

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

Ana Carolina Brasil Marcelino Fook

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS COMPÓSITOS
HA/BIOPOLÍMERO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Campina Grande, 2012

Ana Carolina Brasil Marcelino Fook

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS COMPÓSITOS
HA/BIOPOLÍMERO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande, 2012

F656d Fook, Ana Carolina Brasil Marcelino
Produção e caracterização de arcabouços compósitos HA/biopolímero
para engenharia de tecidos / Ana Carolina Brasil Marcelino Fook.
- Campina Grande, 2012.
137f.: Il.

Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e tecnologia.

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

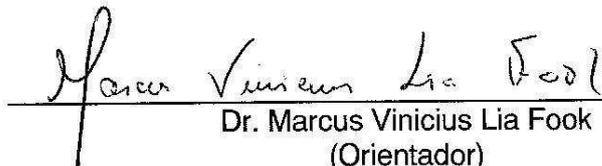
1. Engenharia de Tecidos. 2. Arcabouços. 3. Quitosana. 4. Gelatina.
5. Hidroxiapatita. 6. *Freeze Drying* 7. Procianidina. I. Título.

CDU 557.144.4 (043)

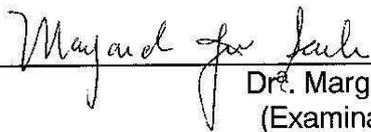
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS COMPÓSITOS
HA/BIOPOLÍMERO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS.

Ana Carolina Brasil Marcelino Fook

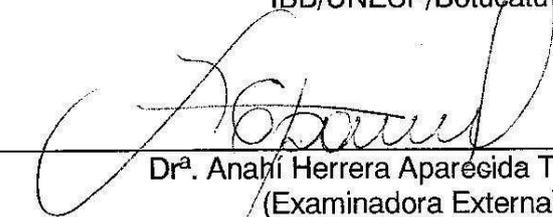
Tese Aprovada em 20/04/2012 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



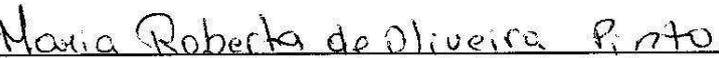
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMA/UFCG



Dr. Margarida Júri Saeki
(Examinadora Externa)
IBB/UNESP/Botucatu



Dr. Anahí Herrera Aparecida Thomazini
(Examinadora Externa)
Pesquisadora do IQ/UNESP/Araraquara



Dr. Maria Roberta de Oliveira Pinto
(Examinadora Externa)
DQ/CCT/UEPB



Dr. Lisiane Navarro de Lima Santana
(Examinadora Interna)
UAEMA/UFCG

Ao meu esposo, Márcio, companheiro e amigo,
pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos.



Aos meus filhos, Daniel e Rafael, presentes de Deus, pelo
mais puro e sincero amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir desfrutar da vida com saúde e paz. Obrigado pela família e pelos amigos que me cercam de carinho.

Aos meus pais Marcelino e Vânia, pelo amor, dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida e aos meus irmãos Leonardo e Gustavo pelo carinho e convivência harmoniosa; À minha avó Dalva Brasil (In Memoriam) e minha tia Mirtes por fazerem parte da minha vida; À todos os meus familiares que sempre torceram por minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pelas contribuições, confiança e compreensão, fatores que foram essenciais para a realização desse trabalho.

Aos amigos do Grupo de Biomateriais da UFCG, Thiago, Rossemberg, Greyce, Glória, Carmem, Izabel, Anna Sylvia, Eva, Maria Eduarda, Waldênia, Adriana, Roberta Meira, Wladimir, Márcio, Klaydson, Rita, Ítalo, Imarally, João Paulo, Lúcia Helena, Katilaine, Aracelle, Hugo, Emanuel, Hygo, Geanne, Daniel, Rosemary e Vieira pela convivência, carinho e incentivo. Agradeço a cada um que contribuiu direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Mário Eduardo R. M. C. Mata e Severina que viabilizou os primeiros experimentos utilizando o processo de liofilização no Laboratório de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas da UFCG.

Ao Doutorando Zoroastro Torres Vilar pela ajuda e orientação nos ensaios mecânicos conduzidos no Laboratório Multidisciplinar de Materiais e Estruturas Ativas – LAMMEA da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica (UAEM) da UFCG.

À Professora Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos que viabilizou os testes de citotoxicidade no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara-SP.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade, gentileza e contribuições.

Aos funcionários da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, em especial a Adriana, Sérgio, Geraldo, Kátia, Emanuel, Márcia, Mila, Violeta e André.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e ao corpo docente do Curso Engenharia de Materiais.

A CAPES pela bolsa concedida.

...lembrando-lhe que aquilo que você tem é maior do que aquilo que você quer e o que é urgente nem sempre é o mais importante.

Max Lucado

RESUMO

O desenvolvimento do campo da engenharia de tecidos objetiva a regeneração de tecidos danificados pela combinação de arcabouços porosos combinados com células, que agem como modelos para regeneração tecidual guiando o crescimento do novo tecido. Partindo desse princípio, este trabalho visou desenvolver arcabouços compósitos Hidroxiapatita (HA) e biopolímeros para utilização na engenharia de tecido ósseo, avaliando a relação entre as características físico-químicas, as propriedades mecânicas e a resposta biológica. Nesse sentido, arcabouços porosos constituídos de Quitosana/Gelatina e Quitosana/Gelatina/HA, com e sem reticulação com procianidina e glutaraldeído, foram confeccionados utilizando o processo *freeze-drying*. Os resultados revelaram a interação entre os componentes e a modificação significativa do intumescimento e das propriedades mecânicas dos arcabouços com a variação dos teores de gelatina, HA e do agente reticulante. Como consequência da reticulação química, nos ensaios de degradação *in vitro*, os arcabouços Quitosana/Gelatina mostraram-se totalmente biodegradáveis, entretanto, os arcabouços Quitosana/Gelatina/HA exibiram maior estabilidade durante a exposição nos meios estudados. Na avaliação da viabilidade celular todos os sistemas avaliados se mostraram não tóxicos e biocompatíveis. Desta forma, pode-se concluir que os arcabouços oferecem uma ampla faixa de escolha para potencialmente serem usados em aplicações biomédicas, tais como, biomaterial, veículo de liberação controlada de drogas e arcabouço para engenharia de tecido ósseo e cartilaginoso.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos, arcabouços, quitosana, gelatina, hidroxiapatita, *freeze drying*, procianidina.

ABSTRACT

The main purpose behind tissue engineering is the development of solutions to treat and regenerate body tissues, combining human cells with porous scaffolds to accommodate and guide the formation of the neo-tissue. Following this principle, the present work aimed the development of composite scaffolds with Hydroxyapatite (HA) and biopolymers, to use in tissue engineering, and assess the relationship between the physical, chemical, mechanical and biologic properties. A freeze-drying technique was used for the manufacture of porous scaffolds composed of Chitosan / Gelatin and Chitosan/Gelatin/HA, crosslinked with procyanidin and glutaraldehyde. The results revealed an interaction between components and also a change in the swelling and mechanical properties for different contents of Gelatin, HA and both crosslinkers. An *in vitro* degradation test was applied to the chemical crosslinked scaffolds, revealing that the Chitosan/Gelatin composition was totally biodegradable while the Chitosan/Gelatin/HA was more stable throughout the same test. Cell viability tests made for all compositions showed non toxicity and biocompatibility. With these results, it is possible to conclude that the produced scaffolds offer a wide range of choices in the biomedical field, such as, drug delivery systems and bone and cartilage regeneration solutions.

Keywords: Tissue Engineering, scaffolds, chitosan, gelatin, hydroxyapatite, freeze drying, procyanidin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1	Osso cortical e osso trabecular. Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na formação dos tecidos duros.	25
Figura 3.2	Representação esquemática da engenharia de tecidos. Populações de células específicas são isoladas e expandidas a partir do tecido apropriado e semeadas em um arcabouço biodegradável.	28
Figura 3.3	Estrutura da quitina e quitosana.	32
Figura 3.4	Estrutura química das unidades (a) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e (b) 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A proporção de grupos a e b distingue quitina de quitosana.	33
Figura 3.5	Exemplos de processamento da quitosana para aplicação na engenharia de tecidos.	35
Figura 3.6	Fórmula estrutural da molécula de gelatina	36
Figura 3.7	Estrutura representativa da procianidina. O "n" significa o número de unidades catequina (monômero). $n \geq 1$, oligômero procianidina.	39
Figura 3.8	Projeção no plano (001) da estrutura da hidroxiapatita.	43
Figura 3.9	Representação esquemática do processo de congelamento direcional. Cristais de gelo crescem em uma direção e os solutos (tais como partículas, moléculas poliméricas ou misturas destas) são excluídas e solidificadas entre os cristais.	45
Figura 4.1	Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa	50
Figura 4.2	(a) solução de quitosana, (b) solução gelatina, (c) mistura das soluções Q/G (1:1) e (d) solução vertida em placa de petri.	52
Figura 4.3	(a) Extrato de semente de uva, (b) Solução do extrato em meio aquoso e (c) arcabouço reticulado.	53
Figura 4.4	Esquema ilustrando o processo de obtenção dos arcabouços compósitos QG/HA.	54
Figura 4.5	Ensaio de compressão dos arcabouços	57
Figura 5.1	Difratograma de raios X da Quitosana em pó.	62
Figura 5.2	Difratograma de raios X da Gelatina em pó	63
Figura 5.3	Espectros de FTIR e estrutura química da quitosana (GD= 75-85%)	65
Figura 5.4	Espectros de FTIR e estrutura química da gelatina	65
Figura 5.5	Arcabouços Q (a), QG2 (b) QG5 (c) e QG10 (d) dispostos em placa de petri após processo de liofilização.	67
Figura 5.6	Difratogramas de raios X dos arcabouços QG	68
Figura 5.7	Espectros vibracionais de IV dos arcabouços QG: (a) Q, (b) QG2, (c) QG5, (d) QG10 e (e) G	69
Figura 5.8	Micrografias MEV do arcabouço Q: superfície (a), seção longitudinal (b) e seção transversal (c). (Imagem maior 80x; Imagem menor 500x)	70
Figura 5.9	Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG2 (a), QG5 (b) e QG10 (c).	72

	Superfície (I), seção longitudinal (II) e seção transversal (III).	
Figura 5.10	Curva típica de tensão-deformação uniaxial de um sólido elastomérico celular em compressão apresentando as regiões elástica linear, platô (colapso) e densificação, assim como o módulo elástico linear (E^*) e tensão elástica na região de colapso (σ^*_{el}).	73
Figura 5.11	Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos scaffolds quitosana/gelatina.	74
Figura 5.12	Grau de Intumescimento pelos arcabouços QG	75
Figura 5.13	Espectro de FTIR do extrato da semente de uva	76
Figura 5.14	Arcabouços QG5 e QG10 reticulados com PA (0,5%-a, 1%-b e 5%-c) e GA 0,5%(d).	77
Figura 5.15	Difratogramas de DRX dos arcabouços QG5 (a) e QG10 (b) reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%).	78
Figura 5.16	Espectros de IV dos arcabouços QG5 (a) e QG10 (b) reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%).	79
Figura 5.17	Micrografias MEV dos arcabouços QG5 reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%). Secção longitudinal (I) e Secção Transversal (II).	81
Figura 5.18	Micrografias MEV dos arcabouços QG10 reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%). Secção longitudinal (I) e Secção Transversal (II).	82
Figura 5.19	Grau de intumescimento dos arcabouços (b) reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%).	83
Figura 5.20	Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos arcabouços QG5%. (n=5)	84
Figura 5.21	Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos arcabouços QG10%. (n=5)	85
Figura 5.22	Comportamento de degradação dos arcabouços QG10% reticulados. (a) PBS e (b) PBS com concentração de lisozima. Média \pm D.P (n=3).	86
Figura 5.23	Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços Q, QG5 e QG5/PA5%. LPS-Controle positivo e CN – Controle negativo. Média \pm D.P. (n=8)	88
Figura 5.24	Arcabouços compósitos QG2 (a), QG5 (b) e QG10 (c)	89
Figura 5.25	Difratogramas de raios X dos arcabouços compósitos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.	90
Figura 5.26	Espectros de FTIR dos arcabouços compósitos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.	92
Figura 5.27	Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG2/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).	94
Figura 5.28	Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG5/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).	95
Figura 5.29	Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG10/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).	96
Figura 5.30	Micrografias MEV demonstrando a Interconectividade entre os poros.	97
Figura 5.31	Média do diâmetro dos poros dos arcabouços compósitos em função da proporção de HA. (n = 25)	98

Figura 5.32	Espectros de FTIR dos arcabouços compósitos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.	99
Figura 5.33	Efeito da incorporação da HA na porcentagem da absorção de água pelos arcabouços compósitos QG.	101
Figura 5.34	Arcabouços QG/HA reticulados com PA e GA. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA.	102
Figura 5.35	Difratogramas dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA	103
Figura 5.36	Espectros de IV dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA.	103
Figura 5.37	Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados com PA e GA.	104
Figura 5.38	Média do diâmetro dos poros dos arcabouços compósitos reticulados. (n=12)	105
Figura 5.39	Efeito da reticulação no grau de intumescimento dos arcabouços compósitos com PA (0,5%, 1% e 5%) e GA (0,5%).	107
Figura 5.40	Comportamento de degradação dos arcabouços QG10/30HA reticulados. (a) PBS e (b) PBS com concentração de lisozima. Média \pm D.P (n=3).	108
Figura 5.41	Amostra do arcabouço QG10/30HA reticulado com PA5% após 14 dias de ensaio de biodegradação no meio PBS/lisozima.	109
Figura 5.42	Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Fórmula e razão Ca/P das fases de apatita.	41
Tabela 3.2	Grupos substituintes dos sítios da apatita.	43
Tabela 4.1	Identificação dos arcabouços Q/G.	52
Tabela 4.2	Identificação dos arcabouços Q/G reticulados.	53
Tabela 4.3	Identificação dos arcabouços compósitos QG/HA	54
Tabela 4.4	Identificação dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados.	55
Tabela 5.1	Atribuições das frequências vibracionais observadas nos espectros de FTIR da quitosana e gelatina.	66
Tabela 5.2	Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 5.7.	69
Tabela 5.3	Resistência à compressão (σ_{10}) dos arcabouços	74
Tabela 5.4	Resistência à compressão (σ_{10}) dos arcabouços reticulados.	85
Tabela 5.5	Resistência à compressão dos arcabouços compósitos QG/HA.	100
Tabela 5.6	Influência da reticulação na resistência à compressão dos arcabouços QG5/3HA e QG10/30HA. Média \pm D.P. (n=5).	106

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
PLA	Ácido poliláctico
α	Alfa
H ₂ O	Água
ASTM	American Society for Testing and Materials
NH	Amina
Å	Ångström
<i>Arg-Gly-Asp</i>	Arginina-glicina-ácido aspártico
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
β	Beta
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
CTMh	Células-tronco mesenquimais humanas
cm	Centímetro
cP	Centipoise
Cu	Cobre
PEC	Complexo polieletrólito
CN	Controle negativo
Da	Dalton
ε	Deformação
∅	Diâmetro
DRX	Difração de Raios X
HA/TCP	Fosfato de cálcio bifásico
TCP	Fosfato tricálcico
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
γ	Gama
G	Gelatina
GAG	Glucosaminoglicano
GTA	Glutaraldeído
g	Gramma
°C	Graus Celcius
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de desacetilação
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroxiapatita
HA	Hidroxiapatita
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
IV	Infravermelho
ICDD	<i>International Center of Diffraction Data</i>
ISO	International Organization of Standardization
Ca ²⁺	Íon Cálcio
Sr ²⁺	Íon estrôncio
PO ₃ ⁻⁴	Íon Fosfato

OH ⁻	Íon hidroxila
Mg ²⁺	Íon magnésio
LPS	Lipopolissacarídeo
m	massa
MEC	Matriz extracelular
MPa	Megapascal
μA	Microampere
μL	Microlitro
μm	Micrometro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
E*	Módulo elástico linear
Mw	<i>Molecular weight</i> – Peso Molecular
nm	Nanometro
Pa	Pascal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salino
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PCO	Procianidinas oligoméricas
PA	Procianidinas ou proantocianidinas
kN	Quilonewton
kV	Quilovolt
Q	Quitosana
Ca/P	Razão cálcio/fósforo
SUS	Sistema Único de Saúde
σ*	Tensão elástica na região de colapso
σ	Tensão
Θ	Theta
3D	Tridimensional
TPP	Tripolifosfato de sódio
BCG	Vitrocerâmica bioativa
v	volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	GERAL	21
2.2	ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1	TECIDO ÓSSEO	23
3.1.1	COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES DO OSSO	24
3.2	ENGENHARIA DE TECIDOS	26
3.2.1	<i>Arcabouços</i>	<i>29</i>
3.3	<i>Biomateriais</i>	<i>31</i>
3.3.1	Polímeros Naturais.....	31
3.3.1.1	Quitosana	31
3.3.1.2	Gelatina.....	35
3.3.2	Cerâmicas bioativas.....	39
3.3.2.1	Fosfatos de Cálcio.....	40
3.4	<i>Processamento de arcabouços para engenharia de tecidos</i>	<i>44</i>
3.4.1	Freeze- Drying	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	MATERIAIS	48
4.2	LOCAL DA PESQUISA	48
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	49
4.3.1	ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	49
4.3.2	<i>Preparação dos arcabouços Quitosana (Q)/Gelatina (G)</i>	<i>51</i>
4.3.3.	<i>Preparação de arcabouços Quitosana (Q)/ Gelatina (G) reticulados</i>	<i>52</i>
4.3.4	<i>Preparação de Arcabouços Quitosana (Q)/Gelatina (G)/ Hidroxiapatita (HA) ..</i>	<i>54</i>
4.3.4.1	Co-precipitação da HA na solução polimérica.....	54
4.3.4.2	Preparação de arcabouços compósitos Quitosana (Q)/Gelatina (G)/Hidroxiapatita (HA) reticulados.....	55
4.3.5	<i>Neutralização dos arcabouços compósitos.....</i>	<i>55</i>
4.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	55
4.4.1	<i>Difração de raios-X (DRX).....</i>	<i>55</i>
4.4.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>56</i>
4.4.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>56</i>
4.4.4	<i>Resistência à compressão</i>	<i>56</i>
4.4.5	<i>Grau de Intumescimento</i>	<i>57</i>
4.4.6	<i>Ensaio de biodegradação in vitro enzimática.....</i>	<i>57</i>
4.4.7	<i>Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos.....</i>	<i>58</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS QUITOSANA (Q)/ GELATINA (G).....	62
5.1.1	<i>Matérias primas: Quitosana e Gelatina.....</i>	<i>62</i>
5.1.1.1	Difração de Raios X	62
5.1.1.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	63
5.1.2	<i>Avaliação Visual dos arcabouços Q/G.....</i>	<i>66</i>
5.1.3	<i>Difração de raios X.....</i>	<i>67</i>

5.1.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	68
5.1.5	<i>Morfologia dos arcabouços</i>	70
5.1.6	<i>Caracterização Mecânica dos arcabouços</i>	73
5.1.7	<i>Grau de Intumescimento</i>	75
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS QG RETICULADOS	76
5.2.1	<i>Caracterização do agente reticulante procianidina (PA)</i>	76
5.2.2	<i>Análise Visual dos arcabouços QG reticulados</i>	77
5.2.3	<i>Difração de raios X</i>	77
5.2.3	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	78
5.2.4	<i>Morfologia dos arcabouços QG reticulados</i>	79
5.2.5	<i>Propriedades Mecânicas dos arcabouços</i>	83
5.2.6	<i>Degradação in vitro</i>	85
5.2.7	<i>Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos</i>	87
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS QG/HA	88
5.3.1	<i>Análise Visual dos arcabouços compósitos QG/HA</i>	88
5.3.2	<i>Difração de raios x</i>	89
5.3.3	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	91
5.3.4	<i>Morfologia dos arcabouços QG/HA</i>	92
5.3.6	<i>Caracterização mecânica dos arcabouços</i>	99
5.3.7	<i>Grau de Intumescimento</i>	101
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS QG/HA RETICULADOS	102
5.4.1	<i>Análise visual dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados</i>	102
5.4.2	<i>Difração de raios X</i>	102
5.4.3	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	103
5.4.4	<i>Morfologia dos arcabouços QG/HA reticulados</i>	104
5.4.5	<i>Propriedades Mecânicas</i>	105
5.4.6	<i>Grau de intumescimento</i>	106
5.4.7	<i>Degradação in vitro dos arcabouços reticulados</i>	107
5.4.8	<i>Estudo de Viabilidade Celular dos arcabouços compósitos</i>	109
6	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	115

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Todos os dias milhares de procedimentos cirúrgicos são executados para substituir ou reparar tecidos que tenham sido danificados por patologias ou traumas. O desenvolvimento do campo da engenharia de tecidos objetiva a regeneração de tecidos danificados pela combinação de células do corpo com biomateriais na forma de arcabouços com alta porosidade, que agem como modelo para regeneração tecidual (O'BRIEN, 2011).

O reparo de tecidos e órgãos é tradicionalmente realizado de duas formas: enxerto de tecidos ou substituição por material sintético (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; GALEA *et al.*, 2008; VALLET-REGÍ e GONZALEZ-CALBET, 2004). O enxerto autógeno é a técnica utilizada normalmente e com melhores resultados do ponto de vista da osteogênese e apresenta a grande vantagem de não transmitir doenças infectocontagiosas, além da possibilidade de levar células osteoprogenitoras, juntamente com fragmentos ósseos, que atuam como condutores das células de reparo para o tecido lesado. Esse tipo de tratamento, no qual se obtém tecido ósseo do próprio paciente, apresenta limitações de uso, como, por exemplo, quantidade insuficiente e qualidade do tecido a ser removido; necessidade de um segundo sítio cirúrgico; o pós-operatório desagradável; a morbidade; o custo da internação e a possibilidade da ocorrência de sequelas. A utilização de enxertos autógenos exige, ainda, a existência de um banco de ossos, cuja manutenção demanda um alto custo (CALAPODOPULOS e VOLPON, 1994; OREFFO e TRIFFIT, 1999).

As técnicas utilizadas para regeneração/substituição óssea incluem não só a utilização de enxertos de origem animal ou humano, como também os materiais sintéticos (metais, polímeros e cerâmicas) na forma de placas, cimentos, grânulos ou estruturas tridimensionais para engenharia de tecidos (TORO, 2005). Os materiais sintéticos, em sua maioria, por sua restrita integração com o tecido, podem falhar com o tempo devido ao desgaste e fadiga, ou resposta adversa do corpo (MOROZ *et al.*, 2008). Os materiais comerciais utilizados para o reparo ou substituição de tecidos não conseguem atender todas as exigências químicas e estruturais, estimulando dessa forma, o desenvolvimento de novos biomateriais (SHEN *et al.*, 2010).

O material ósseo-substituto ideal deve aliar biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas. Apesar de ainda não existir um material que preencha todos esses requisitos, uma grande variedade de opções de materiais para enxertos ósseos tem sido desenvolvida, associada aos avanços nos conhecimentos científicos e tecnológicos nessa área (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As tendências mundiais em longo prazo (2020-2050) indicam foco na medicina diagnóstica e regenerativa. Materiais sintéticos, naturais ou híbridos nanoestruturados ou obtidos por rotas biotecnológicas, associados a terapias celulares, sistemas de liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) ou genes serão indispensáveis para a garantia da qualidade e da eficiência da assistência à saúde prestada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e pelo Sistema de Saúde Suplementar (CGEE, 2010).

Nesse contexto, a engenharia de tecidos, uma área relativamente nova da ciência dos biomateriais, objetiva mimetizar processos naturais para reparo de tecidos doentes. Os arcabouços (*scaffolds*) estão entre os componentes essenciais para o processo de regeneração, servindo como carreadores ou suportes para interações celulares, proporcionando ambiente semelhante ao da matriz extracelular (ISIKLI *et al.*, 2011; RAMAY e ZHANG, 2003; ZHAO *et al.*, 2006).

A composição e a arquitetura do arcabouço desempenham papéis cruciais na capacidade de colonização das células. Considerando a máxima eficiência, o material deve ser biocompatível e bioreabsorvível, cujos produtos da dissolução sejam metabolizados pelo organismo. No caso da engenharia de tecido ósseo, o material deve ser osteocondutor e, de preferência osteoindutor (SENGERS *et al.*, 2007). Quanto à arquitetura, um arcabouço deve ser tridimensional e altamente poroso com uma rede de poros interconectados para crescimento celular/tecidual e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos (BUCKLEY e O'KELLY, 2004). A porosidade aumenta a área superficial disponível para a justaposição osso-implante e a osseointegração, conseqüentemente, o período de ligação interfacial entre o implante e o osso é reduzido (VERCIK *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2005).

O desafio de projetar materiais compósitos inspirados em tecidos avançou na síntese de compósitos cerâmica/polímero com vantagens sobre qualquer cerâmica ou polímero utilizado individualmente, resultando em materiais de qualidade superior para aplicações específicas. Tradicionalmente, as cerâmicas de fosfato de cálcio

provaram ser materiais atraentes para aplicações biológicas. Entre estas biocerâmicas atenção especial tem sido dada à hidroxiapatita (HA) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (RAUCCI *et al.*, 2010). A HA favorece o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações com o tecido ósseo (bioativo). Porém, no estágio atual, os biomateriais a base de HA não podem ser utilizados em aplicações que requeiram sustentação, devido as suas baixas propriedades mecânicas (GALEA *et al.*, 2008).

Várias investigações têm sido realizadas buscando melhorar as propriedades mecânicas da HA, incorporando uma série de compostos orgânicos, tais como, gelatina, quitina, quitosana, colágeno e ácido poliláctico. Entre as propriedades exibidas por esses polímeros, destacam-se a biocompatibilidade e osteocondutividade, aspectos importantes que justificam o crescente interesse em aplicações biomédicas (RAMAY e ZHANG, 2003; ZHAO *et al.*, 2006; SENGERS *et al.*, 2007; BUCKLEY e O'KELLY, 2004).

Diversos materiais têm sido propostos como arcabouços na engenharia tecidual, porém é preciso aprofundar o estudo da interação dos materiais que compõem o arcabouço com células (tecido), além do ajuste da biodegradabilidade ou bioreabsorção. A proposta deste trabalho é a produção de arcabouços compósitos HA/biopolímeros para utilização na engenharia de tecido ósseo, avaliando a relação entre as características físico-químicas, propriedades mecânicas e a resposta biológica dos arcabouços.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir e caracterizar de compósitos hidroxiapatita/biopolímero para utilização como arcabouços para engenharia de tecidos.

2.2 Específicos

- Avaliar as características físico-químicas, microestruturais e mecânicas dos arcabouços Quitosana/Gelatina e dos compósitos Quitosana/Gelatina/Hidroxiapatita.
- Analisar os efeitos da adição do reticulante natural (procianidina) na formação dos arcabouços compósitos.
- Avaliar a biodegradabilidade *in vitro* em meio biológico simulado.
- Avaliar a biocompatibilidade por ensaios biológicos dos arcabouços.

Capítulo 3

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tecido Ósseo

O sistema esquelético, importante para o corpo biomecanicamente e metabolicamente, é composto de ossos individuais e de tecido conjuntivo. Os ossos constituem aproximadamente 20% do peso corporal, e diferem do tecido conjuntivo na rigidez e dureza. Estas características dos ossos são resultado da impregnação dos sais inorgânicos pela matriz, que consiste de fibras colágenas, e uma grande variedade de proteínas não colagenosas e minerais (MOTA *et al.*, 2008; JEE, 2001). A rigidez e dureza dos ossos do esqueleto permitem manter a forma do corpo; servem de suporte para as partes moles e protegem os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano; Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004); Determina a direção e a extensão dos movimentos do corpo. O osso atua como um ponto de ancoragem para a maior parte dos músculos esqueléticos e ligamentos. Quando os músculos contraem, os ossos longos agem como alavancas, e as juntas funcionam como eixos, originando o movimento do corpo (PARK *et al.*, 2006). Atua como uma parte importante na homeostase de cálcio, visto que 99% deste mineral encontrado em todo organismo, está presente no tecido ósseo, o qual atua como um verdadeiro reservatório de cálcio (KAPANEN, 2002; MORAES JÚNIOR, 2002).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). As células são os *osteócitos*, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os *osteoblastos*, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia; e os *osteoclastos*, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos. As células ósseas se localizam dentro do próprio tecido ósseo ou no estroma conjuntivo da medula óssea, rico em células mesenquimais pluripotenciais indiferenciadas (FERNÁNDEZ -TRESGUERRES-HERNÁNDEZ -GIL *et al.*, 2006).

