grande maioria, tóxicos. Até o momento, os agentes reticulantes mais utilizados com a quitosana, sintéticos, são dialdeídos como o glicoxal e, mais comumente, o glutaraldeído. No entanto, a literatura aponta que esse agente requer uma excessiva purificação durante a preparação para eliminar resíduos que não formaram ligações cruzadas, e que podem ter efeitos citotóxicos. Dessa forma, as pesquisas têm-se dirigido para a investigação de novas possibilidades quanto à reticulação da quitosana através de agentes de origem natural (BERGER, 2004; MAGALHÃES JÚNIOR, 2007; YUAN *et al.*, 2007; BISPO, 2009).

3.8 Agente reticulante natural: Genipina

Agentes reticulantes são moléculas de baixa massa molar com pelo menos dois grupos funcionais reativos que permitem a formação de pontes entre as cadeias poliméricas (BERGER, 2004). Essas moléculas podem ser de origem sintética ou

natural. Dentre as moléculas de origem natural, as pesquisas mais recentes apontam as proantocianidinas e a genipina por reagirem espontaneamente com proteínas e polissacarídeos (KIM; NIMNI; HAN, 2005; YOO *et al.*, 2011).

A genipina é um produto hidrolítico do geniposídeo que é encontrado no fruto da Gardênia, o jenipapo, obtido via hidrólise enzimática com β -glucosidase (Figura 11). Gardênia é um gênero de cerca de 250 espécies de plantas da família do café, Rubiaceae, nativa das regiões tropicais e subtropicais da África, sul da Ásia, Austrália e Oceania, bastante comum em grande parte do Brasil (RENHE, 2008; BISPO, 2009; MAGALHÃES JÚNIOR, 2007).

Figura 11: Gardênia: (a) Flor; (b,c) Fruto

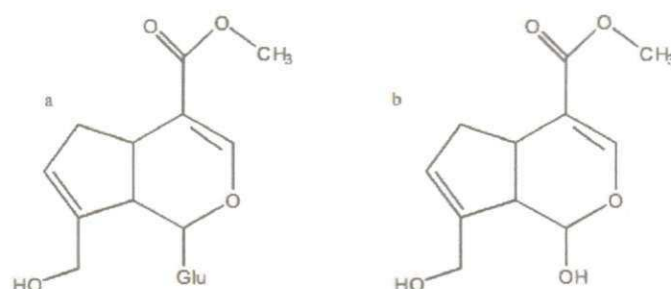


A fruta da *Gardenia jasminoides* Ellis foi utilizada na medicina chinesa para o tratamento de irritabilidade, doenças febris, icterícia, dor de cabeça, conjuntivites agudas, desordens hepáticas, hipertensão, úlceras da pele e outras enfermidades. Ações farmacológicas efetivas da genipina, como ações antioxidativas, antiinflamatória e atividades fibrolíticas também têm sido identificadas. É utilizada também como um corante azul, devido à sua afinidade a proteínas, por indústrias de alimentos (KOO *et al.*, 2004; RENHE, 2008; BISPO, 2009; YOO *et al.*, 2011).

A genipina tem a estrutura descrita na Figura 12, é um glicosilado iridóide e sua estrutura foi descoberta em 1960. Por se tratar de uma substância natural, reportada como uma molécula biodegradável com baixa citotoxicidade, a genipina

tem sido alvo de investigações como um agente reticulante a ser utilizado em aplicações biológicas com materiais com a gelatina, o colágeno e a quitosana. O Quadro 5 apresenta algumas aplicações da genipina como agente reticulante (SUNG *et al.*, 1999; BISPO, 2009; MUZARELLI, 2009).

Figura 12: Estrutura química do (a) geniposídeo e (b) genipina



Fonte: MAGALHÃES JÚNIOR, 2007.

Quadro 5: Algumas aplicações da genipina na área biomédica

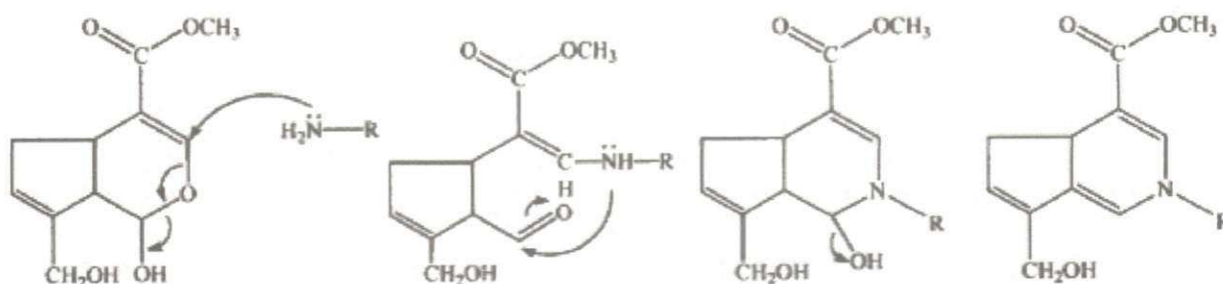
AGENTE RETICULANTE	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
GENIPINA	Microesferas de quitosana para liberação de proteínas	YUAN <i>et al.</i> , 2007
	Suportes biocompatíveis de quitosana-PVA	BISPO, 2009
	Stent polimérico de quitosana modificada com genipina	CHEN <i>et al.</i> , 2009
	Filmes de gelatina-quitosana modificados	YAJIMA; ZANIN; CAVALCANTI, 2010

Os mecanismos de reação entre a genipina e moléculas que contém aminas primárias não é completamente compreendido e tem sido investigado. Segundo pesquisas realizadas por Mi, Shyu, Peng (2005) e Muzzarelli (2009), o mecanismo de reticulação das cadeias poliméricas de quitosana pela genipina é influenciado pelo pH do meio. Assim, dois principais processos químicos de reticulação podem

acontecer, sendo um em meio ácido ou neutro e outro em meio alcalino. Este trabalho tem foco na reação entre a quitosana e a genipina em meio ácido.

Butler, Ng, Pudney (2003) descrevem a proposta do mecanismo reacional para a quitosana e a genipina em meio ácido. Essa proposta também foi reportada por Bispo (2009), Magalhães Júnior (2009), Muzzarelli (2009), Gonsalves *et al.* (2011) e outros. Sugere-se um ataque nucleofílico inicial de um grupo amino da quitosana ao carbono olefínico em C-3, com consequente abertura do anel dihidropirânico e geração da função aldeído na molécula. A aldoxila reage então com a amina secundária recém-formada para gerar o novo heterociclo (Figura 13).

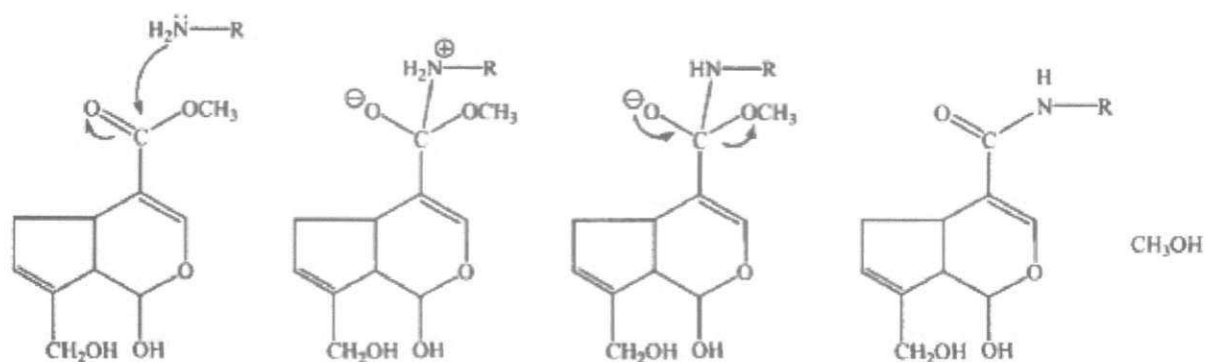
Figura 13: Ataque nucleofílico da quitosana ao carbono C-3 da genipina. R=Quitosana



Fonte: BUTLER *et al.*, 2003.

Na etapa final da reticulação ocorre uma substituição nucleofílica no éster da genipina por uma amina primária do biopolímero, com consequente formação de metanol (Figura 14).

Figura 14: Reação da genipina com quitosana para formar amida secundária. R=Quitosana



Fonte: BUTLER *et al.*, 2003.

Segundo Muzzarelli (2009) a genipina age como um dialdeído mas seus produtos de condensação são muito mais estáveis se comparados àqueles resultantes da reação com o glutaraldeído.

Em comparação ao glutaraldeído quanto à citotoxicidade induzida, de acordo com Sung *et al.* (1999), que investigaram o comportamento dos dois agentes de reticulação *in vitro* utilizando fibroblastos 3T3 através do ensaio MTT, a genipina apresentou citotoxicidade cerca de 10.000 vezes menor que a do glutaraldeído.

Além disso, diversos estudos têm sido realizados no Brasil no intuito de estabelecer parâmetros para obtenção da genipina no país, tendo em vista o alto custo do agente proveniente de fabricantes importados, e a disponibilidade do jenipapo no Brasil e, mais especificamente, na região Nordeste (MAGALHÃES JÚNIOR, 2007; RENHE, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

4.1.1 *Obtenção e caracterização físico-química e microestrutural*

Desenvolvido no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO, localizado no Bloco CJ3, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

4.1.2 *Caracterização biológica*

Realizada no Laboratório de Imunologia Clínica, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

4.2 Materiais

Todos os reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.).

Para preparação dos arcabouços tridimensionais foram empregados: Quitosana (Polymar S.A., Grau de Desacetilação (GD) = 86,5 %), Quitosana (Sigma-Aldrich, 448877, Peso Molecular (PM) = 190×10^3 g/mol – 310×10^3 g/mol., Grau de Desacetilação (GD) = 75 % - 85 %), Ácido acético glacial (Vetec) e Genipina (Sigma-Aldrich, 6902778, Massa Molecular (PM) = 226.23 g/mol, Pureza ≥ 98 % HPLC).

Para tratamento posterior dos arcabouços foram utilizados: Álcool Etílico Absoluto 99,5° GL (Nuclear), Álcool Etílico Hidratado 70° INPM (TUPI) e Hidróxido de Sódio (Vetec).

Para a caracterização biológica foram utilizados: Camudongos machos Swiss, procedentes do CEMIB (Centros Multidisciplinar para Investigação Biológica /

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas), Tioglicolato de sódio (Difco Lab. LTDA), MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, Across Organics), LPS (Lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, Sigma Aldrich), Isopropanol (Mallinckrodt), Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline System - PBS, Sigma-Aldrich).

Todos os procedimentos que utilizaram células vivas foram conduzidos conforme normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratórios) e que obtiveram parecer favorável do Comitê de Ética local (protocolo nº08/2009 CEP/FCF/CAR).

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Etapas de realização do trabalho

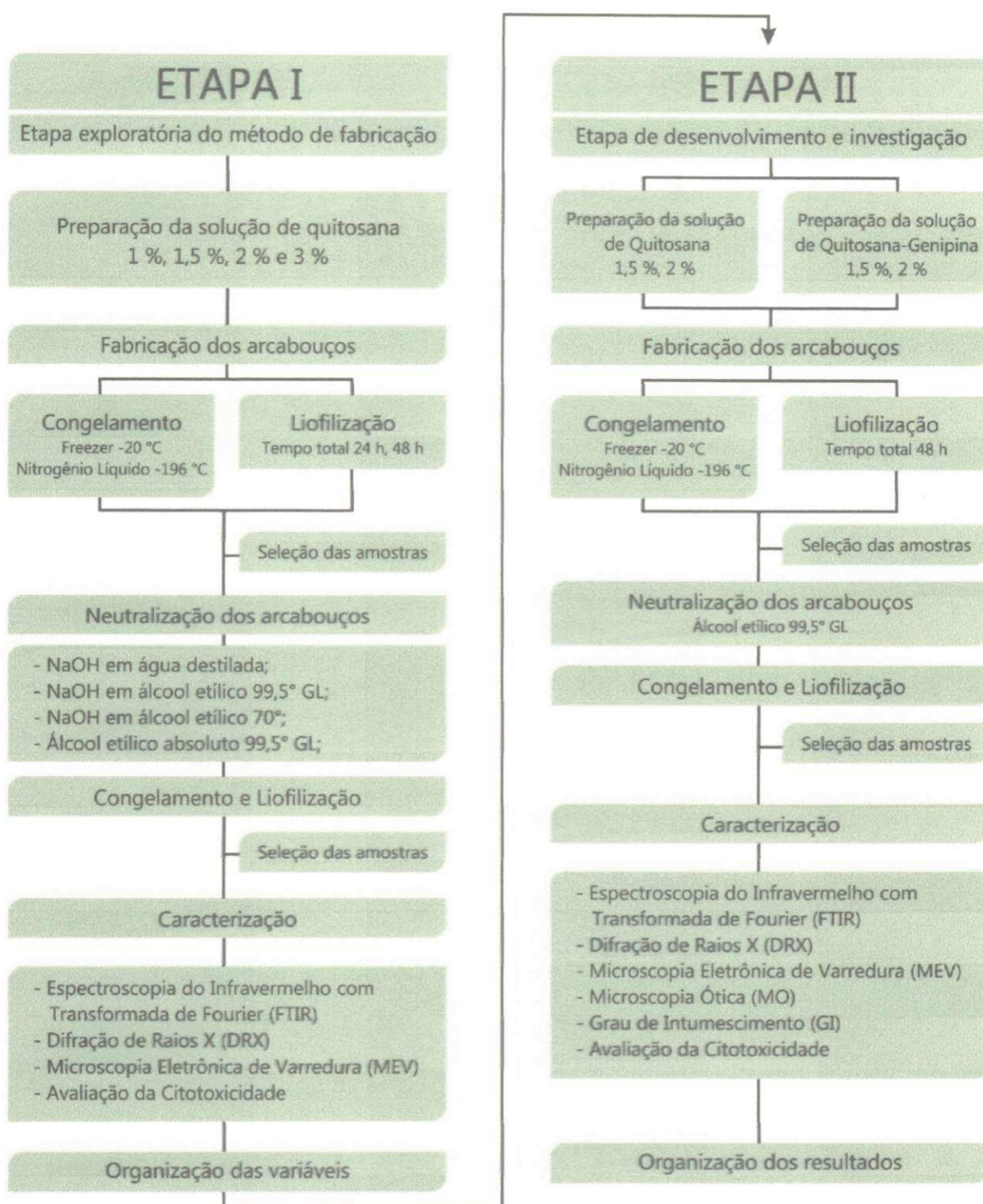
O trabalho foi realizado em duas etapas principais: I – Etapa exploratória do método de fabricação e II – Etapa de desenvolvimento e investigação dos arcabouços.

A **Etapa I** foi realizada com o propósito de explorar o funcionamento do liofilizador, e o comportamento do polímero com relação à variação da concentração de quitosana, à taxa de congelamento, à secagem e reidratação e ao ajuste de pH. Ao final dessa etapa foram definidos parâmetros experimentais favoráveis à otimização do processo, a serem aplicados na Etapa II.

A **Etapa II** consistiu no desenvolvimento dos arcabouços com e sem reticulação, utilizando a genipina como agente intermediário.

Os procedimentos experimentais realizados para cada etapa estão descritos na Figura 15.

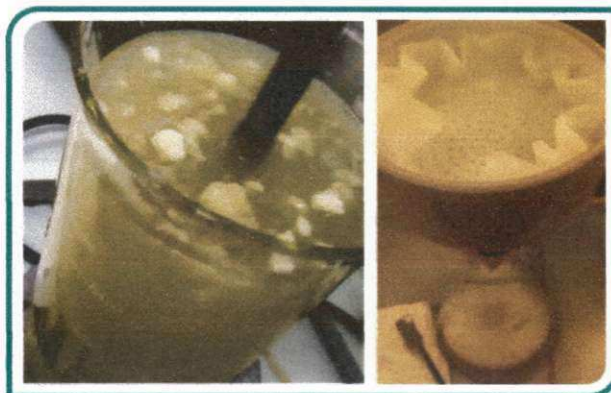
Figura 15: Fluxograma representativo da metodologia experimental



4.3.2 Preparação das Soluções de Quitosana e Quitosana-Genipina

Todas as soluções de quitosana foram preparadas através da dissolução do polímero em solução de ácido acético (1 %), sob agitação magnética à temperatura ambiente, por 24 horas. Após esse período, cada solução foi filtrada a vácuo, para remoção de resíduos, e armazenada por 15 dias à temperatura de 10 °C. As soluções foram preparadas de acordo com a metodologia padrão adotada pelo CERTBIO, descrita por Fidèles (2010). A Figura 16 ilustra as etapas de dissolução e filtragem da quitosana.

Figura 16: Etapas de dissolução e filtragem da quitosana



Etapa I – Foram preparadas soluções com concentrações de quitosana de 1 %, 1,5 %, 2 % e 3 %. Na Etapa I foi utilizada quitosana proveniente do fabricante Polymar S.A.

Etapa II – Foram preparadas soluções com concentrações de quitosana de 1,5 % e 2 %. Na Etapa II foi necessário utilizar quitosana do fabricante Sigma-Aldrich, pois a empregada na Etapa I não estava disponível. Nessa etapa foram também preparadas soluções de Quitosana-Genipina, o agente reticulante escolhido para estudo. A genipina em pó foi adicionada às soluções de quitosana, que permaneceram sob agitação magnética à temperatura ambiente, por 12 horas.

Essas soluções foram utilizadas imediatamente após a finalização do processo de reticulação.

A determinação da massa de genipina a ser adicionada foi o resultado da relação aproximada entre os valores dos pesos moleculares dos dois componentes. O procedimento de reticulação e a porcentagem do reticulante em relação à massa do polímero tiveram como base os trabalhos de Moura, Figueiredo e Gil (2007) e Bispo (2009), com adaptações.

O Quadro 6 apresenta a relação entre a concentração de quitosana e a massa de genipina adicionada para cada solução.

Quadro 6: Relação entre a concentração de quitosana e a massa de genipina

Quantidade da amostra (mL)	Quitosana		Genipina	
	Concentração (%)	Massa (g)	Concentração (%)	Massa (g)
20 mL	1,5 %	0,3 g	0,15 %	0,00045 g
20 mL	1,5 %	0,3 g	0,3 %	0,0009 g
20 mL	2 %	0,4 g	0,15 %	0,0006 g
20 mL	2 %	0,4 g	0,3 %	0,0012 g

4.3.3 Fabricação dos Arcabouços de Quitosana e Quitosana-Genipina

Os arcabouços de quitosana foram preparados utilizando o processo de separação de fase sólido-líquido, e subsequente sublimação do solvente, através do congelamento e liofilização das soluções preparadas. A solução de quitosana foi vertida em moldes apropriados e congelada para solidificar o solvente e induzir a separação das fases sólido-líquido.

O congelamento foi realizado em *freezer* e através de nitrogênio líquido. Os procedimentos realizados foram baseados principalmente na metodologia descrita por Griffon *et al.* (2006), Tiğh, Karakeçili e Gümüşderelioğlu (2007), e Nwe, Furuike e Tamura (2009), com adaptações.

Etapa I – Nessa etapa 8 mL e 15 mL das soluções de quitosana com concentração de 1 %, 1,5 % e 2 % foram vertidos em moldes tubulares de 17 mm e 30 mm de diâmetro, respectivamente. As soluções foram congeladas em nitrogênio líquido, ($\approx -196\text{ }^{\circ}\text{C}$, taxa de congelamento rápido), e imediatamente transferidas para os balões do liofilizador (LIOTOP K105). As amostras foram liofilizadas durante 24 e 48 horas (Figura 17).

Ainda nessa etapa, 20 mL das soluções de quitosana com concentração de 1,5 %, 2 % e 3 % foram vertidas em placas de Petri de poliestireno ($\varnothing = 60\text{ mm}$, altura = 15 mm), e mantidos em um *freezer* à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com variação de taxa de congelamento entre muito lenta e lenta (conforme escala estabelecida por Pitombo em 2009, descrita no tópico 2.3 deste trabalho). Finalizado o congelamento, as amostras foram transferidas para as bandejas do liofilizador (LIOBRAS – L120). As amostras foram liofilizadas durante 48 horas.

O Quadro 7 apresenta a identificação adotada para as amostras.

Quadro 7: Identificação das amostras fabricadas na ETAPA I

Concentração da Quitosana (QT)	Fabricante	Congelamento	Identificação
1,5 %, 2 %, 3 %	Polymar (P)	Freezer (FREE) Muito lento	QTP1,5-FREE QTP2-FREE QTP3-FREE
		Freezer (FREE) Lento (L)	QTP1,5-FREEL QTP2-FREEL
1 %, 1,5 %, 2 %	Polymar (P)	Nitrogênio Líquido (NITRO)	QTP1-NITRO QTP1,5-NITRO QTP2-NITRO

Figura 17: Liofilizador e moldes utilizados para as amostras congeladas por nitrogênio líquido na Etapa I



Etapa II – Nessa etapa, conforme parâmetros estabelecidos ao final da Etapa I, 20 mL das soluções de quitosana e quitosana-genipina foram vertidas em placas de Petri de poliestireno ($\varnothing = 60$ mm, altura = 15 mm). As placas foram congeladas à temperatura de -20 °C em um *freezer*, com variação de taxa de congelamento entre muito lenta e lenta, e de aproximadamente -196 °C em nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram transferidas para o liofilizador (CETEC USV01) e liofilizadas durante 48 horas.

Os Quadros 8 e 9 apresentam a identificação adotada para as amostras sem reticulação e reticuladas, respectivamente. A Figura 18 ilustra o procedimento de fabricação realizado nessa etapa.