3.1.1 Composição, estrutura e propriedades do osso

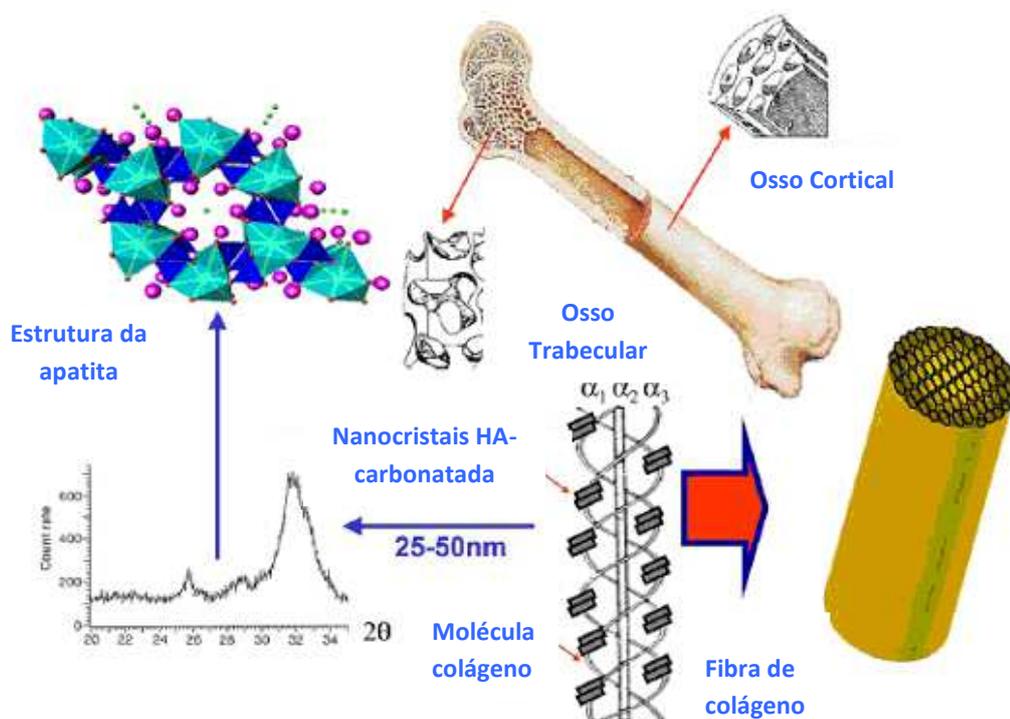
O osso humano é um material compósito constituído de fase orgânica e inorgânica. A fase inorgânica compreende 60-70% do peso do tecido ósseo e é composta de um fosfato de cálcio apatítico organizado em cristais de hidroxiapatita carbonatada. Estes se encontram distribuídos entre as fibras de colágeno formando, assim, feixes impregnados por partículas iônicas (SINHA *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2008).

A fase orgânica é composta de matéria orgânica e água. O colágeno do tipo I constitui de 80% a 90% do componente orgânico do osso. Como se trata de uma proteína fibrosa estrutural, o colágeno oferece ao osso força e flexibilidade. O colágeno também oferece espaços para a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (WILLEMS *et al.*, 2008; STRATES *et al.*, 1997). Cada molécula de colágeno é um bastão pequeno e rígido formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias alfa (α). Essa estrutura protéica justifica as propriedades mecânicas dos colágenos: rigidez, solidez e estabilidade (VARGAS *et al.*, 1997). As moléculas de colágeno apresentam cerca de 300 nm de comprimento e 1.2 nm de espessura. O colágeno do tipo I do osso é muito rico em ligações cruzadas, que impedem sua extração com facilidade.

Além de colágeno, a matriz orgânica apresenta outros componentes não colagenosos, tais como, a osteocalcina, osteonectina, osteopontina, etc., que estão presentes em pequenas quantidades, mas importantes na estrutura e metabolismo ósseo. Essas proteínas podem influenciar nos eventos associados à remodelação óssea, tais como o recrutamento, a adesão, a diferenciação e atividade das células ósseas (INGRAM *et al.*, 1993; MACHADO DO REIS *et al.*, 2008). Como proteínas estruturais, as proteínas não colagenosas também contribuem para a integridade mecânica do osso, incluindo dureza, força e flexibilidade (ROY *et al.*, 2001; KAVUKCUOGLU *et al.*, 2009). A água é distribuída ao longo do osso em três formas principais: livremente móvel em espaço vascular-lacunar-canalicular, ligada à superfície da rede de colágeno e a fase mineral, e como hidroxila de outras moléculas. A água, juntamente com a fase mineral e o colágeno, desempenha um papel importante nas propriedades mecânicas do osso (WANG *et al.*, 2010; JEE, 2001).

Na composição da fase mineral dos ossos encontram-se principalmente os íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_3^{-4}) na forma de cristais de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], contendo frações de carbonato, magnésio, flúor, citrato e estrôncio incorporados dentro da rede cristalina ou absorvidas pela superfície do cristal (WANG *et al.*, 2010; JEE, 2001). Esses cristais apresentam dimensões variando de 30-50 nm de comprimento, 15-30 nm de largura e 2-10 nm de espessura e estão depositados de forma ordenada em pequenas lacunas intersticiais presentes entre as moléculas de colágeno, conforme Figura 3.1. A deposição dos nanocristais apatíticos ocorre através de um processo controlado de biomineralização envolvendo mais de 200 proteínas ácidas diferentes. Essas proteínas agem como inibidores, nucleadores ou suportes para o crescimento epitaxial de nanocristais ancorados no colágeno (OLSZTA *et al.*, 2007; VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004). A superfície livre dos cristais está envolta por substância fundamentalmente amorfa. Os íons da superfície dos cristais atraem água e formam uma capa de hidratação, que permite trocas de íons com o fluido extracelular (GARTNER; HIATT, 2003).

Figura 3.1: Osso cortical e osso trabecular. Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na formação dos tecidos duros.



Fonte: Adaptada de VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004.

As propriedades mecânicas do osso resultam da combinação da dureza da fase inorgânica e elasticidade da fase orgânica. Esta superposição de materiais heterogêneos com propriedades inteiramente diferentes resulta na formação de um nanocompósito, no qual as propriedades físico-químicas e mecânicas superam as dos componentes individuais. O osso pode remodelar-se e adaptar-se ao esforço mecânico aplicado, isto é, a aplicação de uma tensão mais elevada resulta em um osso mais denso (KATTI, 2004).

Os ossos são caracterizados por sua composição, estrutura cristalina, morfologia, tamanho de partícula e orientação (VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004). A composição do tecido ósseo varia com a espécie, a idade, o tipo estrutural e se este foi ou não acometido por alguma doença (TAKAMORI, 2004). Independentemente de sua anatomia macroscópica, todos os segmentos do esqueleto são constituídos por uma camada externa de osso cortical (osso compacto) e uma zona interior (osso trabecular), que contém medula óssea (BONUCCI, 2000).

O osso cortical é uma massa densa e sólida, com apenas canais microscópicos. Aproximadamente 80% da massa óssea no esqueleto humano adulto é osso cortical, que constitui a parede exterior de todos os ossos e é o grande responsável pela função de apoio e proteção do esqueleto (JEE, 2001). O osso cortical se estrutura em condutos de Havers recobertos por lâminas em disposição concêntrica onde estão situados os osteócitos e é caracterizado por pouca atividade metabólica e poucas células. (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006; MORAES JÚNIOR, 2002). Os 20% restantes da massa óssea é o osso esponjoso, uma estrutura tridimensional interconectada conhecida como trabécula, cada uma apresentando aproximadamente 200 μm de espessura. O osso trabecular tem uma porosidade entre 75%-95% com poros interligados e cheios de medula óssea, tendo a função de receber cargas e responder rapidamente às necessidades fisiológicas (JEE, 2001; MARTIN, 1998).

3.2 Engenharia de Tecidos

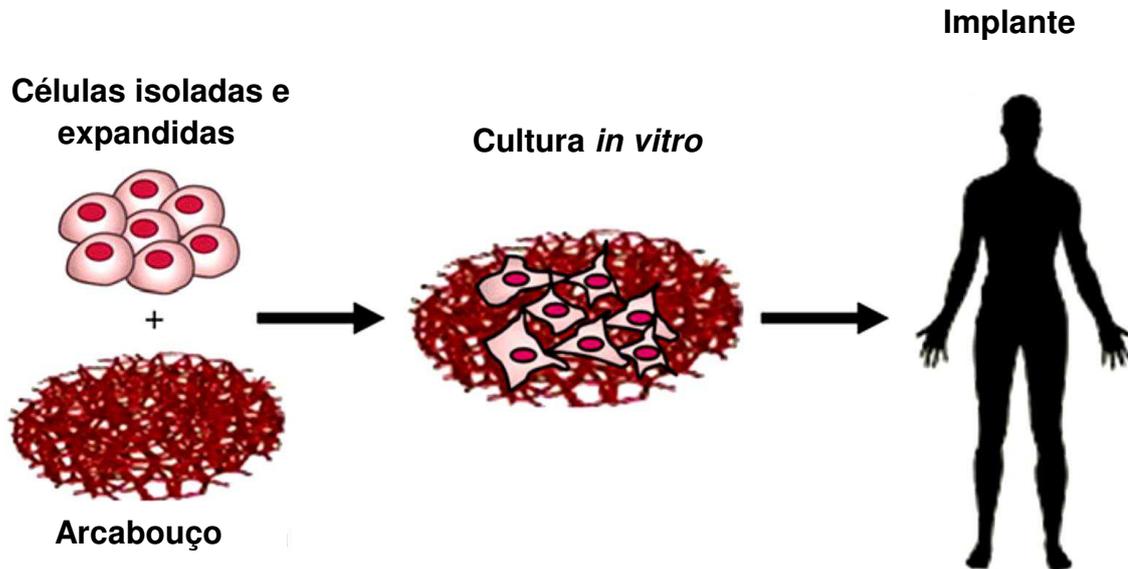
A engenharia de tecidos é um campo científico e tecnológico em rápido crescimento que objetiva criar, reparar e ou substituir tecidos e órgãos usando

combinações de células, biomateriais e ou moléculas biologicamente ativas (GOMES e REIS, 2004, STOCK e VACANTI, 2001, MOROZ *et al.*, 2008).

A engenharia de tecidos emergiu em 1990 para corrigir as limitações do enxerto de tecidos e uso de materiais sintéticos (MOROZ *et al.*, 2008). Ao induzir o crescimento e regeneração do tecido natural, a função do implante já não se limita a uma função estática, como um apoio estrutural, mas é capaz de proporcionar um ambiente propício para crescimento ósseo e pode ser totalmente substituído (biodegradáveis) pelos tecidos naturais ao longo de um tempo desejado (WANG *et al.*, 2010). Isso envolve o entendimento fundamental de relações entre estrutura e função em tecidos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou aumentem a função tecidual (ARMENTANO, 2010).

Se for bem sucedido, as limitações existentes nas terapias de enxerto ósseo podem ser completamente contornadas. Atualmente, existem três abordagens amplamente aceitas na engenharia de tecidos: uma é usar arcabouços degradáveis, tridimensionais e porosos para fornecer suporte mecânico, com reparo dependente do próprio corpo, para o recrutamento e migração das células do hospedeiro para o arcabouço e essas se diferenciarem em tecidos do fenótipo desejado, enquanto há a substituição do arcabouço degradável (CHEN *et al.*, 2007; SCHANTZ *et al.*, 2003; TYLER e MCCOBB, 1980). Outro é o de extrair as células apropriadas de um paciente, cultura de células *in vitro*, e em seguida, transplantar as células cultivadas de volta para o paciente (KULAKOV *et al.*, 2008; PENG e HUARD, 2004; REDLICH *et al.*, 1999). A última abordagem é a cultura de células de pacientes em um arcabouço tridimensional pré-formado *in vitro* e o transplante do sistema célula-arcabouço (CARSTENS *et al.*, 2005; HOWARD *et al.*, 2008; TABATA, 2003). De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos segue as seguintes etapas: Seleção e processamento do arcabouço; Inoculação da população celular sobre o arcabouço; Crescimento do tecido prematuro; Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (biorreator); Reimplante cirúrgico; Assimilação do produto (Figura 3.2).

Figura 3.2- Representação esquemática da engenharia de tecidos. Populações de células específicas são isoladas e expandidas a partir do tecido apropriado e semeadas em um arcabouço biodegradável.



Fonte: Adaptada de GUALANDI, 2011.

O grande desafio na pesquisa de engenharia de tecidos é criar um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação das células em tecidos funcionais. Três elementos são inevitáveis para o sucesso da engenharia tecidual: os arcabouços, as células e o ambiente em que os sistemas célula-arcabouço são cultivados e condicionados (WANG *et al.*, 2010). Nesse ambiente, combinações de sinais bioquímicos e biofísicos devem ser apresentadas para as células em uma estrutura tridimensional de forma que permita interações celulares com células vizinhas e com a matriz extracelular (MAROLT *et al.*, 2010)

Embora células tenham sido cultivadas ou crescidas fora do corpo por muitos anos, a possibilidade de crescer tecidos tridimensionais complexos, reproduzindo literalmente o design e função do tecido humano, é um desenvolvimento recente. A engenharia de tecidos tem a intenção de cultivar todo tipo de tecido humano - fígado, osso, músculo, cartilagem, vasos sanguíneos, músculos do coração, nervos, ilhotas de pâncreas e mais. Pele, comercialmente produzida, já está disponível para uso no tratamento de pacientes com úlceras diabéticas e queimaduras (HENCH *et al.*, 2006).

3.2.1 Arcabouços

Arcabouços tridimensionais servem como substratos temporários para suportar e guiar a formação tecidual em diferentes ambientes de regeneração de tecidos *in vitro* e *in vivo* (LUO *et al.*, 2007). Como meio apropriado, os arcabouços devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tóxica ou sistêmica, ter propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação, ser material de fácil produção ou aquisição e purificação e possuir compatibilidade com a substância química e com soluções aquosas em condições fisiológicas (OLSSON, 2008).

Longe de serem componentes passivos, o material escolhido e o *design* poroso da arquitetura do arcabouço são fatores cruciais no sucesso da regeneração do tecido. Um arcabouço bem sucedido deve prover sustentação mecânica ao mesmo passo que promove o transporte em massa, e ainda, degradar-se de maneira que o tecido regenerado assuma suas funções. As propriedades do arcabouço incluem: o tamanho, distribuição e forma dos poros; rugosidade da superfície; a presença de sítios de adesão celular; e biomecânica dos materiais constituintes e da estrutura do arcabouço (MOROZ *et al.*, 2008).

O tamanho dos poros é uma questão muito importante porque, se os poros forem muito pequenos, poderá ocorrer a oclusão dos poros pelas células. Isso evitará a penetração celular, produção da matriz extracelular e a neovascularização nas áreas internas do arcabouço (SALGADO *et al.*, 2004). Se os poros forem muito grandes podem tornar o material do implante frágil. Além disso, mesmo micromovimentos do implante (que são difíceis de evitar), geralmente na interface, podem cortar o suprimento de sangue para o tecido e causar complicações, tais como, morte tecidual, inflamação e destruição da estabilidade interfacial (DEVILLE *et al.*, 2006; HENCH, 1991).

Em geral, os arcabouços mais adequados para a formação óssea são aqueles com poros grandes e interconectados (que facilitam a infiltração celular e deposição da matriz), superfícies internas rugosas, que facilitam a fixação da célula, e produzidos com materiais osteocondutores (tais como a proteína do osso e hidroxiapatita), e com propriedades mecânicas semelhantes aos de osso nativo (habilitados a suportar carga e estimular a osteogênese). Os recursos adicionais de

interesse incluem estrutura anisotrópica, capacidade de vascularização e processabilidade em formas anatomicamente corretas (MAROLT *et al.*, 2010).

O osso é um compósito natural com uma estrutura altamente hierarquizada, e é um tecido dinâmico capaz de auto-regeneração ou auto-remodelação ao longo da vida. Assim, o enxerto ósseo sintético ideal deveria ter uma ampla gama de propriedades e características semelhantes às dos ossos naturais e /ou ser projetado para estimular ou ajudar na regeneração dos tecidos. As principais tarefas da engenharia de tecido ósseo são fabricar sistemas de arcabouços funcionais que possam mimetizar o tecido natural e garantir o sucesso da regeneração do tecido recuperando suas funções normais (SOMMERFELDT e RUBIN, 2001; RODAN, 1992). Neste sentido, utiliza arcabouços de materiais biocompatíveis/bioreabsorvíveis que podem ser combinados com as células provenientes de várias fontes e fatores de crescimento para garantir a regeneração tecidual adequada e oportuna (SHIKINAMI *et al.*, 2006).

Quando um arcabouço é implantado no osso, os poros tornam-se preenchidos primeiro com sangue, como coágulos, depois com as células mesenquimais osteoprogenitoras, em seguida, após cerca de 4 semanas, trabéculas ósseas. Esses novos ossos remodelam-se em resposta ao estresse mecânico. O processo de crescimento ósseo para dentro do arcabouço depende do grau de estabilidade mecânica nas fases iniciais. Se o movimento for demasiado ocorre o crescimento de um tecido colagenoso e não do tecido ósseo (CRUZ, 2010).

Após a seleção de arcabouços com características desejáveis, as células com potencial osteogênico adequado também são decisivas para um processo de regeneração de tecidos bem sucedido. As células podem ser obtidas do paciente (autólogo), outro doador humano (alogenico), e outra espécie (xenogénica). As células autólogas são as mais desejáveis em termos de questões legais e imunorejeição. Todas as outras fontes de célula certamente apresentam problemas com relação à rejeição pelo sistema imunológico e outros problemas genéticos (WANG *et al.*, 2010). Atualmente, quatro tipos de células têm sido estudados para aplicações na engenharia de tecido ósseo: células da medula óssea (CONNOLLY, 1995; SOLTAN *et al.*, 2009), células-tronco mesenquimais (FILHO CERRUTI *et al.*, 2007; KULAKOV *et al.*, 2008), as células musculares (BUENO *et al.*, 2009; GOODELL *et al.*, 2001) e as células-tronco embrionárias (HANDSCHEL *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2008).

3.3 Biomateriais

Tipicamente, três grupos individuais de biomateriais são usados na fabricação de arcabouços para engenharia de tecidos: polímeros naturais, polímeros sintéticos e cerâmicas (O'BRIEN, 2011).

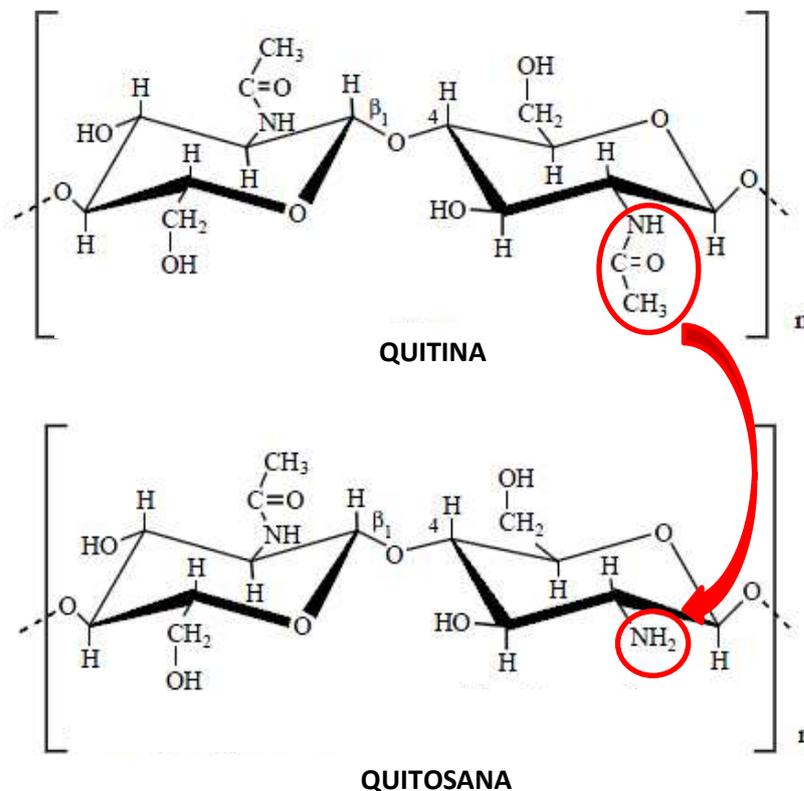
3.3.1 Polímeros Naturais

Derivados de fontes renováveis, tais como, plantas, animais e microorganismos, os polímeros naturais utilizados como arcabouços oferecem vantagens devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, apresentam componentes similares a matriz extracelular (MEC) nativa, que podem também evitar o estímulo de inflamação crônica ou reações imunológicas e toxicidade, geralmente detectada com polímeros sintéticos. (GRIFFITH *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2010; MANO *et al.*, 2005). Os polissacarídeos (quitina, quitosana, ácido hialurônico, alginato, amido etc), as proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, etc) e poliésteres naturais produzidos por bactérias (polihidroxibutirato, polihidroxivalerato, etc.) destacam-se na aplicação em engenharia de tecidos e liberação controlada de fármacos, com diferentes topografias, quer como materiais puros ou em combinação com polímeros sintéticos ou substâncias inorgânicas (BALAJI *et al.*, 2012; SHE *et al.*, 2008; KIM; SALIH, 2005).

3.3.1.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação parcial da quitina, conforme Figura 3.3. A quitina é o segundo mais abundante polissacarídeo natural, após a celulose. É biodegradável, não tóxico e encontrado no ambiente marinho como microfibrilas cristalinas ordenadas formando componentes no exoesqueleto de artrópodes e nas paredes celulares de alguns fungos e bactérias. É usualmente obtida do descarte de processamento de alimentos provenientes do mar, principalmente das cascas de caranguejos, camarões e lagostas (GUINESI *et al.*, 2007; JAYAKUMAR, 2010).

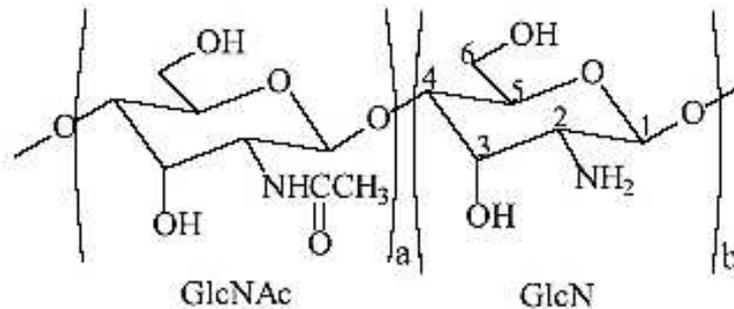
Figura 3.3- Estrutura da quitina e quitosana.



Fonte: Adaptado de MANO *et al.*, 2007.

Quimicamente, quitina e quitosana estão proximamente relacionadas desde que ambas são polissacarídeos lineares contendo as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (*GlcNAc*) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (*GlcN*) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, conforme Figura 3.4. A proporção de unidades *GlcNAc* em relação às de *GlcN* é definida como grau de acetilação (*GA*) do biopolímero e diferencia quitina ($GA > 0,5$) de quitosana ($GA \leq 0,5$) (GUINESI *et al.*, 2007). A quitina com um grau de desacetilação (*GD*) de 65-70% ou acima é geralmente conhecida como quitosana. A quitosana exibe uma variedade de propriedades físico-químicas e biológicas dependentes da massa molar e grau de desacetilação. A massa molar da quitosana comercial pode variar entre 10,000 - 2 milhões Dalton (Da) e o *GD* usualmente encontra-se numa faixa entre 66-95%. Esses valores da massa molar e *GD* podem sofrer alteração através de mudanças nas condições de reação durante a produção da quitosana (ŞENE e; MCCLURE, 2004; SONIA e SHARMA, 2011).

Figura 3.4- Estrutura química das unidades (a) 2-acetamido-2-desoxi-Dglicopiranosose (GlcNAc) e (b) 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A proporção de grupos a e b distingue quitina de quitosana.



Fonte: GUINESI *et al.*, 2007.

A quitosana é considerada como um material funcional apropriado para aplicações biomédicas por sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-antigenicidade e propriedades de adsorção. Reações anti-inflamatórias ou alérgicas não têm sido observadas em humanos sujeitos a aplicação local, implantação, injeção e ingestão. A habilidade da quitosana propiciar o ataque e proliferação celular é atribuída às suas propriedades químicas. A estrutura química da quitosana é similar aos glicosaminoglicanos, o maior componente da matriz extracelular do osso e cartilagem (THEIN-HAN e MISRA, 2009).

A quitosana pode ser degradada enzimaticamente pela quitinase, quitosanase, e pectinase (TSAI *et al.*, 2007). Esta também pode ser degradada *in vivo* pela lisozima, normalmente produzida pelos macrófagos, e os produtos de degradação são não tóxicos (ŞENEL e MCCLURE, 2004; PETER *et al.*, 2010). A taxa de degradação da quitosana é relativamente lenta, podendo ser modificada através do controle do grau de desacetilação. Um alto grau de desacetilação produz uma baixa taxa de degradação (KOYANO *et al.*, 1998; CHATELET *et al.*, 2001).

A presença dos grupos amino no polímero quitosana torna-o positivamente carregado e solubilizado por protonação em meios com valor de $\text{pH} < 6$ (TSAI *et al.*, 2007). A natureza catiônica da quitosana permite a formação de um complexo polieletrólito (PEC) com polímeros de carga oposta, tais como polissacarídeos (alginato, sulfato de condroitina, etc), proteínas (colágeno, gelatina, etc) glicosaminoglicanos (ácido hialurônico) e ácidos poliamínicos (poli-L-lisina, ácido poliaspártico, etc) via grupos aniônicos carboxílicos ou sulfatos. Dessa forma, complexos polieletrólitos (PECs) podem ser definidos como uma associação de

complexos formada entre partículas de cargas opostas (exemplo polímero-polímero, polímero-fármaco e polímero-fármaco-polímero), devido à interação eletrostática entre poliões de carga oposta (SALEEM *et al.*, 2010).

Vários estudos relatam a combinação da quitosana com uma grande variedade de materiais, além dos já citados anteriormente, tais como hidroxiapatita, fosfato de cálcio, poli metilmetacrilato (PMMA) e fatores de crescimento para potencial aplicação na ortopedia. Quitina e quitosana apresentam inerentemente reduzidas propriedades mecânicas. Por essa razão, a quitina pode ser utilizada como substituto ósseo para reparo e reconstrução óssea apenas com adição de biomateriais tais como, hidroxiapatita (HA), vitrocerâmica bioativa, etc, com intuito de melhorar sua propriedade mecânica; a quitosana é um polímero que pode oferecer grandes vantagens quando utilizado com fosfatos de cálcio, por suas propriedades elastoméricas. A quitosana tem sido utilizada com compostos de fosfato de cálcio granulares, produzindo um arcabouço moldável e autoendurecido (CHOW, 2009).

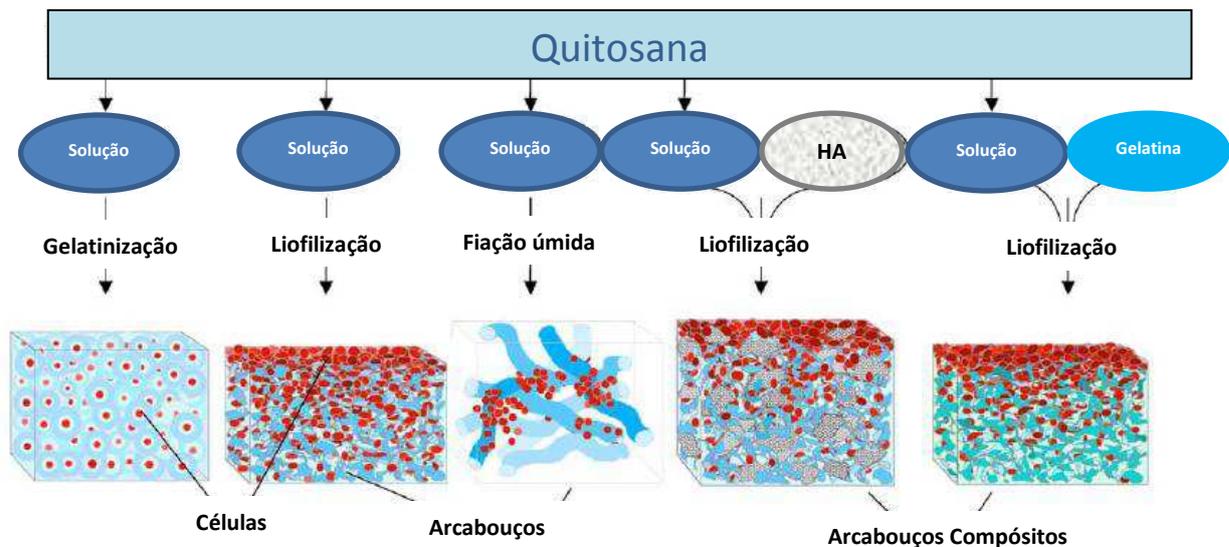
Outras vantagens dos suportes porosos de quitosana para engenharia de tecido ósseo incluem a formação de suportes altamente porosos com poros interconectados, osteocondutividade e habilidade de intensificar a formação óssea *in vitro* e *in vivo* (THEIN-HAN e MISRA, 2009).

De forma geral, a quitosana oferece amplas possibilidades para engenharia de tecidos (HU *et al.*, 2004). Matrizes para cultura celular podem ser desenvolvidas na forma de géis, esponjas, fibras, arcabouços porosos com incorporação de cerâmicas ou outros materiais poliméricos, tais como, colágeno ou gelatina, no intuito de ajustar propriedades químicas e comportamento mecânico de acordo com o tecido de aplicação (Figura 3.5) (CHENITE *et al.*, 2000; JIANKANG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2005; RISBUD *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2009). Estudos prévios tem mostrado que a gelatina exibe importantes características para engenharia de tecidos tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e alta resistência à tração (HUANG *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2002).

Com uma estrutura similar aos glicosaminoglicanos (GAGs) e ao colágeno, o complexo polieletrólito (PEC) derivado da interação entre quitosana e gelatina tem sido usado na confecção de arcabouços, mimetizando a matriz extracelular natural, para engenharia de tecido ósseo e cartilaginosa, e pele artificial (ZHAO *et al.*, 2002; XIA *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2011). Da mesma forma que as células progenitoras de osteoblastos e condrócitos, postula-se que as células-tronco

mesenquimais humanas (CTMh) responderão positivamente aos scaffolds biomiméticos produzidos a partir do PEC de quitosana e gelatina (ZHAO *et al.*, 2006).

Figura 3.5 – Exemplos de processamento da quitosana para aplicação na engenharia de tecidos.



Fonte: Adaptada de DI MARTINO *et al.*, 2005.

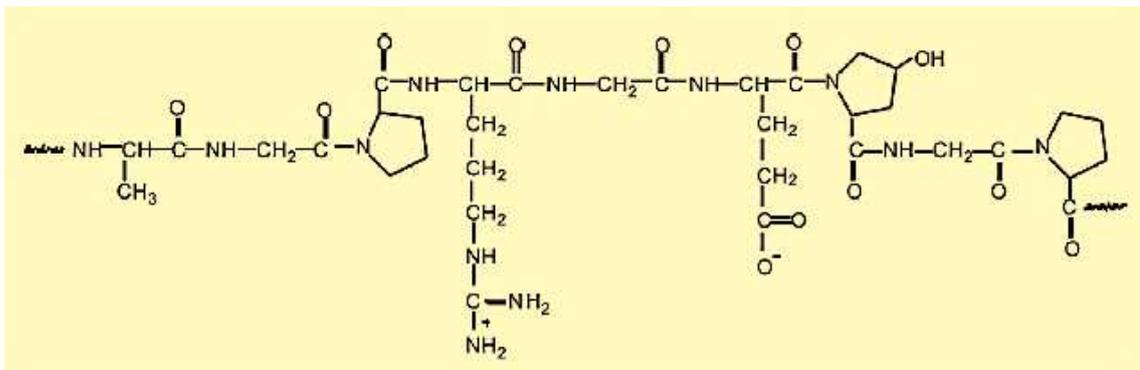
3.3.1.2 Gelatina

A Gelatina é uma proteína solúvel derivada da desnaturação parcial do colágeno. O colágeno é a proteína mais difundida no corpo ocorrendo na pele, cartilagem, osso e tecido conectivo e constitui a maior parte das matrizes extracelulares nos animais; No entanto, o colágeno apresenta antigenicidade devido a sua origem animal (LIEN *et al.*, 2010). Assim como o colágeno, a gelatina apresenta boa biocompatibilidade e osteocondutividade e como biomaterial possui vários atrativos, entre eles, a não-antigenicidade em condições fisiológicas e, além disso, é completamente reabsorvida *in vivo*. Suas propriedades de adesividade e plasticidade tornam a gelatina uma matriz adequada para compósitos cerâmicos (LIU *et al.*, 2006). A gelatina apresenta grande potencial para aplicações na

engenharia de tecido ósseo, porque contém um alto grau de grupos funcionais biológicos.

A gelatina é uma proteína purificada obtida por hidrólise ácida parcial (Tipo A) ou hidrólise alcalina parcial (Tipo B) do colágeno animal e pode ser constituída por uma mistura dos dois tipos. Sua estrutura química está ilustrada na Figura 3.6.

Figura 3.6- Fórmula estrutural da molécula de gelatina



Fonte: PEÑA *et al.*, 2010.

O processo de conversão do colágeno em gelatina envolve várias etapas de lavagem, depuração, tratamento e outras, que culminam na obtenção de um produto alimentício desidratado de cor amarelo-claro. Juntamente com a água a gelatina forma um gel coloidal semi-sólido. A degradação por hidrólise utiliza ácidos ou bases fortes e envolve o rompimento da estrutura tripla hélice terciária do colágeno e redução do peso molecular produzindo a gelatina que é solúvel em água morna (BIGI *et al.*, 2004). Após a hidrólise, a gelatina é purificada e seca produzindo um pó (BATICH; LEAMY, 2003).

A gelatina é atualmente utilizada na indústria farmacêutica na forma de cápsulas e microesferas; selantes para próteses vasculares; como mantas absorventes para uso cirúrgico; como curativos e adesivos (RUNGSIYANONT *et al.*, 2010; BIGI *et al.*, 2004).

Em temperatura de aproximadamente 40°C, as soluções aquosas de gelatina estão no estado sol e sofrem gelatinização quando resfriadas a temperatura ambiente. A transformação sol-gel ocorre devido à transição ordem-desordem

conformacional das cadeias da gelatina que formam regiões termoreversíveis pelas ligações entre as hélices em zonas de conexão estabilizadas por ligações de hidrogênio (BIGI *et al.*, 2004; BIGI *et al.*, 2002).

A qualidade da gelatina para uma aplicação particular depende de suas propriedades reológicas. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial da gelatina, além das propriedades físico-químicas (composição, solubilidade, transparência, cor, odor e gosto), são a resistência do gel e estabilidade térmica (temperaturas de gelificação e fusão). Para padronização, a medição da resistência do gel é determinada usando um teste denominado “*Bloom*”, permitindo assim que a resistência do gel seja expressa no “valor bloom”. Tanto a resistência do gel quanto a termoestabilidade são largamente dependentes das propriedades moleculares da gelatina, especialmente no que diz respeito a dois principais fatores: a composição de aminoácidos e a distribuição de peso molecular (condições de processamento) (STAINSBY, 1987; WAINEWRIGHT, 1977; GÓMEZ-GUILLÉN, TURNAY ET AL., 2002).

3.3.1.2.1 Reticulação da gelatina

Recentemente, os biomateriais constituídos de gelatina têm sido aplicados como pele artificial, enxertos ósseos, e arcabouços para engenharia de tecidos. No entanto, a principal limitação da gelatina em aplicações na engenharia de tecidos é a solubilidade apresentada em ambientes aquosos à temperatura do corpo humano de aproximadamente 37°C (LIEN *et al.*, 2010). Em aplicações biomédicas de longa duração, o método para corrigir essa limitação é a reticulação, que aumenta tanto a estabilidade mecânica quanto térmica do material (PORTO *et al.*, 2006).

Os métodos de reticulação física incluem tratamento hidrotérmico e radiação ultravioleta e gama. Contudo, devido ao grande número de grupos funcionais que possui a gelatina, a reticulação química também é uma alternativa. Isso é usualmente executado utilizando reagentes bifuncionais como glutaraldeído (GTA) e diisocianatos, além de carbodiimidas, compostos poliepóxi e acil-azida (MA *et al.*, 2003).

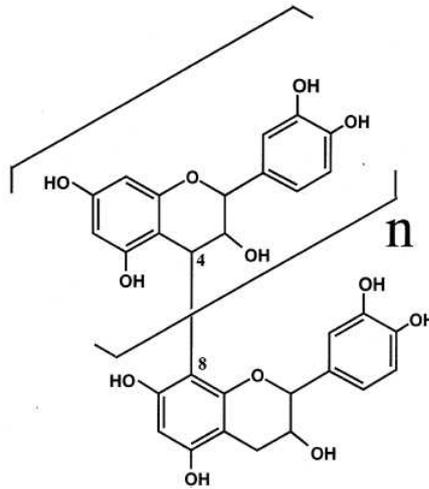
O GTA é o agente mais intensamente utilizado, devido a sua eficiência na estabilização dos biomateriais a base de colágeno, apesar de apresentar alguma citotoxicidade e calcificação local em implantes de longo período (BIGI *et al.*, 2002).

É conhecido que o GTA reage com o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina na proteína formando ligações covalentes, que induzem a formação de reticulações intercadeias e resultam na estabilidade da matriz contra a degradação química e enzimática e alteração das propriedades. Em alguns casos, resíduos desse agente podem ser removidos através da secagem do material tratado a 100°C, como também pelo tratamento com bissulfito de sódio (NARBAT *et al.*, 2006). Essa é a razão da busca crescente por um agente de reticulação capaz de formar produtos reticulados estáveis e biocompatíveis, sem problemas adicionais de citotoxicidade.

A genipina, um agente reticulante natural, extraído do fruto da *Gardenia jasminoides Ellis*, tem se destacado como alternativa para reticulação de tecidos celulares e acelulares, assim como biomateriais incluindo microesferas de gelatina, compósitos alginato-quitosana e hidrogéis de polietileno glicol (MA *et al.*, 2003; SUNG *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; MOFFAT; MARRA, 2004; SUNG *et al.*, 1998). Um estudo realizado por YAO e colaboradores (2004) utilizando a genipina como reticulante no desenvolvimento de compósito biodegradável a base de gelatina e fosfato tricálcico mostra que a reação de reticulação no compósito foi completa utilizando uma concentração de genipina de 0,5%. No entanto, a concentração de genipina deve ser < 0,5% para prevenir citotoxicidade.

As procianidinas (PA), principais componentes das proantocianidinas, são polifenóis naturais encontrados em frutas, vegetais, sementes, flores e cascas, e atuam como agentes reticulantes naturais ainda pouco utilizados. Estas estão presentes em concentrações relativamente importantes em frutos (uvas, maçãs, etc.) bebidas derivadas, no cacau e chocolate, entre outros. As PAs constituem os polifenóis majoritários das uvas encontrando-se na sua maioria nas sementes, nas películas e no engaço. Eles são comumente adotados como antioxidantes naturais e protetores cardiovasculares. PAs são membros da categoria dos taninos condensados, que compreendem estruturas altamente hidroxiladas que podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas, conforme Figura 3.7 (SANTOS-BUELGA *et al.*, 2000; SOUQUET *et al.*, 1996; BRAVO, 1998; TEIXEIRA, 2002). Diferente do GTA, a reticulação de proteínas com PAs envolve a formação da ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila fenólico e a carbonila da amida da proteína (DONGMO *et al.*, 2001; BLAZSO *et al.*, 1997).

Figura 3.7- Estrutura representativa da procianidina. O “n” significa o número de unidades catequina (monômero). $n \geq 1$, oligômero procianidina.



Fonte: YAMAKOSHI *et al.*, 1999.

Han e colaboradores (2003) relataram em seu estudo que a PAs reticularam eficientemente o colágeno reduzindo as taxas de degradação *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios de citotoxicidade revelaram que as PAs são cerca de 120 vezes menos citotóxicos que o GTA e suas matrizes reticuladas promovem a proliferação celular. Kim e colaboradores (2005) utilizaram a procianidina como agente reticulante de membranas quitosana/gelatina e os resultados exibiram membranas mais estáveis, com redução do grau de intumescimento e taxa de degradação controlada, e com propriedades mecânicas superiores.

PAs originadas do extrato da semente de uva têm demonstrado promover formação óssea nos cêndilos mandibulares de ratos, aumentar a rigidez da dentina desmineralizada e inibir a progressão de cáries radiculares artificiais (ISHIKAWA *et al.*, 2005; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008).

Um estudo recente desenvolvido por He e colaboradores (2011) revelou que a PA estabiliza o colágeno. Os resultados dos ensaios realizados indicaram um aumento da hidrofobicidade, diminuição da permeabilidade de vapor de água e aumento da estabilidade térmica dos filmes de colágeno.

3.3.2 Cerâmicas bioativas

3.3.2.1 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio estão entre os materiais mais intensamente usados para regeneração de tecido ósseo. Eles podem ser produzidos na forma de géis, pastas, blocos sólidos ou como matrizes porosas, com a ortopedia e odontologia sendo suas principais áreas de aplicação (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Esses materiais têm se destacado entre as denominadas biocerâmicas por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica (biocompatibilidade), ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, aparente habilidade em interagir com o tecido hospedeiro e se assemelham à composição do osso (MIAO *et al.*, 2004).

Em cirurgias ortopédicas, essas cerâmicas têm sido usadas para preenchimento de defeitos ósseos em consequência da remoção de ossos doentes ou defeituosos. Recobrimentos densos ou porosos de cerâmica de fosfato de cálcio são frequentemente aplicados em materiais de boa resistência mecânica para fixação biológica ou osseointegração de implantes de sustentação como hastes de quadril e raízes de dentes artificiais, tais como os substratos metálicos. Cerâmicas porosas de fosfato de cálcio estão também desempenhando um importante papel no tratamento de problemas ósseos com o desenvolvimento da engenharia de tecidos (SOARES, 2005).

A Hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP) são as fases mais comumente utilizadas em aplicações biomédicas, por apresentar razões cálcio/fósforo (Ca/P) semelhantes as do osso natural e também pela sua estabilidade quando em contato com o ambiente fisiológico. Além desses materiais, o fosfato de cálcio bifásico HA/TCP e cimentos de fosfato de cálcio têm sido bastante empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos ou como arcabouço para tecidos celularizados (SOARES, 2005; RESWAN *et al.*, 2006). Sabe-se que cerca de 60% em peso do osso é composto de HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e portanto é evidente o porque da HA e dos fosfatos de cálcio relacionados (α -TCP e β -TCP) estarem em intensa investigação como os maiores componentes dos arcabouços para a engenharia de tecido ósseo (BERTAZZO, 2004).

De forma geral, as biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido estudadas segundo os seguintes aspectos: comportamento em estudos *in vivo* e comportamento da interface fosfato de cálcio/soluções iônicas. Estes estudos têm por objetivo investigar o comportamento destes materiais quando em contato com os

fluidos presentes no organismo humano e, finalmente aspectos relacionados às variações da estrutura cristalina e da composição destes materiais, representados principalmente pela razão Ca/P, cristalinidade e presença de outros íons além dos íons cálcio e fosfato (KAWACHI *et al.*, 2000).

Os fosfatos de cálcio para aplicação biológica podem ser definidos a partir da relação atômica entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P. Esta relação varia de 0,5 a 2,0 e formam diferentes fases conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Fórmula e razão Ca/P das fases de apatita.

Ca/ P	Nome	Fórmula
2,0	Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
1,67	Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,5	Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1,5	Fosfato Tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,33	Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,0	Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0	Fosfato Dicálcico (DCP)	CaHPO_4
1,0	Pirofosfato de Cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1,0	Pirofosfato de Cálcio Dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,7	Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$
0,67	Dihidrogênio Fosfato Tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$
0,5	Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	Metafosfato de Cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$

Fonte: AOKI, 1991.

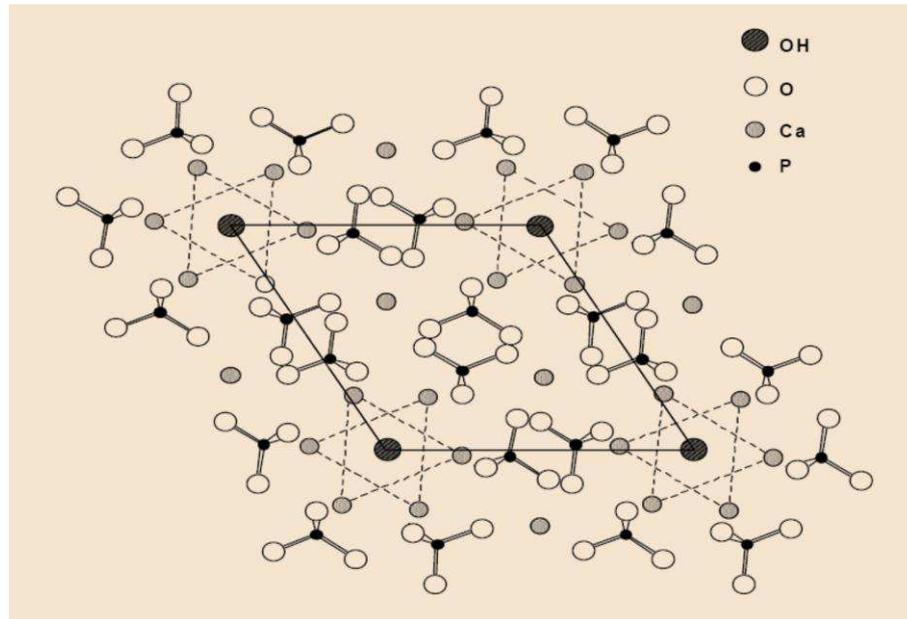
De forma genérica, as biocerâmicas de fosfato de cálcio degradam, com uma velocidade dada pela seguinte ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A reabsorção do material que representa esta degradação é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local. Para $\text{Ca/P} < 1$, a acidez e a solubilidade são extremamente altas, e ambos os parâmetros decrescem substancialmente para relações Ca/P próximas de 1,67, que é o valor da hidroxiapatita estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (VALLET-RÉGI;

GONZALEZ CALBET, 2004). A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial ($A_{\text{pó}} > A_{\text{sólido poroso}} > A_{\text{sólido denso}}$), com o decréscimo da cristalinidade e no caso da hidroxiapatita, pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato e hidroxila e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de cálcio (AOKI, 1991).

Estas cerâmicas podem ser produzidas por uma série complexa e demorada de reações de síntese utilizando, principalmente, hidróxido ou carbonato de cálcio e ácido fosfórico. Ao final dessas reações de síntese, obtêm-se as cerâmicas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas, resultando em baixas propriedades mecânicas (ROSA *et al.*, 2000). A síntese dos fosfatos de cálcio tem sido realizada por diferentes métodos, tais como, neutralização, reações no estado sólido, método hidrotermal, processo sol-gel, micro-emulsão, microondas (FINISIE, 2001; HAN *et al.*, 2006). Especificamente, a síntese dos pós de fosfato de cálcio pelo método de neutralização é considerada uma técnica versátil, pela possibilidade de obtenção de pós com diferentes morfologias através de variações nos parâmetros de processo, tais como atmosfera, tipo de agitação e velocidade, taxa de precipitação, tempo de envelhecimento, processo de secagem, etc. Portanto, o pó pode ser utilizado em diferentes aplicações de acordo com os aspectos morfológicos (MARCHI *et al.*, 2009).

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA), com razão Ca/P igual a 1,67, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos e dentes é, sem dúvida, a mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas. Essa cerâmica é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente das ligações ósseas, formando forte ligação química com o tecido ósseo (VAZ *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2006). A HA cuja estrutura química é representada pela fórmula $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (VITAL *et al.*, 2006; BILLOTTE, 2006) apresenta alta cristalinidade e ausência de carbonato, resultando em uma lenta taxa de biodegradação em comparação com o mineral ósseo nanocristalino (TADIC *et al.*, 2004). A Figura 3.8 apresenta a estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Figura 3.8 – Projeção no plano (001) da estrutura da hidroxiapatita.



Fonte: EICHERT *et al.*, 2009.

A família apatita desse mineral, cuja fórmula geral é $[A_{10}(BO_4)_6X_2]$, cristaliza dentro de prismas hexagonais rômnicos com dimensões da célula unitária $a = 9.432 \text{ \AA}$ e $c = 6.881 \text{ \AA}$. Diversos elementos podem ocupar os sítios A, B e X como mostra a Tabela 3.2 (AOKI, 1991).

Tabela 3.2 - Grupos substituintes dos sítios da apatita.

Sítios	Elementos substituintes
A	Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, etc
B	P, V, As, S, Si, Ge, CO_3^{2-} , etc
X	F, Cl, OH, O, Br, CO_3^{2-} , etc

Fonte: VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004.

Essa similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos tornou a hidroxiapatita um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a

grande similaridade química superficial (VOLKMER *et al.*, 2006). A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e também proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo assim, a regeneração tecidual (SALEH *et al.*, 2004).

3.4 Processamento de arcabouços para engenharia de tecidos

Na confecção de arcabouços tridimensionais porosos biodegradáveis muitos métodos foram desenvolvidos para aplicação na engenharia de tecidos, incluindo a injeção de gás (gas-foaming), a impressão tridimensional, separação de fases por indução térmica, eletrofiação (eletrospinning) e *freeze-drying*. Arcabouços de biomateriais naturais são geralmente preparados por *freeze-drying*, processo que se mostra eficaz para materiais termo-sensíveis e que se dissolvem em meio aquoso (MOONEY *et al.* 1996; SHERWOOD *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2005; MA; ZHANG, 2001; PATIST *et al.*, 2004; MCCAM *et al.*, 2006).

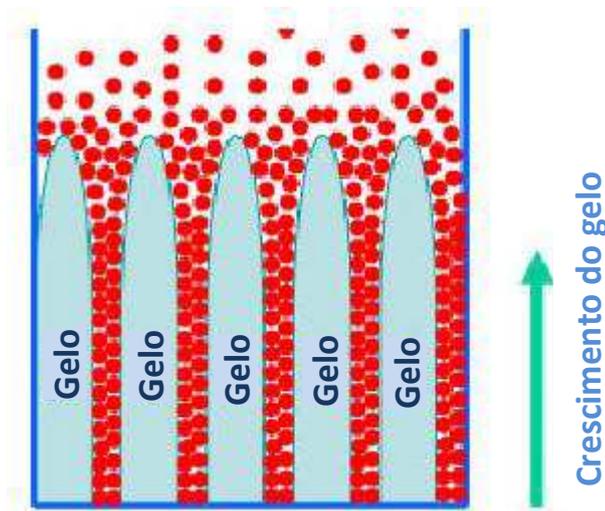
3.4.1 Freeze- Drying

O processo *freeze-drying*, também conhecido como liofilização, é um processo industrial que consiste na remoção de água de amostras congeladas através de sublimação e dessorção utilizando-se baixas temperaturas de secagem sob vácuo. É uma técnica comumente utilizada por muitos autores para confecção de arcabouços porosos, com porosidade acima de 90%, e tem a vantagem de estabilizar e preservar bioprodutos termo-sensíveis. Além destas vantagens, a liofilização permite a utilização de soluções aquosas, e a utilização de cristais de gelo como modelo porogênico, sendo considerado verde e sustentável, particularmente benéfico para aplicações biológicas. O processo de remoção do solvente não traz impurezas para as amostras e um processo de purificação adicional não se faz necessário (LIAPIS *et al.*, 1996; QIAN; ZHANG, 2010).

Durante a etapa de congelamento, os cristais do solvente crescem e as moléculas do soluto são excluídas até a amostra congelar completamente. Alterando variáveis de congelamento, tais como, a temperatura de congelamento, concentração da solução, tipo de solvente, e a direção do congelamento é possível

produzir materiais com uma riqueza de morfologias dos poros e nanoestruturas (QIAN e ZHANG, 2010). A estrutura dos poros obtida é uma réplica de dendritos de cristais de gelo emaranhados no final da solidificação; o diâmetro, forma e interconectividade dos poros são regulados pelo tamanho e morfologia de cristais de gelo (YUNOKI *et al.*, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2004). A representação do processo de liofilização está demonstrada na Figura 3.9.

Figura 3.9- Representação esquemática do processo de congelamento direcional. Cristais de gelo crescem em uma direção e os solutos (tais como partículas, moléculas poliméricas ou misturas destas) são excluídos e solidificados entre os cristais.



Fonte: Adaptado de ZHANG e COOPER, 2007.

Malafaya e Reis (2003) desenvolveram arcabouços bioativos quitosana/HA utilizando o método *freeze-drying*. Em outro estudo, (OLIVEIRA *et al.*, 2006) foram desenvolvidos arcabouços bicamadas quitosana e HA para aplicação osteocondral, onde a morfologia dos poros da camada de quitosana foi induzida por *freeze-drying*.

Deville e colaboradores (2008) produziram arcabouços porosos de HA para regeneração óssea com elevada resistência mecânica utilizando o processo de *freeze-drying*. Os materiais apresentaram conectividade bem definida entre os poros e uma porosidade completamente aberta e vários parâmetros que afetam a porosidade e resistência à compressão foram investigados, incluindo concentração da pasta cerâmica inicial, taxa de congelamento e condições de sinterização.

No estudo de Wu e colaboradores (2009) a gelatina foi escolhida como material de partida para preparação de arcabouços com estrutura orientada microtubular, para aplicação na engenharia de tecidos, utilizando o método *freeze-drying* unidirecional. Os resultados exibiram arcabouços com porosidade acima de 98% e poros com largura e comprimento de 50-100 μm e 100-500 μm , respectivamente.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.) e água destilada foi utilizada em todas as soluções.

Para preparação dos arcabouços foram empregados: Quitosana em pó (massa molar (MW) = 190.000-310.000 g/mol, GD=75-85%, viscosidade = 200-800 cP, Sigma Aldrich); Gelatina de pele suína (G2500 – Tipo A, ~ 300g bloom) foi adquirida da Sigma Aldrich; Ácido acético glacial (VETEC); O ácido fosfórico e hidróxido de cálcio (VETEC).

Para ajuste de pH e reticulação dos arcabouços foram utilizados: Álcool Etílico Absoluto (VETEC); Extrato de semente de uva (*vitis vinífera*) (União Vegetal); Glutaraldeído a 25% (Sigma Aldrich).

Para caracterização da degradação *in vitro* dos arcabouços foram utilizados: Lisozima de ovo de galinha (~70000 Units/mg) e Tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4.

Para caracterização biológica *in vitro* dos arcabouços foram utilizados: 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); Camundongos machos *Swiss*, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) São Paulo.

4.2 Local da Pesquisa

- **Obtenção e caracterização físico-química e microestrutural**

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

- ***Caracterização Mecânica***

Realizada no Laboratório Multidisciplinar de Materiais e Estruturas Ativas – LAMMEA da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica (UAEM) da UFCG.

- ***Caracterização biológica***

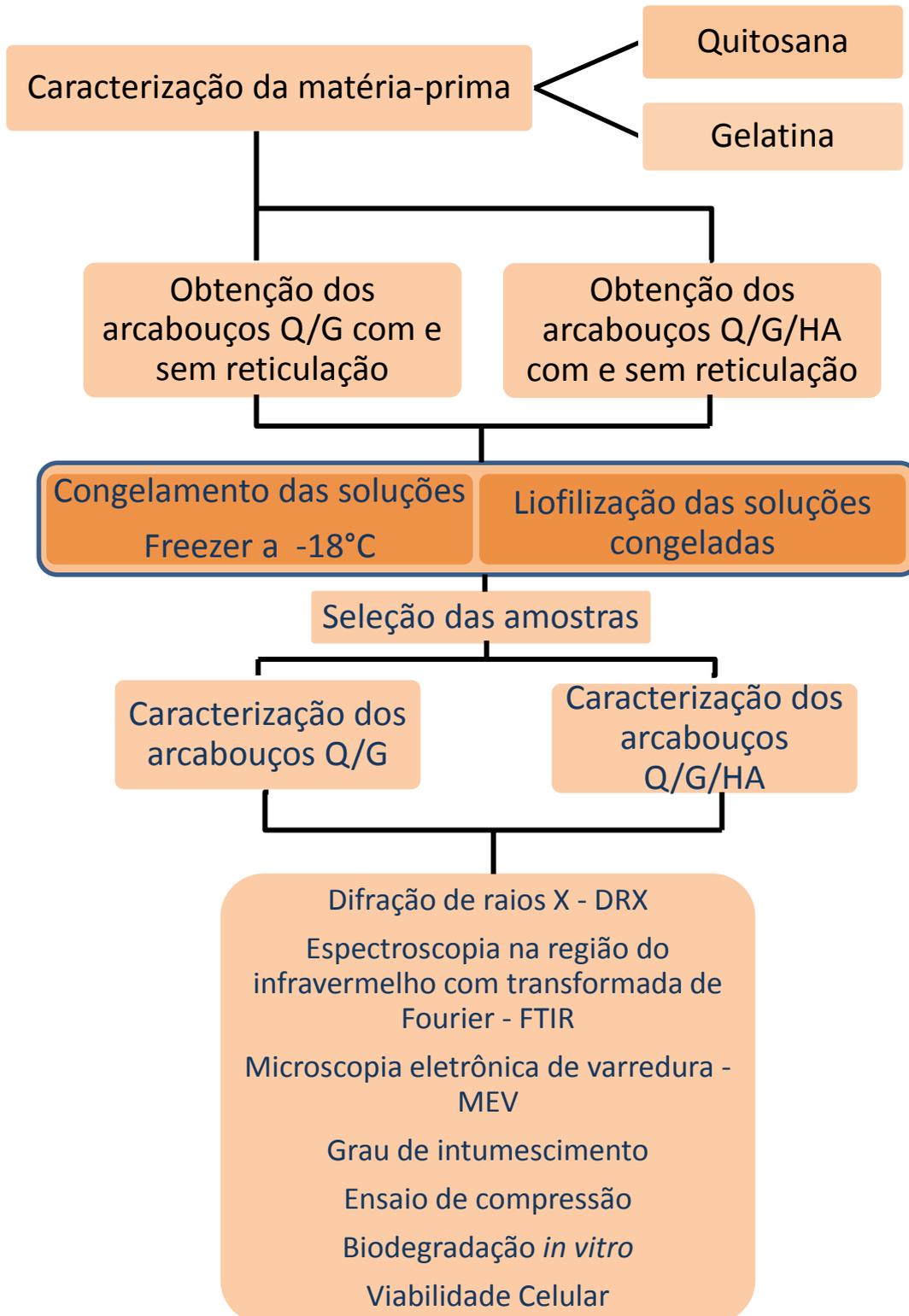
Realizada no Laboratório de Imunologia Clínica, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

4.3 Metodologia experimental

4.3.1 Etapas de desenvolvimento da pesquisa

Inicialmente foi realizada a caracterização das matérias primas, quitosana, gelatina e hidroxiapatita, formadores dos arcabouços. Em seguida, os arcabouços compósitos Quitosana (Q)/Gelatina (G) e QG/Hidroxiapatita (HA) foram produzidos com e sem reticulação por procianidina (PA) para aplicação potencial na engenharia de tecidos e foram caracterizados por análises físico-químicas, mecânicas e biológicas. Procurou-se com estes testes o conhecimento das propriedades dos materiais sintetizados e a verificação da similaridade com as propriedades do tecido ósseo. Na Figura 4.1 estão relacionadas as etapas desenvolvidas neste trabalho.