Quadro 8: Identificação das amostras sem reticulação fabricadas na Etapa II

Concentração da Quitosana (QT)	Fabricante	Congelamento	Identificação
1,5 %, 2 %	Sigma-Aldrich (S)	Freezer (FREE) Muito lento	QTS1,5-FREE QTS2-FREE
		Freezer (FREE) Lento	QTS1,5-FREEL QTS2-FREEL
		Nitrogênio Líquido (NITRO)	QTS1,5-NITRO QTS2-NITRO

Quadro 9: Identificação das amostras reticuladas fabricadas na Etapa II

Concentração da Quitosana (QT)	Fabricante	Congelamento	Concentração do Genipina (GE)	Identificação
1,5 %, 2 %	Sigma-Aldrich (S)	Freezer (FREE) Muito lento	0,15 %, 0,3 %	QTS1,5-GE15-FREE QTS1,5-GE3-FREE QTS2-GE15-FREE QTS2-GE3-FREE
		Nitrogênio Líquido (NITRO)	0,15 %	QTS1,5-GE15-NITRO QTS2-GE15-NITRO

Figura 18: Liofilizador e moldes utilizados para as amostras da Etapa II



4.3.4 Ajuste e controle de pH dos arcabouços

No intuito de adequar o valor do pH dos arcabouços obtidos àqueles recomendados para avaliação do comportamento do material *in vitro*, foram investigados métodos de ajuste que pudessem, além de elevar o pH de ácido para neutro (processo de neutralização), manter a estrutura porosa original do arcabouço obtido. O controle dos valores de pH das soluções quitosana e quitosana-genipina foram medidos através de pHmetro (Hanna Instruments), e dos arcabouços durante o ajuste de pH por indicador universal de pH.

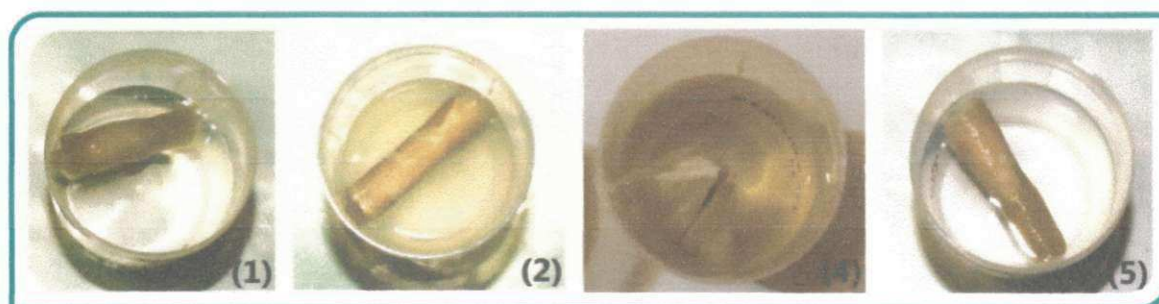
Etapa I – Nessa etapa foi investigado o comportamento dos arcabouços após a imersão em soluções aquosas e alcoólicas, durante tempo determinado, em cinco

condições distintas de ajuste de pH. Os arcabouços foram posteriormente imersos em álcool etílico 70°, congelados novamente através do nitrogênio líquido, recolocados em seus moldes iniciais e liofilizados por 48 horas. O Quadro 10 apresenta as cinco condições de ajuste experimentadas e a Figura 19 ilustra os arcabouço imersos nas referidas soluções.

Quadro 10: Descrição das condições de ajuste de pH experimentadas

	SOLUÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO	TRATAMENTO POSTERIOR
1	1M NaOH em água destilada	3 horas	————
2	1M NaOH em álcool etílico 99,5° GL	3 horas	————
3	1M NaOH em álcool etílico 99,5° GL	3 horas	Lavagem com água destilada
4	1M NaOH em álcool etílico 70°	3 horas	Lavagem com água destilada
5	Álcool etílico 99,5° GL	1 hora	————

Figura 19: Condições de ajuste de pH experimentadas após 1 hora de imersão. (1) Solução 1M NaOH; (2) Solução 1M NaOH/Álcool etílico 99,5°GL; (3) 1M NaOH/Álcool etílico 70°; (4) Álcool etílico 99,5°C



Etapa II – Nessa etapa, os arcabouços produzidos foram neutralizados conforme parâmetros estabelecidos na Etapa I, através da imersão em Álcool etílico 99,5° GL pelo período de 1 hora. Os arcabouços foram congelados novamente por nitrogênio líquido e liofilizados durante 48 horas.

4.4 Caracterização dos arcabouços

As caracterizações físico-química e microestrutural dos arcabouços foram realizadas através das análises por Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO) e Ensaio de Grau de Intumescimento (GI).

A caracterização biológica do material foi efetuada através da Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e Determinação da Produção de Óxido Nítrico.

As análises que foram aplicadas às Etapas I e II do trabalho estão relacionadas na Figura 15.

4.4.1 Caracterização Físico-química e Microestrutural

4.4.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, dessa forma, tem extensa aplicação na identificação dos compostos (FOOK, 2005; AIMOLI, 2007).

A análise vibracional de polímeros fornece informações sobre três importantes características estruturais: a composição química, a estrutura configuracional e conformacional e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares (AIMOLI, 2007).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro (Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer), na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras.

4.4.1.2 *Difração de Raios X (DRX)*

A Difração de Raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Este método pode identificar as fases cristalinas de um composto, e fornecer informações sobre a natureza e os parâmetros do reticulado, assim como detalhes a respeito do tamanho, da perfeição e da orientação dos cristais (PADILHA; AMBROZIO FILHO, 2004; AIMOLI, 2007; HOLANDA, 2011).

Os dados de Difração de Raios X foram obtidos utilizando um difratômetro (XRD-7000 Shimadzu), nas seguintes condições: 40 kV e 30 mA com radiação de $\text{K}\alpha\text{Cu}$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e examinadas a um intervalo de 2θ , a uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$. A varredura foi realizada na região de 2° a 50° para os arcabouços de quitosana, e na região de 2° a 70° para os arcabouços quitosana-genipina. A identificação das fases presentes foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas padrões da base de dados mantida pelo JCPDS.

4.4.1.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, basicamente não transparentes ao feixe de elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, resultando em imagens com aparência tridimensional (AIMOLI, 2007; PADILHA e AMBROZIO FILHO, 2004).

A morfologia, tamanho e a distribuição de tamanho dos poros dos arcabouços foram caracterizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (HITACHI; TM 1000).

Além disso, o diâmetro médio de poro foi determinado seguindo o método descrito por Yin *et al.* (2003): mediram-se a largura e o comprimento dos poros a partir das micrografias de MEV dos arcabouços, sendo o diâmetro médio de poro determinado através da expressão $d = \sqrt{l \cdot h}$, onde l e h são o comprimento e a largura média dos poros, respectivamente. Realizaram-se medições em 15 poros por amostra.

4.4.1.4 Microscopia Ótica (MO)

Os variados constituintes que podem estar presentes num material polimérico interagem com a luz de uma forma própria. A velocidade de propagação da luz é máxima no vácuo ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$) e, nos materiais, varia de acordo com a estrutura química e com a densidade. Os polímeros não absorvem significativamente a luz, e em consequência disso são transparentes.

As análises dos arcabouços foram realizadas através de um microscópio ótico (Advanced 3D Digital, Hirox - KH 7700), que possui profundidade de campo estendida, com medição 2D e 3D. Esse tipo de microscópio, além de ampliar as estruturas, pode fazê-lo capturando imagens tridimensionais da estrutura interna do material.

4.4.1.5 Grau de Intumescimento (GI)

O ensaio de avaliação do Grau de Intumescimento, também denominado Ensaio de Absorção, é aplicado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em soluções aquosas de concentração iônica similar à do plasma sanguíneo.

O grau de intumescimento foi obtido através da reidratação das amostras, obtidas de secções dos arcabouços, em solução de PBS (pH 7.4). As amostras foram utilizadas em quadruplicata, e a pesagem realizada após neutralização e liofilização. Após a pesagem as amostras foram colocadas em recipientes com PBS e mantidas à temperatura de 37 °C durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas dos recipientes e pesadas. No intuito de eliminar o excesso de PBS, as amostras foram colocadas rapidamente sobre papel filtro e pesadas em balança analítica. A metodologia utilizada para avaliação do GI é descrita por Bispo, 2009 e Tiğh, Karakeçili, Gümüşderelioğlu, 2007.

O GI foi obtido conforme a Equação 2:

$$GI = \left(\frac{M_i - M_s}{M_s} \right) \times 100 \% \quad (2)$$

sendo M_i a massa intumescida e M_s a massa da amostra seca.

4.4.2 Caracterização Biológica

Com o intuito de avaliar a viabilidade de aplicação de arcabouços de quitosana e quitosana-genipina para a produção de dispositivos médicos, foram realizados testes de citotoxicidade, seguindo a norma ISO 10993-5: "Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods". Foram realizadas a Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e a Determinação da Produção de Óxido Nítrico.

Todas as amostras foram cortadas e adaptadas ao tamanho do poço da placa de cultura ($\approx \varnothing 6,5\text{mm}$). Devido à alta capacidade de absorção do material, as amostras foram cortadas em secções medindo 1 mm^3 . As secções foram esterilizadas por Método de exposição aos Raios Ultravioleta por 40 minutos.

Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 μ L de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. As placas foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após essa incubação, foram descartados o sobrenadante e as amostras utilizadas, e adicionado 100 μ L de álcool isopropílico.

De acordo com Denizot, Lang (1986) e Santos *et al.* (2007), as células absorvem o sal MTT, o qual é reduzido a cristais de formazan no interior da mitocôndria, através de ação enzimática. A concentração de formazan produzida é avaliada através da absorbância e apenas as células viáveis são capazes de metabolizar o MTT.

A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech.*) a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade.

4.4.2.2 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é encontrado desempenhando uma função de sinalizador molecular em muitas partes do organismo, bem como sendo uma importante molécula citotóxica de resposta imune inata. Sua ação inclui a função hemostática, incluindo vasodilatação, neurotransmissão, inibição da adesão e da agregação plaquetária (que representam a defesa do organismo contra agentes infecciosos tais como bactérias, fungos e parasitas), agindo também como destruidor de células tumorais. Muitas células imunes são capazes de produzir NO, inclusive os macrófagos (WEINBERG *et al.*, 1995; KRÖNCKEO, FEHSEL, KOL-BACHOFEN, 1997; LIMA, 2010)

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess. Para isso, 50 μ L do meio de cultura resultante da incubação da Placa 01 foram adicionados a uma nova placa (Placa 02). A Placa 02 foi incubada durante 10 minutos, ao abrigo da luz e, logo após, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em

Espectofotômetro (Leitor ELISA Labsystem). As concentrações de óxido nítrico liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em μmols de nitrito.

A análise estatística foi realizada por meio do Programa *GraphPad InStat* 3.00.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em duas partes, conforme as etapas de trabalho descritas no tópico 3.

5.1 ETAPA I – Etapa Exploratória do método de fabricação

5.1.1 Fabricação dos arcabouços porosos de quitosana

Para essa fase do trabalho foram selecionados: percentuais de concentração de quitosana de 1 %, 1,5 %, 2 e 3 %; temperaturas de congelamento de -20°C e -196°C , representando taxas de congelamento muito lenta, lenta e rápida. A Figura 20 ilustra os resultados obtidos para as amostras congeladas à -196°C , selecionados após avaliação macroscópica dos arcabouços.

Figura 20: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana 1 %, 1,5 % e 2 %, através do congelamento com nitrogênio líquido em moldes tubulares

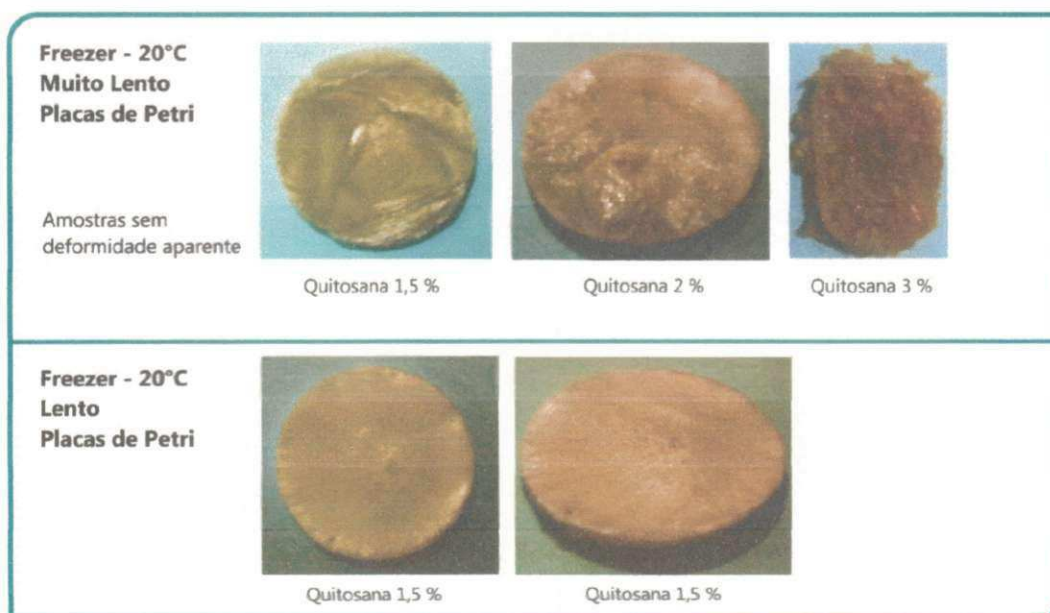


Os arcabouços apresentaram coloração amarelada um pouco mais clara que à da quitosana em pó, superfície uniforme, caráter esponjoso e bastante aderente. Amostras foram seccionadas no intuito de observar o interior do material. Arcabouços com concentração de 1 % demonstraram uma fragilidade acentuada em sua estrutura, de maneira que o corte causou, mesmo com lâminas apropriadas, grandes deformações. Logo, esses arcabouços foram descartados das análises posteriores.

Entre as amostras que foram imersas em soluções aquosas e alcoólicas para o ajuste de pH, algumas apresentaram alterações acentuadas com relação à estrutura original, a exemplo daquelas imersas em solução NaOH. Com relação às soluções NaOH/Etanol 99,5°GL e NaOH/Etanol 70°, puderam ser observadas alterações em menor proporção, porém, após 30 dias, todas as amostras imersas em soluções com NaOH apresentaram em sua superfície e interiormente, a formação crescente de uma camada de pó que, em alguns casos, tornou o material quebradiço. As amostras imersas em Etanol 99,5°GL não exibiram alterações significativas, e todas as amostras neutralizadas perderam característica aderente.

Os principais resultados para as amostras obtidas através do congelamento em *freezer* à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de congelamento muito lento (abaixo de $0,01\text{ }^{\circ}\text{C/s}$) estão ilustrados na Figura 21.

Figura 21: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana 1,5 %, 2 % e 3 %, através do congelamento em *freezer* à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (taxa muito lenta, abaixo de $0,01\text{ }^{\circ}\text{C/s}$) em placas de Petri ($\varnothing = 60\text{ mm}$, altura = 15 mm)



Os arcabouços apresentaram coloração amarelada mais escura que a dos arcabouços congelados em nitrogênio líquido, que escureceu com o aumento da concentração de quitosana da solução preparada, caráter esponjoso e aderente.

As amostras congeladas através de taxa muito lenta exibiram, em geral, uma estrutura formada por folhas distribuídas multidirecionalmente, formando largos espaços vazios. Os arcabouços congelados em taxa lenta apresentaram superfície uniforme, assemelhando-se aos arcabouços congelados em nitrogênio líquido.

Quanto ao tempo de liofilização, observou-se que algumas amostras liofilizadas durante 24 horas apresentaram umidade remanescente. As amostras liofilizadas durante 48 horas secaram completamente, com maior remoção do ácido acético do arcabouço, percebida através do odor exalado.

Durante os procedimentos realizados várias amostras foram descartadas devido à rachaduras, formação de películas de quitosana, ressecamento excessivo, presença de áreas nas quais o congelamento não ocorreu completamente, entre outras deformidades. As amostras selecionadas foram encaminhadas para a caracterização.

5.1.2 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

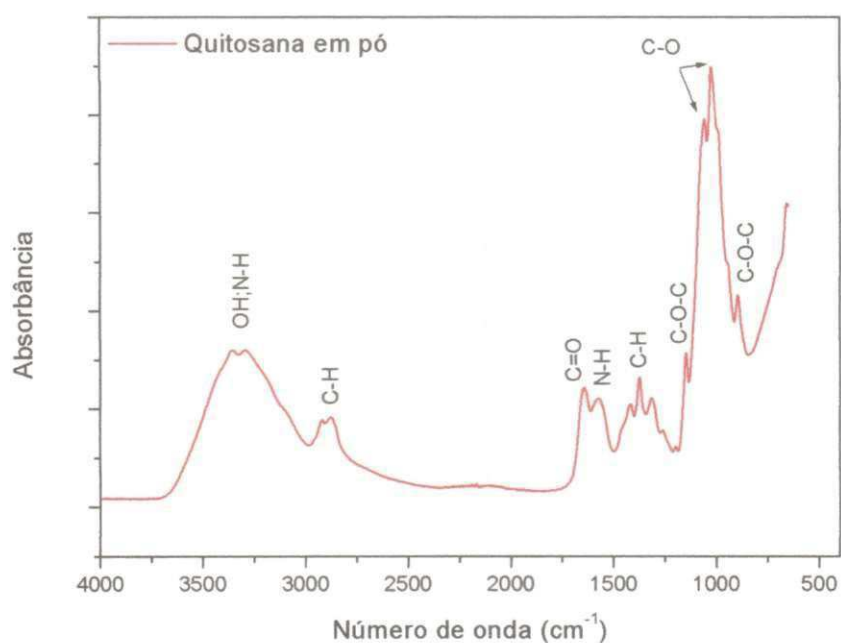
Através da análise por Espectroscopia do Infravermelho puderam ser observadas as bandas de absorção presentes no material utilizado para fabricação e nos arcabouços fabricados. Para essa etapa, os espectros de infravermelho foram obtidos a partir de secções das amostras QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO E QTP2-NITRO, antes da neutralização, e a partir do pó da quitosana (fabricante Polymar S.A.) utilizada para o preparo das soluções.

O Quadro 11 apresenta as vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de infravermelho da quitosana em pó, conforme ilustra a Figura 22.

Quadro 11: Vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de IV da quitosana em pó

Atribuições	Frequências vibracionais (cm^{-1})
OH, N-H	3295
CH_2	2920
CH_3	2875
C=O (Amida I)	1644
$\delta\text{N-H} + \nu\text{C-N}$ (Amida II)	1566
CH_2	1413
CH	1376
$\nu(\text{C-O-C})$	1146
$\nu(\text{C-O})$	1057
$\nu(\text{C-O})$	1026
$\nu(\text{C-O-C})$	890

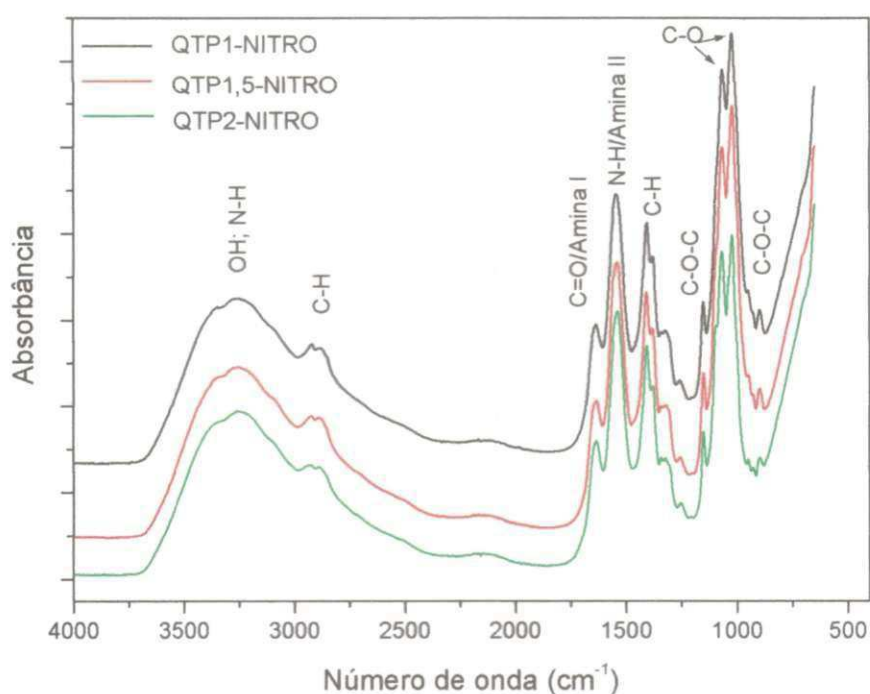
Figura 22: Espectro vibracional de IV da quitosana em pó (fabricante Polymar S.A.)



O espectro de infravermelho da quitosana em pó apresentou as seguintes bandas características: estiramento axial de -OH entre 2980 e 3700 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C = O de amida por volta de 1634 cm^{-1} ; deformação angular de N-H em aproximadamente 1543 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de amida por volta de 1421 cm^{-1} ; deformação angular simétrica de CH_3 em 1380 cm^{-1} ; bandas de estruturas polissacarídicas na região em 895 e 1153 cm^{-1} . O espectro obtido está de acordo com os espectros característicos da quitosana descritos por Aimoli (2007), Antonino (2007), Fidèles (2010) e Lima (2010).

A Figura 23 ilustra os espectros de IV dos arcabouços de quitosana em variadas concentrações, antes da neutralização, congelados por nitrogênio líquido.