Figura 4.1 – Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa



4.3.2 Preparação dos arcabouços Quitosana (Q)/Gelatina (G)

Os arcabouços Q/G foram preparados utilizando o processo de separação de fase sólido-líquido e subsequente sublimação do solvente, conhecido como *freeze drying* ou pré-congelamento e liofilização. Recentemente, esse processo tem atraído grande atenção como uma das alternativas para fabricação de arcabouços, por possibilitar a obtenção de estruturas tridimensionais porosas com canais porosos interconectados. Essa arquitetura é produzida através da remoção do solvente ou veículo congelado da estrutura via sublimação (LEE *et al.*, 2007).

Inicialmente, foram preparadas as soluções de quitosana e gelatina. A solução de quitosana foi preparada a partir da dissolução do pó de quitosana em uma solução de ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 2% (m/v) em ácido acético, sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, o material insolúvel foi removido por filtração a vácuo.

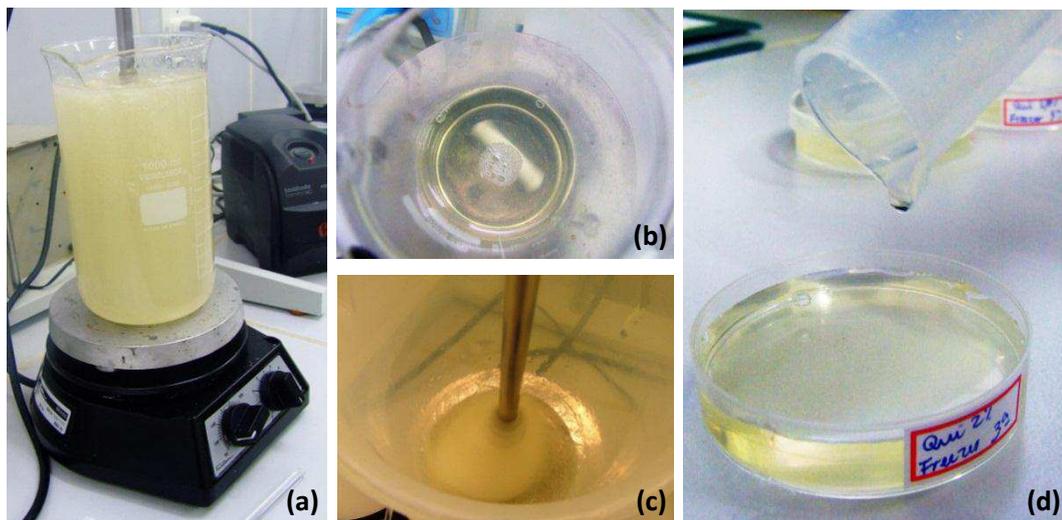
A solução de gelatina foi preparada através da sua dissolução em água destilada para obtenção de concentrações finais de 2, 5 e 10% (m/v), sob agitação magnética e aquecimento em temperatura de 40°C até dissolução.

As soluções foram misturadas em agitador magnético por 2 horas na proporção Q/G (1:1), vertidas em placas de petri de poliestireno ($\varnothing = 60$ mm, altura = 15 mm) e rapidamente transferidas para um freezer a -18°C para solidificar o solvente e induzir a separação das fases sólido-líquido. As misturas solidificadas foram mantidas nessa temperatura por 48 horas, e em seguida transferidas para o recipiente do liofilizador (Modelo Bandeja - USV-01/UFCG). As amostras foram finalmente liofilizadas durante 48 horas, resultando em materiais esponjosos que foram armazenados em um dessecador até a etapa de caracterização. As amostras dos arcabouços Q/G foram identificadas conforme indicado na Tabela 4.1. A Figura 4.2 exibe as soluções poliméricas utilizadas neste estudo para preparação dos arcabouços.

Tabela 4.1 – Identificação dos arcabouços Q/G

Quitosana (m/v)	Gelatina (m/v)	ARCABOUÇOS
2%	-	Q
2%	2%	QG2
2%	5%	QG5
2%	10%	QG10

Figura 4.2 – (a) solução de quitosana, (b) solução gelatina, (c) mistura das soluções Q/G (1:1) e (d) solução vertida em placa de petri.



4.3.3. Preparação de arcabouços Quitosana (Q)/ Gelatina (G) reticulados

A procianidina (PA) foi utilizada para reticular os arcabouços Q/G com o objetivo de diminuir a solubilidade da gelatina e consequentemente aumentar a estabilidade do arcabouço em meio aquoso na temperatura corpórea humana de 37°C. A solução de procianidina foi preparada a partir da dissolução do pó de extrato de semente de uva em água destilada, para uma concentração final da solução de 0,5, 1 e 5%, sob agitação magnética em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida o material insolúvel foi removido por filtração à vácuo. As soluções de PA foram adicionadas à solução QG e misturadas em agitador magnético à temperatura

de 40°C por 30 minutos. A solução de PA foi adicionada na proporção de 1 mL por grama de polímero contido na solução.

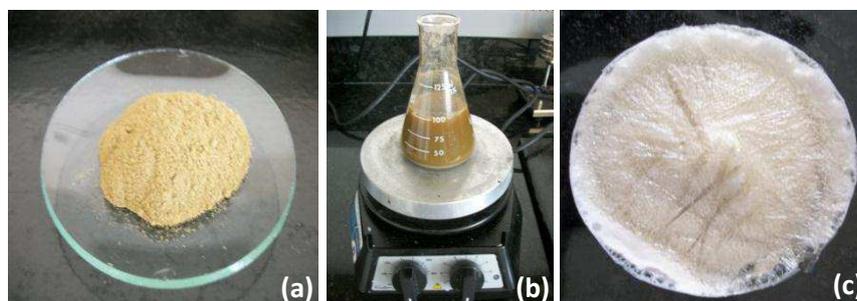
Com o intuito de comparação, o glutaraldeído (GA), agente de reticulação intensamente aplicado na estabilização de biomateriais poliméricos a base de colágeno, também foi utilizado como agente reticulante dos arcabouços QG. Uma solução de GTA com concentração de 0,5% em água destilada foi adicionada à solução QG e misturada rapidamente para evitar a gelatinização ainda no recipiente de mistura. Por fim, as soluções finais foram vertidas em placas de petri e seguiram o mesmo procedimento de congelamento e liofilização.

Neste estudo as composições selecionadas para confecção dos arcabouços foram QG5 e QG10. A Tabela 4.2 apresenta a identificação dos arcabouços reticulados.

Tabela 4.2 – Identificação dos arcabouços QG reticulados.

ARCABOUÇOS QG RETICULADOS	
QG5/PA0,5	QG10/PA0,5
QG5/PA1	QG10/PA1
QG5/PA5	QG10/PA5
QG5/GA0,5	QG10/GA0,5

Figura 4.3 - (a) Extrato de semente de uva, (b) Solução do extrato em meio aquoso e (c) arcabouço reticulado.



4.3.4 Preparação de Arcabouços Quitosana (Q)/Gelatina (G)/ Hidroxiapatita (HA)

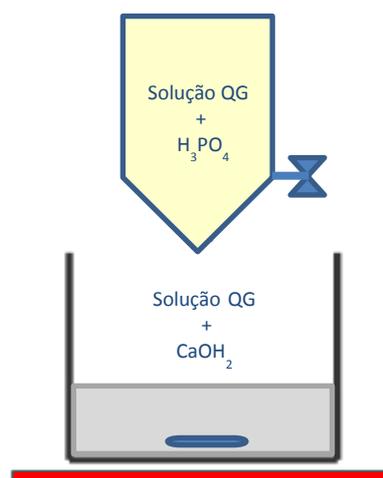
4.3.4.1 Co-precipitação da HA na solução polimérica

A HA foi precipitada *in situ* na presença da solução quitosana/gelatina (QG). A referida solução foi dividida em duas partes iguais para adição dos precursores utilizados para a síntese da HA, o hidróxido de cálcio e o ácido fosfórico, formando dois tipos de solução: Quitosana/Gelatina/ H_3PO_4 e Quitosana/Gelatina/ $Ca(OH)_2$, como ilustrado na Figura 4.4. Em ambas as soluções, os precursores foram adicionados sob agitação constante e temperatura de $40^\circ C$ durante 2 horas, para interação entre as fases. Em seguida, a solução Quitosana/Gelatina/ H_3PO_4 foi adicionada lentamente (gotejamento) à solução Quitosana/Gelatina/ $Ca(OH)_2$. A razão de QG, $Ca(OH)_2$ e H_3PO_4 foi calculada estequiometricamente para obter arcabouços com composições finais QG:HA variadas, 30:70, 50:50 e 70:30, como apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Identificação dos arcabouços compósitos QG/HA

ARCABOUÇOS		
QG2/30HA	QG5/30HA	QG10/30HA
QG2/50HA	QG5/50HA	QG10/50HA
QG2/70HA	QG5/70HA	QG10/70HA

Figura 4.4 – Esquema ilustrando o processo de obtenção dos arcabouços compósitos QG/HA.



4.3.4.2 **Preparação de arcabouços compósitos Quitosana (Q)/Gelatina (G)/Hidroxiapatita (HA) reticulados**

O processo de reticulação dos arcabouços compósitos QG/HA seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 4.4.3.1, com adição dos agentes reticulantes após o processo de co-precipitação da HA. Neste estudo as composições selecionadas para confecção dos arcabouços foram QG5/30HA e QG10/30HA. A Tabela 4.4 apresenta a identificação dos arcabouços reticulados.

Tabela 4.4- Identificação dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados.

ARCABOUÇOS QG/HA RETICULADOS	
QG5/30HA/PA0,5	QG10/30HA/PA0,5
QG5/30HA/PA1	QG10/30HA/PA1
QG5/30HA/PA5	QG10/30HA/PA5
QG5/30HA/GA0,5	QG10/30HA/GA0,5

4.3.5 **Neutralização dos arcabouços compósitos**

Com o objetivo de adequar o valor do pH dos arcabouços obtidos àqueles recomendados para avaliação do comportamento do material *in vitro*, as amostras foram neutralizadas. Para isso, os arcabouços foram imersos em Álcool etílico absoluto pelo período de 1 hora, congelados novamente e liofilizados durante 48 horas. Os procedimentos realizados nessa etapa seguiram estudo previamente reportado pelo grupo de Biomateriais – CERTBIO (SAMPAIO, 2012).

4.4 **Técnicas de caracterização**

4.4.1 **Difração de raios-X (DRX)**

As matérias primas na forma de pó, quitosana e gelatina, e as amostras dos arcabouços foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular variando de 10°

a 70° com passo de 0,06°/min, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ na tensão de 40kV e corrente 30mA.

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR em modo de absorbância foi utilizada para caracterizar os materiais de partida, quitosana, gelatina, o agente reticulante (PA) e a interação entre a fase inorgânica (HA) e os biopolímeros. As amostras foram obtidas a partir das matérias-primas em pó, e de secções dos arcabouços produzidos. A análise foi realizada em um espectrômetro AVATAR TM 360 ESP Nicolet (UAEMa/CCT/UFCG), com varredura de 4000 a 650 cm^{-1} .

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microestruturas dos arcabouços compósitos foram observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, TM-1000, HITACHI), a partir da análise de secções longitudinais e transversais obtidas.

Além disso, o diâmetro médio de poro foi determinado seguindo o método descrito por Yin *et al.* (2003): foram medidos 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. Imagens representativas de cada amostra foram usadas, e as medições foram realizadas em pelo menos 12 poros por amostra.

4.4.4 Resistência à compressão

Os testes de compressão foram realizados em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos (Instron, modelo 5582, capacidade de 100 kN) em amostras com formato cilíndrico com razão diâmetro/espessura de aproximadamente 2 com taxa de deformação constante de 5mm/min. A resistência à compressão foi calculada a partir da divisão entre a tensão máxima e a área original.

Cinco amostras foram testadas e o valor médio da resistência com o seu respectivo desvio foi calculado para 10% de deformação.

Figura 4.5 – Ensaio de compressão dos arcabouços.



4.4.5 Grau de Intumescimento

O ensaio de avaliação do Grau de Intumescimento 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.

Para realização deste ensaio os arcabouços foram imersos em PBS (pH 7.4). As amostras foram cortadas, pesadas e inseridas na referida solução, utilizadas em triplicata. Após o período pré-determinado (24h), os arcabouços foram retirados, a água adsorvida na superfície foi removida através de papel de filtro e o peso úmido foi registrado. O grau de intumescimento foi determinado pela equação 2.

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_f - M_0}{M_0} \times 100 (\%) \quad (2)$$

sendo M_0 a massa da amostra seca e M_f a massa intumescida.

4.4.6 Ensaio de biodegradação in vitro enzimática

Empregou-se como base neste ensaio as normas ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2009) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007). Para realização desse estudo, as amostras foram divididas em

dois grupos: no primeiro grupo os arcabouços foram imersos em solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS com concentração de 1,5 mg/mL, e no segundo grupo foi utilizada apenas a solução de PBS, para controle. A concentração enzimática utilizada foi 10 vezes maior que a encontrada no corpo humano (FREIER *et al.*, 2005).

Foram utilizadas amostras em triplicata tanto para a solução de lisozima/PBS como para a solução PBS, em dois lotes. Os arcabouços neutralizados e secos foram cortados na dimensão de 0,5 cm², pesados em balança analítica e incubados em estufa microbiológica, à temperatura de 37°C. As amostras foram retiradas nos períodos de 02, 07 e 14 dias, seguidas por um procedimento de congelamento e liofilização por 48 horas, e posterior pesagem em balança analítica. O peso remanescente das amostras foi avaliado utilizando a equação (3) e forneceram os resultados referentes à degradação dos arcabouços.

$$\text{Peso Remanescente (\%)} = 100 \cdot \frac{M_f}{M_0} \quad (3)$$

sendo M_0 a massa da amostra seca e M_f a massa após incubação.

4.4.7 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

Com o objetivo de avaliar a viabilidade de aplicação dos arcabouços compósitos para 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”. Dentre os métodos descritos, o teste de avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] foi escolhido.

Esse procedimento foi introduzido por Mosmann (1983) como uma alternativa aos métodos radioativos utilizados, e proporciona a medição quantitativa da sobrevivência/proliferação de células. Consiste, de uma maneira geral, em um ensaio colorimétrico que permite avaliar a capacidade das enzimas mitocondriais de células viáveis de metabolizar o tetrazólio de metiltiazol (MTT), havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, que pode ser detectado pela leitura da absorbância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm (MOSMANN, 1983; GERLIER; THOMASSET, 1986; FERRARI; FORNASIERO; ISETTA, 1990).

Para realização deste teste foram executadas as seguintes etapas:

- Preparação dos arcabouços:

Todas as amostras foram neutralizadas, 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.

- Obtenção de células macrofágicas:

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de 08 camundongos *Swiss* machos, após injeção intraperitoneal de solução aquosa de Tioglicolato de Sódio a 3,0 % nos animais, três dias antecedentes ao experimento. Após este período, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e, para a remoção dos macrófagos, foi realizada a exposição da cavidade peritoneal, injeção intraperitoneal de 5 mL de PBS (pH 7,4) gelado e estéril, massagem vigorosa da cavidade e a re-suspensão das células abdominais.

- Padronização do número de células:

Para padronização do número de células a serem utilizadas em cada experimento, foi realizada a contagem dos macrófagos com o auxílio de uma câmara hemocitométrica de Neubauer em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico (Diastar, Reichert, Buffalo, NY), utilizando-se o aumento de 200x. As células foram ajustadas à concentração de 5.10^6 células em meio RPMI-1640-C (Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular).

- Obtenção do tapete de células macrofágicas:

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano foram adicionados 100 μL de células diluídas em RPMI 1640-C nos poços determinados previamente de acordo com os tipos de amostras e quantidade de animais. A placa permaneceu em estufa com atmosfera de CO_2 (Forma Scientific) por 1 hora, a 37°C .

- Incubação das amostras:

Após a formação do tapete de células foram adicionados 200 μL de RPMI 1640-C e as amostras a serem testadas, em triplicata. Em poços pré-determinados da placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionados 100 μL de LPS (Controle positivo - lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*) a uma concentração de 10 μL , ou apenas meio de cultura (controle negativo). A placa foi incubada em estufa com atmosfera de CO_2 (Forma Scientific) por 24 horas, a 37 °C. Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 μL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. As placas foram incubadas novamente a 37° C com 5% de CO_2 por 3 horas. Após essa incubação, foram descartados o sobrenadante e as amostras utilizadas, e adicionado 100 μL de álcool isopropílico.

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.

CAPÍTULO 5
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

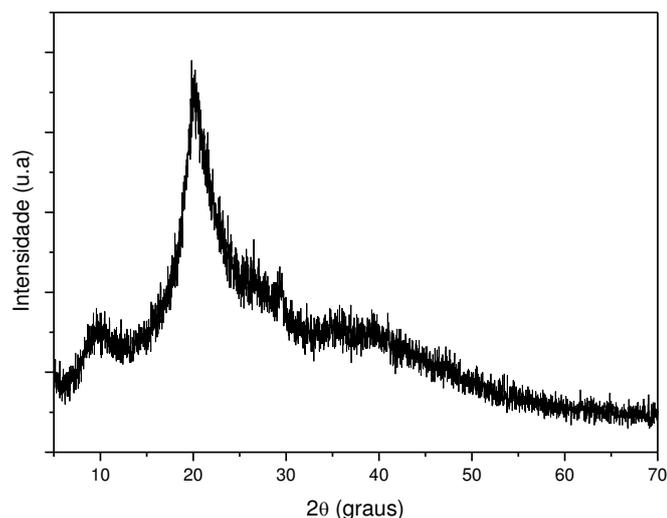
5.1 Caracterização dos arcabouços quitosana (Q)/ gelatina (G)

5.1.1 Matérias primas: Quitosana e Gelatina

5.1.1.1 Difração de Raios X

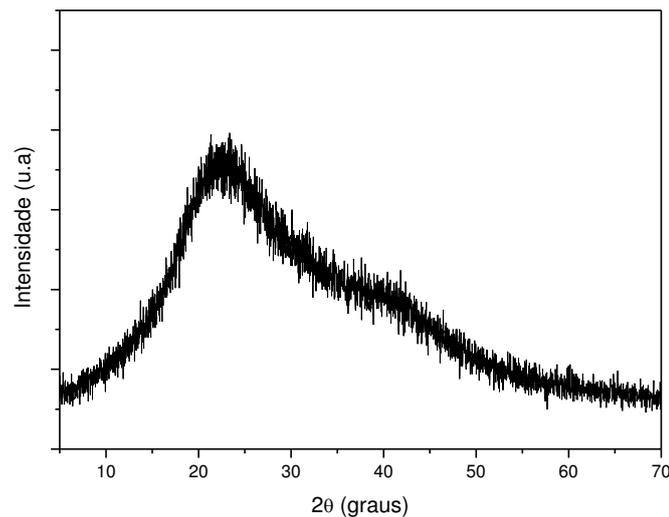
A Figura 5.1 apresenta o difratograma de raios X do pó de quitosana. O parâmetro principal que determina as propriedades da quitosana, além da massa molecular e grau de desacetilação, é a cristalinidade do polímero (MODRZEJEWSKA *et al.*, 2006). Pode-se observar no difratograma um comportamento típico de polímeros semicristalinos, com um pico menos intenso que é encontrado em $2\theta \cong 10^\circ$ e um mais intenso em $2\theta \cong 22^\circ$, indicando pequena quantidade de cristais hidratados e presença da fase amorfa do material. Este resultado corrobora com o estudo de Ogawa e colaboradores (1992) realizado em três formas de quitosana (cristalina hidratada, cristalina anidra e amorfa). A forma hidratada da quitosana revela um pico agudo em $2\theta = 10,4^\circ$ e um pico fraco em $2\theta = 20-22^\circ$. A forma anidra da quitosana é caracterizada por um pico principal intenso em $2\theta = 15^\circ$ e um pico adicional em $2\theta = 20^\circ$. A forma amorfa apresenta apenas um pico em $2\theta = 20^\circ$.

Figura 5.1- Difratograma de raios X da Quitosana em pó.



A Figura 5.2 apresenta o difratograma de raios-X da amostra de gelatina. O difratograma apresentou um ombro largo entre 10 e 30°, sugerindo um caráter amorfo. Este resultado é compatível com Thein-Han *et al.* (2009).

Figura 5.2- Difratograma de raios-X da Gelatina em pó.



5.1.1.2 ***Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)***

O espectro de infravermelho obtido da amostra de quitosana está apresentado na Figura 5.3. Pode-se observar a presença das bandas características de absorção em 3353, 2933, 2873 cm^{-1} atribuído a vibrações de estiramentos dos grupos funcionais -OH, -CH₂ e -CH₃ (FIDÉLES, 2010; MARTINÉZ-CAMACHO *et al.*, 2010). O grupo amino tem uma banda de absorção característica na região de 3400-3500 cm^{-1} , a qual deve ter sido mascarada pela banda de absorção devido ao grupo -OH. Além disso, uma banda característica da deformação angular do CH₂ (tesoura) aparece na região de 1421 cm^{-1} . As bandas características a 1650 cm^{-1} e 1575 cm^{-1} correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação -C=O da amida I e à deformação da ligação N-H conjuntamente com o estiramento da ligação C-N da amida II, respectivamente. A banda na região de 1375 cm^{-1} é característica da vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil (CH₃) do grupo acetamido (KOLHE; KANNAN, 2003; AMARAL *et al.*, 2005; WANG; WANG, 2007,

TORRES *et al.*, 2005). As bandas de absorção na região de 1151 e 896 cm^{-1} (estiramento de ligações C-O-C), 1060 e 1025 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo C-O) são características da estrutura sacarídea da quitosana. A presença do pico em 1650 cm^{-1} (devido ao grupo $\text{CH}_3\text{-C=O}$ denotando a presença do grupo acetil) e em 3353 cm^{-1} (representando a presença do grupo -OH), confirma que a quitosana é um produto parcialmente desacetilado (SHANMUGASUNDARAM *et al.*, 2005; SIONKOWSKA *et al.*, 2004). A razão entre essas bandas de absorção é usada por muitos autores para indicar o grau de desacetilação do biopolímero quitosana (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001). O grau de desacetilação (GD), que indica os grupos amina livres ao longo da cadeia de quitosana, é um parâmetro chave que muda a suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, conformação de cadeia e propriedades eletrostáticas (JAYAKUMAR *et al.*, 2010; ARCA *et al.*, 2009).

Autores também relatam que um alto grau de desacetilação da quitosana, isto é, maior número de grupos amina catiônicos, proporciona um ambiente adequado para a adesão celular. Investigou-se a viabilidade de fibroblastos nos scaffolds de quitosana com diferentes graus de desacetilação. Um aumento significativo no número de células foi observado em scaffolds de quitosana com GD acima de 85% (ZHANG *et al.*, 2010; CHATELET *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2005).

O espectro de IV da gelatina (Fig. 5.4) apresenta as bandas de absorção típicas da vibração de estiramento da ligação -NH e -OH (H_2O) em 3294 cm^{-1} . A banda em 3060 cm^{-1} é característica da ligação -CH . As bandas em 2929 cm^{-1} (menor intensidade) e 2873 cm^{-1} (maior intensidade) são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo -CH_2 (assimétrico) e -CH_3 (simétrico), respectivamente. As bandas em 1630, 1532 e 1233 cm^{-1} são características da amida I (-C=O), amida II (-NH) e amida III (-CN e -NH) similares ao espectro do colágeno (FICAI *et al.*, 2010). A região em 1334 cm^{-1} apresenta uma banda característica ao grupo COO^- de aminoácidos da estrutura da gelatina. A banda em 1447 cm^{-1} é atribuída às ligações C-N e C-C decorrente do empacotamento do anel pirrolidínico, sugerindo que a gelatina tipo A utilizada nesse estudo é caracterizada pela presença da estrutura de tripla hélice do tropocolágeno, indicando que processo do tratamento ácido para a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas não a desnaturou totalmente, uma vez que apresentaram uma relação de absorbâncias 1233/1447 cm^{-1} próxima da unidade (CHAUDRY *et al.*, 1997). A banda de absorção na região de 1080 cm^{-1} corresponde

a vibrações de estiramento de das ligações glicosídicas (C-O-C). Baseado nessa observação estrutural confirma-se que a gelatina, mesmo desnaturada do colágeno, manteve considerável número de grupos orgânicos característicos, especialmente aminoácidos.

Figura 5.3- Espectros de FTIR e fórmula estrutural da quitosana (GD= 75-85%)

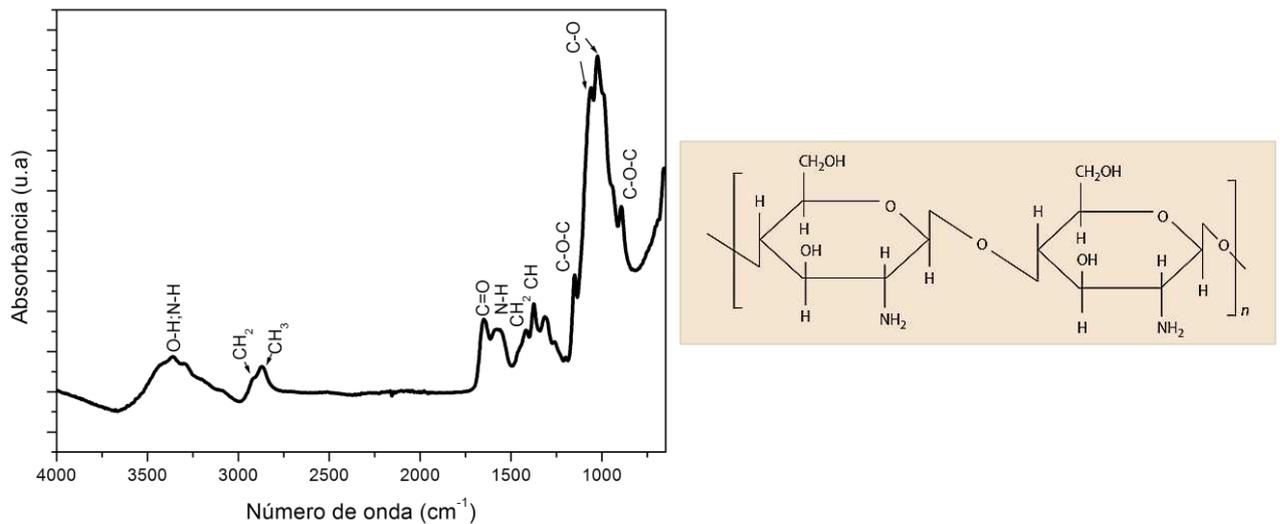


Figura 5.4- Espectros de FTIR e fórmula estrutural da gelatina

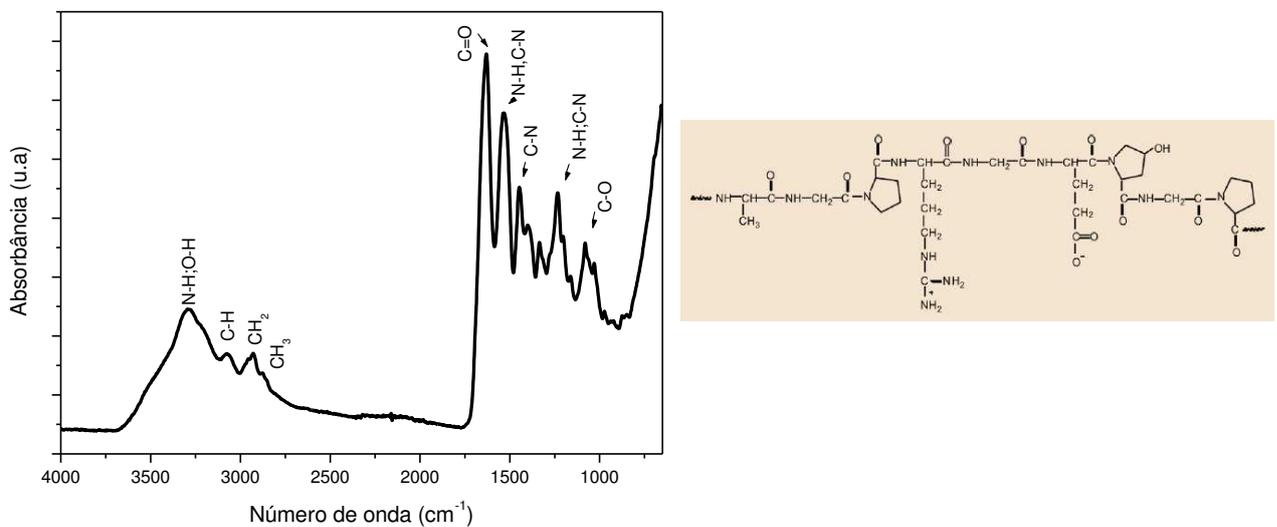


Tabela 5.1 – Atribuições das freqüências vibracionais observadas nos espectros de FTIR da quitosana e gelatina.