Figura 23: Espectro vibracional de IV dos arcabouços de quitosana QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO, QTP2-NITRO



Os espectros obtidos para os arcabouços apresentam todas as bandas características da quitosana, conforme indicado no espectro de IV da quitosana em pó, independentemente das concentrações estudadas.

As amostras foram caracterizadas antes da etapa de neutralização, o que pode ser verificado pelo efeito da presença do ácido, confirmando a necessidade de neutralização. Este efeito pode ser verificado no incremento da absorção do grupo amida II (N-H, 1543 cm^{-1}), que passa a ser amida III, devido à protonação do grupo ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$). Por não existir desdobramento do pico referido, podemos concluir que as cadeias de quitosana se encontram totalmente protonadas.

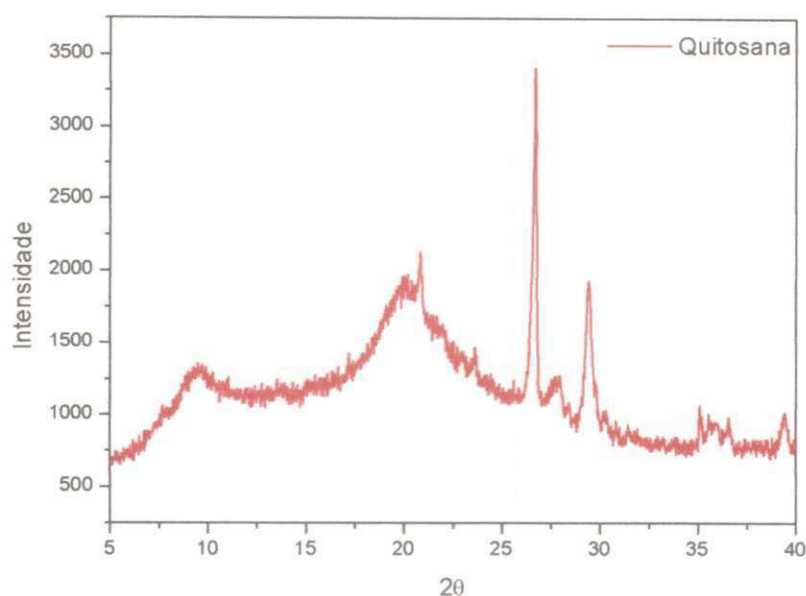
Verifica-se ainda, um incremento tanto da absorção do grupo (C-H, 1380 cm^{-1}) e do grupo (C-O, 1065 cm^{-1} , 1022 cm^{-1}) devido à presença do grupo acetato no interior do arcabouço. A banda de absorção do grupo hidroxila (OH, 3260 cm^{-1}) é também superior, possivelmente devido à presença de alguma umidade residual no interior do arcabouço. Finalmente, não se verificam diferenças entre concentrações de quitosana, concluindo-se que a liofilização não introduz alterações estruturais nas macromoléculas de quitosana.

5.1.3 Difração de Raios X (DRX)

A Difração de Raios X foi aplicada com a finalidade de observar a influência da concentração e do processamento do polímero na cristalinidade do material. Para essa etapa, os espectros de IV foram obtidos a partir de secções das amostras QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO E QTP2-NITRO, antes da neutralização, e a partir do pó da quitosana (fabricante Polymar S.A.) utilizada para o preparo das soluções.

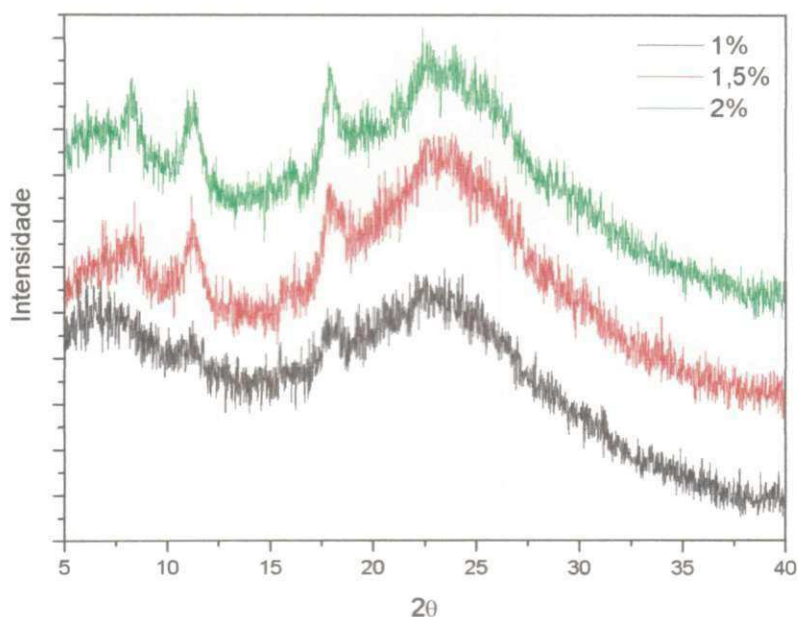
O pó de quitosana utilizado apresenta uma estrutura típica de um polímero semicristalino com dois picos de reflexão em 2θ a 10° e a 20° (Figura 24), características dos difratogramas de quitosana apresentados por autores como Signini e Campana Filho (2001), Aimoli (2007) e Lima (2010). Os picos de reflexão em 2θ a $26,52^\circ$ e a 29° consistem em interferências do porta-amostras.

Figura 24: DRX da quitosana em pó (fabricante Polymar S.A.)



A Figura 25 apresenta os difratogramas de DRX dos arcabouços liofilizados obtidos com variadas concentrações da solução de quitosana. Observa-se que quanto maior a concentração da solução de quitosana mais acentuadas as reflexões em 2θ a $8,4^\circ$, $11,18^\circ$, $17,82^\circ$ e $22,94^\circ$, indicando uma estrutura melhor organizada/ordenada em longas distâncias.

Figura 25: DRX dos arcabouços de quitosana QTP1-NITRO, QTP1,5-NITRO, QTP2-NITRO



5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma alta porosidade e interconectividade entre os poros são essenciais para permitir tanto a difusão de nutrientes e o transporte de oxigênio através do arcabouço, quanto a remoção de produtos metabólicos gerados durante o crescimento celular (LI *et al.*, 2010).

Para investigar o comportamento da microestrutura dos arcabouços com relação às diferentes taxas de congelamento da solução de quitosana, às concentrações de quitosana das soluções e às condições de ajuste de pH dos arcabouços, foram realizadas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Foram analisadas amostras obtidas a partir de secções longitudinais e transversais dos arcabouços QTP1, QTP1,5, QTP2 e QTP3, congelados à -20 °C e -196 °C, antes e após o ajuste de pH, nas condições experimentadas.

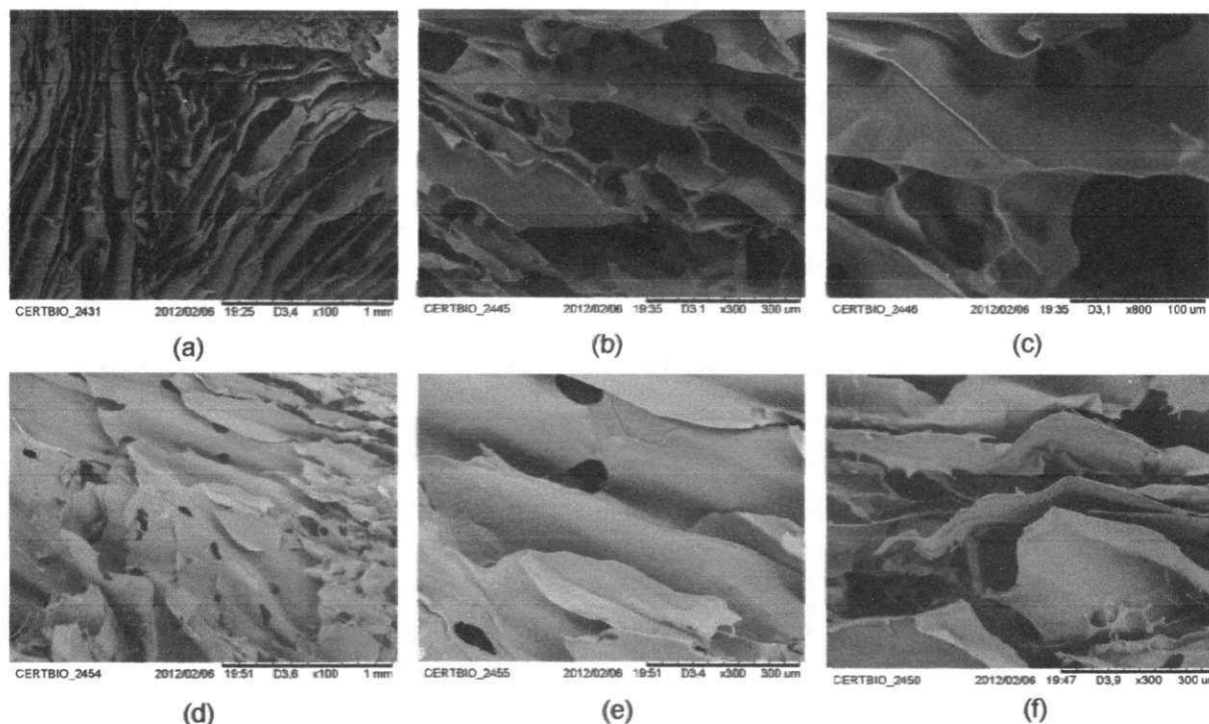
Efeito da taxa de congelamento

Arcabouços submetidos a estágios de congelamento muito lento, lento (-20°C) e rápido (-196 °C) foram analisados, demonstrando a influência da taxa de congelamento na morfologia final dos arcabouços. Foram comparados os resultados obtidos para os arcabouços com concentração de quitosana de 2 %.

Taxa de congelamento abaixo de 0,01 °C/s (Muito lenta)

A Figura 26 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com concentração de quitosana 2%, submetidos a estágio de congelamento muito lento (-20°C, taxa abaixo de 0,01 °C/s).

Figura 26: Micrografias (MEV) da secção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-300x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento muito lento (-20°C , taxa abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$)



Através da imagem 26(a) referente à secção longitudinal do arcabouço, pode-se observar a formação de placas multidirecionais ordenadas que se organizam, entre si, em forma de canais e poros. Esse alinhamento pode ser entendido como consequência do estágio de congelamento, tendo em vista que taxas muito lentas permitem a formação cristais de gelo maiores, que crescem simultaneamente em todas as regiões da solução. Em maiores magnificações dessa secção, imagens 26(b e c), observa-se a estrutura interna dos canais. A superfície das placas originadas apresenta poros de variados tamanhos e que permitem a interconexão da estrutura.

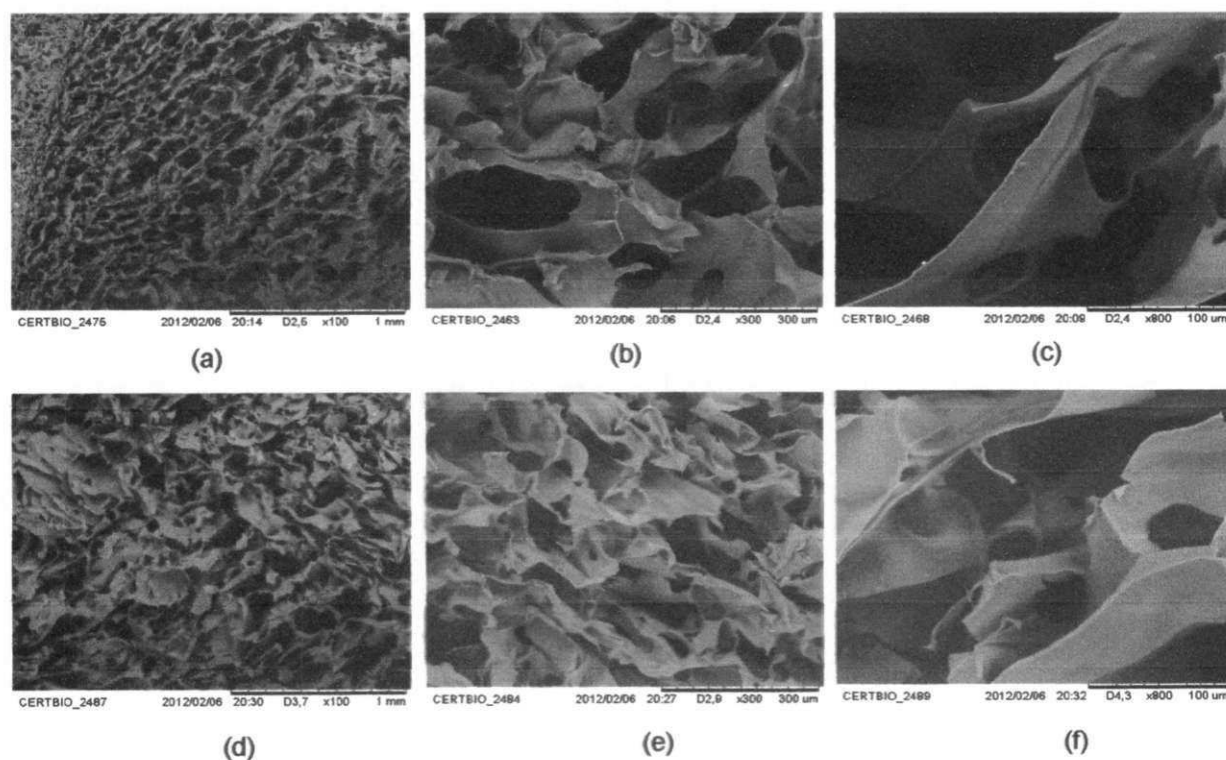
As imagens 26(d,e), referentes à secção transversal da mesma amostra, ilustram a superfície das placas formadas. Percebe-se a sobreposição de placas de superfície ondulada, cuja largura da ondulação formada consiste na largura dos canais encontrados na estrutura interna. Além disso, observa-se que a formação porosa nessas placas é bem menor se comparada com a imagem 26(b), indicando

que o arcabouço apresenta formações porosas diferenciadas ao longo da estrutura. A imagem 26(f) também indica a presença de canais sem poros aparentes.

Taxa de congelamento de 0,01 °C/s a 0,06 °C/s (Lenta)

A Figura 27 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com concentração de quitosana 2%, submetidos a estágio de congelamento lento (-20°C, taxa de 0,01 °C/s a 0,06 °C/s).

Figura 27: Micrografias (MEV) da seção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-800x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento lento (-20°C, taxa de 0,01 °C/s a 0,06 °C/s)



Através da imagem 27(a), observa-se a formação porosa do arcabouço desde a extremidade (esquerda) até o centro da amostra (direita). Esse arcabouço apresenta uma formação porosa extratiforme, uma vez que os cristais de gelo

crecem e solidificam na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro da solução.

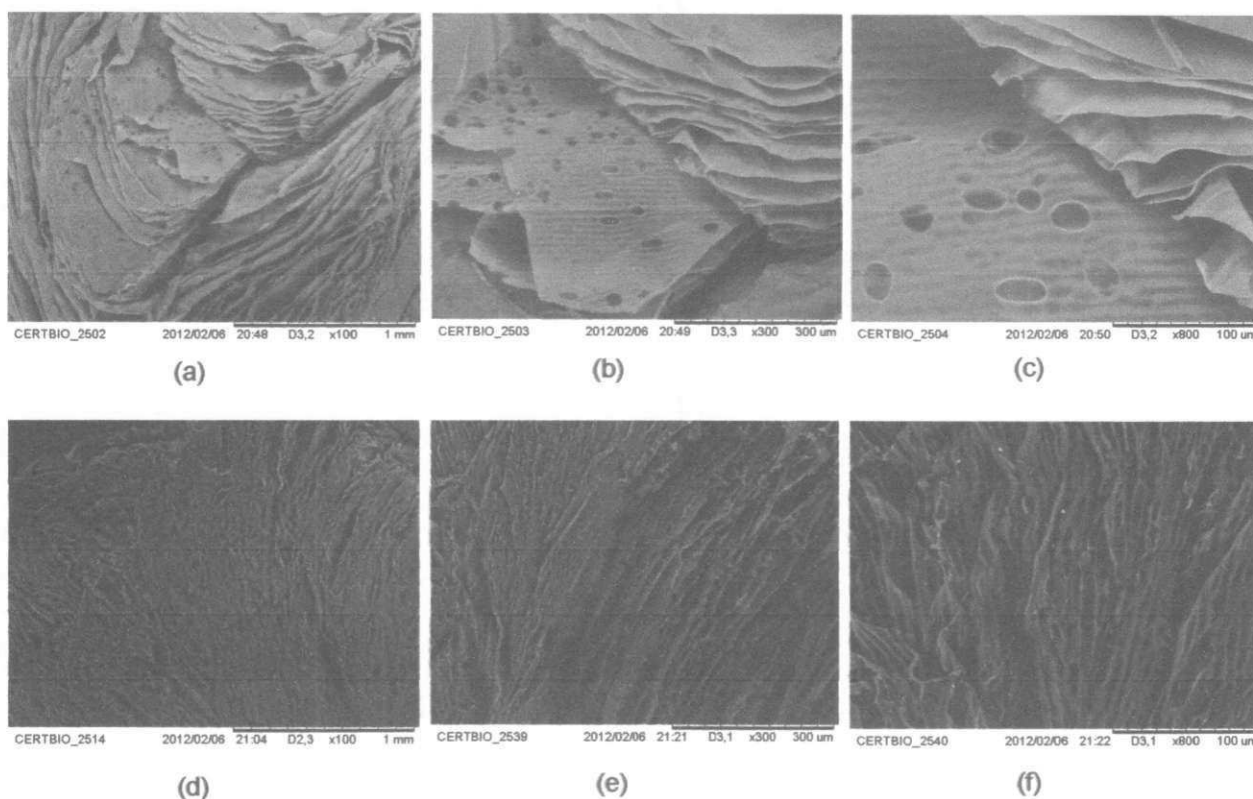
O aumento da magnificação da secção, imagens 27 (b,c), ilustram a formação interna da estrutura nas quais não se observam canais porosos como na Figura 26, mas sim poros com maior interconexão. Além disso, a quantidade de poros é maior, o formato dos poros é poligonal e mais uniforme, independentemente do seu tamanho e há formação poros com contornos mais esféricos.

Essa arquitetura pode ser percebida como resultado do aumento da taxa de congelamento, que proporciona um menor tempo para a formação de cristais de gelo, que apresentam tamanhos menores em toda a solução congelada. A taxa de congelamento mais rápida (de muito lenta para lenta) não permite a formação de placas densas e canais alongados. Essa estruturação pode ser confirmada através das imagens referentes à secção transversal (27(d,e,f)), que também indicam a formação de canais poligonais.

Taxa de congelamento de 0,06 °C/s a 50 °C/s (Rápida)

As micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com concentração de quitosana 2%, submetidos a estágio de congelamento rápido (-196 °C, taxa de 0,06 °C/s a 50 °C/s) são apresentadas na Figura 28.

Figura 28: Micrografias (MEV) da seção longitudinal (a-100x, b-300x, c-800x) e transversal (d-100x, e-300x, f-800x) do arcabouço de quitosana 2% liofilizado submetido a um estágio de congelamento rápido (-196°C , taxa de $0,06^{\circ}\text{C/s}$ a 50°C/s)



Através da imagem 28(a,b) pode-se observar a formação de lâminas ordenadas e multidirecionais, semelhantes às percebidas na estrutura dos arcabouços congelados em taxa muito lenta, Figura 26. Com o aumento da magnificação da secção do arcabouço, imagem 28 (c), pode-se observar que a principal diferença entre essas estruturas está no espaçamento entre as placas/lâminas formadas e espessura das lâminas. Além disso, nessa imagem também pode-se perceber que as lâminas apresentam poros em suas superfícies, tornando-as interconectadas, e ondulações inicialmente percebidas como “listras” nas imagens.

As imagens referentes à secção transversal do arcabouço, imagens 28 (d,e,f), indicam uma estrutura mais densa, devido ao espaçamento mínimo entre as lâminas construídas durante o congelamento. Com o aumento da imagem (28(f)), as “listras”

presentes nas amostras podem ser percebidas com mais clareza, e indicam a formação de ondulação de tamanho bastante reduzido, formando canais regulares.

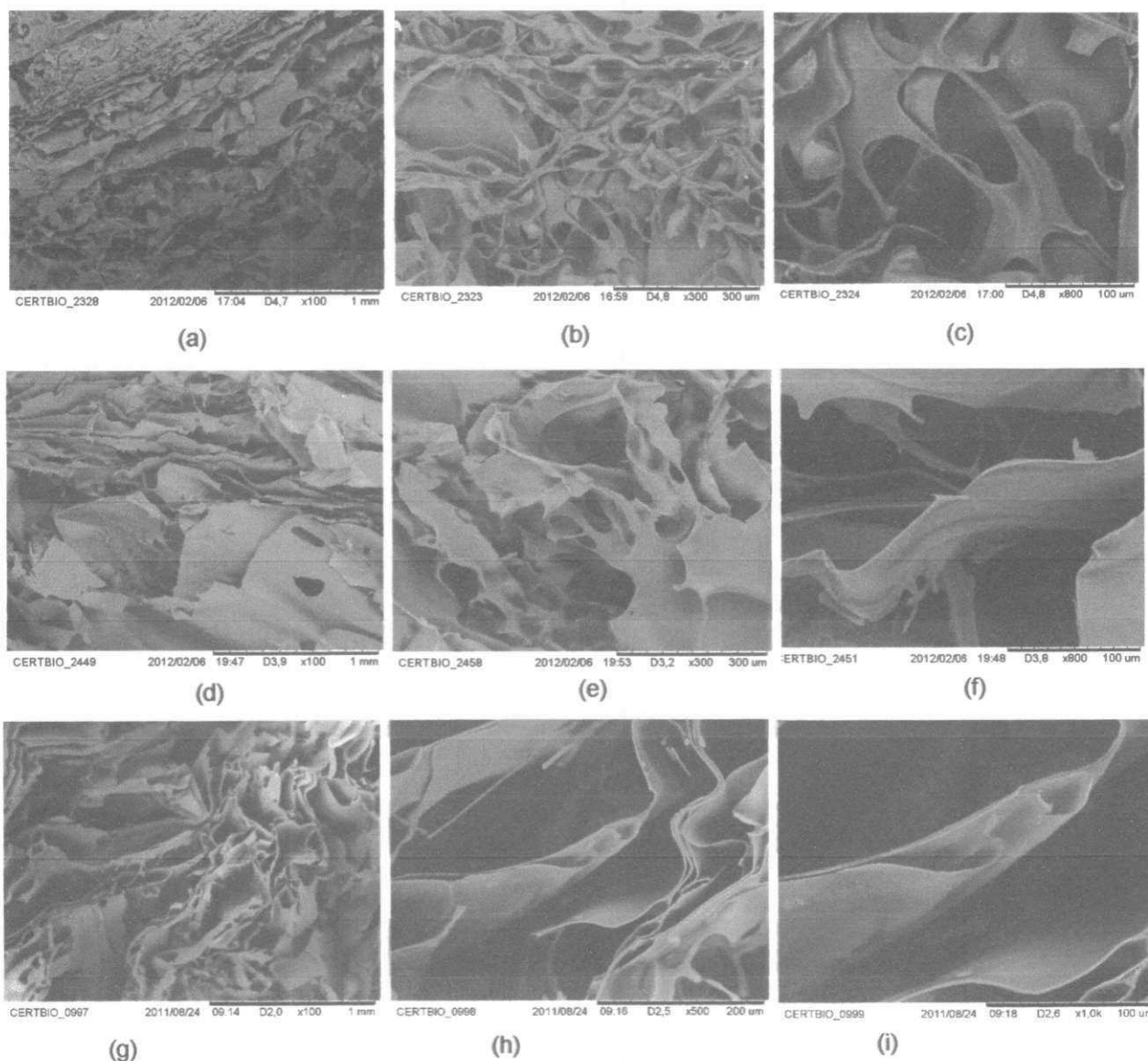
A formação desse tipo de construção indica que o congelamento ocorre em várias direções, de acordo com o contato da superfície do molde/solução com o nitrogênio líquido, formando lâminas sequenciais. Por se tratar de uma taxa de congelamento rápida, não há tempo suficiente para a formação de grandes cristais de gelo, resultando em poros menores e com contorno mais esférico.

Os resultados obtidos quanto às taxas de congelamento das soluções de quitosana são consonantes com as pesquisas de Huang *et al.* (2005), Tiğh, Karakeçili, Gümüşderelioğlu (2007) e She *et al.* (2008).

Efeito da concentração de quitosana nas soluções

Arcabouços produzidos a partir de soluções de quitosana com concentração de 1,5 %, 2 % e 3 %, congelados à temperatura de -20 °C, com taxa de congelamento muito lenta, foram analisados, demonstrando a influência da concentração de quitosana na morfologia final dos arcabouços. As micrografias desses arcabouços estão ilustradas na Figura 29.

Figura 29: Micrografias (MEV) dos arcabouços liofilizados fabricados a partir do congelamento de solução de quitosana com concentração de 1,5 % (a-100x, b-300x, c-800x), 2 % (d-100x, e-300x, f-800x) e 3 % (g-100x, h-500x, i-1500x), à temperatura de -20°C (taxa muito lenta, abaixo de 0,01 °C/s)



Através das imagens 29(a,b,c), referentes à secção longitudinal do arcabouço com concentração de quitosana 1,5 %, pode-se perceber uma arquitetura com maior número de poros de tamanhos variados, distribuídos em maior ou menor quantidade na estrutura, formando placas mais ou menos densas, respectivamente.

As imagens 29 (d,e,f), referentes à secção longitudinal do arcabouço de quitosana com concentração 2 %, revelam uma estrutura porosa formada por placas mais densas que aquelas observadas no arcabouço de quitosana 1,5 %, nas quais são percebidas formações porosas em menor quantidade, com predominância de canais.

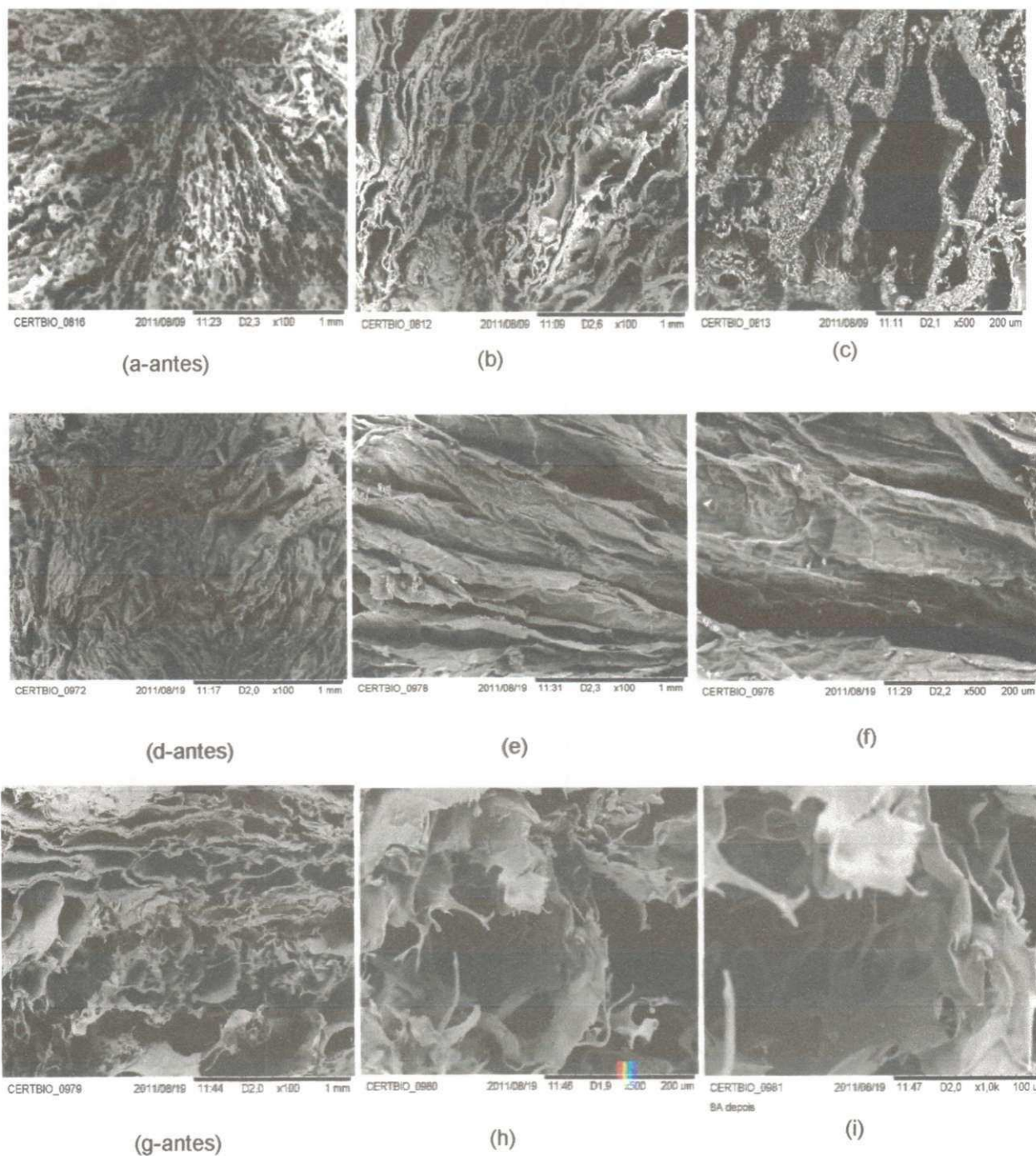
Comparando-se os arcabouços de quitosana 1,5 % e 2 % com a secção longitudinal do arcabouço de quitosana com concentração 3 %, representado através das imagens 29 (d,e,f) em diferentes magnificações, percebe-se a densificação da estrutura gerada, com a formação de canais quase na totalidade das imagens capturadas. O aumento da espessura das paredes internas e a ausência de poros dos arcabouços com maior concentração de quitosana se tornam mais nítidos através da comparação entre os arcabouços de quitosana 1,5 % e 3 %.

Os resultados obtidos corroboram com aqueles encontrados por Hshieh, Chang, Lin (2007) e Tiğh, Karakeçili, Gümüşderelioğlu (2007), em pesquisas com metodologia semelhante.

Efeito das condições de ajuste de pH

Arcabouços produzidos a partir de soluções de quitosana com concentração de 2 %, congelados à temperatura de -20 °C, com taxa de congelamento muito lenta, foram analisados, demonstrando a influência da condição de ajuste de pH experimentada, na morfologia final dos arcabouços. As micrografias desses arcabouços estão ilustradas nas Figuras 30 e 31.

Figura 30: Micrografias (MEV) de secções de arcabouços com concentração de quitosana 2 % liofilizados, antes e após serem submetidos às condições de ajuste de pH, em solução 1M NaOH (a-antes-100x,b-100x,c-500x), 1M NaOH/Etanol 99,5°GL (d-antes-100x,e-100x,f-500x) e Etanol 99,5°GL (g-antes-100x,h-500x,i-1000x)



De acordo com as imagens ilustradas na Figura 30, pode-se observar que as condições de neutralização geram estruturas mais densas. Essa característica é percebida através do aumento da espessura das paredes dos canais dos arcabouços, que ocorre devido à aproximação e, muitas vezes, junção completa dessas paredes (Imagens 30 (b,e,h)).

Essa alteração ocorre em maior ou menor proporção a depender da condição de ajuste de pH empregada. Observa-se que com a utilização de solução aquosa de 1M NaOH, imagens 30(b,c), ocorre a formação de um sal em toda superfície do arcabouço. Isso se deve provavelmente à reação entre o NaOH (base) e o ácido acético que permaneceu no arcabouço após a liofilização, formando o Acetato de Sódio, que é parcialmente solúvel em água. Com a utilização de solução 1M NaOH/Etanol 99,5°GL, imagens 30 (e,f), também é percebida a formação do sal, porém em quantidade reduzida.

Os arcabouços imersos em Etanol 99,5°GL, imagens 30 (h,i), não apresentam indícios da presença do sal. Entre o álcool etílico 99,5 °GL e o ácido acético ocorre a reação de esterificação, responsável pelo ajuste do pH dos arcabouços de ácido (pH=5.0) para neutro (pH≈7). Essa reação converte a estrutura em um éster, à temperatura ambiente, formando-se o acetato de etilo com produção também de água. O acetato de etilo é bastante volátil, o que facilita a liofilização da estrutura.

Nas imagens da Figura 31 podem ser observadas as estruturas internas dos arcabouços com concentração de quitosana 2 % submetidos a condições de ajuste de pH com posterior lavagem com água destilada. Observa-se que a estrutura dos poros dos arcabouços apresenta menor alteração quanto à arquitetura original, havendo também uma quantidade reduzida de precipitação de sal na estrutura, provavelmente devido à solubilidade parcial do acetato de sódio em água.

A lavagem das amostras com água destilada pode eliminar ácido acético remanescente, evitando formação do acetato de sódio, mas a estabilidade da estrutura após qualquer lavagem ou imersão realizada é favorecida através da imersão final do arcabouço em Etanol 70°.

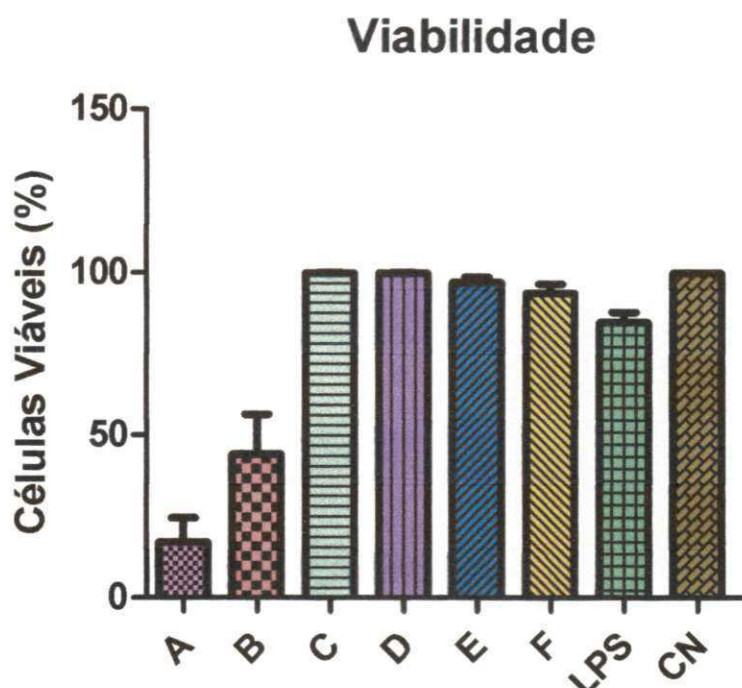
Os resultados obtidos são consonantes com os estudos de neutralização realizados por Nwe, Furuike, Tamura (2009), que apresentam a solução 1M NaOH/Etanol 99,5°GL como a mais viável. Huang et al (2005) e Tiğh, Karakeçili, Gümüşderelioğlu (2007), em suas pesquisas, apresentam o Etanol 99,5 °GL como o método mais viável para os arcabouços produzidos.

5.1.5 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Este teste foi realizado no intuito de avaliar a viabilidade das células na presença dos arcabouços produzidos. Nessa etapa, foram analisados arcabouços fabricados com quitosana proveniente do fabricante Polymar S.A., congelados em nitrogênio líquido e submetidos às condições de ajuste de pH investigadas neste trabalho.

Os percentuais de viabilidade celular obtidos para os arcabouços podem ser observados na Figura 32.

Figura 32: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços. A – QTP2%-Solução1MNaOH, B – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL, C – QTP1,5%-Etanol 99,5°GL, D – QTP2%- Etanol 99,5°GL, E – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL+lavagem, F – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 70°+lavagem, LPS – controle positivo, CN – controle negativo



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na última coluna (CN=controle negativo). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 5 animais e 3 arcabouços de cada composição por animal.

A viabilidade das células expostas aos arcabouços foi acima de 90 % para as amostras C, D, E e F, e abaixo de 50 % para as amostras A e B. A resposta das células macrofágicas às amostras A e B estão provavelmente relacionadas com a não-efetividade do método de neutralização aplicado, referentes à imersão em solução 1M NaOH e 1M NaOH/Etanol 99,5 °GL, respectivamente. Nessas amostras,

resíduos de NaOH podem ter sido responsáveis por ocasionar pH básico no interior dos arcabouços, tendo em vista que as amostras imersas em solução 1M NaOH/Etanol 99,5°GL (E) e solução 1M NaOH/Etanol 70° (F) com posterior lavagem com água destilada, apresentaram viabilidade acima de 90 %.

No Quadro 12 estão relacionados a média e o desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença dos seis tipos de amostra estudados, e para os controles positivo e negativo.

Quadro 12: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença dos seis tipos de amostra estudados, e para os controles positivo e negativo.

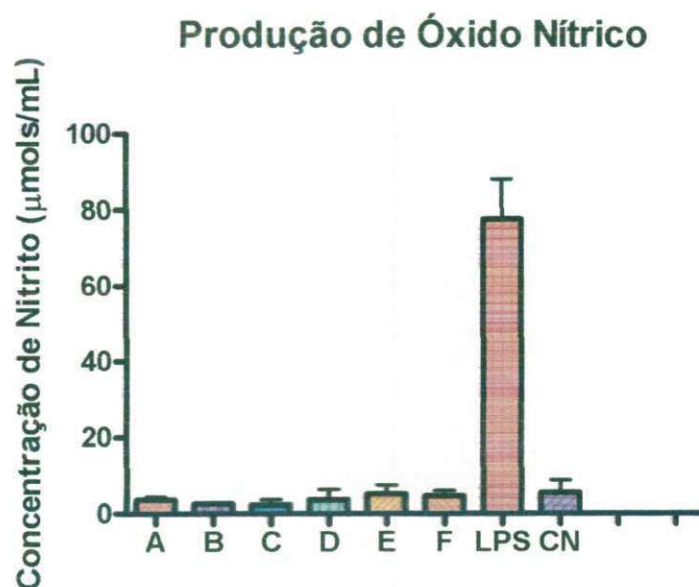
VIABILIDADE CELULAR		
Testes / Amostras	Média	Desvio-padrão
Amostra A	17,18	25,78
Amostra B	44,24	42,09
Amostra C	99,99	0,02578
Amostra D	99,96	0,1260
Amostra E	97,01	5,691
Amostra F	93,72	9,814
LPS (Controle Positivo)	84,68	10,69
Controle Negativo	100,0	0,0

Os resultados obtidos para as amostras C e D, correspondentes aos arcabouços imersos em Etanol 99,5 °GL, demonstraram a efetividade da neutralização através desse método, indicando viabilidade em 100 % para os arcabouços de quitosana em concentrações de 1,5% e 2 %. Os resultados também confirmam os dados disponíveis na literatura que apontam a quitosana como material biocompatível (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009; DASH *et al.*, 2011).

5.1.6 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição aos arcabouços testados situou-se em 20 $\mu\text{mols/mL}$ que são considerados valores positivos. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 33 e estão relacionados com os respectivos desvios-padrões no Quadro 13.

Figura 33: Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços. A – QTP2%-Solução1MNaOH, B – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL, C – QTP1,5%-Etanol 99,5°GL, D – QTP2%-Etanol 99,5°GL, E – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 99,5°GL+lavagem, F – QTP2%-Solução1MNaOH/Etanol 70°+lavagem, LPS – controle positivo, CN – controle negativo



Quadro 13: Médias e desvio-padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença dos seis tipos de amostra estudados, e para os controles positivo e negativo, em comparação com a porcentagem de células viáveis

ÓXIDO NÍTRICO			
Amostras	Células Viáveis (%)	Média ($\mu\text{mols/mL}$)	Desvio-padrão
Amostra A	17,18	1,424	0,3398
Amostra B	44,24	1,979	0,4791
Amostra C	99,99	4,077	6,346
Amostra D	99,96	6,605	12,91
Amostra E	97,01	6,087	11,69
Amostra F	93,72	3,319	6,656
LPS (Controle Positivo)	84,68	47,08	14,24
Controle Negativo	100,0	10,99	14,51

Os resultados indicam que para as Amostras A e B, as células que continuaram vivas (17,18 % e 44,24 %) reagiram liberando uma média de concentração de 1,424 e 1,979 $\mu\text{mols/mL}$, respectivamente. Da mesma forma, as células sobreviventes para as Amostras C, D, E e F reagiram liberando a média de concentração de óxido nítrico indicada no Quadro 13. Esses resultados são consonantes àqueles expressados pelo teste de Viabilidade Celular, já que as células vivas restantes para as Amostra A e B reagiram à presença do material, indicando toxicidade, enquanto as células vivas para as Amostras C, D, E e F demonstraram baixa liberação de óxido nítrico, indicando uma reação natural de defesa das células, com estímulo apenas inicial.

Logo, os estudos realizados demonstram que os arcabouços de quitosana fabricados através dos procedimentos estabelecidos por esta pesquisa, podem ser aplicados sem que haja uma resposta indesejada dos tecidos celulares, já que os resultados apontam que o material não é citotóxico. Ainda, os arcabouços neutralizados através da imersão em Etanol 99,5°GL apresentaram taxas mais

favoráveis de viabilidade celular para os macrófagos com relação aos outros métodos investigados.

5.1.7 Parâmetros determinados a partir dos resultados da ETAPA I

De acordo com os resultados obtidos através dos procedimentos e análises realizados nessa etapa, foram determinados parâmetros experimentais favoráveis à otimização do processo, a serem empregados na continuação do trabalho. Esses parâmetros estão listados a seguir.

- Quanto ao procedimento de fabricação:
Utilização de Placas de Petri como moldes mais apropriados para o congelamento, que resulta em menor número de amostras com defeitos;
Liofilização durante 48 horas para garantir a secagem do material.
- Quanto à concentração de quitosana das soluções poliméricas:
Estudos comparativos entre soluções de quitosana com concentração de 1,5% e 2 %, tendo em vista a fragilidade da estrutura dos arcabouços com concentração de 1 % e a arquitetura densa dos arcabouços de quitosana 3 %.
- Quanto à taxa de congelamento:
Todas as taxas de congelamento foram mantidas como variáveis para estudo na Etapa II.
- Quanto à neutralização dos arcabouços:
Imersão em Álcool etílico 99,5 °GL e estabilização através de imersão em Álcool etílico 70°, por manter a arquitetura original do arcabouço, não interferindo na biocompatibilidade do material;
Secagem após a neutralização através do congelamento e liofilização do arcabouço neutralizado.