QUITOSANA		GELATINA	
Atribuições vibracionais (cm ⁻¹)	Frequências	Atribuições	Frequências vibracionais (cm ⁻¹)
OH, N-H	3361	OH, N-H	3294
CH ₂	2920	CH	3075
CH ₃	2872	CH ₂	2929
C=O (Amida I)	1650	CH ₃	2876
δN-H + νC-N Amida II)	1567	C=O (Amida I)	1630
CH ₂	1418	δN-H+νC-N (Amida II)	1532
CH	1375	C-N, C-C	1447
ν(C-O-C)	1151	COO ⁻	1335
ν(C-O)	1059	δN-H+νC-N(Amida III)	1233
ν(C-O)	1025	ν(C-O-C)	1080
ν(C-O-C)	893		

5.1.2 Avaliação Visual dos arcabouços Q/G

A Figura 5.5 apresenta os arcabouços após processo de liofilização. O arcabouço Q mostrou uma estrutura porosa na superfície e um comportamento esponjoso. Os arcabouços Q/G mostram uma tendência de tornarem-se incolores e apresentaram uma rigidez crescente de acordo com o aumento do teor de gelatina na composição. Macroscopicamente os arcabouços revelaram estruturas superficiais diferentes. A superfície do arcabouço QG2 apresentou a formação de canais multiorientados e distribuídos de forma irregular (Figura 5.5b). Com o aumento da proporção de gelatina, 5 e 10%, na composição final foi possível observar arcabouços mais densos, com superfícies mais lisas e homogêneas (Figuras 5.5c,d).

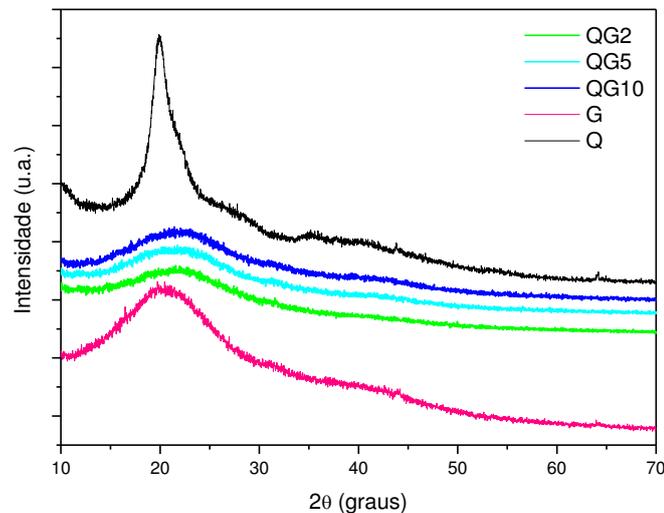
Figura 5.5- Arcabouços Q (a), QG2 (b) QG5 (c) e QG10 (d) dispostos em placa de petri após processo de liofilização.



5.1.3 Difração de raios X

A Figura 5.6 apresenta os difratogramas de raios X dos arcabouços Q/G com variados teores de gelatina. Pode-se observar a ausência do pico de difração da quitosana ($2\theta = 20^\circ$) ou sua fusão com o pico largo da gelatina, entre 10 e 30° em todas as composições. Assim, pode-se concluir a partir das observações por DRX que o grau de cristalinidade diminuiu com a adição de gelatina e que os arcabouços Q/G tendem a tornarem-se amorfos (THEIN HAN *et al.*, 2009). Esta diminuição na cristalinidade pode ser novamente relacionada com a interação existente entre quitosana e gelatina, de acordo com dados seguintes de FTIR.

Figura 5.6 - Difratomogramas de raios-X dos arcabouços Q/G



5.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 5.7 apresenta os espectros de FTIR dos arcabouços QG. Os espectros dos polímeros Q e G foram incluídos para identificar possíveis interações entre eles nos arcabouços QG.

O aumento da intensidade dos picos na região 3290 cm^{-1} e em $800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ foi observado em todos os arcabouços quando comparado ao espectro da gelatina pura, revelando a presença da quitosana no complexo. Porém, com o aumento do teor de gelatina no complexo, as intensidades dos picos citados sofreram uma redução, provavelmente devido à forte interação entre Q e G em meio aquoso e pontes de hidrogênio intermoleculares na formação do complexo polieletrólito (THEIN-HAN *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2005). Os deslocamentos dos principais picos observados nos espectros da Figura 5.7 estão apresentados na Tabela 5.2.

Os grupos -OH , -NH_2 e -C=O na gelatina são capazes de formar pontes de hidrogênio com os grupos -OH e -NH_2 da quitosana (CHEN *et al.*, 2008). Adicionalmente, em meio ácido ($\text{pH} < 6,5$), a maioria dos grupos amino da quitosana tornam-se protonados, permitindo a formação de interações eletrostáticas envolvendo os grupos -NH_3^+ da quitosana e os grupos carboxílicos livres -COO^- da gelatina (FERNANDES *et al.*, 2011; SILVA, ANDRADE, 2009), originando uma rede estrutural através de ligações de hidrogênio (THEIN-HAN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2007). A adição da gelatina a quitosana é importante para prover características

biologicamente ativas. A gelatina possui em sua estrutura resíduos de *arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp)* ou *RGD*, também conhecida como "*sítio universal de reconhecimento celular*", que promove a adesão e migração celular, além de ser capaz de formar complexos polieletrólíticos (HUANG *et al.*, 2005, XIONG *et al.*, 2002).

Figura 5.7- Espectros vibracionais de IV dos arcabouços QG: (a) Q, (b) QG2, (c) QG5, (d) QG10 e (e) G.

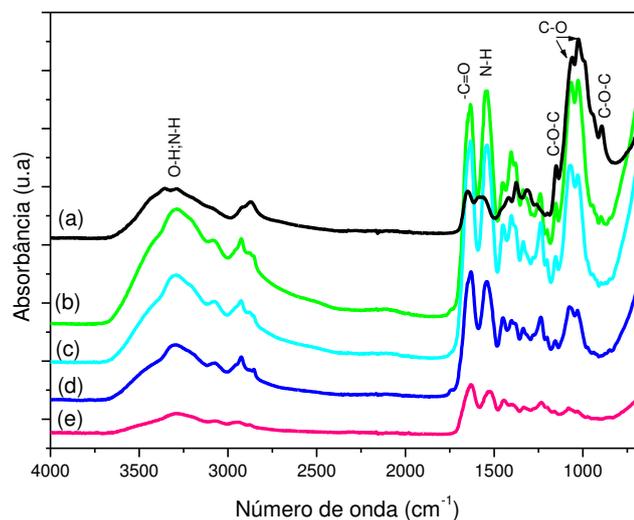


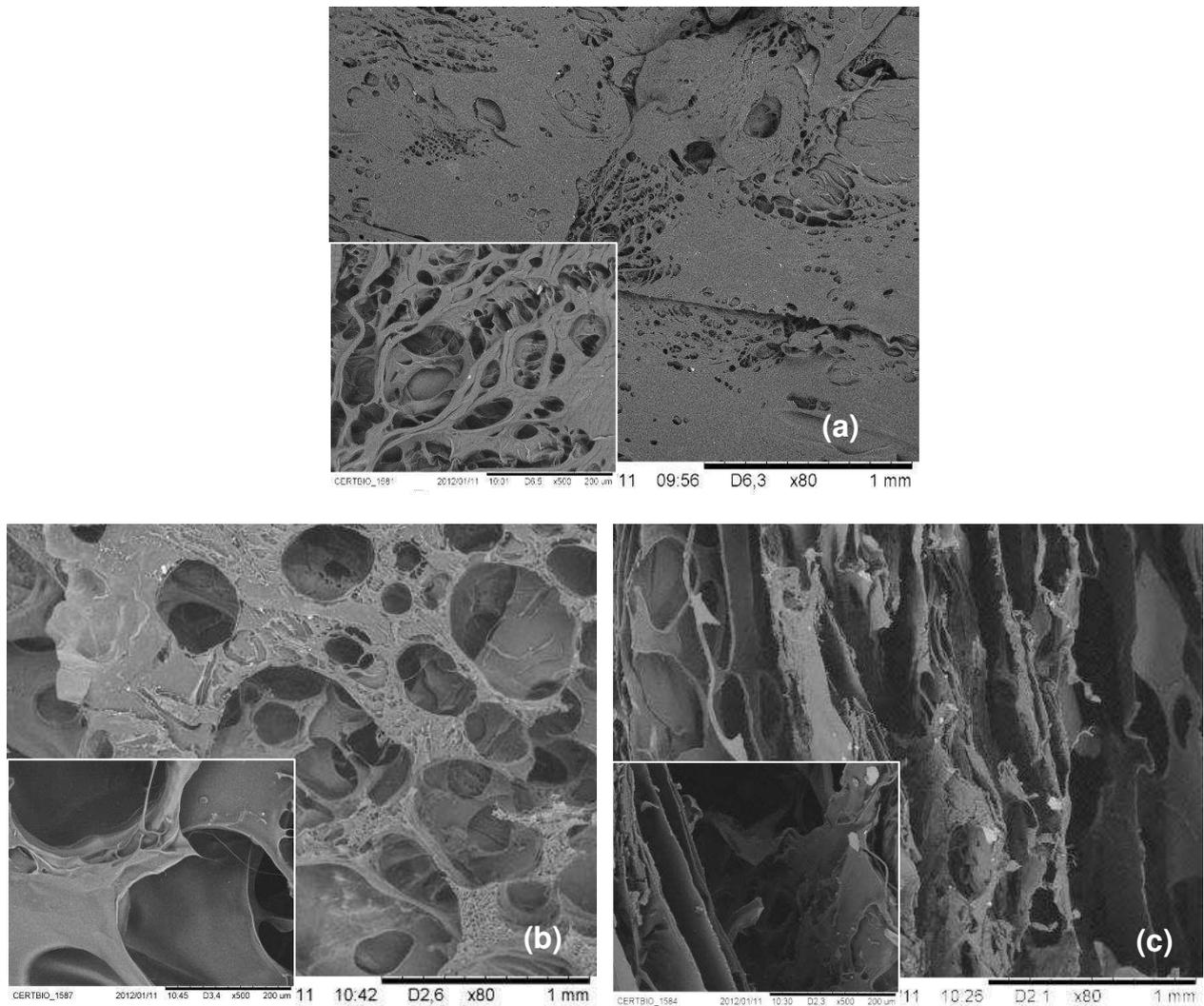
Tabela 5.2- Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 5.7.

Bandas de Absorção IR (cm⁻¹)	Quitosana (Q)	Gelatina (G)	QG2	QG5	QG10
-OH;-N-H	3361	3294	3289	3292	3292
-CH	-	3075	3081	3072	3071
-CH ₂	2920	2929	2925	2926	2925
-CH ₃	2872	2876	2876	2876	2876
-C=O (Amida I)	1650	1630	1634	1633	1630
δN-H + νC-N (Amida II)	1576	1532	1539	1539	1541
-C-N;-C-C	1418	1447	1450	1450	1450
-COO ⁻	1315	1335	1337	1337	1336
δN-H + νC-N (Amida III)	-	1233	1240	1237	1237
ν(C-O-C)	1151	1161	1153	1153	1155
ν(C-O)	1059	1080	1066	1070	1075
ν(C-O)	1025	1030	1027	1028	1030
ν(C-O-C)	893	876	897	897	896

5.1.5 Morfologia dos arcabouços

As morfologias das superfícies e das secções longitudinal e transversal dos arcabouços Q e QG foram examinadas por MEV e as micrografias estão apresentadas nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.

Figura 5.8- Micrografias MEV do arcabouço Q: superfície (a), secção longitudinal (b) e secção transversal (c). (Imagem maior 80x; Imagem menor 500x)



Para conhecer o efeito da adição da gelatina foi necessário o exame do arcabouço constituído apenas por quitosana. Este apresenta uma superfície com presença de algumas regiões porosas e na secção longitudinal uma estrutura

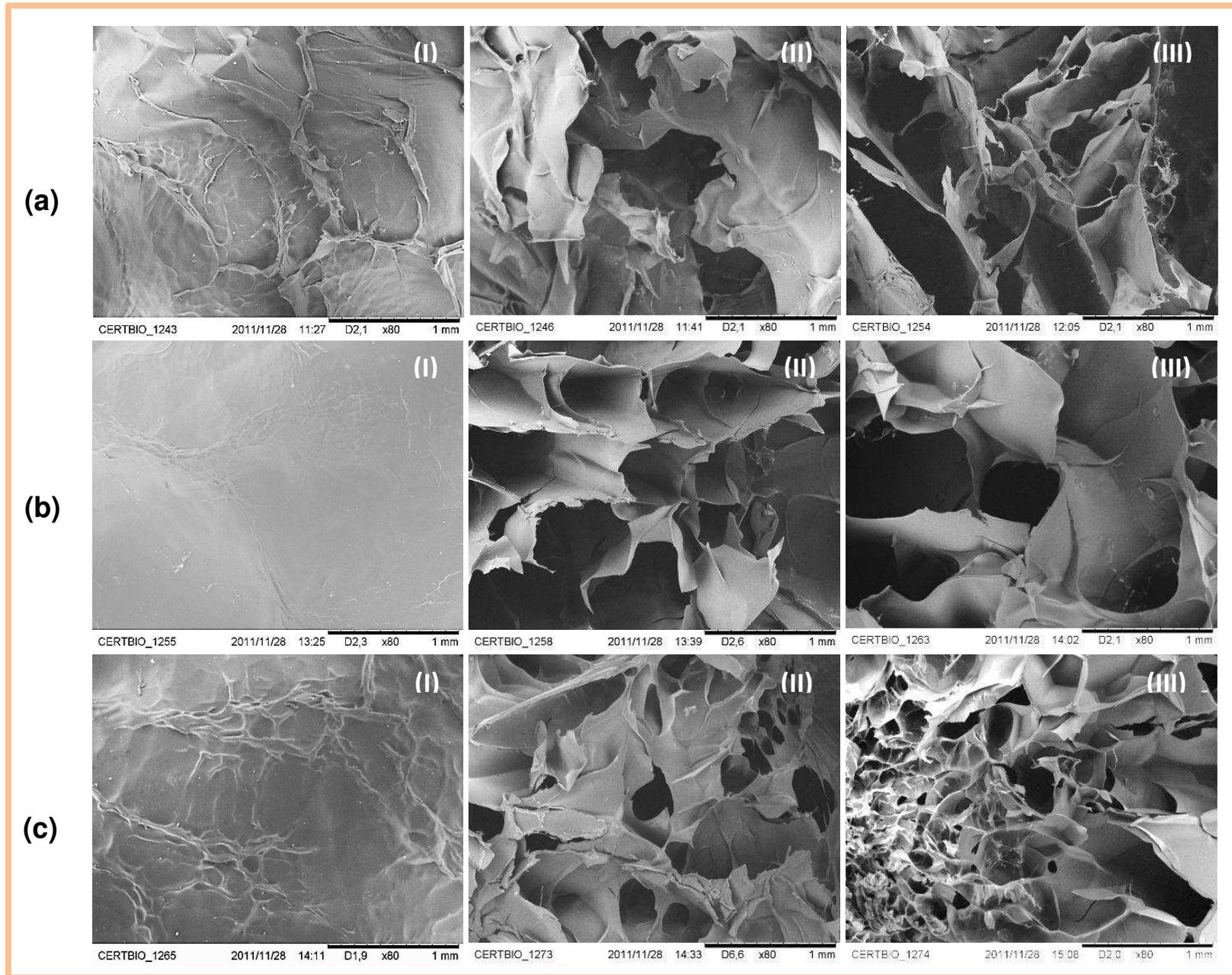
altamente porosa e interconectada, formada por macroporos com tamanhos variando entre 200 μm - 1 mm. O corte da secção transversal apresenta camadas paralelas orientadas longitudinalmente (Fig. 5.8b) com presença de poros esféricos no seu interior. A formação dos macroporos nessa faixa de tamanho pode ser atribuída ao processo de congelamento da solução. Madhally e Matthew (1999) mostraram que o tamanho do poro e a conectividade do arcabouço Q são influenciados pela temperatura de congelamento, concentração da solução polimérica e distância da parede do molde.

O efeito da concentração de gelatina na morfologia dos arcabouços QG foi investigado utilizando soluções de gelatina 2%, 5% e 10% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e as micrografias MEV da superfície e secções longitudinal e transversal estão apresentadas na Figura 5.9. Pode-se observar uma clara modificação na microestrutura dos arcabouços, com a adição de gelatina, quando comparado ao arcabouço de Q (Figura 5.8).

Todos os arcabouços apresentaram uma superfície densa, lisa e sem a presença de poros. O arcabouço com menor concentração de gelatina (QG2) apresentou em sua secção longitudinal uma estrutura porosa irregular, formado por macroporos com formatos indefinidos e a secção transversal apresentou canais multi-orientados. Com o aumento do teor de gelatina para 5%, foi possível observar, nas secções longitudinal e transversal do arcabouço QG5 (Fig. 5.9b), macroporos mais regulares com formatos mais esféricos. Contudo, o arcabouço com maior concentração de gelatina, QG10, apresentou uma estrutura mais densa e irregular, com diminuição significativa no tamanho dos poros.

WU e colaboradores (2010) e CHUNG e colaboradores (2002) relataram em seus estudos que a concentração de gelatina influencia o crescimento dos cristais de gelo durante o congelamento, etapa inicial da liofilização, alterando a porosidade e tamanho de poros. Na solução de gelatina, as moléculas da água são separadas pelas macromoléculas da gelatina, bloqueando as moléculas da água de se concentrarem e se arranjam durante a etapa de congelamento. Com o aumento da concentração de gelatina durante o processo de congelamento, a viscosidade da solução de gelatina sofre um aumento, dificultando ainda mais o processo de separação do solvente (água). Esse fato restringe o crescimento dos cristais e, conseqüentemente reduz a porosidade e o tamanho dos poros dos arcabouços.

Figura 5.9- Micrografias MEV dos arcabouços compostos QG2 (a), QG5 (b) e QG10 (c). Superfície (I), seção longitudinal (II) e seção transversal (III).

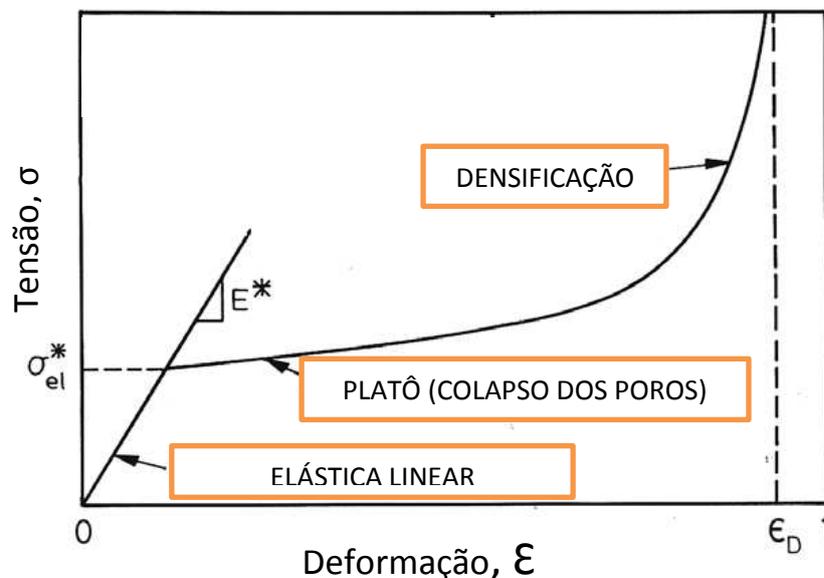


5.1.6 Caracterização Mecânica dos arcabouços

A caracterização mecânica está entre os mais importantes testes físicos que devem ser realizados, especialmente para os materiais implantáveis que irão suportar esforços mecânicos em uso clínico, por exemplo, aplicações vasculares e ortopédicas (MANO *et al.*, 2005).

As propriedades mecânicas dos arcabouços compósitos em estudo foram caracterizadas por testes de compressão. As análises por compressão geraram curvas tensão-deformação típicas de sólidos celulares, tais como, espumas de célula aberta de baixa densidade. Essas curvas são caracterizadas por três regiões distintas: (1) uma região elástica linear controlada pela flexão das paredes dos poros, (2) um longo platô na curva devido ao colapso dos poros (3) uma região caracterizada pelo aumento da tensão sem grande incremento na deformação, conhecida como região de densificação, onde os poros são completamente colapsados, o que provoca um aumento rápido da resistência do material, conforme Figura 5.10 (GIBSON, ASHBY, 1997; GIBSON, 2005)

Figura 5.10 – Curva típica de tensão-deformação uniaxial de um sólido elastomérico celular em compressão apresentando as regiões elástica linear, platô (colapso) e densificação, assim como o módulo elástico linear (E^*) e tensão elástica na região de colapso (σ_{el}^*).



Fonte: Adaptada de GIBSON e ASHBY, 1997.

A Figura 5.11 apresenta as curvas tensão-deformação dos arcabouços Q e Q/G, exemplificando o comportamento ao teste mecânico de compressão. A resistência à compressão (σ) calculada em valores de 10% de deformação está apresentada na Tabela 5.3. A incorporação da gelatina resultou em um aumento significativo na resistência à compressão dos arcabouços nos teores de 5 e 10%, e esse aumento foi crescente com o incremento do teor de gelatina. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados na análise por MEV dos arcabouços Q/G (Fig.5.9), onde a composição QG10 revelou uma morfologia menos porosa com paredes dos poros mais espessas e conseqüentemente, com maior capacidade de suportar a tensão aplicada, elevando a resistência à compressão.

Figura 5.11- Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos arcabouços Q/G.

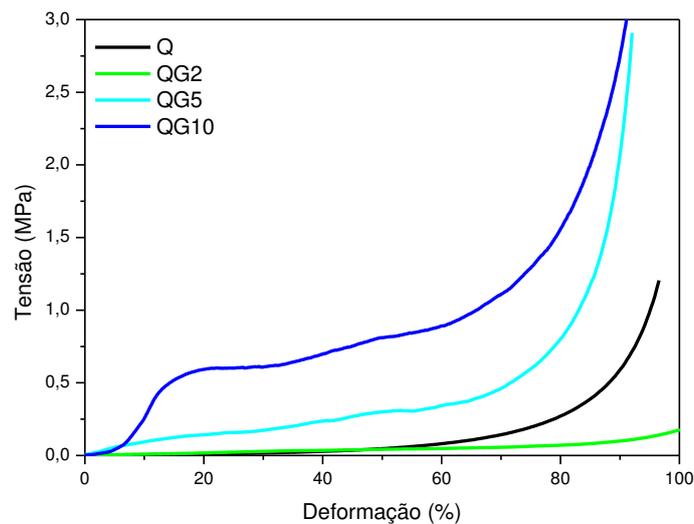


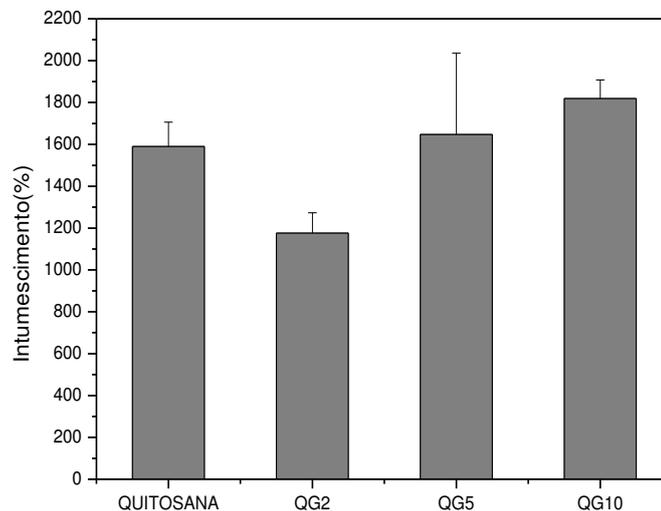
Tabela 5.3- Resistência à compressão (σ_{10}) dos arcabouços.

Arcabouço	σ_{10} (MPa)
Q	0,041 ± 0,009
QG2	0,012 ± 0,002
QG5	0,071 ± 0,028
QG10	0,442 ± 0,164

5.1.7 Grau de Intumescimento

A Figura 5.12 compara a capacidade de intumescimento dos arcabouços. Nota-se que todas as composições apresentaram alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução, uma vez que absorvem mais água do que seus próprios pesos, isto é, valores individuais >100%. Observa-se que a adição da gelatina na composição do arcabouço QG2 reduz a capacidade de absorção em relação ao arcabouço Q.

Figura 5.12- Grau de Intumescimento pelos arcabouços QG.



Essa redução pode ser atribuída às interações existentes entre os grupos hidrofílicos da gelatina e o grupo amina da quitosana, e/ou a alteração na morfologia do arcabouço com a adição da gelatina, tornando-se menos poroso que o arcabouço Q. Com o aumento da proporção de gelatina nos arcabouços (QG5 e QG10) o valor do grau de intumescimento do arcabouço Q é superado de forma discreta. Esse fato pode ser atribuído aos grupos hidrofílicos livres da gelatina, -COOH e -NH₂ presentes nessas composições. No caso da quitosana, a hidrofiliidade se dá como função de seus grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares (ASSIS, SILVA, 2003).

De acordo com Thein-Han e colaboradores (2009), a absorção de água facilita a infiltração das células dentro dos arcabouços durante a cultura celular;

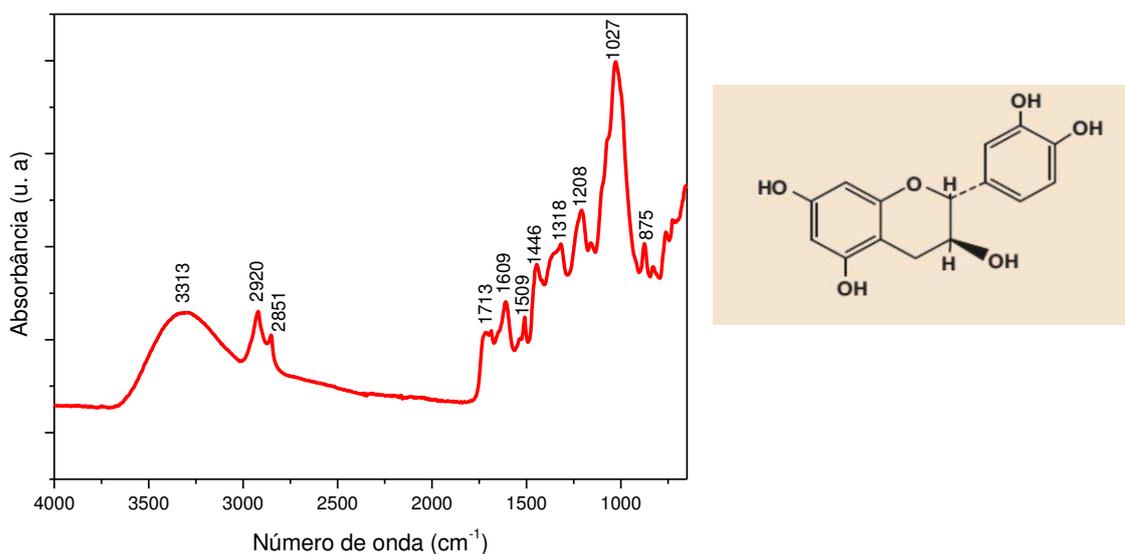
maximiza a adesão celular; aumenta o tamanho de poro e porosidade total do arcabouço incrementando a área superficial interna dos arcabouços; maximiza o crescimento celular e favorece o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos. No entanto, além de promover a adesão celular, a capacidade de absorção de água pode reduzir as propriedades mecânicas do arcabouço.