5.2 ETAPA II – Etapa de desenvolvimento e investigação dos arcabouços

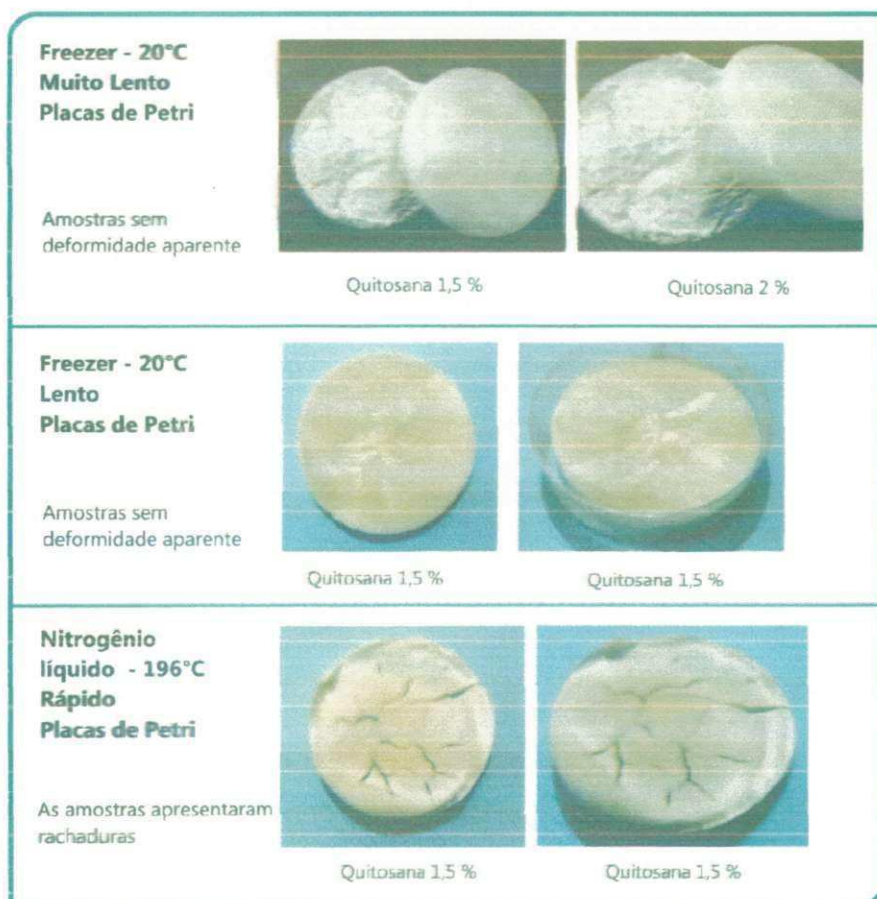
5.2.1 Fabricação dos arcabouços

Para essa fase do trabalho foram selecionados percentuais de concentração de quitosana de 1,5 % e 2 % e temperaturas de congelamento de -20 °C e -196 °C, representando taxas de congelamento muito lenta, lenta e rápida.

Foram fabricados arcabouços a partir de soluções de quitosana e quitosana-genipina com base nos parâmetros estabelecidos através da Etapa I deste trabalho. Dessa forma, os procedimentos foram realizados através do congelamento das soluções em Placas de Petri e liofilizados por 48 horas. Além disso, todos os arcabouços foram neutralizados através da imersão em Álcool etílico 99,5 °GL.

A Figura 34 ilustra os principais resultados obtidos para as amostras de quitosana, selecionados após avaliação macroscópica dos arcabouços.

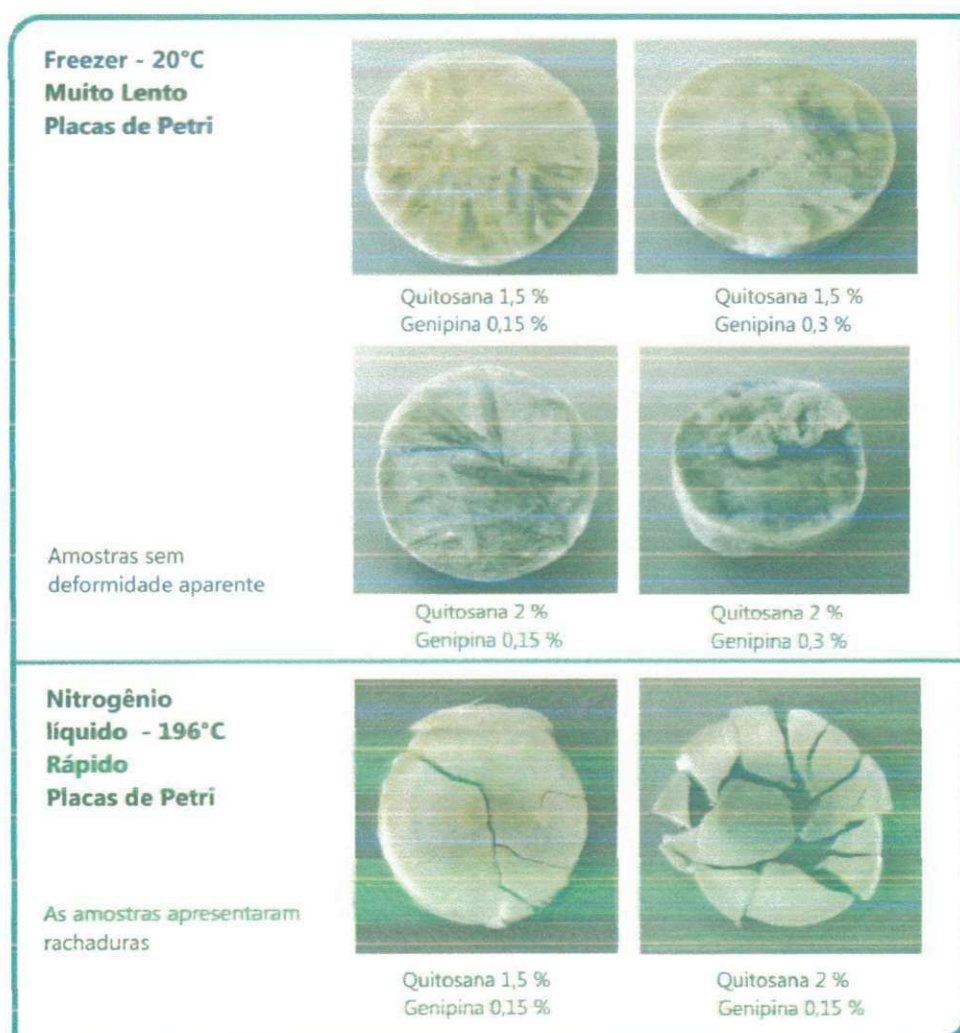
Figura 34: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana com concentração de 1,5 % e 2 %, através de taxas de congelamento variadas, à -20 °C e -196 °C



Os arcabouços produzidos com a quitosana Sigma-Aldrich apresentaram coloração mais esbranquiçada com relação aos produzidos com quitosana Polymar. Arcabouços fabricados através do congelamento em nitrogênio líquido apresentaram rachaduras que são consequência do contato entre a amostra congelada a -196°C e a temperatura ambiente durante a transferência para o balão de vácuo do liofilizador. Os arcabouços congelados em freezer não apresentaram deformidades aparentes.

A Figura 35 ilustra os principais resultados obtidos para as amostras de quitosana-genipina, selecionados após avaliação macroscópica dos arcabouços.

Figura 35: Arcabouços fabricados com soluções de quitosana-genipina com concentração de quitosana 1,5 % e 2 % e de genipina 0,15% e 0,3%, congeladas à temperatura de -20°C (taxa muito lenta) e -196°C (taxa rápida)



Os arcabouços de quitosana-genipina congelados à temperatura de -20 °C e -196 °C apresentaram uma estrutura semelhante aos arcabouços de quitosana congelados nas mesmas taxas, com exceção da composição Quitosana 2 % - Genipina 0,3 %, que exibiu uma estrutura semelhante à dos arcabouços congelados em taxa considerada como lenta. Os arcabouços congelados em nitrogênio líquido também apresentaram rachaduras.

Outra característica importante observada no material produzido foi a diferença da coloração final para cada composição quitosana-genipina.

Chen *et al.* (2005) estudou o efeito da temperatura e tempo de reação na aparência física das soluções de quitosana-genipina, com concentração de quitosana-genipina fixa. Os resultados encontrados pelo autor estão relacionados no Quadro 14.

Quadro 14: Efeito da temperatura e tempo de reação na aparência física das soluções de quitosana-genipina, com concentração de quitosana-genipina fixa. A área destacada se refere à temperatura e ao tempo utilizados neste trabalho

Temperatura de Incubação (°C)	Tempo de incubação (h)							
	0	1	3	6	12	24	36	48
37	Incolor	Incolor	Amarelo-claro	Verde-azulado	Azul escuro	Azul escuro	Azul escuro	Azul escuro
20	Incolor	Incolor	Levemente amarelado	Levemente amarelado	Amarelo-claro	Azul-esverdeado	Verde-azulado escuro	Azul escuro
4	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Levemente amarelado	Levemente amarelado	Amarelo-claro

Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2005

Comparando a coloração estudada pelo autor com a aparência física dos arcabouços quitosana-genipina fabricados neste trabalho, pode-se perceber a similaridade entre as tonalidades descritas. Pode-se inferir que com o tempo e a temperatura fixos, como é o caso deste trabalho de dissertação, as variações na concentração da quitosana e da genipina geram a mesma paleta de cores.

Ainda de acordo com essa pesquisa, e com os estudos de Gonsalves *et al.* (2010), o grau de reticulação das soluções preparadas aumenta proporcionalmente com o tempo, temperatura e pH da incubação, o que indica que o escurecimento da solução está relacionado com o aumento do seu grau de reticulação.

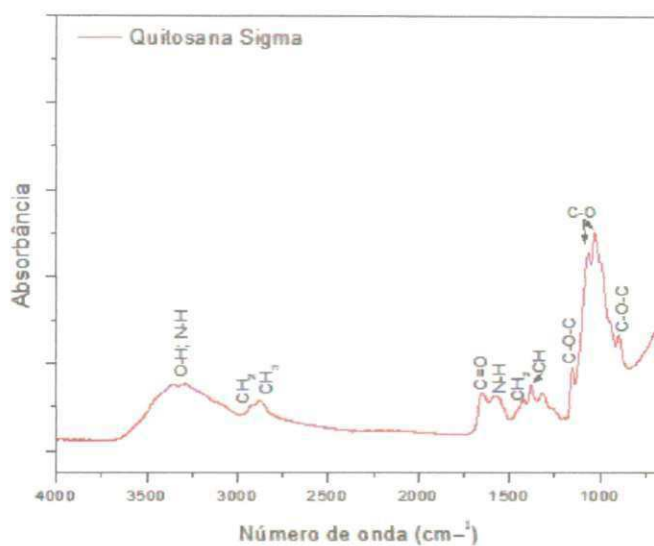
Dessa forma, a variação da coloração dos arcabouços produzidos ilustrados na Figura 35 indica que com o aumento da concentração de genipina nas soluções de quitosana, o grau de reticulação aumentou. Além disso, o congelamento através de nitrogênio líquido tornou os arcabouços mais claros quando comparados com as amostras de mesma composição congeladas em freezer.

5.2.2 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por Espectroscopia do Infravermelho foi aplicada, nessa etapa, para a observação das bandas de absorção presentes na matéria-prima utilizada para a fabricação dos arcabouços, com exceção da genipina (dados comparados com a literatura) e nas amostras congeladas à temperatura de -20°C (taxa de congelamento muito lenta) e -196°C , neutralizadas e não-neutralizadas, com e sem reticulação.

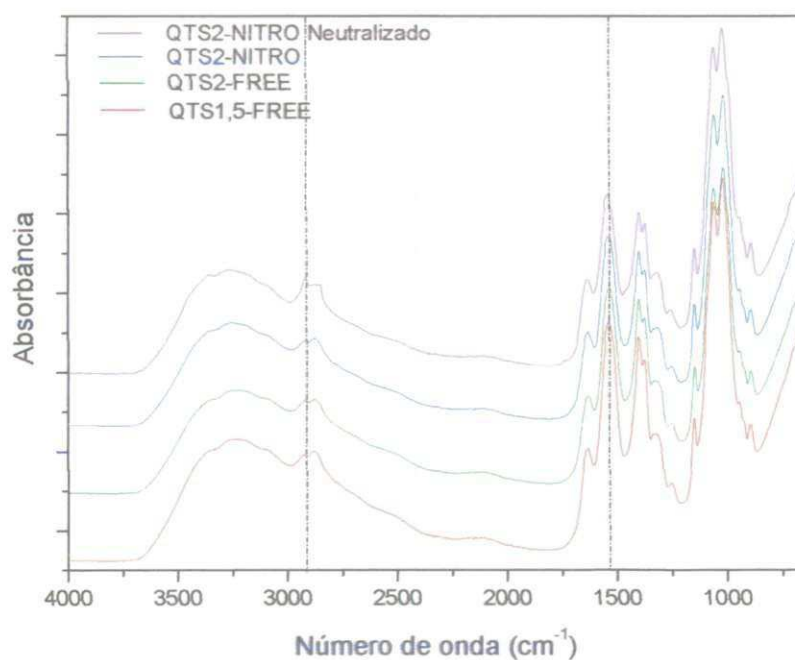
O Figura 36 ilustra o espectro de IV da quitosana em pó obtida do fabricante Sigma-Aldrich. O espectro obtido apresenta todas as bandas características da quitosana, conforme indicado no Quadro 10 para a quitosana Polymar, confirmando os estudos realizados na Etapa I e mostrando que não ocorreram diferenças consideráveis nos materiais produzidos, a partir dos dois fornecedores diferentes. Estudo semelhante foi realizado por Lima (2010).

Figura 36: Espectro vibracional de IV da quitosana em pó (fabricante Sigma-Aldrich)



Os espectros de IV dos arcabouços liofilizados obtidos através do congelamento da solução à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Freezer*) e $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nitrogênio líquido), com e sem neutralização, estão ilustrados na Figura 37.

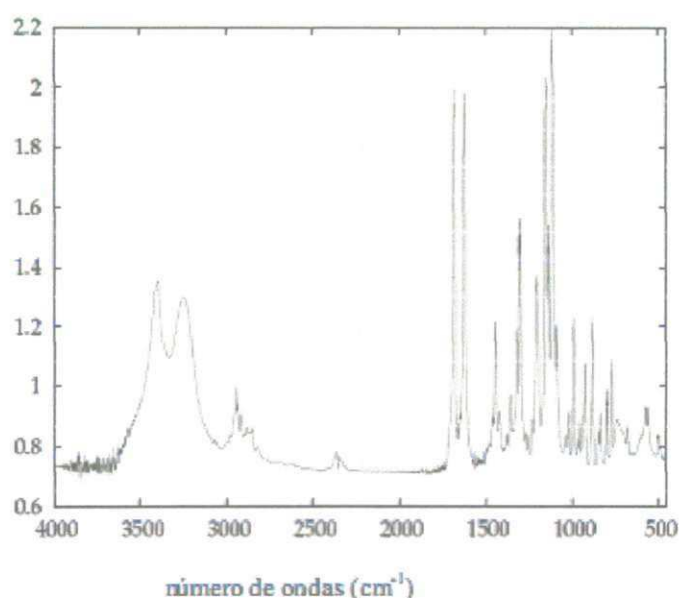
Figura 37: Espectro vibracional de IV dos arcabouços QTS1,5-FREE, QTS2-FREE, QTS2-NITRO e QTS2-NITRO Neutralizado



Pode-se observar que não há alterações significativas nos espectros dos arcabouços em função da temperatura de congelamento. Contudo, o espectro QTS2-NITRO neutralizado apresentou um pequeno decréscimo nos picos referentes ao estiramento N-H do grupo amina NH_2 (1546 cm^{-1}) e um aumento do pico referente à vibração de estiramento do grupo C-H assimétrico (2920 cm^{-1}). De acordo com Noriega e Subramanian (2011), essas diferenças são decorrentes da etapa de neutralização.

A Figura 38 apresenta o espectro da genipina e o Quadro 15 apresenta as vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de IV, de acordo com as pesquisas de Magalhães Júnior (2007) e Bispo (2009).

Figura 38: Espectro vibracional de IV da genipina



Fonte: MAGALHÃES JÚNIOR, 2009

Quadro 15: Vibrações correspondentes aos principais grupos químicos apresentados no espectro de IV da genipina em pó

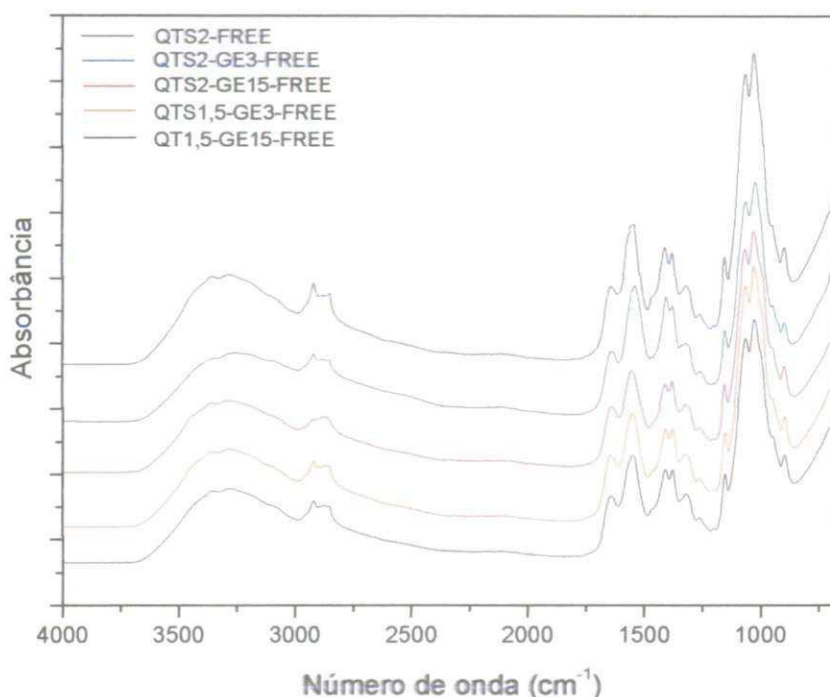
Atribuições	Frequências vibracionais (cm^{-1})
OH: δ	1000-1060
$\nu(\text{C-O})$	1200-1270
$\nu(\text{C-O})$	1170-1300
$\delta\text{OH}/\delta\text{CH}_2:(\nu)/\text{NH}:\delta$	1300-1530
$\nu(\text{C-H/OH/C=O})$	1400-1450
$\nu(\text{C=C})$	1406
$\nu(\text{C=C})$	1600-1700
$\nu(\text{C=O})$	1700-1750
$\nu(\text{C=C})$	2750-3000

Fonte: Adaptado de BISPO, 2009.

De acordo com Magalhães Júnior (2007), o espectro apresentou as seguintes bandas características dos grupos funcionais da genipina: deformação axial de OH em 3402 cm^{-1} (OH livre) e em 3246 cm^{-1} (OH em ligação de hidrogênio intermolecular); absorção de deformação axiais de éster conjugados em 1683 cm^{-1} (C=O) e 1203 cm^{-1} (C-O de C-(=O)-O); deformação axial de C=C de olefinas (ciclo alqueno em 1109 cm^{-1}).

A Figura 39 ilustra os espectros obtidos para os arcabouços reticulados com genipina, congelados à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir dos espectros podem-se obter informações adicionais sobre as interações entre a quitosana e o agente de reticulação genipina.

Figura 39: Espectro vibracional de IV dos arcabouços QTS1,5-GE15-FREE, QTS1,5-GE3-FREE, QTS2-GE15-FREE, QTS2-GE3-FREE, todos neutralizados



Comparando os espectros de FTIR das amostras reticuladas com a amostra sem reticulante na composição é possível observar uma diminuição da intensidade de absorção das bandas na região entre $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ (O-H;N-H), dos picos correspondentes à amida II (1546 cm^{-1}) e das ligações glicosídicas da quitosana ($800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$). A banda em 1064 cm^{-1} é resultante do estiramento C-O e a banda em 1406 cm^{-1} ao estiramento da molécula de genipina (C=C). O perfil típico de polissacarídeo é mantido em 1150 cm^{-1} , característico do estiramento C-O-C. Esses resultados estão de acordo com as pesquisas de Butler, Ng, Pudney (2003), Chen *et al.* (2005) e Bispo (2009).

Ainda de acordo com esses espectros, comparando-se as amostras QTS2-GE15-FREE e QTS2-GE3-FREE, pode ser observada que a absorção da banda em 1650 cm^{-1} , associada ao grupamento amida, cresce com o aumento da concentração de genipina, o que sugere o aumento de grupos amida, evidenciando a efetivação da reticulação. Além disso, o estiramento do anel da amida

heterocíclica em 1340 cm^{-1} ocorre com aumento de absorção crescente em relação à concentração de reticulante. Os resultados são consoantes com aqueles obtidos por Magalhães Júnior (2007) e Bispo (2009).