5.2 Caracterização dos arcabouços QG reticulados

5.2.1 Caracterização do agente reticulante procianidina (PA)

A Figura 5.13 apresenta o espectro de FTIR do extrato da semente de uva utilizado como agente reticulante. A banda 3313 cm^{-1} pode ser atribuída aos grupos hidroxila (fenólicos e açúcares). As bandas em 2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} e 1713 cm^{-1} foram atribuídos a vibração de estiramento dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}$. As bandas em 1609 e 1509 cm^{-1} estão associados ao estiramento do anel aromático $\text{C}=\text{C}$. A banda a 1446 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático. As bandas em 1318 cm^{-1} e 1208 cm^{-1} foram atribuídos ao estiramento $\text{C}-\text{C}$ ($\text{C}-\text{CHR}-\text{C}$). O pico em 1027 cm^{-1} corresponde ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ decorrente da estrutura do anel pirano derivado dos taninos. As bandas na região entre $670-900\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos às vibrações de flexão $\text{C}-\text{H}$ aromáticas. Todas as bandas características da procianidina foram identificadas de acordo com Fernández e Agosin (2007) e Ping *et al* (2012).

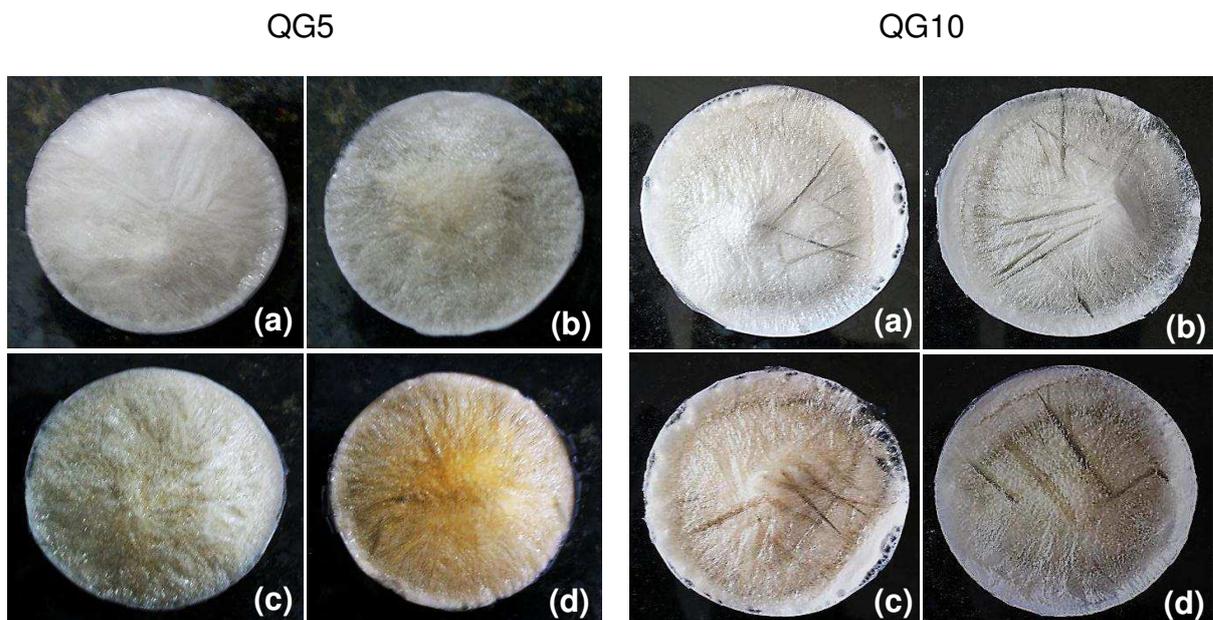
Figura 5.13- Espectro de FTIR do extrato da semente de uva e estrutura química da procianidina.



5.2.2 Análise Visual dos arcabouços QG reticulados

A procianidina (PA) e o glutaraldeído (GTA) foram utilizados como agentes reticulantes para os arcabouços QG. Nesse estudo os arcabouços QG5 e QG10 foram escolhidos como representantes do grupo e foram reticulados com PA em três concentrações diferentes (0,5%, 1% e 5%) e GTA (0,5%), conforme Figura 5.14. Podem-se observar alterações na coloração dos arcabouços com a incorporação dos agentes reticulantes. O aumento da concentração de PA resultou em arcabouços com intensificação do tom castanho. Estudos relatam que a variação da concentração de glutaraldeído leva a uma intensificação da cor amarela (MONTEIRO Jr., AIROLD, 1999).

Figura 5.14 – Arcabouços QG5 e QG10 reticulados com PA (0,5%-a, 1%-b e 5%-c) e GTA (0,5%-d).

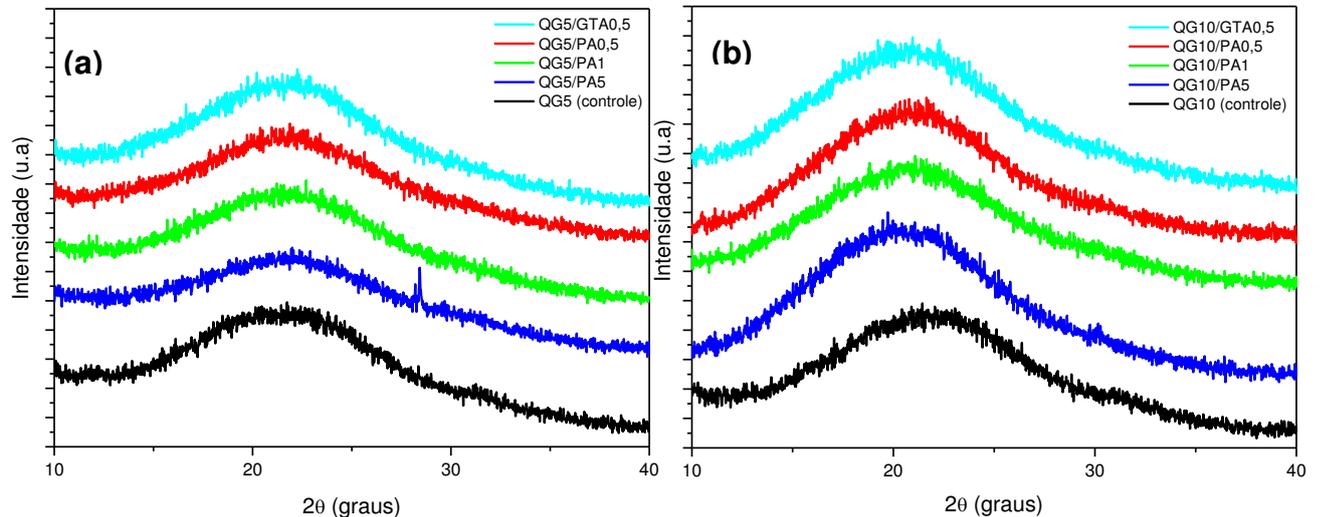


5.2.3 Difração de raios X

A Figura 5.15 apresenta os difratogramas de DRX dos arcabouços QG5 e QG10 reticulados com PA e GTA. Pode-se observar em todas as composições, independente do agente reticulante utilizado, um alargamento da base da região cristalina entre 10 e 30°, sugerindo uma tendência de redução da cristalinidade,

devido à diminuição dos graus de liberdade com a reação de reticulação (COSTA JR, MANSUR, 2008).

Figura 5.15 – Difratoogramas de DRX dos arcabouços QG5 (a) e QG10 (b) reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GTA (0,5%).



5.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

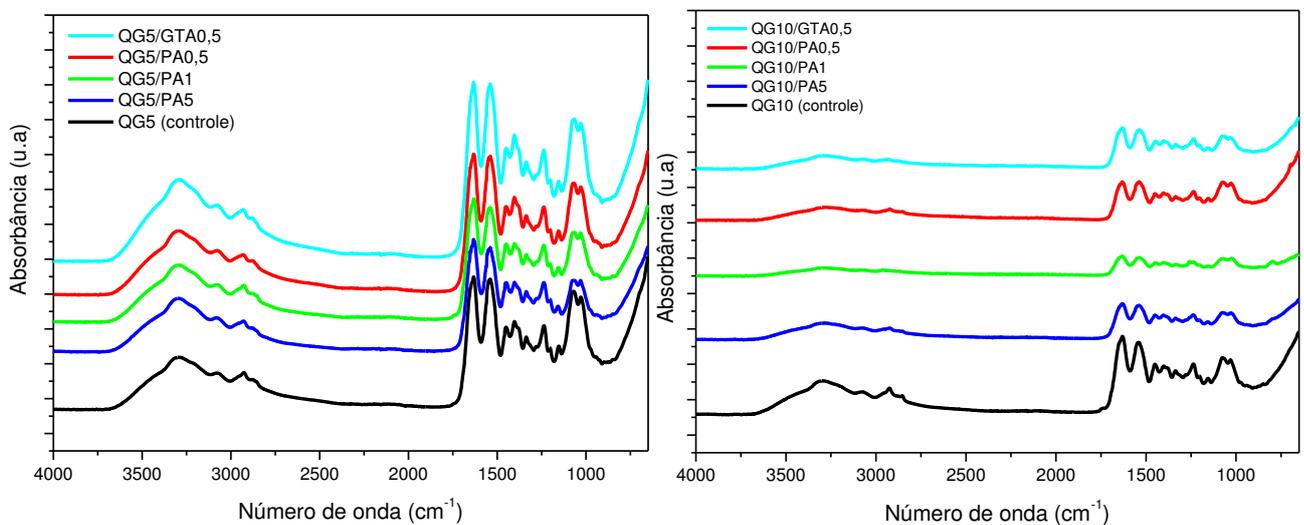
A Figura 5.16 apresenta os espectros de IV dos arcabouços QG5 e QG10 reticulados com PA e GTA. Comparando os espectros dos arcabouços QG e os arcabouços reticulados com PA, é possível observar uma diminuição crescente nos modos de vibração por estiramento dos grupos funcionais O-H e/ ou N-H em 3290 cm^{-1} , estiramento C=O da amida I em 1633 cm^{-1} , deformação da ligação C-N da amida II em 1539 cm^{-1} , estiramento das ligações C-O em 1076 cm^{-1} , com o aumento do teor de PA nos arcabouços. Esse efeito de redução da intensidade das bandas características do complexo QG foi mais pronunciado no arcabouço QG10, demonstrando a maior efetividade da reticulação com o aumento do teor de gelatina. Esse resultado sugere que os grupos hidroxila da PA interagem através de ligações do tipo pontes de hidrogênio com os grupos carbonila (-C=O) e amina da gelatina (CARVALHO, 2007).

A reticulação química da quitosana com o GTA ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amino (-NH_2) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando

assim a ligação C=N ($\sim 1648 \text{ cm}^{-1}$), base de Schiff (WANG, 2004; ROKHADE, 2007). O GTA também reage com os grupos funcionais amino encontrados na gelatina, particularmente com os grupos da lisina e hidroxilisina (resíduos de aminoácidos do colágeno), formando ligações similares aa das bases de Schiff (KATHURIA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2008; CHIELLINI *et al.*, 2001a).

Nesse estudo não foi possível observar a formação da ligação C=N na região 1648 cm^{-1} e essa ausência pode ser atribuída a influência do meio ácido em que a reação foi realizada. Em ambiente ácido, o grupo protonado $-\text{NH}_3^+$ (1548 cm^{-1}) tem mais possibilidade de se formar, pois ele reduz significativamente a nucleofilicidade do nitrogênio, diminuindo a atividade da reação da base de Schiff (RAO, 2006; WANG *et al.*, 2004). Porém, observou-se um aumento da intensidade das bandas em 1542 e 1631 cm^{-1} , característico da formação da imina (C=N) durante a reação de reticulação com GA (YIN *et al.*, 1999).

Figura 5.16 – Espectros de IV dos arcabouços QG5 (a) e QG10 (b) reticulados com PA em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) e GTA (0,5%).



5.2.4 Morfologia dos arcabouços QG reticulados

As micrografias exibidas nas Figuras 5.17 e 5.18 mostraram as modificações ocorridas nas morfologias da secção longitudinal e transversal dos arcabouços QG reticulados com PA e GTA quando comparadas aos arcabouços QG de controle (Fig.5.9). Foram observadas estruturas altamente porosas, com presença de

macroporos de tamanhos variados, principalmente nos arcabouços reticulados com PA. A morfologia anisotrópica apresentada pelos arcabouços reticulados foi caracterizada pela formação de poros tubulares alinhados radialmente. Esse comportamento é resultado do crescimento e solidificação dos cristais de gelo na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro da solução durante a etapa de congelamento. Um aspecto importante, porém pouco observado nas micrografias foi a interconectividade entre os poros.

As micrografias dos arcabouços QG5/PA0,5 e QG5/PA1 (Figura 5.17) apresentaram-se semelhantes (secção transversal), com maior número de poros e uma distribuição larga de tamanho com diâmetros variando entre 240-640 μm e 220-590 μm , respectivamente. Os arcabouços QG5/PA5 e QG5/GTA0,5 apresentaram um menor número de poros com diâmetros maiores variando entre 355-710 μm e 390-964 μm , respectivamente.

Os arcabouços QG10 reticulados (Figura 5.18) apresentaram uma estrutura porosa mais irregular quando comparados aos arcabouços QG5. O arcabouço QG10/PA0,5 exibiu poros com diâmetro variando entre 490-880 μm . As micrografias do arcabouço QG10/PA1 revelou poros com diâmetros acima de 1 mm. O arcabouço QG10/PA5 apresentou um número maior de poros e os valores dos diâmetros variaram entre 388-742 μm . Uma estrutura mais densa com a presença de um menor número de poros (secção transversal) com diâmetro entre 220-450 μm foi apresentada pelo arcabouço QG10/GTA0,5.

O efeito da reticulação no grau de intumescimento dos arcabouços QG5 e QG10 estão exibidos na Figura 5.19. Arcabouços com estruturas mais porosas e regulares foram reveladas por todas as composições quando comparadas aos não reticulados (Figuras 5.9b e 5.9c). Pode-se observar que os arcabouços reticulados QG5/PA0,5 e QG5/PA1 apresentaram um aumento do grau de intumescimento que pode ser atribuído a maior porosidade comprovada na análise por MEV quanto ao menor efeito da reticulação (Figuras 5.17 e 5.18). Os arcabouços reticulados QG5/PA5 e QG5/GTA0,5 revelaram forte influência da reticulação sobre o volume de líquido absorvido, apresentando reduções no grau de intumescimento de 28,4% e 33,6%, respectivamente. Os arcabouço QG10/PA5 e QG10/GTA0,5 exibiram redução de 23,3% e 56,5%, respectivamente.

Figura 5.17 – Micrografias MEV dos arcabouços QG5 reticulados com PA e GTA. Secção longitudinal (I) e Secção Transversal (II).

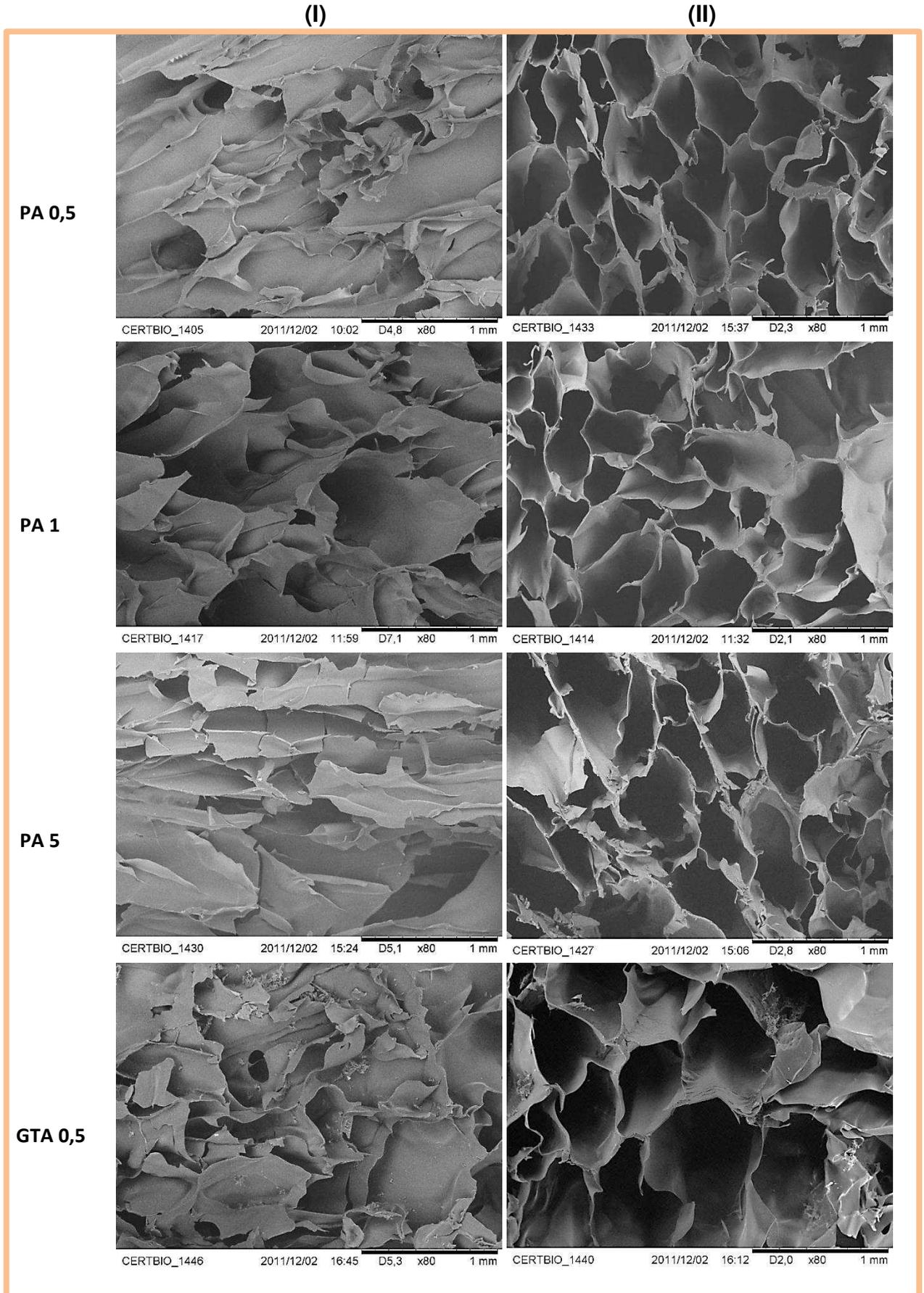


Figura 5.18 – Micrografias MEV dos arcabouços QG10 reticulados com PA e GTA. Secção longitudinal (I) e Secção Transversal (II).

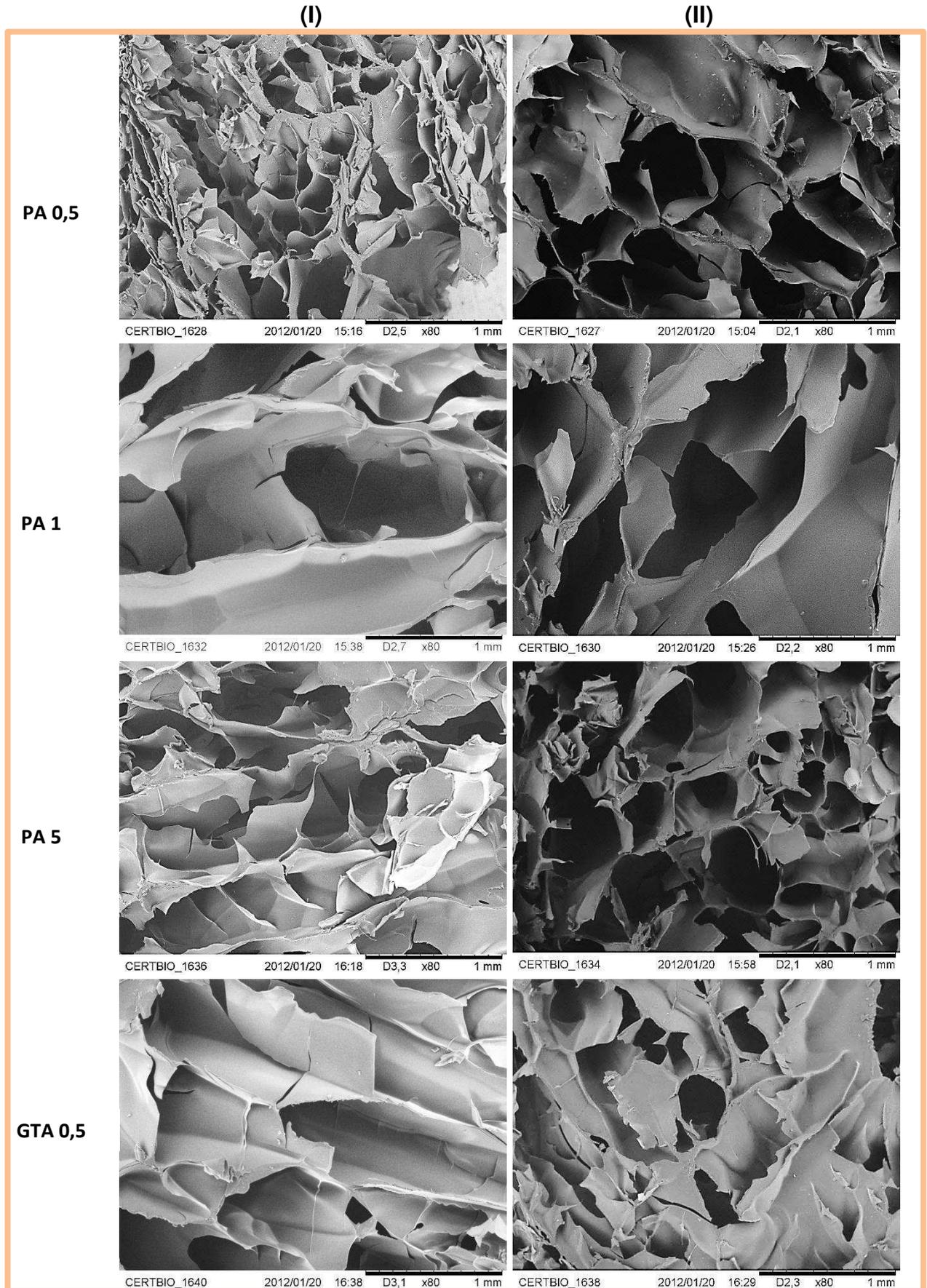
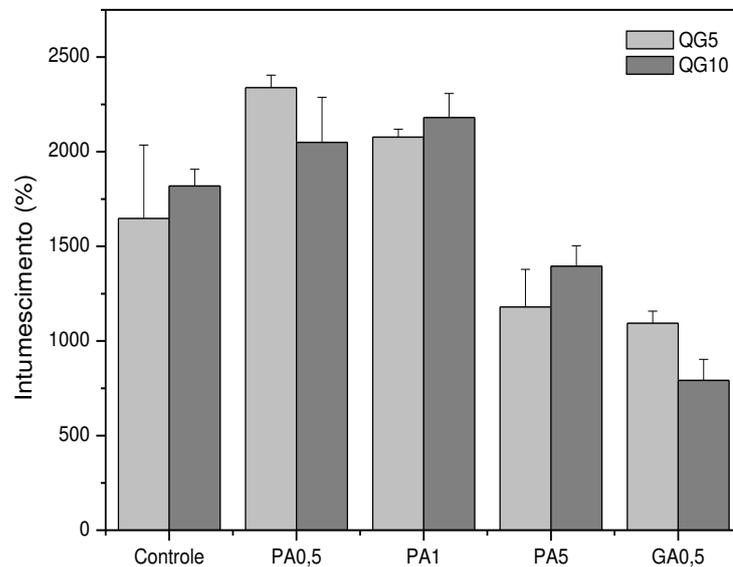


Figura 5.19 – Grau de intumescimento dos arcabouços (b) reticulados com PA GTA.



Kim e colaboradores (2005) desenvolveram filmes QG reticulados com PA. A avaliação do grau de intumescimento mostrou que a capacidade de intumescimento dos filmes sofreu forte redução e que a concentração de 0,5% de PA foi a mais efetiva.

Ma e colaboradores (2003) investigaram a bioestabilidade de arcabouços colágeno/quitosana utilizando o GTA como agente de reticulação e comprovaram sua influência na morfologia e redução do grau de intumescimento do arcabouço. A forte influência das ligações cruzadas sobre a capacidade de absorção do fluido também foi relatada por Costa Jr e colaboradores (2009) quando desenvolveram filmes de blendas de Q/PVA reticulados com diferentes concentrações de GTA.

5.2.5 Propriedades Mecânicas dos arcabouços

A resistência à compressão (σ_{10}) dos arcabouços QG5 e QG10 com adição dos agentes reticulantes PA e GTA foi determinada a partir dos ensaios de compressão como demonstrado nas Figuras 5.20 e 5.21. Os resultados, apresentados na Tabela 5.4, foram calculados em valores de 10% de deformação, uma vez que as curvas apresentaram uma região elástica em valores muito baixos de tensão. A adição dos agentes de reticulação reduziram as propriedades

mecânicas dos arcabouços quando comparado aos arcabouços QG de controle. Essa redução foi mais intensa nos arcabouços QG10.

Sabe-se que a reticulação tende a aumentar a resistência mecânica dos polímeros. Portanto, para explicar o fenômeno de redução das propriedades mecânicas reveladas neste estudo, consideramos a forte influência da modificação da morfologia dos arcabouços com a reação de reticulação, com aumento da porosidade e do tamanho dos poros. Tem sido reportado que a resistência mecânica de um arcabouço poroso depende principalmente do tamanho dos poros, e poros menores são necessários para aumentar a resistência biomecânica desses materiais (MAO *et al.*, 2003).

Como descrito no item referente aos resultados das análises por MEV (Fig. 5.16 e 5.17), foram observadas modificações na morfologia dos arcabouços reticulados, gerando estruturas altamente porosas com presença de macroporos, principalmente com a adição do agente PA, justificando o comportamento mecânico apresentado nos ensaios de compressão.

Figura 5.20- Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos arcabouços QG5%. (n=5)

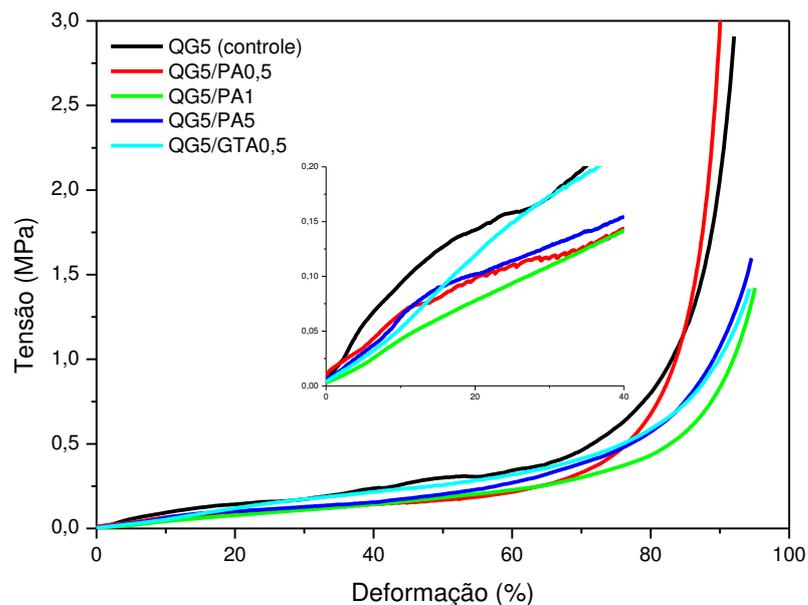


Figura 5.21- Curva representativa tensão-deformação dos testes de compressão dos arcabouços QG10%. (n=5)

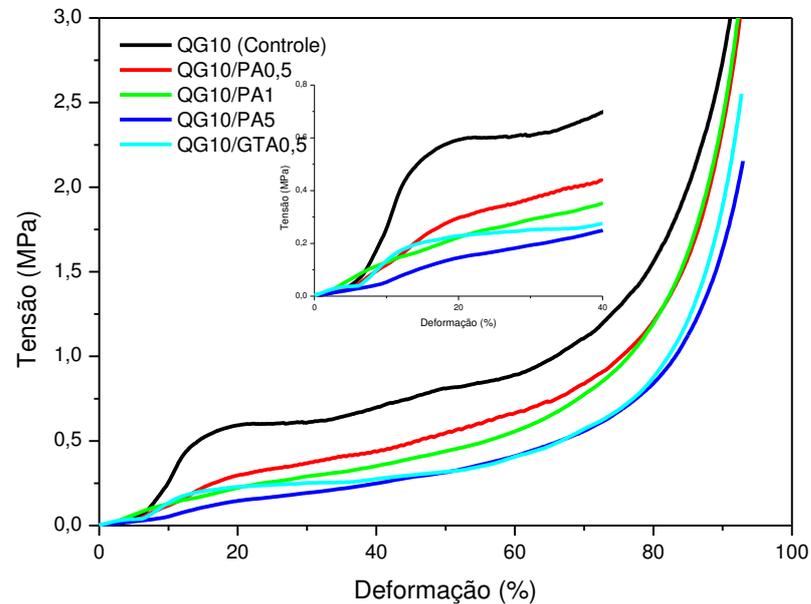


Tabela 5.4- Resistência à compressão (σ_{10}) dos arcabouços reticulados.

QG5	σ_{10} (Mpa)	QG10	σ_{10} (Mpa)
Controle	0,071 ± 0,028	Controle	0,442 ± 0,164
PA0,5	0,0681 ± 0,0061	PA0,5	0,1306 ± 0,0182
PA1	0,0395 ± 0,0079	PA1	0,1219 ± 0,0182
PA5	0,0665 ± 0,0109	PA5	0,0575 ± 0,0193
GTA0,5	0,0513 ± 0,0067	GTA0,5	0,1271 ± 0,0112

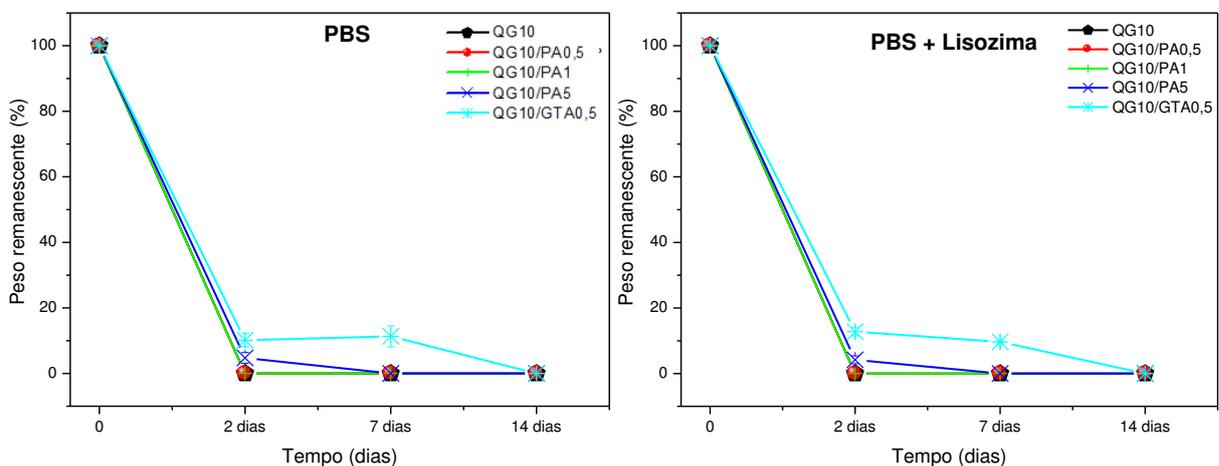
5.2.6 Degradação *in vitro*

Nesse estudo os arcabouços QG10% com e sem reticulação com PA e GTA foram escolhidos como representantes do grupo, por apresentar maior teor de gelatina, para avaliação da adição dos agentes de reticulação na diminuição da taxa de degradação. A Figura 5.22 apresenta o comportamento de degradação dos arcabouços em PBS e PBS com concentração de lisozima de 1,5 mg/L. Os resultados da degradação dos arcabouços foram muito semelhantes nos dois meios estudados. Em 2 dias de exposição nas soluções as amostras do arcabouço QG10

sem reticulação foram totalmente desintegradas. O mesmo comportamento foi apresentado pelos arcabouços QG10/PA0,5 e QG10/PA1. Os arcabouços QG10/PA5 e QG10/GTA0,5 apresentaram uma perda de massa em 2 dias de aproximadamente 95% e 90%, respectivamente. A contínua exposição desses arcabouços nas soluções durante 7 dias resultou na completa desintegração do arcabouço reticulado com QG10/PA5 e na manutenção da taxa de degradação do arcabouço reticulado com QG10/GTA0,5. Em 14 dias de exposição todos os arcabouços apresentaram completa degradação.

Uma controlável taxa de biodegradação desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular e regeneração tecidual (KASAHARA *et al.*, 2003). Nesse sentido, o processo de reticulação conhecido por aumentar a resistência mecânica e a estabilidade química também se torna uma alternativa de controle da solubilidade e permeabilidade aquosa, além de reduzir o grau de intumescimento (MA *et al.*, 2003).

Figura 5.22 – Comportamento de degradação dos arcabouços QG10% reticulados. (a) PBS e (b) PBS com concentração de lisozima. Média \pm D.P (n=3).



Os arcabouços QG10% podem ser considerados completamente biodegradáveis, e a adição dos agentes reticulantes PA e GTA, nos teores estudados, não foi suficiente para reduzir a biodegradabilidade desses arcabouços que é, segundo a literatura, provocada pela degradação da quitosana e dissolução da gelatina. Além da composição dos arcabouços serem susceptíveis a degradação por hidrólise, a alta capacidade de intumescimento demonstrada e a morfologia dos

arcabouços, caracterizada por alta porosidade, presença de macroporos e paredes finas, aumenta a área de contato com as soluções, potencializando o efeito da degradação (MAO *et al.*, 2003).

A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação *in vivo* da quitosana, porém tal degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana (SUH e MATTHEW, 2000). Segundo Dallan (2005), o maior valor de degradação das membranas quando expostas à enzima durante 60 dias, conforme observado em seu estudo, foi de 14,33%. Esse comportamento foi confirmado por Tigli *et al.* (2007), em que arcabouços de quitosana (GD= 5-85%) apresentaram uma perda de massa acima de 20% após três semanas de exposição à enzima lisozima. Portanto, torna-se evidente que a adição da gelatina (polímero hidrofílico) na confecção dos arcabouços QG facilita a degradação e que a taxa de degradação pode ser controlada pelo ajuste da razão quitosana:gelatina (ZHUANG *et al.*, 2007).

Yang *et al.* (2010) desenvolveram hidrogéis híbridos a base de Q e G reticuladas por radiação em temperatura ambiente e avaliaram entre outras propriedades a degradação *in vitro* em presença de lisozima e o resultado foi a total degradação entre 2 e 5 dias. O tempo de degradação foi menor quando a concentração de gelatina foi superior ao de quitosana.

Uma alternativa sugerida por Jatariu *et al.* (2011) para aumentar a estabilidade de hidrogéis quitosana/gelatina foi realizar uma dupla reticulação (covalente seguida pela iônica) utilizando o GTA e o tripolifosfato de sódio (TPP) como agentes de reticulação. Os resultados mostraram a efetividade das reticulações com consequente aumento do potencial de aplicação biomédica desses hidrogéis.

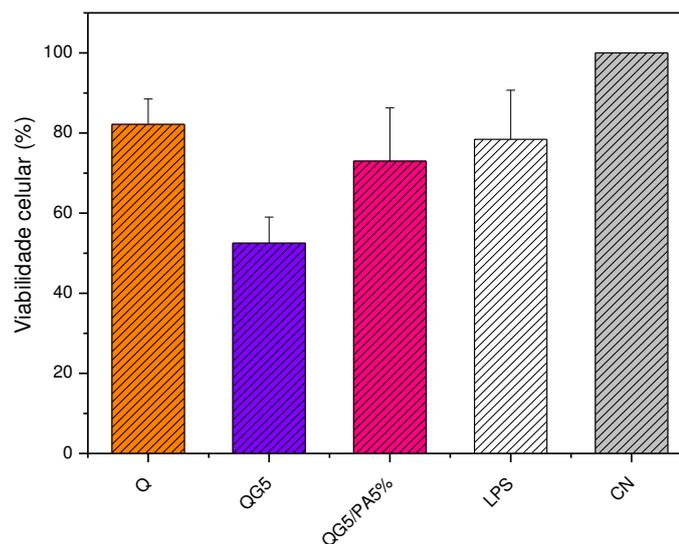
5.2.7 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

A Figura 5.23 apresenta o estudo da viabilidade celular de MTT por macrófagos cultivados em contato com os arcabouços Q, QG5 e QG5/PA5. O arcabouço Q apresentou viabilidade celular acima de 80%. A viabilidade celular do arcabouço QG5% foi de 52%, apresentando uma redução de aproximadamente 36% quando comparada ao arcabouço Q. Essa redução da viabilidade sofrida com a adição da gelatina pode ser atribuída ao aumento do caráter adesivo do arcabouço ocorrendo, dessa forma, uma impregnação de células no arcabouço e não a morte celular. A reticulação do

arcabouço com PA5% resultou em uma viabilidade celular de aproximadamente 72%. O valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50% e os valores exibidos pelos arcabouços foram superiores a este valor, sendo, portanto, considerados viáveis com potencial para aplicação na engenharia de tecidos.

Kim *et al.* (2005) desenvolveram filmes de QG reticulados com PA e avaliaram a citotoxicidade *in vivo* desses materiais dentre as caracterizações realizadas. O resultado demonstrou que além dos filmes não apresentarem toxicidade, proporcionaram um arcabouço favorável para proliferação e diferenciação celular.

Figura 5.23- Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços Q, QG5 e QG5/PA5. LPS-Controle positivo e CN – Controle negativo. Média \pm D.P. (n=8)



5.3 Caracterização dos arcabouços QG/HA

5.3.1 Análise Visual dos arcabouços compósitos QG/HA

A Figura 5.24 apresenta as imagens dos arcabouços compósitos QG/HA liofilizados com variadas proporções de G (2, 5 e 10%) e HA (30, 50 e 70%) na composição final. Os arcabouços QG5 e QG10 com teores de HA 30 e 50% apresentaram uma estrutura homogênea e densa. No entanto, os arcabouços QG2 e todas as composições com teor 70% de HA apresentaram aparente fragilidade.

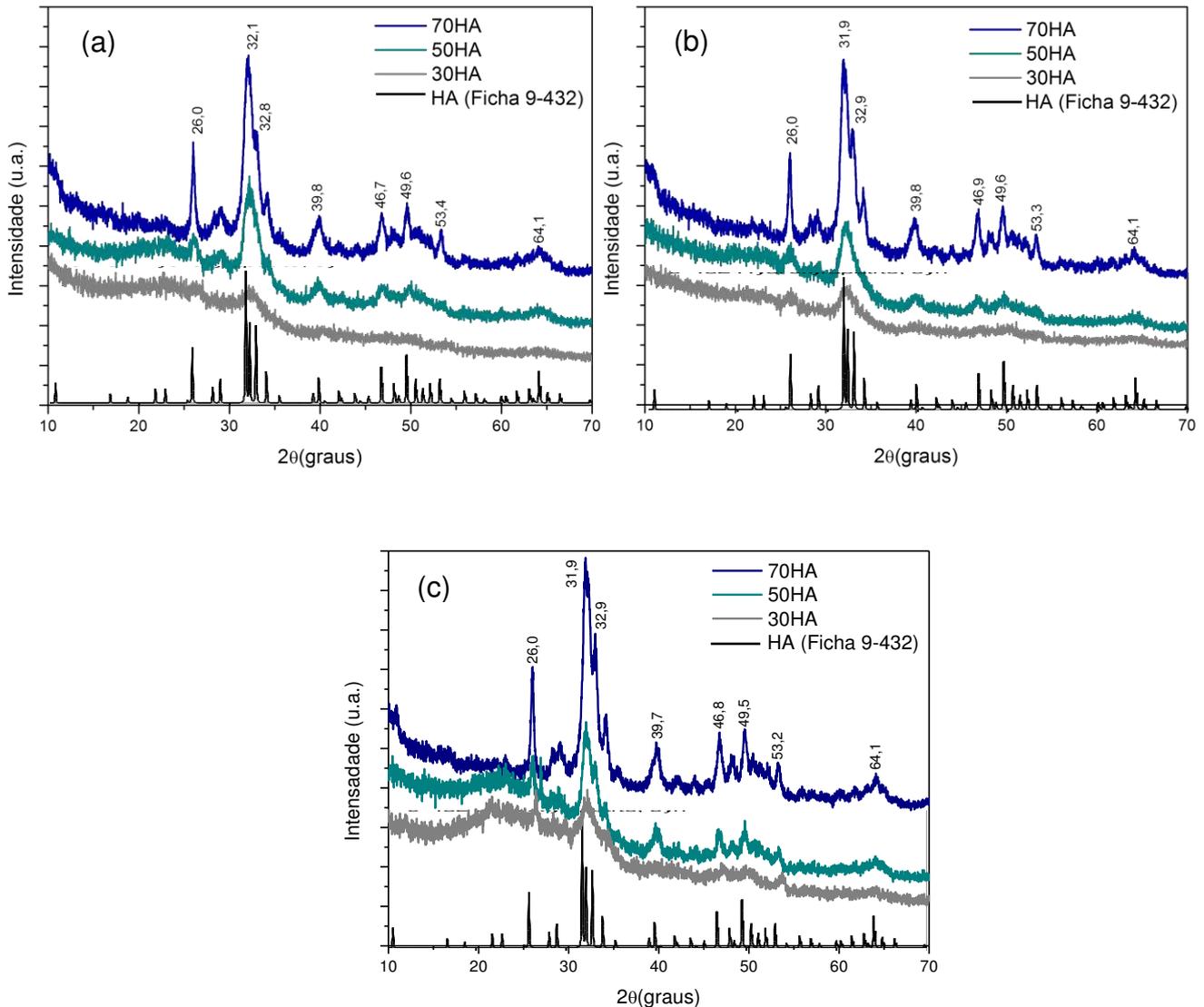
Figura 5.24- Arcabouços compostos QG2 (a), QG5 (b) e QG10 (c).



5.3.2 Difração de raios x

Os padrões de DRX dos arcabouços com adição de hidroxiapatita, apresentados na Figura 5.25 foram comparados com a ficha padrão da HA (ICDD-PDF nº. 9-432). Dois grupos de picos de reflexão podem ser usados para avaliar a formação de HA: um pico em $2\theta = 26^\circ$ (0 0 2) e um outro grupo variando de $2\theta = 31,8^\circ$ (2 1 1) a $2\theta = 32,9^\circ$ (1 1 2) e $39,81^\circ$ (3 1 0) (AHN *et al.*, 2001; CHANG *et al.* 2003; KOUMOULIDIS *et al.*, 2003; CIOBANU *et al.*, 2011).

Figura 5.25- Difratoogramas de raios X dos arcabouços compostos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.



Em todas as composições os picos característicos da HA foram observados. Com o aumento da proporção de HA na composição final, as intensidades desses picos aumentaram, e o picos de gelatina e quitosana ($2\theta \cong 20^\circ$) sofreram um decréscimo correspondente. Além disso, foi possível observar que os picos de reflexão se tornaram mais fortes quando a proporção de gelatina aumentou na composição final do arcabouço, QG10 (Figura 5.29c), isso indica que uma maior quantidade de HA é formada nas superfícies dos arcabouços. Esse resultado está de acordo com Chang *et al.* (2003) e Sundaram *et al.* (2008).

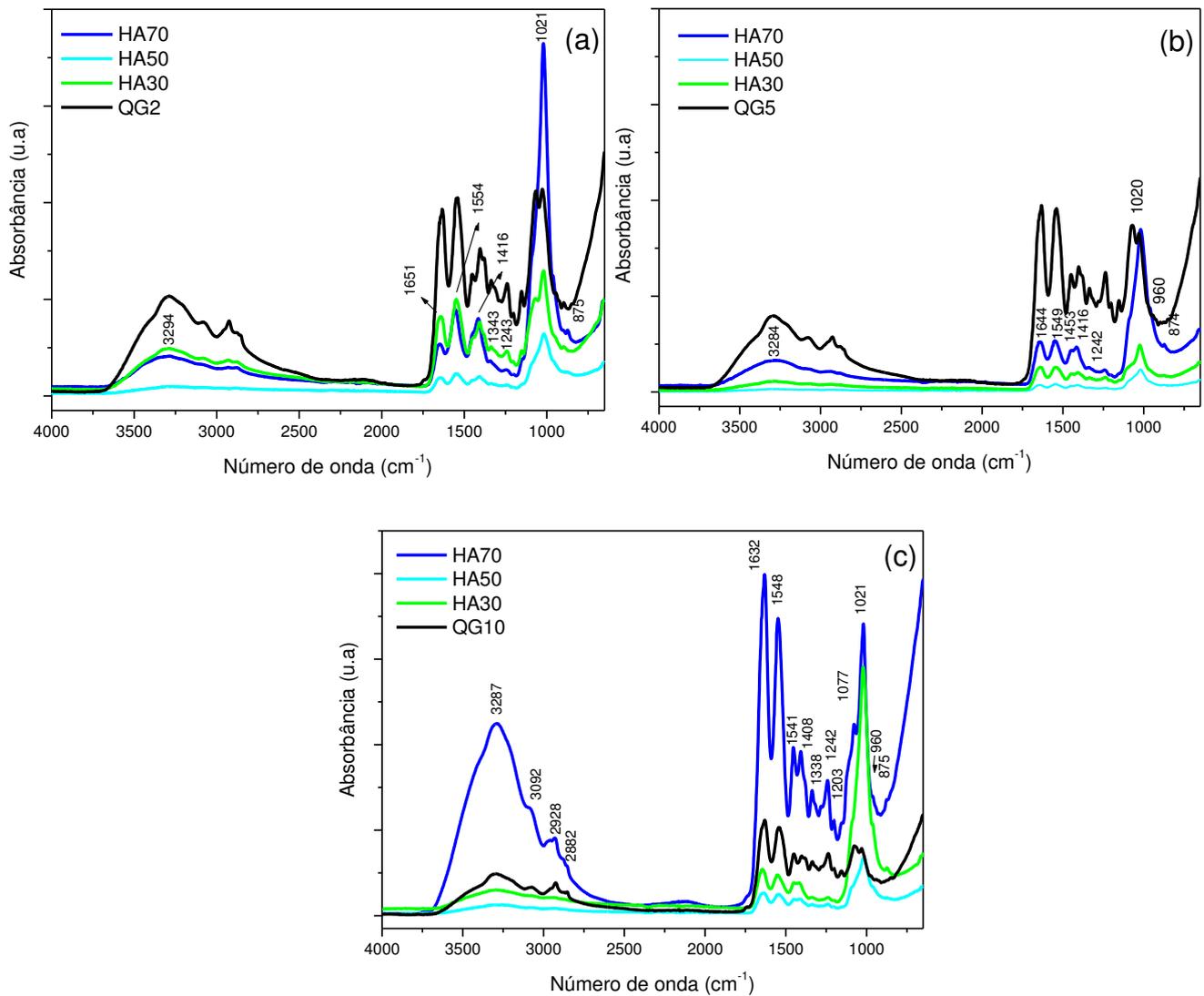
5.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A partir dos espectros de FTIR podem-se obter mais informações sobre as interações entre as fases HA, e o complexo QG. Os espectros dos arcabouços compósitos QG/HA estão apresentados na Figura 5.26. Os espectros apresentaram bandas características do complexo QG e os picos de absorção típicos da HA. As bandas em 1020 cm^{-1} e em 960 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico ν_3 e simétrico ν_1 do grupo fosfato (PO_4^{3-}), respectivamente. A presença da banda em 875 cm^{-1} indica a presença de íons carbonato na apatita (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ISIKLI *et al.*, 2011). Como a fase mineral do osso humano contém uma quantidade importante de carbonato (4 a 8% em peso), a presença do carbonato nos compósitos QG/HA é vantajosa, já que aumenta a bioatividade da apatita, o que pode contribuir para uma maior osteocondução na implantação (MURUGAN, RAMAKRISHNA, 2004).

Comparando com o espectro do arcabouço QG, as absorções dos grupos -COOH e -OH tornam-se mais fracas com a adição do teor de 50% de HA. Isso indica a existência de fortes interações entre a HA e a rede QG por pontes de hidrogênio. A adição do teor de 70% de HA rompe a barreira estequiométrica resultando na formação de uma segunda fase, rica em HA, em relação ao compósito. Esse comportamento foi mais evidenciado com o aumento do teor de gelatina no arcabouço, corroborando com os dados de DRX.

Os grupos funcionais reativos dos biopolímeros agem como um sítio ativo para ligação com HA, através de ligação ou quelação com íons de carga oposta, cálcio e fosfato (LI *et al.*, 2007). No caso da quitosana, o seu grupo amino ($-\text{NH}_2$) que se transforma em NH_3^+ , sendo positivamente carregado, forma um complexo com o grupo fosfato (PO_4^{3-}) da HA (VERMA *et al.*, 2008). No caso da gelatina, as interações ocorrem entre os grupos COO^- , $\text{C}=\text{O}$ e NH_4^{2+} e os grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} da HA (SUNDARAM *et al.*, 2008; PETER *et al.*, 2010). Segundo WANG *et al.* (2006) os íons Ca^{2+} unem-se com o grupo COO^- por meio de interação polar ou eletrostática.

Figura 5.26- Espectros de FTIR dos arcabouços compósitos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.



5.3.4 Morfologia dos arcabouços QG/HA

As micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG/HA estão apresentados nas Figuras 5.27-5.29. As micrografias revelam que a precipitação da HA provocou uma significativa alteração na morfologia dos arcabouços quando comparada aos arcabouços QG de controle (Fig. 5.9). Enquanto a superfície dos arcabouços QG de controle foi densa e lisa, a adição da HA resultou em arcabouços com superfície rugosa, porosa e com poros interconectados desde a superfície.

O arcabouço compósito QG5 com 30% de HA na composição apresentou poros mais esféricos e regulares, característicos da matriz polimérica. Com o

aumento do teor de HA os poros apresentaram uma morfologia lamelar e multidirecional. Esse comportamento é típico de arcabouços cerâmicos e é consequência da etapa de congelamento, onde os cristais de gelo crescem e expõem as partículas cerâmicas (ZHANG *et al.*, 2009; DEVILLE *et al.*, 2006).

As micrografias do arcabouço compósito QG10/HA revelaram uma arquitetura com menor porosidade, paredes mais espessas e diminuição do tamanho dos poros. Esse comportamento pode ser atribuído ao maior envolvimento das partículas de HA pela matriz polimérica QG, resultando numa estrutura mais homogênea. A tendência à formação de poros lamelares foi observada para o teor de 70% de HA.

A arquitetura de um arcabouço para engenharia de tecidos é tão importante quanto à composição química do material do qual é fabricado (WOLFE *et al.*, 2011). Arcabouços para osteogênese devem mimetizar a função, estrutura e morfologia do osso, com o objetivo de melhorar a integração com os tecidos circundantes (MARKS Jr, ODGREN, 2000). A morfologia do osso é resultado da estrutura do osso trabecular, que apresenta uma porosidade entre 50-90% e poros com tamanho na ordem de 1 mm em diâmetro, com o osso cortical em torno dele (KAPLAN *et al.*, 1994). Dessa forma, a presença de poros faz-se necessária para a formação de tecido ósseo porque permitem a infiltração, migração, proliferação dos osteoblastos e células mesenquimais, bem como a vascularização, e assim restaurar as funções fisiológicas normais (KUBOKI *et al.*, 1998; TOH *et al.*, 2006; BERRY *et al.*, 2004).

Apenas a presença de poros no arcabouço com dimensões apropriadas para o crescimento tecidual não é suficiente, os poros também necessitam ser abertos e interconectados (KIDOAKI *et al.*, 2005). A interconectividade entre os poros, demonstrada na Figura 5.30, é a característica principal da porosidade que tem se confirmado ao longo de vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento do tecido ósseo, pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos intersticiais (RATNER *et al.*, 1996; LIEBSCHNER *et al.*, 2003; YASZEMSKI *et al.*, 1996). O papel da interconectividade dos poros, a acessibilidade dos poros da superfície do arcabouço, a presença de poros isolados e a importância da avaliação destas propriedades em três dimensões são considerados essenciais para muitos autores (OTSUKI *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007).

Figura 5.27- Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG2/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).

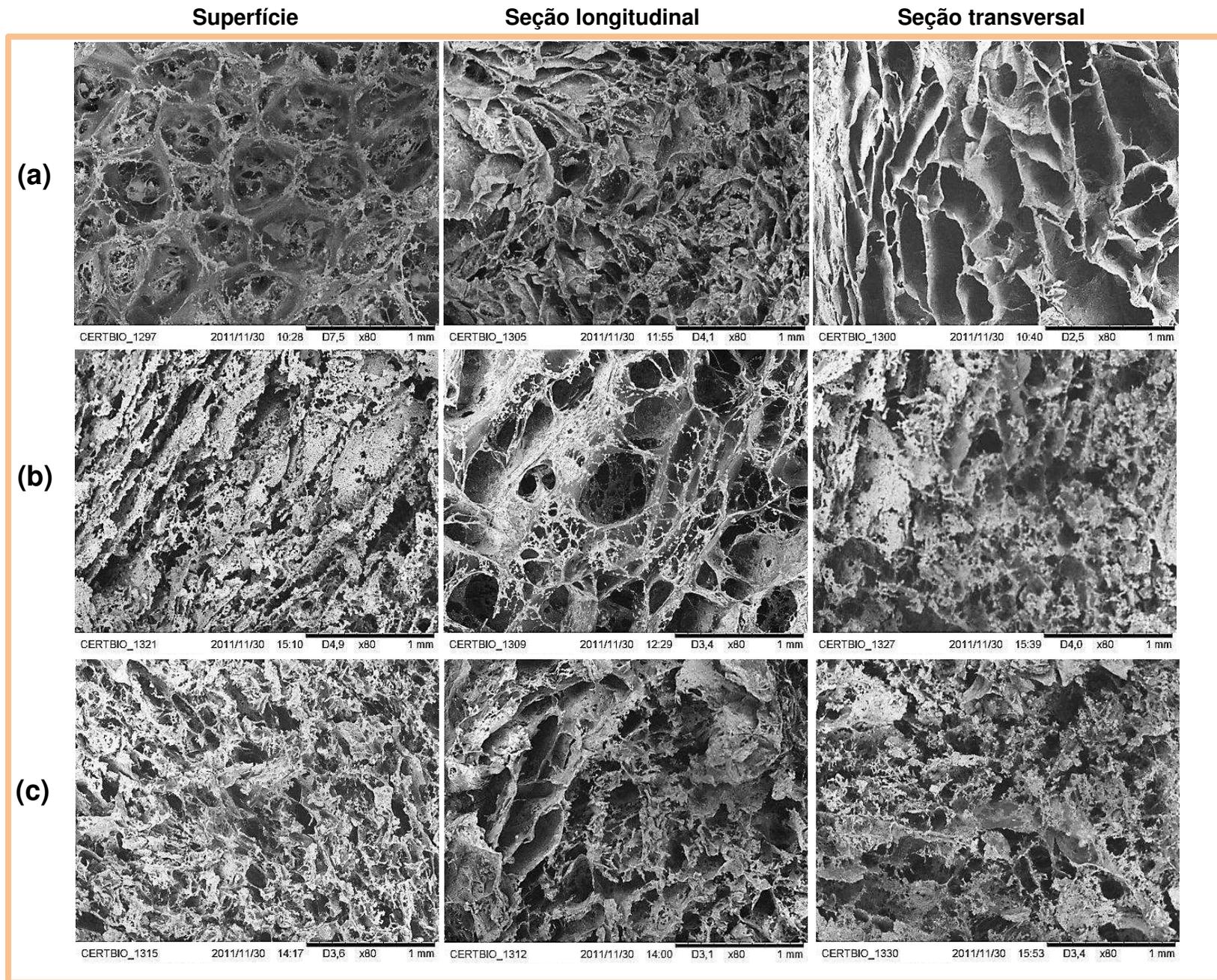


Figura 5.28- Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG5/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).