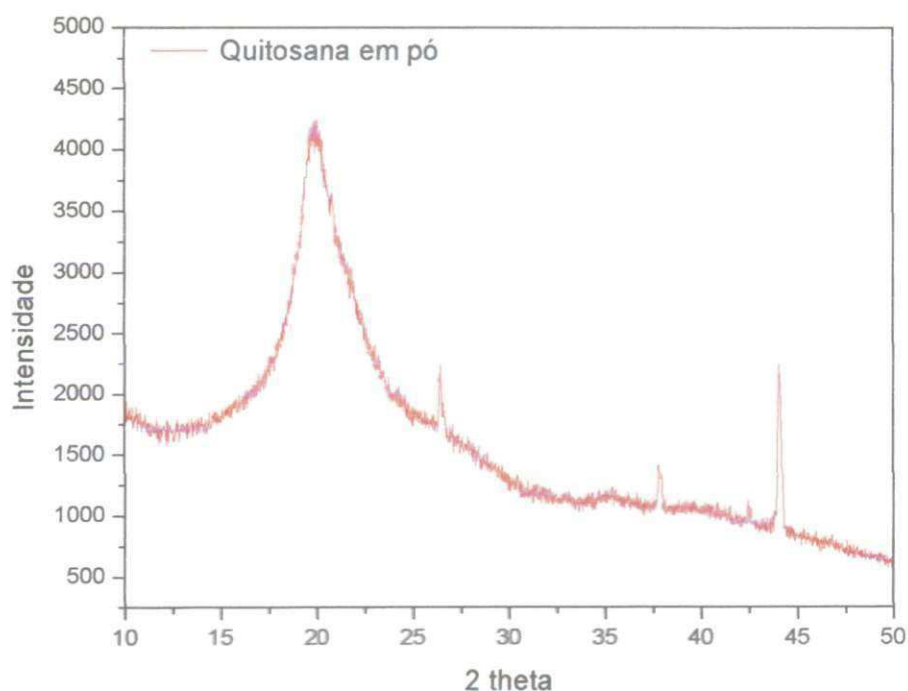
Mi, Shyu e Peg (2005) descrevem que, seguindo o esquema sugerido para a reação entre a quitosana e a genipina em meio ácido (Figura 13), a reação de abertura de anel pode ser inibida devido à protonação dos grupos amino na condição ácida (pH 5,0). Embora a reação de grupos éster de genipina com quitosana só possa prosseguir na presença de ácido, é sugerido que a reação de substituição nucleofílica sobre os grupos de éster de genipina não seja a reação de reticulação dominante. Esse pode ser um indicativo para a diferença mínima observada entre os espectros de IV dos arcabouços de quitosana e quitosana-genipina.

5.2.3 Difração de Raios X (DRX)

Nessa etapa a Difração de Raios X foi realizada com o objetivo de caracterizar a matéria-prima dos arcabouços, tendo em vista a utilização de quitosana do fabricante Sigma-Aldrich, e de observar a influência dos estágios de congelamento, da neutralização e da concentração do agente reticulante nos arcabouços. Para essa etapa, os difratogramas foram obtidos a partir de secções das amostras sem reticulação (QTS1,5-NITRO, QTS2-FREE, QTS2-NITRO, QTS2-NITRO Neutralizado), com reticulante (QTS1,5-GE15-FREE, QTS1,5-GE3-FREE, QTS2-GE15-FREE, QTS2-GE3-FREE), e a partir do pó da quitosana utilizada para o preparo das soluções.

O difratograma do pó de quitosana proveniente do fabricante Sigma-Aldrich apresenta pico de reflexão em 2θ a 20° , característico do material, conforme reportado na Etapa I (Figura 40).

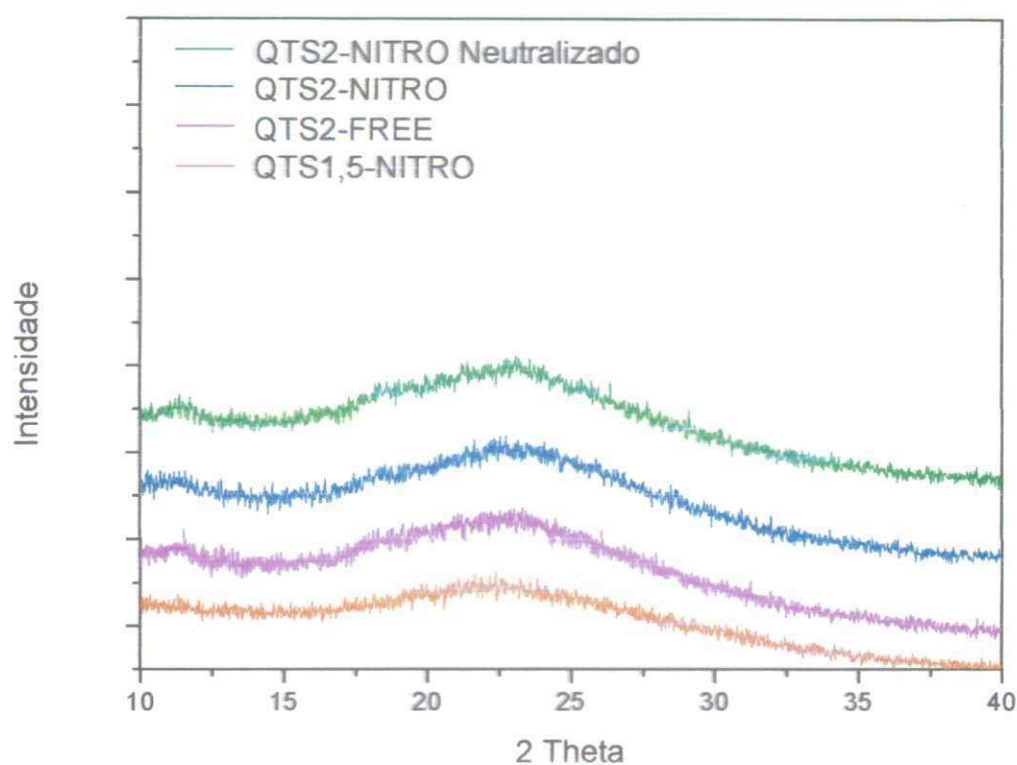
Figura 40: DRX da quitosana em pó (fabricante Sigma-Aldrich)



A Figura 41 ilustra os difratogramas de DRX dos arcabouços liofilizados obtidos através do congelamento da solução à temperatura de -20°C (*Freezer*) e -196°C (Nitrogênio líquido), com e sem neutralização. Comparando as amostras QTS1,5-NITRO e QTS2-NITRO, observa-se o aumento da reflexão dos picos em 2θ a 20° conforme aumenta a concentração da solução de quitosana, de acordo com estudo realizado na Etapa I.

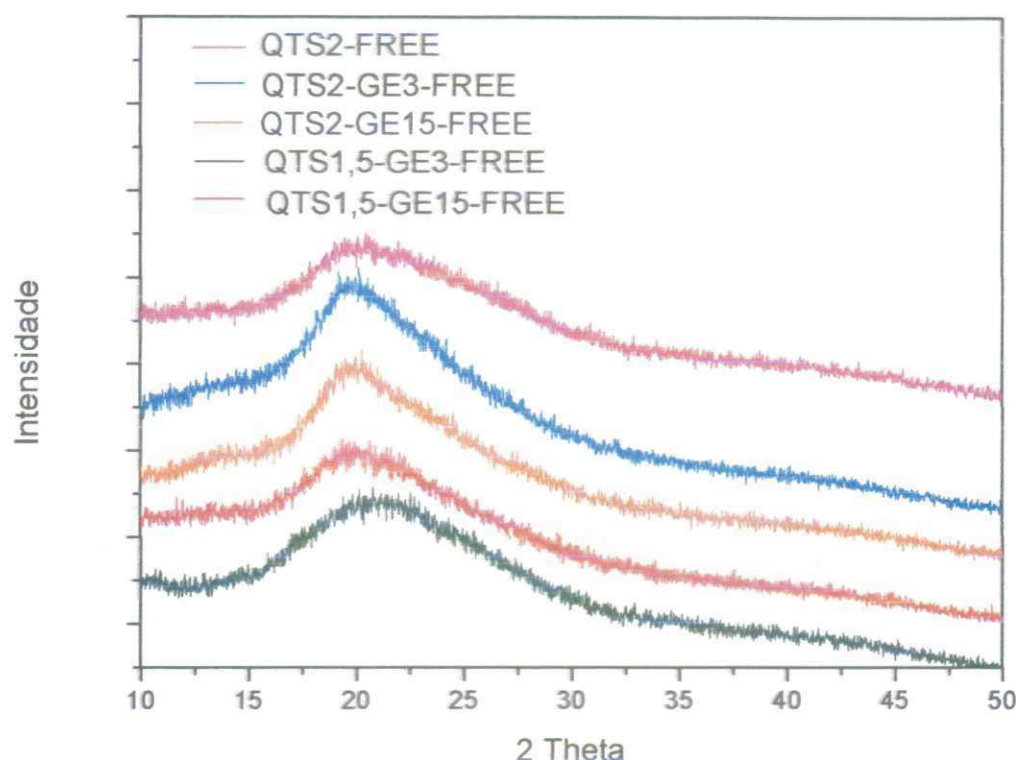
Nos difratogramas das amostras QTS2-FREE, QTS2-NITRO e QTS2-NITRO Neutralizado não são observadas diferenças relevantes, o que indica que a taxa de congelamento e a neutralização não interferem na orientação macromolecular da quitosana.

Figura 41: DRX dos arcabouços de quitosana QTS1,5-NITRO, QTS2-FREE, QTS2-NITRO e QTS2-NITRO Neutralizado (fabricante Sigma-Aldrich)



Os difratogramas das amostras dos arcabouços de quitosana reticulada com genipina estão ilustrados na Figura 42. Pode-se observar que, quanto maior a concentração de genipina em relação à concentração de quitosana, mais acentuadas as reflexões em 2θ a 20° . Os resultados são consonantes com os encontrados por Rinki e Dutta (2010).

Figura 42: DRX dos arcabouços de quitosana QTS1,5-GE15-FREE, QTS1,5-GE3-FREE, QTS2-GE15-FREE, QTS2-GE3-FREE e QTS2-FREE, todos neutralizados (fabricante Sigma-Aldrich)



Conforme reportado por Butler, Ng, Pudney (2003), a genipina reage com a quitosana formando ligações covalentes. Dessa forma, o material reticulado apresenta ligações covalentes em maior número, e esse número de ligações cresce com o aumento da concentração de genipina havendo, conseqüentemente, o aumento da cristalinidade, uma vez que se tratam de estruturas mais organizadas.

Através dos difratogramas pode-se inferir que, embora haja aumento da cristalinidade do material através da reticulação, o aumento da concentração de genipina de 0,15 % para 0,3 % induz pouca diferença na cristalinidade da estrutura. Esses resultados podem estar relacionados com a menor interação entre a quitosana e a genipina em meio ácido, conforme foi observado através das análises por FTIR.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

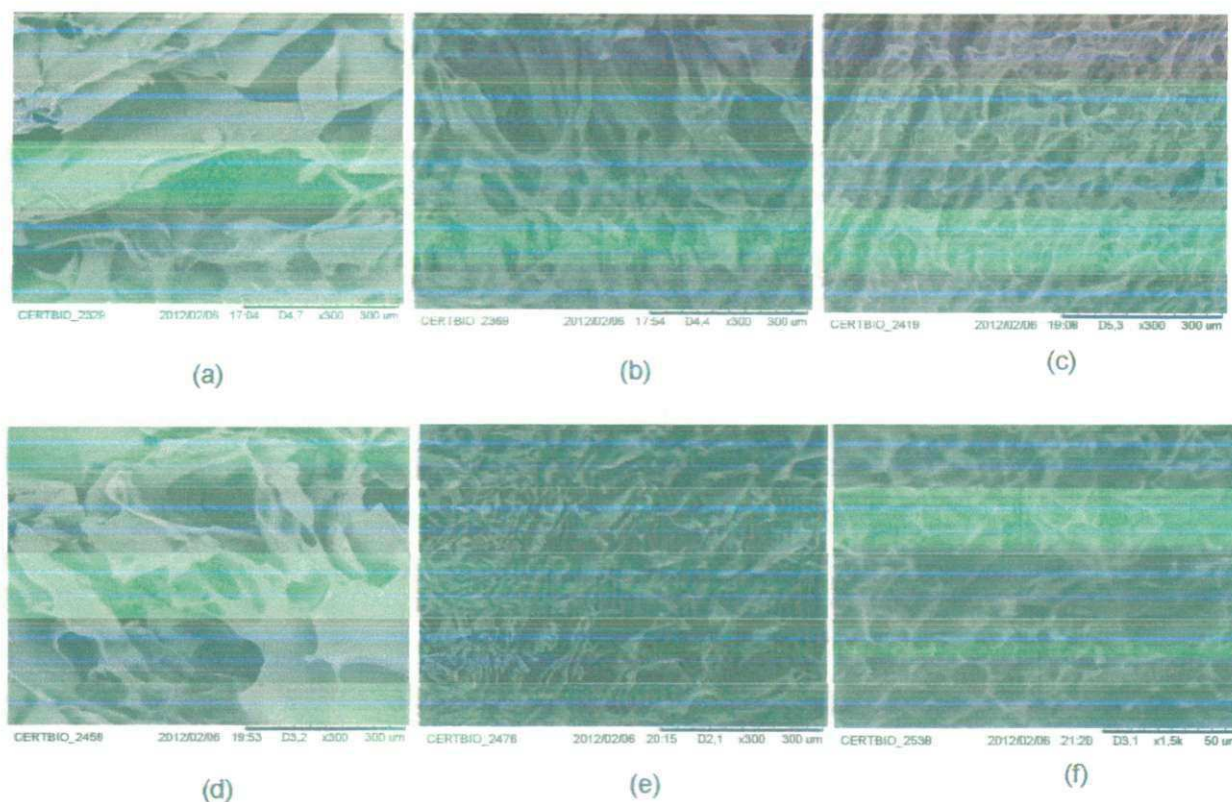
Para investigar o comportamento da microestrutura dos arcabouços de quitosana e quitosana-genipina produzidos, foram realizadas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Arcabouços foram fabricados a partir de soluções de quitosana com concentração de 1,5 % e 2 %, congeladas à temperatura de -20°C e -196 °C, em taxa de congelamento muito lenta (abaixo de 0,01 °C/s), lenta (entre 0,01 °C/s e 0,06 °C/s) e rápida (entre 0,06 °C/s e 50 °C/s), no intuito de comparar os arcabouços produzidos nas etapas I e II e dimensionar os poros obtidos na arquitetura dos arcabouços.

Arcabouços de quitosana

A Figura 43 ilustra as micrografias obtidas para os arcabouços com concentração de 1,5 % e 2 %, submetidos às taxas de congelamento muito lento, lento e rápido.

Figura 43: Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 1,5 %, submetidos a taxas de congelamento muito lento (a-300x), lento (b-300x) e rápido (c-300x) e de 2 % (d-300x), (e-300x) e f (300x) submetidos à taxas de congelamento semelhantes

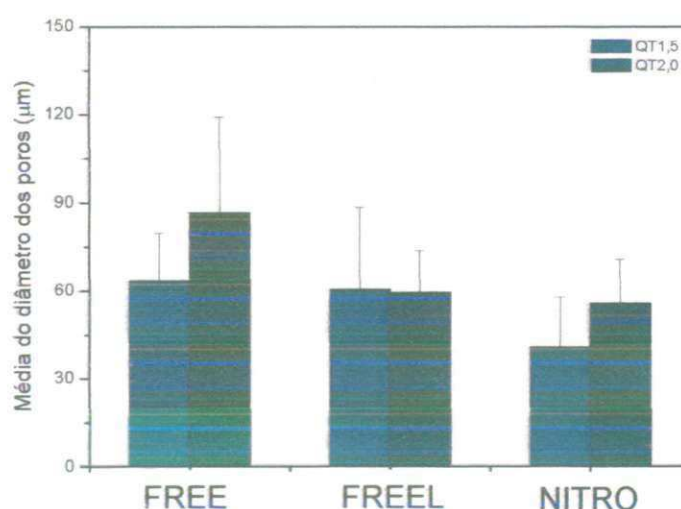


De acordo com as micrografias ilustradas na Figura 43, pode-se perceber o aumento do número de poros da estrutura com o aumento da taxa de congelamento da solução, tanto para os arcabouços com concentração de 1,5 % quanto para aqueles de 2 %, assim como uma diminuição do tamanho dos poros apresentados, conforme estudo detalhado realizado na Etapa I deste trabalho.

De acordo com a média do diâmetro de poros calculada através das micrografias (MEV), os arcabouços com concentração de 1,5% apresentam média de 65 μm e 60 μm, respectivamente, para as amostras congeladas em taxa muito lenta e lenta, não havendo variação significativa (Figura 44). Essa variação ocorre com a mudança da taxa para rápida, através do congelamento com nitrogênio líquido, na qual a média dos poros chega a 40 μm. Comparando esses valores com aqueles obtidos para os arcabouços com concentração de quitosana 2 %, pode-se

perceber que a mudança da taxa de congelamento de muito lenta para lenta interfere significativamente na arquitetura porosa, com média de poros de 87 μm e 58 μm , respectivamente. Além disso, pode-se observar a formação de estruturas com maior distribuição de poros (variação de tamanho de poro existente no arcabouço). Esse valor pode ser estimado através do desvio-padrão. Por exemplo, para a composição quitosana 2%FREE, têm-se uma variação de tamanho de poro de 54 μm e 120 μm , que confirmam os resultados obtidos durante a análise da morfologia na Etapa I. De acordo com o gráfico, com o aumento da concentração de quitosana, o tamanho médio dos poros aumenta.

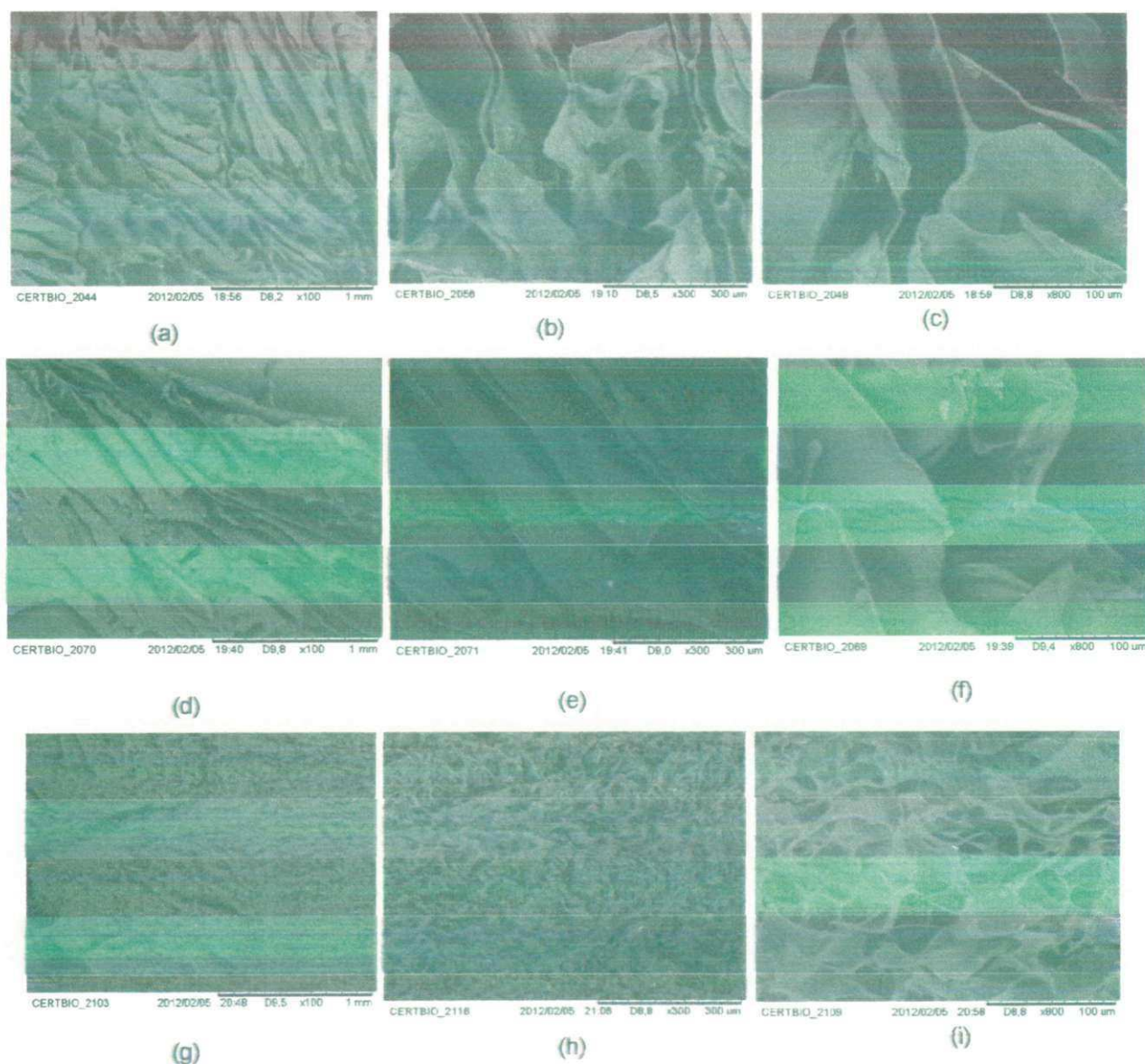
Figura 44: Média do diâmetro dos poros dos arcabouços de quitosana com concentração de 1,5 % e 2 %, congelados através de taxa muito lenta (abaixo de 0,01 °C/s), lenta (entre 0,01 °C/s e 0,06 °C/s) e rápida (entre 0,06 °C/s e 50 °C/s), calculados através das micrografias (MEV) obtidas



Arcabouços de quitosana-genipina

A Figura 45 ilustra as micrografias obtidas para os arcabouços com concentração de quitosana de 1,5 % e 2 % e de genipina 0,15 % e 0,3 %, submetidos às taxas de congelamento muito lento e rápido.

Figura 45: Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana-genipina liofilizados com concentração de Quitosana 1,5 % e concentrações de genipina 0,15% (a-100x, b-300x, c-800x) congelado à -20 °C (muito lento), genipina 0,3% (d-100x, e-300x, f-300x) congelado à 20 °C (muito lento) e genipina 0,15 % (g-100x, h-300x, i-800x) congelado à -196 °C



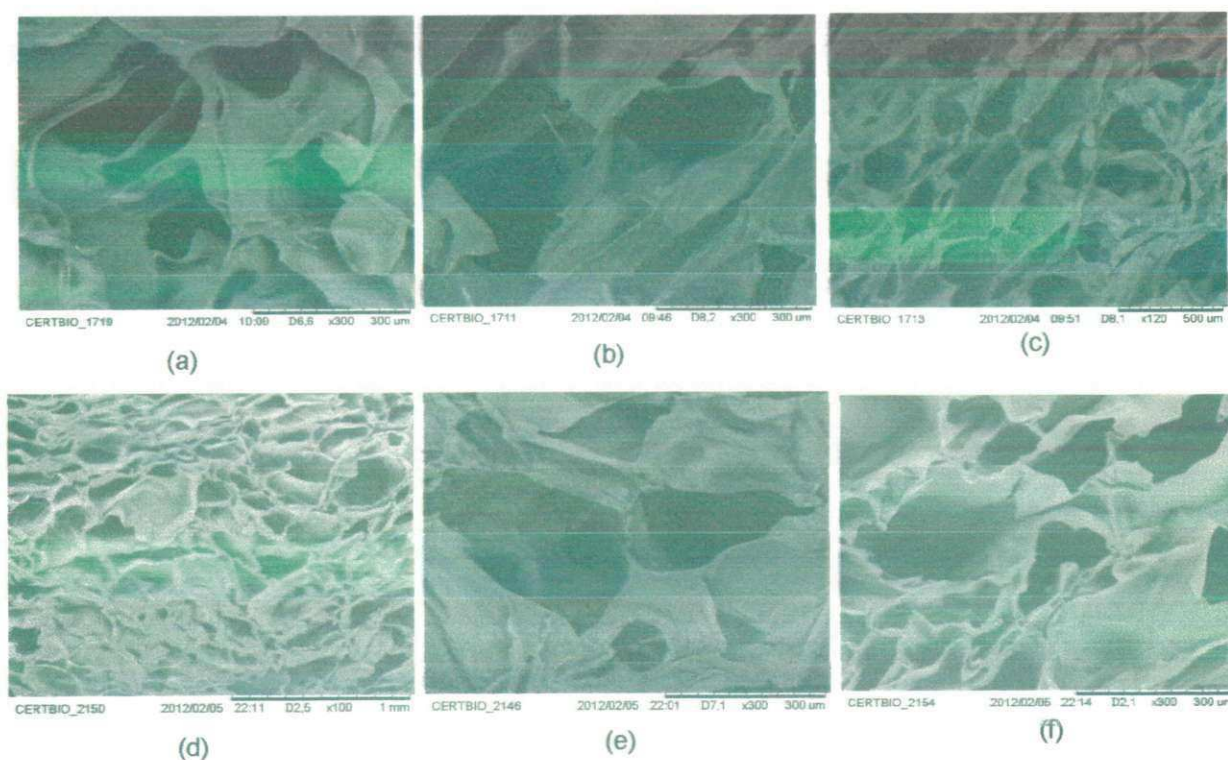
Através das imagens 45 (a,b,c) e 45 (d,e,f) pode ser observada a formação interna dos arcabouços de quitosana reticulados com genipina em concentração de 0,15% e 0,3%. Não há diferença significativa entre a arquitetura dos arcabouços, que exibe uma morfologia constituída da placas densas e multidirecionais, que formam canais sem interconexão. Essas estruturas apresentam, respectivamente,

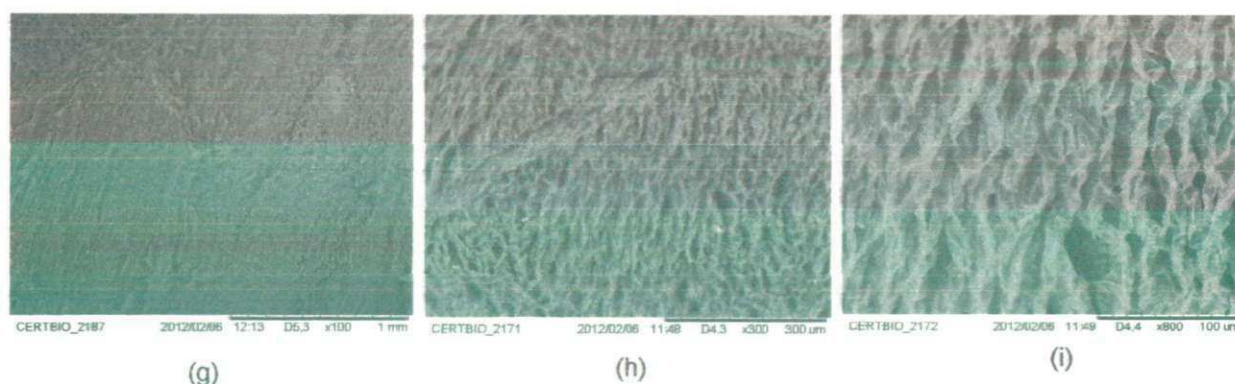
uma média de diâmetro de poros de 135 μm e 140 μm (Figura 47), sendo que a composição quitosana 1,5%-genipina 0,15% apresenta uma maior distribuição do tamanho dos poros. Observa-se, ainda, que a estrutura das paredes dos canais são mais espessas que às dos arcabouços de quitosana. Essa arquitetura se deve provavelmente ao aumento da cristalinidade do material através da reticulação.

Essa morfologia altera significativamente com a mudança do estágio de congelamento para rápido, apresentando uma quantidade de poros acentuada, com tamanho de poro reduzido, com média de 30 μm . A regularidade do congelamento da estrutura não permite uma larga distribuição de poros.

A Figura 46 apresenta as micrografias referentes aos arcabouços com concentração de quitosana 2 % e genipina 0,15% e 0,3%, submetidos à taxa de congelamento muito lenta e rápida.

Figura 46: Micrografias (MEV) das seções longitudinais dos arcabouços de quitosana-genipina liofilizados com concentração de Quitosana 2 % e concentrações de genipina 0,15% (a-100x, b-300x, c-800x) congelado à -20 °C (muito lento), genipina 0,3% (d-100x, e-300x, f-300x) congelado à 20 °C (muito lento) e genipina 0,15 % (g-100x, h-300x, i-800x) congelado à -196 °C



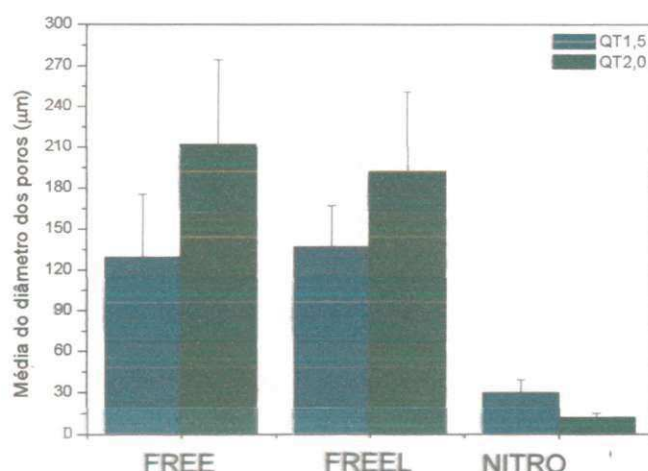


Os arcabouços de quitosana com concentração de 2 % reticulados com genipina apresentam uma morfologia interna diferenciada se comparados com os arcabouços com concentração de quitosana de 1,5 %. Através das imagens pode-se perceber a formação de poros poligonais de tamanhos variados. As paredes apresentam espessura acentuada com relação aos arcabouços sem reticulação, e interconectividade entre os poros existentes. Essa morfologia pode indicar que o aumento da concentração do reticulante interfere na formação dos poros dos arcabouços.

Essas estruturas apresentam média do diâmetro de poros maiores, com valores de 210 μm e 195 μm para as amostras com 0,15% e 0,3% de genipina, respectivamente. Não há uma grande diferença entre os valores das composições com o aumento da concentração de genipina sem variação da concentração de quitosana, o que indica que o aumento da concentração de reticulante não interfere acentuadamente.

As imagens referentes à estrutura do arcabouço congelado através de nitrogênio líquido, imagem 46 (g,h,i), indicam uma arquitetura com formação de poros de tamanho menor, devido à mudança da taxa de congelamento. Ainda, esses poros apresentam tamanho bastante reduzido se comparados com os arcabouços de quitosana congelados na mesma taxa. Foi encontrada uma média de poro de 13 μm . Esse resultado pode indicar que o aumento da cristalinidade da solução combinado à taxa de congelamento rápida, causa uma dificuldade de crescimento para os cristais de gelo.

Figura 47: Média do diâmetro dos poros dos arcabouços de quitosana-genipina com concentração de 1,5 % e 2 %, e genipina 0,15 % e 2 %, congelados através de taxa muito lenta (abaixo de 0,01 °C/s) e rápida (entre 0,06 °C/s e 50 °C/s), calculados através das micrografias (MEV) obtidas



5.2.4 Microscopia Ótica (MO)

A Microscopia Ótica foi utilizada para investigar o comportamento dos arcabouços poliméricos com e sem reticulação, com relação às diferentes concentrações das soluções de quitosana e quitosana-genipina, quando da interação com a luz ótica. Foram capturadas representações em 2D e 3D.

Foram analisadas amostras obtidas a partir de secções longitudinais dos arcabouços QTS1,5 e QTS2, com e sem reticulação, congelados à temperatura de -20 °C (taxa de congelamento abaixo de 0,01 °C/s).

A Figura 48 apresenta as imagens obtidas para os arcabouços liofilizados sem reticulação, em representação 2D.

Figura 48: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana com concentração de 1,5 % (a-280x, b-420x) e 2% (c-280x, d-420x) submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C , taxa abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$)



(a)



(b)



(c)

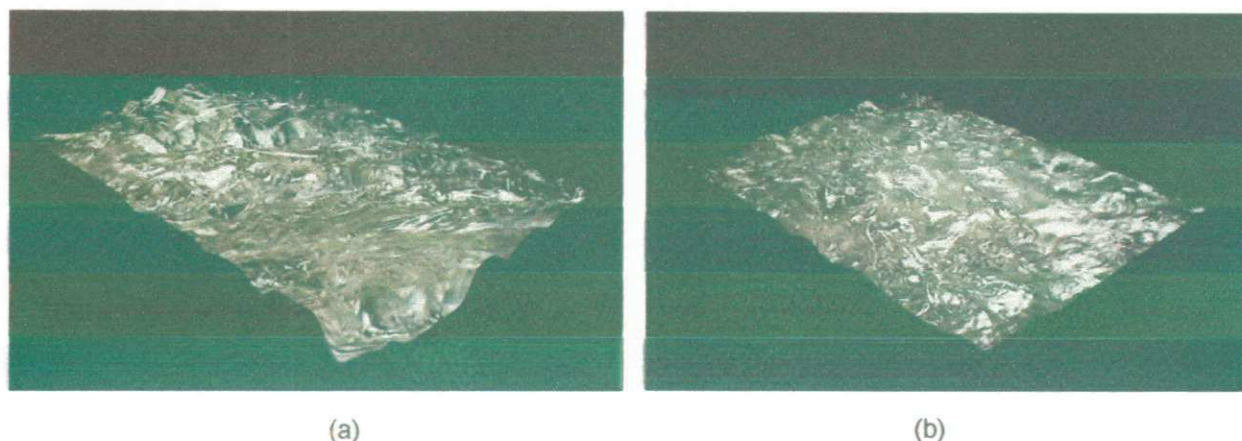


(d)

De acordo com as imagens pode-se observar a formação porosa das estruturas dos arcabouços através da identificação do contorno de alguns poros situados no plano de foco. As imagens também revelam a transparência das paredes internas da estrutura, tendo em vista a percepção da arquitetura do arcabouço através do plano de foco. Não foram observadas diferenças significativas quanto à variação da concentração da solução de quitosana de 1,5 % para 2 %.

A Figura 49 apresenta as imagens obtidas para os arcabouços liofilizados sem reticulação, em representação 3D.

Figura 49: Microscopia ótica (MO) 3D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana com concentração de 1,5 % (a) e 2% (b) submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C , taxa abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$)



Através da representação tridimensional (3D) da estrutura interna dos arcabouços nos pontos onde foram capturadas as representações 2D, pode-se perceber a formação de ondulações tanto no arcabouço de quitosana 1,5 % quanto no de 2 %, que confirmam alguns dos resultados obtidos através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A diferença na quantidade de ondulações observadas, tendo em vista se tratar de arcabouços submetidos à mesma taxa de congelamento, provavelmente se deve à diversidade da formação interna dos arcabouços, resultado observado também nas micrografias por MEV.

As Figuras 50 e 51 apresentam as imagens obtidas para os arcabouços liofilizados com reticulação da quitosana através da genipina, em representação 2D e 3D.

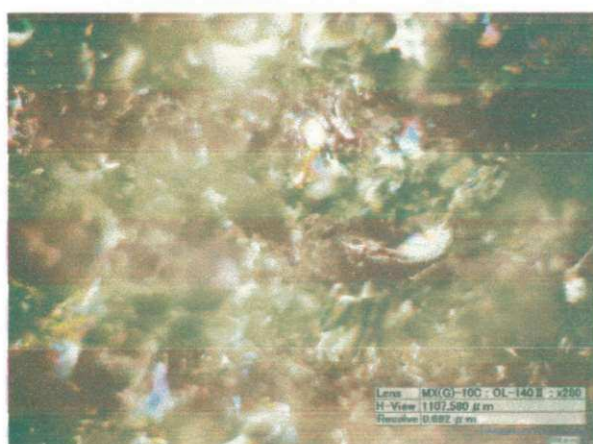
Figura 50: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana-genipina com concentração QTS1,5-GE15 (a-280x), QTS1,5-GE3 (b-280x) e QTS2-GE15 (c-280x), QTS2-GE3 (d-280x), submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C , taxa abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$)



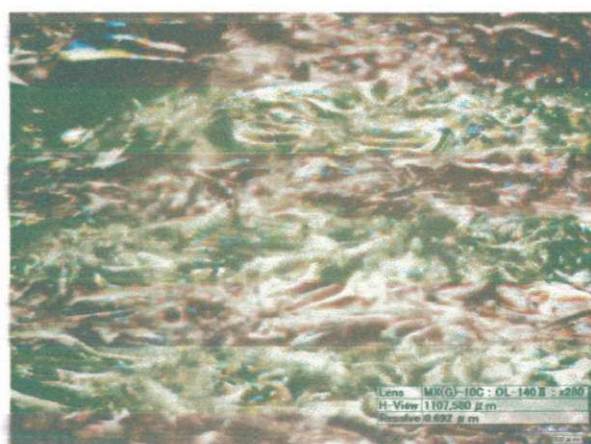
(a)



(b)



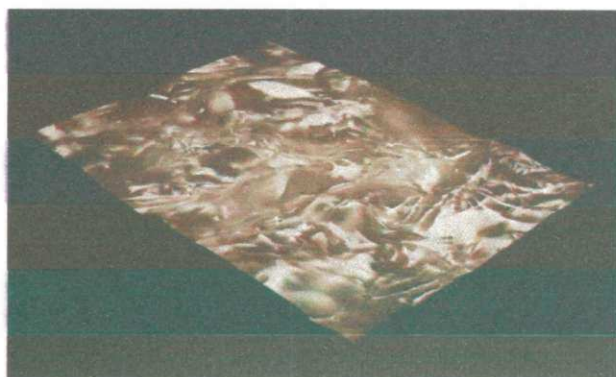
(c)



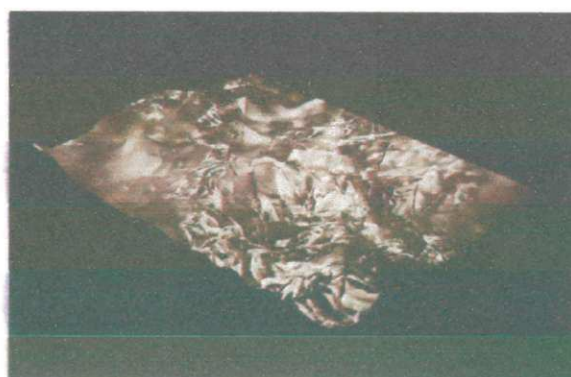
(d)

A Figura 51 apresenta as imagens obtidas para os arcabouços liofilizados com reticulação da quitosana através da genipina, em representação 3D.

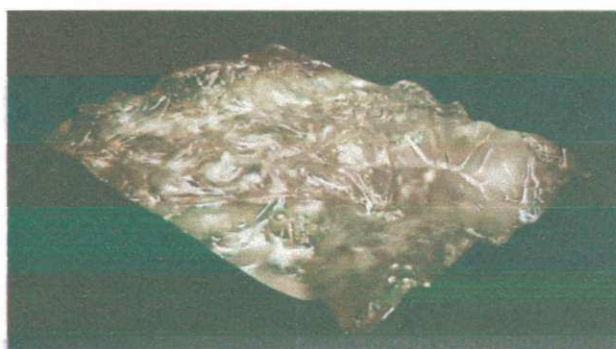
Figura 51: Microscopia ótica (MO) 2D das secções longitudinais dos arcabouços liofilizados de quitosana-genipina com concentração QTS1,5-GE15 (a), QTS1,5-GE3 (b) e QTS2-GE15 (c), QTS2-GE3 (d), submetidos a um estágio de congelamento muito lento (-20°C , taxa abaixo de $0,01^{\circ}\text{C/s}$)



(a)



(b)



(c)



(d)

Através das imagens 2D e 3D obtidas pode-se observar a formação estrutural dos arcabouços de quitosana reticulados com genipina em variadas concentrações. A imagem 50(a) mostra a presença de poros, enquanto a imagem 50(b) revela a presença de placas. Dessa forma, com o aumento da concentração de quitosana e genipina nos arcabouços é percebida a diminuição da quantidade de poros aparente. Esses resultados estão em consonância com aqueles obtidos através das micrografias por MEV.

Ainda, um aspecto importante identificado através dessas imagens é o incremento da fluorescência nos arcabouços. É percebido que com o aumento da concentração de genipina na estrutura, a fluorescência apresentada pelo material é atenuada.

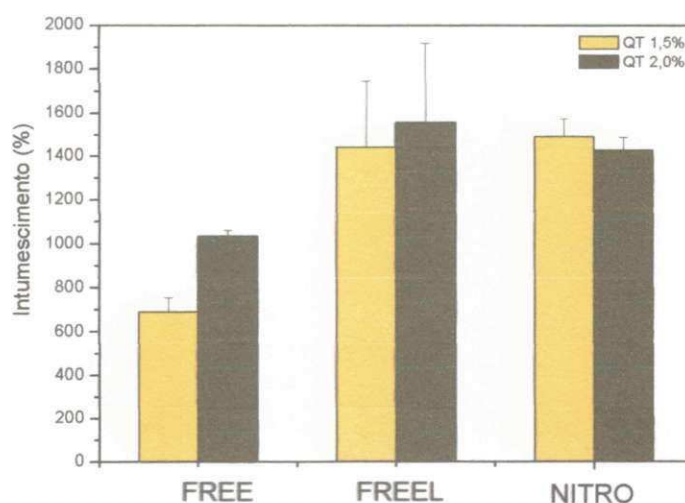
De acordo com *Chen et al.* (2005), os grupos amina primários da quitosana são os únicos alvos da reação com a genipina com potencial de gerar produtos fluorescentes. Dessa forma, pode-se aferir que a reação de reticulação através da formação de ligações covalentes foi efetiva nos arcabouços, e que o aumento da concentração de genipina e da concentração de quitosana induz a um maior número de reações do agente reticulante com as aminas do polissacarídeo, formando estruturas mais cristalinas e, conseqüentemente, com menor quantidade de poros aparentes. Esses resultados corroboram com os dados obtidos através das análises por FTIR, DRX e MEV nesta pesquisa, e com os resultados obtidos por Butley, Ng, Pudney (2003), *Chen et al.* (2005) e Bispo (2009).

5.2.5 Grau de Intumescimento

As Figuras 52 e 53 comparam a capacidade de intumescimento dos arcabouços de quitosana QTS1,5 e QTS2 em relação às taxas de congelamento e teor de reticulante.

Nota-se que todas as composições apresentaram alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução PBS, uma vez que absorvem mais água do que seus próprios pesos, isto é, valores individuais >100%. Essa capacidade pode ser atribuída tanto à hidrofiliabilidade quanto à manutenção das suas estruturas 3D (TIĞH; KARAKEÇILI; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2007). É possível observar que há um significativo aumento no grau de intumescimento dos arcabouços com o aumento da velocidade de congelamento, devido a uma maior regularidade na estrutura porosa com formação de poros menores e mais uniformes. Essa estrutura consegue reter uma maior quantidade de água em seu interior.

Figura 52: Porcentagem de intumescimento dos arcabouços de quitosana QTS1,5 e QTS2, submetidos a estágios de congelamento muito lento (-20 °C, taxa abaixo de 0,01 °C/s), lento (-20 °C, taxa entre 0,01 °C/s e 0,06°C/s) e rápido (0,06 °C/s a 50 °C/s)



A Figura 52 apresenta o grau de intumescimento dos arcabouços QTS1,5 e QTS2 submetidos a diferentes taxas de congelamento. Como pode-se perceber, tanto no congelamento muito lento (FREE) como no congelamento lento (FREEL), o arcabouço de quitosana preparado com concentração 2 % apresentou maior valor de intumescimento do que o preparado com 1,5 %.

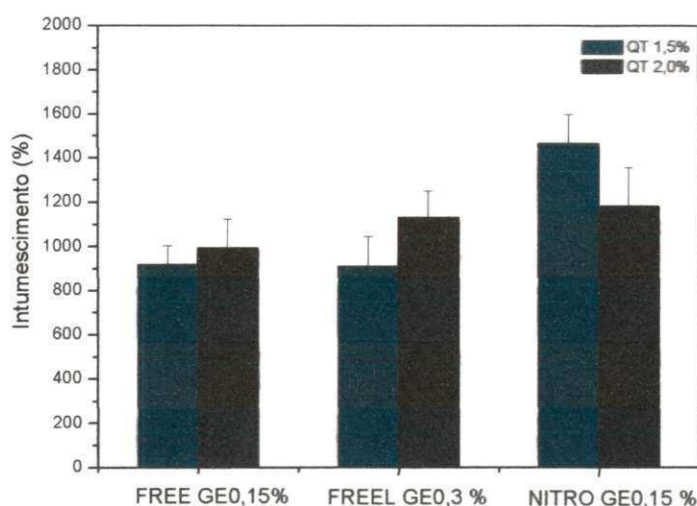
Entre esses arcabouços não houve diferenças significativas na morfologia que possa estar ligada com a quantidade de água aprisionada nos poros. Logo, esse comportamento pode ser atribuído à presença dos grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares, e que se apresentam em maior quantidade com o aumento da concentração da quitosana.

Como visto, esses grupos têm uma grande influência sobre o montante de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no arcabouço interfere significativamente na quantidade absorvida. Segundo Assis e Silva (2003), mesmo para a solução tampão a tendência de aumento da concentração com acréscimos no ganho de massa é observada.

No caso do congelamento com nitrogênio o arcabouço QTS2 sofre uma pequena redução no grau de intumescimento em relação ao arcabouço QTS1,5, atribuído à influência da morfologia.

A Figura 53 apresenta o grau de intumescimento dos arcabouços processados com diferentes concentrações de genipina e congelados às temperaturas de -20 °C (taxa muito lenta) e -196 °C (taxa rápida).

Figura 53: Porcentagem de intumescimento dos arcabouços de quitosana-genipina QTS1,5-GE15, QTS1,5-GE3, QTS2-GE15 e QTS2-GE3, submetidos a estágios de congelamento muito lento e rápido



Comparando os valores de intumescimento dos arcabouços com e sem adição de genipina, pode-se observar que a adição do reticulante altera, mas não de forma significativa, a capacidade de absorção de água. Esse resultado está relacionado com a formação de reação fraca entre a quitosana e a genipina em meio ácido, conforme descrito nos resultados das análises por FTIR.

Além disso, pode-se perceber que o aumento da concentração de genipina para arcabouços com concentração de quitosana iguais, gerou um acréscimo na diminuição do grau de intumescimento. Mi, Shuy e Peg (2005) em suas pesquisas, sugerem que a condição do pH pode ter um impacto sobre o ataque nucleofílico do grupo amino da quitosana ao carbono C-3 da genipina. Esse impacto pode levar à formação de diferentes extensões da reação para a solução de quitosana-genipina

reticulada os quais, por sua vez, podem influenciar suas propriedades de intumescimento.

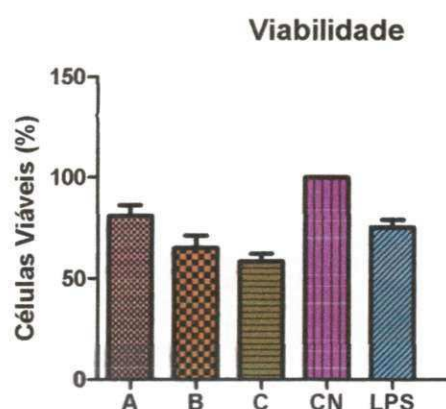
A influência mais significativa da concentração de genipina ocorreu no arcabouço QTS2-GE15, congelado em nitrogênio líquido, fator que potencializou esse comportamento.

5.2.6 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Este teste foi realizado no intuito de avaliar a viabilidade das células na presença dos arcabouços de quitosana reticulados com genipina. Nessa etapa, foram analisados arcabouços fabricados com quitosana proveniente do fabricante Sigma-Aldrich, congelados à temperatura de -20°C em taxa de congelamento muito lenta (abaixo de $0,001^{\circ}\text{C/s}$).

Os percentuais de viabilidade celular obtidos para os arcabouços podem ser observados na Figura 54.

Figura 54: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços. A – QTP2%FREE, B – QTP2%GE015%FREE e C – QTP2%GE0,3%FREE, LPS – controle positivo, CN – controle negativo



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na penúltima coluna

(CN=controle negativo). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 5 animais e 3 arcabouços de cada composição por animal.

A viabilidade das células expostas aos arcabouços foi acima de 80 % para a amostra A, e acima de 50 % para as amostras B e C. A resposta das células macrofágicas à amostra A apresenta um percentual acima do controle positivo (LPS) o que indica o caráter não-citotóxico da quitosana. As amostras B e C, compostas por quitosana e genipina, apresentam um percentual acima de 50 % que, de acordo com Bispo (2009), é o valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade. Pode ser percebido que, com o aumento da concentração de genipina na amostra, houve redução mínima da resposta viável das células.

Dessa forma, os resultados obtidos para os arcabouços corroboram com as pesquisas desenvolvidas por Bispo (2009) e Muzzarelli (2009), que indicam a genipina como agente reticulante favorável à interação com tecidos celulares.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho objetivou a produção e caracterização de arcabouços de quitosana e a avaliação do efeito da reticulação com genipina. A análise dos resultados das caracterizações propostas permitiu se chegar às seguintes conclusões:

- As análises por Difração de Raios X confirmaram as alterações sofridas na cristalinidade da quitosana com a variação da concentração do biopolímero e do agente de reticulação (genipina), indicando estruturas menos amorfas com o aumento das concentrações.
- A técnica de espectroscopia na região do infravermelho identificou todas as bandas características da quitosana independentemente da taxa de congelamento, da liofilização e da neutralização aplicados. A efetividade da neutralização foi identificada através do decréscimo na absorção referente ao grupo amina (1546 cm^{-1}) e do aumento da absorção referente ao grupo C-H (2920 cm^{-1}). Os espectros evidenciaram a interação entre os grupos funcionais reativos da quitosana e do agente reticulante através das mudanças nas absorções nas regiões entre $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, dos picos correspondentes à amida II (1546 cm^{-1}) e das ligações glicosídicas da quitosana ($800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$).
- O estudo morfológico dos arcabouços realizado por Microscopia Eletrônica de Varredura revelou a formação de uma arquitetura tridimensional com poros e/ou canais interconectados, influenciada pela taxa de congelamento e concentração da solução, e pela adição do agente de reticulação. Foi possível perceber que as soluções congeladas em taxa lenta apresentaram maior número de poros interconectados e de tamanhos variados, e que a reticulação diminuiu significativamente essa formação. Em todas as composições os arcabouços apresentaram poros de tamanhos variados e majoritariamente maiores que $100\text{ }\mu\text{m}$, sendo, portanto considerados

materiais em potencial para aplicação em engenharia de tecidos cartilaginosos.

- As análises por Microscopia Ótica confirmaram os resultados observados através das micrografias eletrônicas de varredura e indicaram a efetividade da reticulação através dos pontos de fluorescência revelados.
- Os arcabouços apresentaram alta capacidade de intumescimento em todas as composições, ainda que a adição da genipina não tenha reduzido essa capacidade de retenção. Essa característica foi influenciada tanto pela arquitetura quanto pela concentração de quitosana dos arcabouços.
- Os ensaios de MTT e NO revelaram que os arcabouços de quitosana e quitosana-genipina são biocompatíveis.

Dessa forma, a técnica de *freeze drying* utilizada demonstrou ser efetiva para a obtenção de estruturas porosas de quitosana, e versátil devido à possibilidade de manipulação de variáveis experimentais. Os resultados mostraram que a alteração da concentração da solução de quitosana, da taxa de congelamento e a adição de diferentes concentrações do agente reticulante (genipina) modificam as propriedades gerais dos arcabouços produzidos.

REFERÊNCIAS

- AIMOLI, C. G. *Investigação da adequação de membranas de quitosana quimicamente modificadas para uso como biomaterial: estudo da calcificação in vitro*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2007.
- ANTONINO, N. A. *Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana*. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.
- ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Registro Brasileiro de Transplantes. São Paulo: Lado a Lado - Serviços de Comunicação Ltda, v. 2, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Registro Brasileiro de Transplantes. São Paulo: Lado a Lado - Serviços de Comunicação Ltda, 2011.
- AUSTIN, K. Scaffold design: use of chitosan in cartilage tissue engineering. *MMG 445 Basic biotechnology e-journal*, v.3, 62-66, 2007.
- AZEVEDO, V.; CHAVES, S.; BEZERRA, D.; LIA FOOK, M.; COSTA A. Quitina E Quitosana: Aplicações Como Biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, 2007.
- BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n.1, p. 13-21, 2005.
- BARBOSA, R. C. *Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fístula ruminal*. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 2011, 119 p.
- BENYUS, Janine M. *Biomimicry: Innovation Inspired by Nature*. New York: Perennial, 2002.
- BERGER, J.; REISTT, M.; MAYER, J.M.; FELTT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52, 2004.
- BISPO, V. M. *Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. 2009. 206f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BHARDWAJ, T.; PILLIAR, R.M.; GRYNPAS, M.D.; KANDEL, R.A. Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, V. 57(2), p. 190–199, 2001.

BITTENCOURT, R. A. C. *Cultura de condrócitos para o uso terapêutico: reconstituição de cartilagem*. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2008.

BURG, K. J. L.; ORR, D. E. An overview of bioresorbable materials. In: *Degradation rate of bioresorbable materials*. Ed. Buchanan, F., Woodhead Publishing Materials: New York, 2008.

BUTLER, M. F.; NG, Y.-F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. v. 41, n. 24, p. 3941–3953, 2003.

CAMERON, R. E.; KAMVARI-MOGHADDAM, A. Synthetic bioresorbable polymers. In: *Degradation rate of bioresorbable materials*. Ed. Buchanan, F., Woodhead Publishing Materials: New York, 2008.

CAMPANA-FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p.644–650, 2007.

CALLISTER, W. D. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. LTC: Rio de Janeiro, 2002.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Artliber, 2002.

CHAVES, K. C. B.; MARQUES, L.G.; FREIRE, J.T. Determinação das curvas de congelamento em freezer convêncional e nitrogênio líquido da pimenta “dedo-demoça”. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.

CHEN, H.; OUYANG, W.; LAWUYI, B.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *J Biomed Mater Res A*. v. 75; n. 4, p. 917–27, 2005.

CHEN, M.-C.; LIU, C.-T.; TSAI, H.-W.; LAI, W.-Y.; CHANG, Y.; SUNG, H.-W. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. *Biomaterials*. v. 30, p. 5560–5571, 2009.

CHUNG, C.; BURDICK, J.A. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, p. 243–262, 2008.

CHUNG, H. J.; PARK, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 59, p. 249-262, 2007.

CORRELO, V. M.; GOMES, M.E.; TUZLAKOGLU, K.; OLIVEIRA, J.M.; MALAFAYA, P.B.; MANO, J.F.; NEVES, N.M.; REIS, L.R. Tissue engineering using natural polymers. In: *Byomedical polymers*. Ed. Jenkins, M. Woodhead Publishing Ltda.: Cambridge, 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical. *Progress in polymer science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric essay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Method*. v. 89, p. 271-277, 1986.

DUTTA, J.; DUTTA, P. K. Antimicrobial Activity of Chitin, Chitosan and Their Oligosaccharides. In: *Chitin, chitosan, oligssaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. Ed. Kim, S.-K. Taylor & Francis Group: B R, 2011.

DOMARD, A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate polymers*. v. 84, p. 696-703, 2011.

FARACH-CARSON, M.; WAGNER, R. C.; KIICK, K. L. Extracellular matrix: structure, function, and applications to tissue engineering. In: *Tissue engineering*. Ed. Fischer, J.P.; Mikos, A. G.; Bronzino, J.D. Taylor & Francis Group: B R, 2007.

FIDÉLES, T. B. *Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial*. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

FIOROTTI, J. L. *Obtenção De Quitosana A Partir De Resíduos Na Indústria Pesqueira Aracruz*. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, Faculdade de Aracruz. Espírito Santo, 2009.

FRANKS, F. *Freeze-drying of pharmaceutical and biopharmaceuticals: principles and practice*. RSC Publishing: Cambridge, 2007.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GOUGH, J. E. Cartilage tissue engineering. In: *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Ed. Boccaccini, A. R.; Gough, J. E. Taylor & Francis Books: B R, 2007.

GRIFFON, J. D.; SEDIGUI, M. R.; SCHAEFFER, D. V.; EURELL, J. A.; JOHNSON, A. L. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, v.2, p. 313-320, 2006.

HARRISON, K. Introduction to polymeric scaffolds for tissue engineering. In: *Byomedical polymers*. Ed. Jenkins, M. Woodhead Publishing Ltda.: Cambridge, 2007.

HENNIG, E. L. *Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons Fe^{3+}* . Dissertação (Mestrado) Mestrado em química tecnológica e ambiental, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.

HSHIEH, C.-Y.; TSAI, S.-P.; HO, M.-H.; WANG, D.-M.; LIU, C.-E.; HSIEH, C.-H.; TSENG, H.-C.; HSHIEH, H.-J. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. *Carbohydrate polymers*, v.67, p. 124-132, 2007a.

HSHIEH, W.-C.; CHANG, C.-P.; LIN, S.-M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Coloids and surfaces B: biointerfaces*, v. 57, 250-255, 2007.

HOLANDA, A. L. *Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização*. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2011, 113 p.

HUANG, Y.; ONYERI, S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; MADIHALLY, S. V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, 7616-7627, 2005.

JOHNSON, R.M.; MWAIKAMBO, L.Y.; TUCKER, N. Biopolymers. *Rapra Review Reports*. v. 14, n. 3, 2003.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial arcabouços and osteogenesis. *Biomaterials*, v. 26, p. 5474-5491, 2005.

KARANDE, T. S.; AGRAWAL, C. M. Functions and requirements of synthetic scaffolds in tissue engineering. In: *Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold*. Ed. LAURENCIN, C. T.; NAIR, L.S. Taylor & Francis Group: B R, 2008.

KIM, I.-N.; SEO, S.-J.; MOON, H.-S.; YOO, M.-K.; PARK, I.-Y.; KIM, B.-C.; CHO, C.-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 1-21, 2008.

KIM, S.; NIMNI, M. E.; YANG, Z.; HAN, B. Chitosan/Gelatin-Based Films Crosslinked by Proanthocyanidin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. v. 75, n. 2, p. 442-50, 2005.

KOO, H.-J.; SONG, Y.S.; KIM, H.-J.; LEE, Y.-H.; HONG, S.-M.; KIM, S.-J.; KIM, B.-C.; JIN, C.; LIM, C.-J.; PARK, E.-H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology*. v. 495, p. 201-208, 2004.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: citotoxily versus cytoprotection – how, why, when, and where? *No Biol Chem*, v. 1, p. 107-120, 1997.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LI, Y.; WANG, Y.; WU, D.; ZHANG, K.; HU, Q. A facile approach to construct three-dimensional oriented chitosan scaffolds with in-situ precipitation method. *Carbohydrate Polymers*. v. 80, p. 408-412, 2010.

LIMA, I.S.; RIBEIRO, E.S.; AIROLDI, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. *Quim. Nova*, v. 29, n. 3, p. 501-506, 2006.

LIMA, R. S. C. *Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina*. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

LU, J. X.; PRUDHOMMEAUX, F.; MEUNIER, A.; SEDEL, L.; GUILLEMIN, G. Effects of chitosan on rat knee cartilages. *Biomaterials*, v. 20, p. 1937-1944, 1999.

LUCAS, F.E.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de Polímeros*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2001.

MAGALHÃES JÚNIOR, 2007. *Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos*. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007, 96 p.

MELO, K.G.P.C. *Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e o-carboximetilquitosana*. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

MI, F.-L.; SHYU, S.-S.; PENG, C.-K. Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and pH-Dependent Cross-linking Reactions between Chitosan and Genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. v. 43, n. 10, p. 1985-2000, 2005.

Ministério da Saúde. Transplantes. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1004>. Acesso em: 17 de julho de 2011.

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M.; GIL, M. H. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules*. v. 8, p. 3823-3829, 2007.

MOROZ, A. *Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 1-9, 2009.

NEHRER, S.; BREINAN, H.A.; RAMAPPA, A.; YOUNG, G.; SHORTKROFF, S.; LOUIE, L.K. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, v. 18(11), p. 769-76, 1997.

NORIEGA, S.E.; SUBRAMANIAN, A. Consequences of Neutralization on the Proliferation and Cytoskeletal Organization of Chondrocytes on Chitosan-Based Matrices. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 2011, 2011.

NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds. *Materials*, v. 2, p. 374-398, 2009.

PECK, M.; DUSSERRE, N.; McALLISTER, T.N.; L'HEUREUX, N. Tissue engineering by self-assembly. *Materialstoday*, v. 14, n. 5, 2011.

PITOMBO, R. M. N. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. In: SBPC Ciência e Cultura, p. 427-431, 1989.

REN, D.; YI, H.; WANG, W.; MA, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of *n*-acetylation. *Carbohydrate research*, v. 340, n. 15, p. 2403-2440, 2005.

RENHE, I. R. T. *Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (Genipa americana L.)*. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008, 49p.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, v. 31, p. 603-632, 2006.

RINKI, K.; DUTTA, P.K. Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 261-266, 2010.

SANTOS, M.H.; VALERIO, P.; GOES, A.M.; LEITE, M.F.; HENEINE, L.G.D.; MANSUR, H.S. Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites doped with Zn²⁺. *Biomedical Materials*, v. 2, p. 135-141, 2007.

SANTOS JR, A. R. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, p. 308-317, 2007.

SENEDESE, A. L. C. *Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva*. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2011.

SHE, Z.; JIN, C.; HUANG, Z.; ZHANG, B.; FENG, Q.; XU, Y. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 19, p. 3545-3553, 2008.

SHI, D. *Introduction to Biomaterials*. Tsinghua University Press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: London, 2006.

SILVA, M. L. A.; CRAWFORD, A.; MUNDY, J. M.; CORRELO, V. M.; SOL, P.; BHATTACHARYA, M.; HATTON, P. V.; REIS, L.R.; NEVES, N.M. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: Assessment of extracellular matrix formation. *Acta biomaterialia*, v.6, p. 1149-1157, 2010.

STEVES, M.P. *Polymer Chemistry an introduction*. 3 ed. Oxford university Press, 1999.

SUH, J.-K. F.; MATHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v. 21, 2589-2598, 2000.

SUNG, H. W.; HUANG, R. N.; HUANG, L. L. H.; TSAI, C. C.; CHIU, C. T. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal Biomedical Materials Research*, v. 47, p. 116-126, 1999.

TABATA, Y. Significance of release technology in tissue engineering. *DDT*, v.10, n.23/24, p. 1639-1646, 2005.

TİGH, R. S.; KARAKEÇİLİ, A.; GÜMÜŞDERELİOĞLU, M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J Mater Sci: Mater Med*. v. 18, p. 1665-1674, 2007.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. *Material science of chitin and chitosan*. Kodansha Ltd.: Tokyo, 2006.

VEISEH, M.; TURLEY, E. A.; BISSEL, M. J. Top-down analysis of a dynamic environment: extracellular matrix structure and function. In: *Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold*. Ed. LAURENCIN, C. T.; NAIR, L.S. Taylor & Francis Group: B R, 2008.

VISSER, S. A.; HERGENROTHER, W.; COOPER, S. Polymers. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*, Academic Press, p. 50-60. 1996.

WEINBERG, J.B.; MISUKONIS, M.A.; SHAMI, P.J.; MASON, D.L.; SAUIS, W.A.; DITTMAN, E.R.; WOOD, G.K.; SMITH, B.; McDONALD, K.E.; BACHUS, A.F.; HANEY, GRANGER, D.L. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase

(iNOS): Analysis of iNOS mRNA, iNOS protein bioprotein, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, p. 2941-2953, 2008.

YAJIMA, E. M.; ZANIN, G.M.; CAVALCANTI, O.A. Caracterização Térmica de Filmes Isolados de Gelatina-Quitosana Modificados com Genipina. *Lat. Am. J. Pharm.* v. 29, n. 3, p. 436-42, 2010.

YANG, F.; ELISSEEFF, J. H. Cartilage tissue engineering. In: *Tissue engineering*. Ed. Fischer, J.P.; Mikos, A. G.; Bronzino, J.D. Taylor & Francis Group: B R, 2007.

YANG, B.; LI, X.; SHI, S.; KONG, X.; GUO, G.; HUANG, M.; LUO, F.; WEI, Y.; ZHAO, X.; QIAN, Z. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate polymers*, v. 80, p. 860-865, 2010.

YANG, F.; NEELEY, W. L.; MOORE, M. J.; KARP, J. M.; SHUKLA, A.; LANGER, R. Tissue engineering: the therapeutic strategy of the twenty-first century. In: *Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold*. Ed. LAURENCIN, C. T.; NAIR, L.S. Taylor & Francis Group: B R, 2008.

YIN, Y.; YE, F.; CUI, J.; ZHANG, F.; LI, X.; YAO, K., "Preparation and characterization of Macroporous chitosan-gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering". *J Biomed Mater Res*. v. 67, p. 844-855, 2003.

YOO, J. S.; KIM, Y. J.; KIM, S. H.; CHOI, S. H. Study on Genipin: A New Alternative Natural Crosslinking Agent for Fixing Heterograft Tissue. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. v. 44; p. 197-207, 2011.

YOON, D.M.; FISHER, J.P.. Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications. In: *Tissue Engineering*. (Bronzino, ed.) CRC Press, Boca Raton, 2007.

YUAN, Y.; CHESNUTT, B. M.; UTTURKAR, G.; HAGGARD, W. O.; YANG, Y.; ONG, J. L.; BUMGARDNER, J. D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*. v. 68, p. 561-567, 2007.