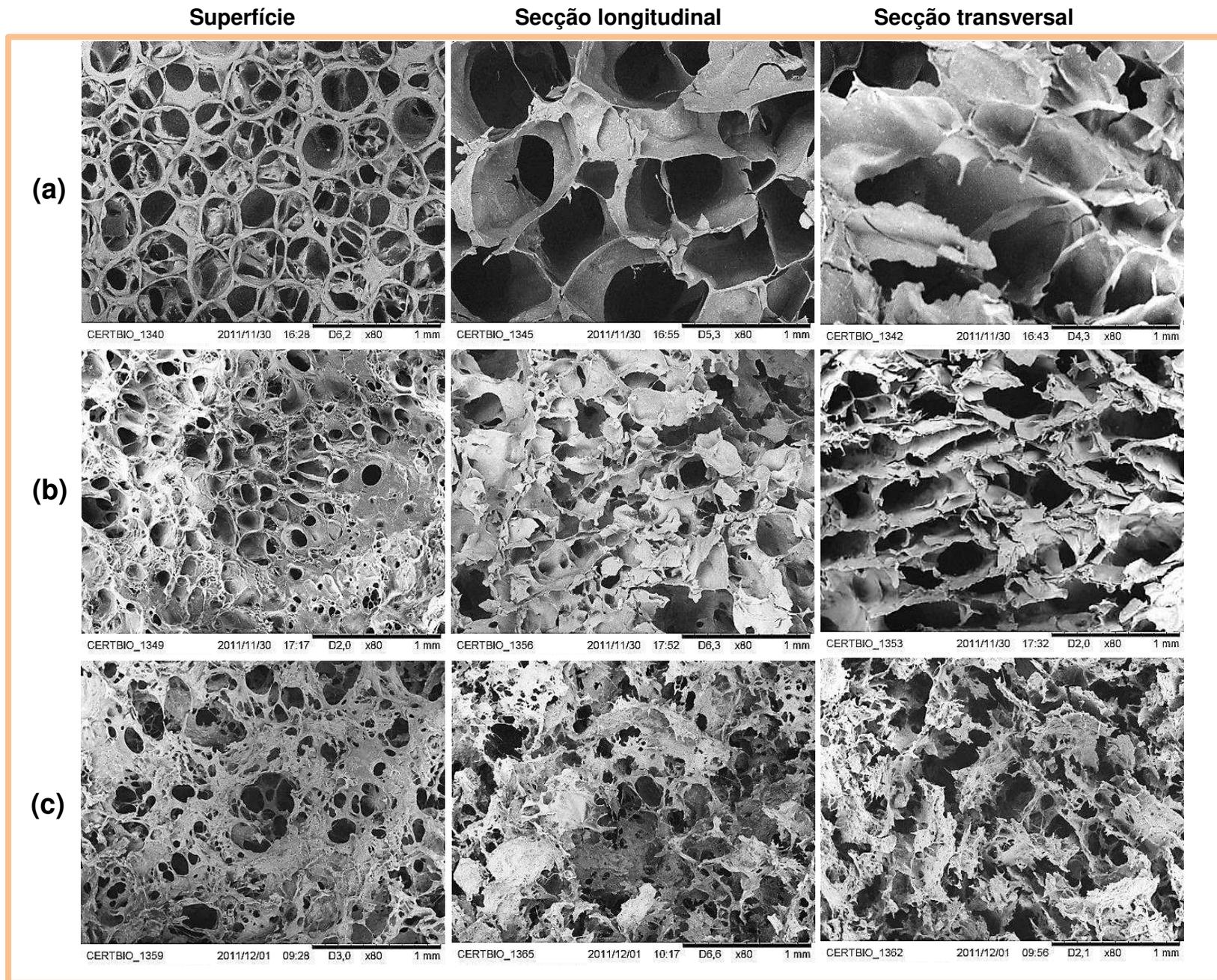


Figura 5.29- Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG10/HA. HA30% (a) HA50% (b) HA70% (c).

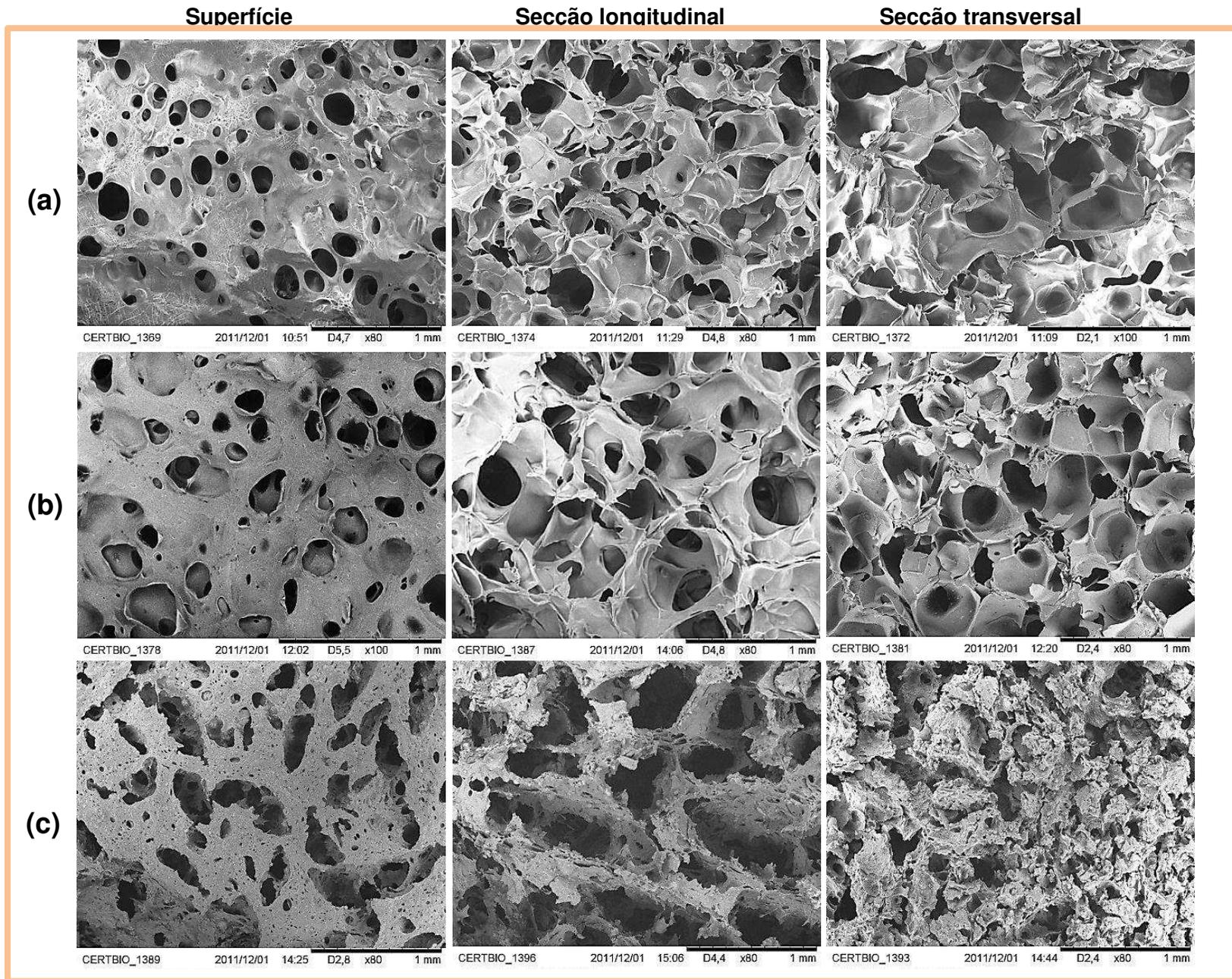
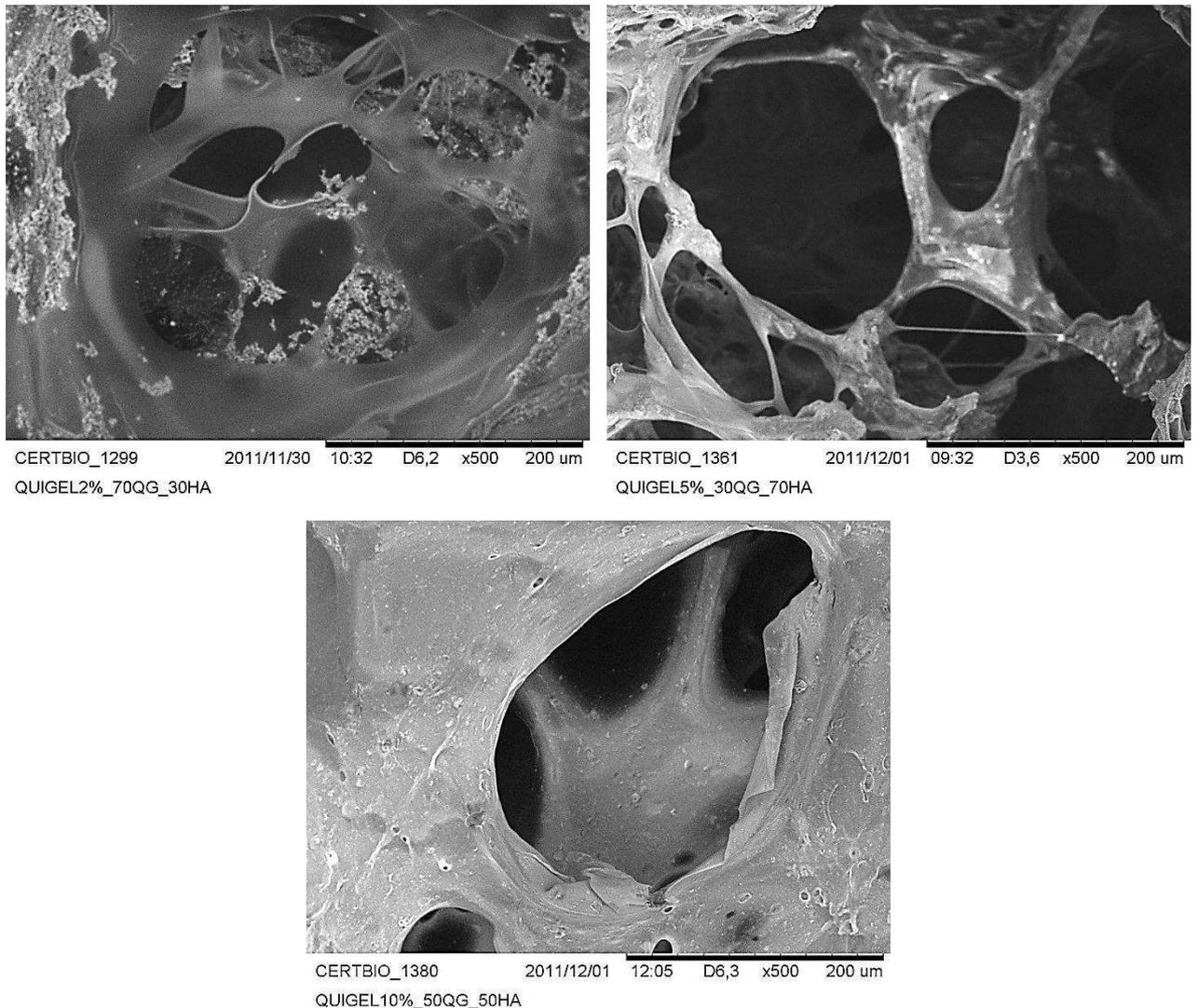


Figura 5.30 - Micrografias MEV demonstrando a Interconectividade entre os poros.

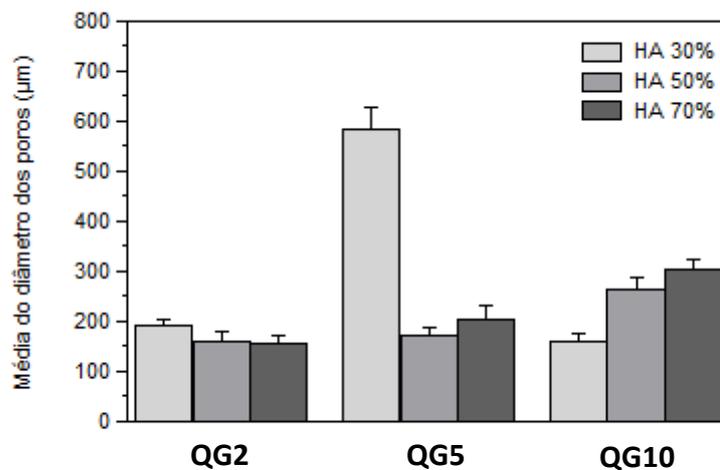


A Figura 5.31 apresenta a média do diâmetro dos poros dos arcabouços compósitos em função da proporção de HA na composição final. Foi possível observar que o aumento da proporção da HA nos arcabouços QG2 e QG5 resultou na diminuição do diâmetro dos poros. Entre todas as composições estudadas, o arcabouço QG5/30HA destacou-se por apresentar a maior média de diâmetro de poro (590 μm). Um comportamento inverso foi observado nos arcabouços QG10/HA, onde o aumento da proporção de HA gerou poros maiores e mais alongados (Figura 5.29).

A presença de poros maiores que 100 μm demonstrou que os arcabouços compósitos HA/biopolímero, em todas as composições estudadas, são materiais em potencial para aplicação na regeneração óssea, uma vez que os poros são

suficientemente extensos para acomodar células (THOMSON *et al.*, 1998; NARBAT *et al.*, 2006). Ao longo dos anos os estudos de crescimento de tecido ósseo em materiais porosos com tamanhos de poros variados tem gerado um consenso que o valor ótimo para o raio do poro para crescimento do tecido está entre 50-150 μm (HULBERT *et al.*, 1972; KARAGEORGIO; KAPLAN, 2005).

Figura 5.31- Média do diâmetro dos poros dos arcabouços compósitos em função da proporção de HA. (n = 25)



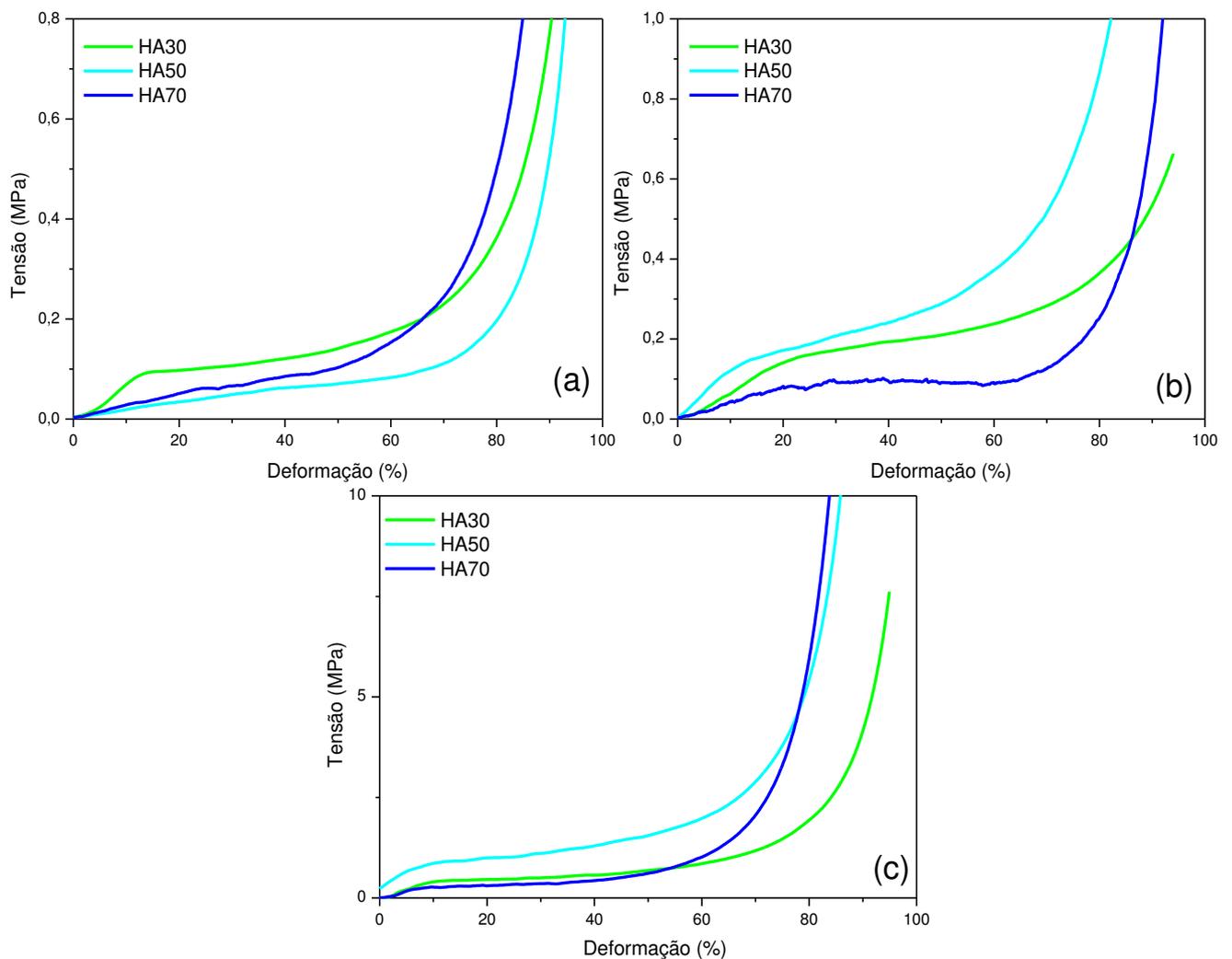
Segundo KARAGEORGIU e KAPLAN (2005), o tamanho mínimo necessário para o crescimento de células ósseas é de 100 - 200 μm . Poros menores entre 75 - 100 μm resultam no crescimento de tecido osteóide não mineralizado. Poros menores ainda, entre 10 - 75 μm permitem a penetração apenas de tecido fibroso, o que ajuda somente na fixação mecânica da peça.

KLAWITER e HULBERT (1971) e WHANG *et al.* (1999), demonstraram através de experimentos o efeito do tamanho do poro na regeneração de tecidos. Os poros de 5 μm permitem a neovascularização, entre 5-15 μm o crescimento de fibroblastos, 40-100 μm o crescimento da matriz osteóide e 100-350 μm a regeneração óssea. Adicionalmente, tamanhos de poros de 100-1000 μm determinará as propriedades mecânicas em um nível global. Finalmente, tamanhos variando de 1-10 μm influenciarão na adesão e atividade de células individuais (HOLLISTER *et al.*, 2005).

5.3.6 Caracterização mecânica dos arcabouços

As composições dos arcabouços estudadas apresentaram comportamento tensão-deformação similares, conforme Figura 5.32, e os resultados do ensaio de compressão dos arcabouços compósitos QG/HA estão apresentados na Tabela 5.6.

Figura 5.32- Espectros de FTIR dos arcabouços compósitos QG/HA. (a) QG2, (b) QG5 e (c) QG10.



Os arcabouços mostraram uma elasticidade linear em valores baixos de tensão, seguido por um platô e finalizando abruptamente por um regime de densificação, no qual a tensão sofre um aumento de forma exponencial (OCHSNER *et al.*, 2003). Contudo, foi possível observar que o aumento do teor de HA nos arcabouços até 50% em massa, resultou em um aumento nas propriedades de resistência a compressão. Acima desse teor os arcabouços apresentaram um

declínio dessas propriedades. Esse comportamento é atribuído à fragilidade da HA, que quando incorporada em altos teores, tende a formar uma segunda fase em relação ao compósito, e conseqüentemente há um aumento da fragilidade (inerente às cerâmicas) do arcabouço compósito QG/HA, levando a uma diminuição correspondente da resistência a compressão e módulo elástico (TENG *et al.*, 2009).

Entre os resultados apresentados na Tabela 5.5, o arcabouço QG10/50HA destacou-se por apresentar maior resistência à compressão. Em se tratando da aplicação para engenharia de tecido ósseo, esses valores ainda se encontram muito abaixo do requisitado para áreas de sustentação, uma vez que os valores de resistência a compressão do osso trabecular se encontram na faixa de 2-12 MPa (HENCH *et al.*, 1993).

Tabela 5.5 – Resistência à compressão dos arcabouços compósitos QG/HA.

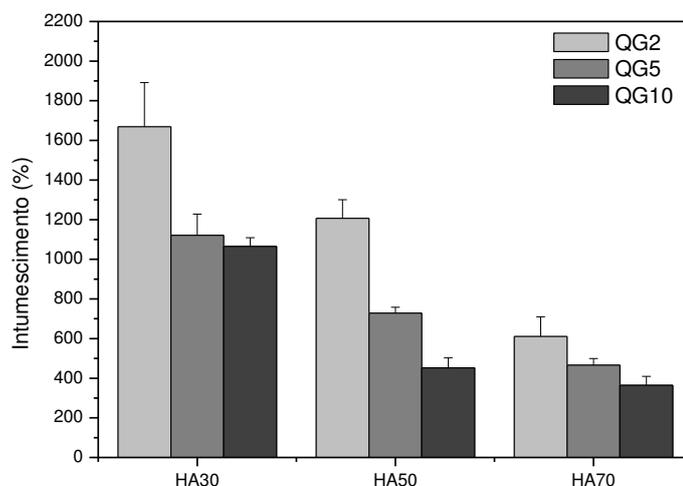
Arcabouço	σ_{10} (Mpa)			
	Controle	30HA	50HA	70HA
QG2	0,0120 ± 0,0020	0,0647 ± 0,0036	0,0156 ± 0,0027	0,0292 ± 0,0022
QG5	0,0710 ± 0,0280	0,0678 ± 0,0094	0,1157 ± 0,0256	0,0388 ± 0,0020
QG10	0,4420 ± 0,1640	0,3575 ± 0,0438	0,7835 ± 0,0610	0,2761 ± 0,0159

A avaliação do desempenho dos arcabouços à compressão faz-se necessário, uma vez que estes devem apresentar uma estabilidade estrutural para suportar o esforço efetuado durante a cultura *in vitro* e a implantação *in vivo* (POMPE *et al.*, 2003). Diversos fatores podem contribuir para a resposta mecânica dos arcabouços compósitos multicomponentes, tais como, tamanho das partículas do componente inorgânico, as propriedades mecânicas inerentes do componente orgânico, as interações interfaciais entre os componentes orgânicos e inorgânicos, a razão entre o conteúdo orgânico/inorgânico e o caráter da reticulação (CAI *et al.*, 2009).

5.3.7 Grau de Intumescimento

A avaliação do grau de intumescimento dos arcabouços compósitos após 24h de incubação em PBS está apresentada na Figura 5.33. Os resultados indicaram um alto grau de intumescimento e uma capacidade de reter líquido maior que seu peso original. No entanto, a incorporação da HA reduziu essa capacidade dos arcabouços e essa redução foi crescente com o aumento do teor de HA. Essa redução deve-se as interações existentes entre a HA (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) e os grupos hidrofílicos da gelatina e o grupo amina da quitosana. Esses resultados foram consonantes com diversos autores (PETER *et al.*, 2010; THEIN, MISRA, 2009; NORDTVEIT *et al.*, 1996).

Figura 5.33- Efeito da incorporação da HA na porcentagem da absorção de água pelos arcabouços compósitos QG.



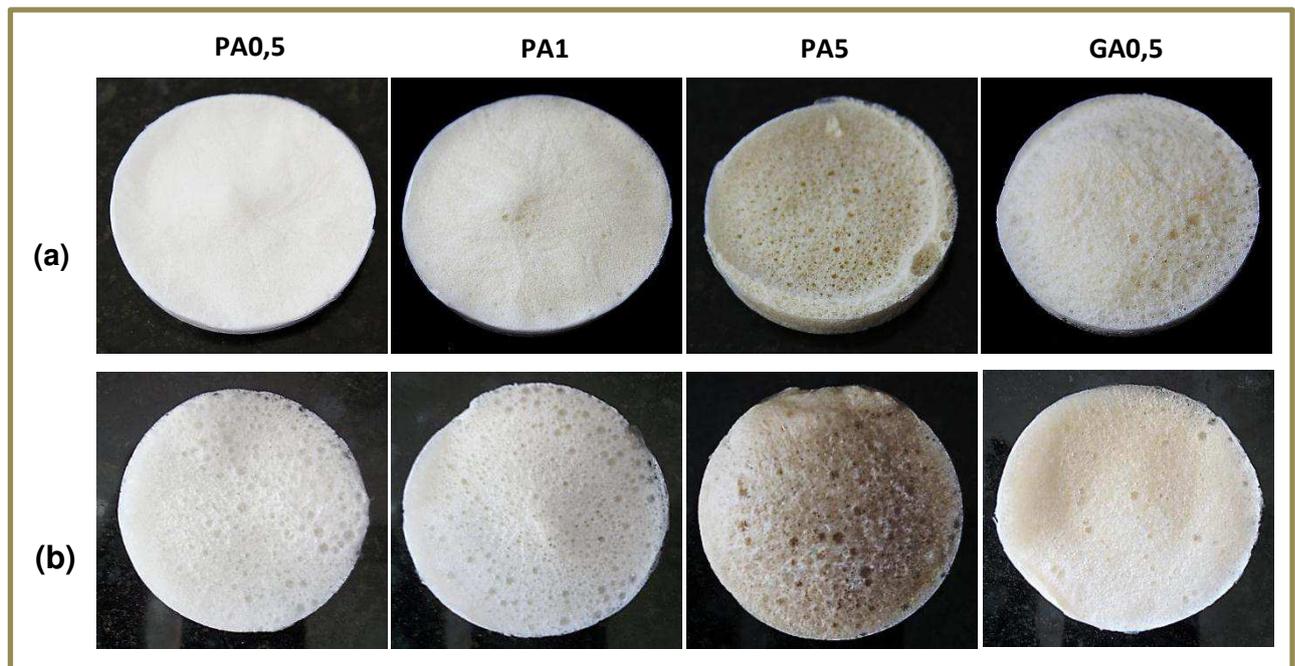
O intumescimento facilita a infiltração de células nos arcabouços durante a cultura de células; aumenta o tamanho dos poros e a porosidade total maximizando assim a área de superfície interna dos arcabouços. No entanto, o intumescimento dos arcabouços pode tanto promover uma maior adesão celular, como também reduzir as propriedades mecânicas (PETER *et al.*, 2010).

5.4 Caracterização dos arcabouços QG/HA reticulados

5.4.1 Análise visual dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados

Os arcabouços compósitos selecionados para o estudo da reticulação com PA e GA foram QG5/30HA e QG10/30HA. Os arcabouços reticulados apresentaram-se rígidos e com porosidade superficial. A adição do agente PA em maior concentração resultou em arcabouços com uma tonalidade próxima do castanho e a adição do GA resulta em uma tonalidade amarelada, conforme Figura 5.34.

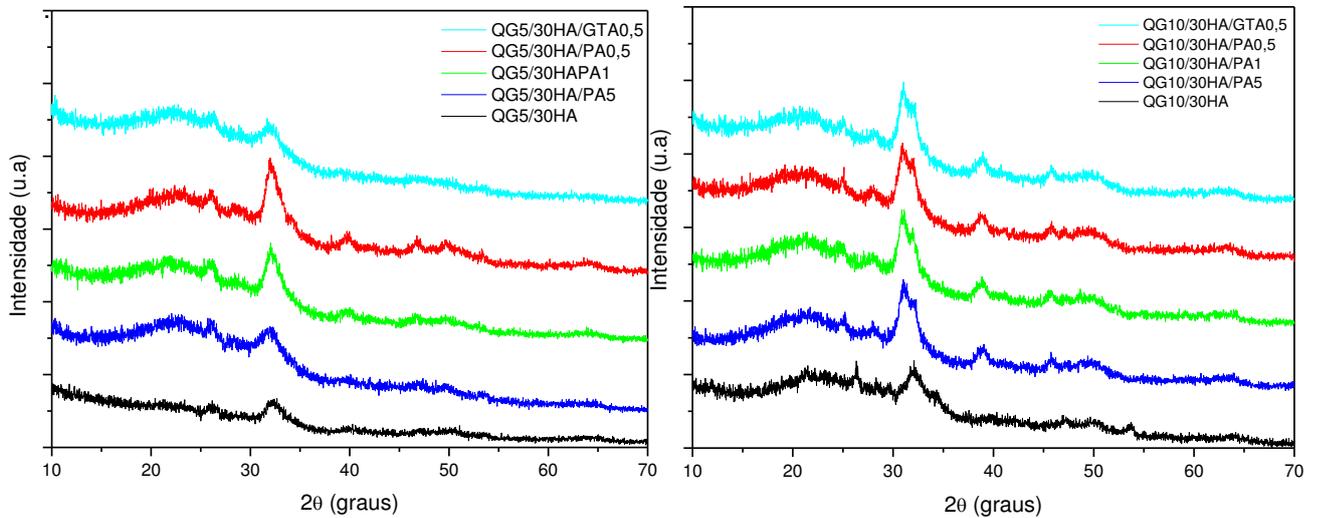
Figura 5.34 – Arcabouços QG/HA reticulados com PA e GA. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA.



5.4.2 Difração de raios X

A Figura 5.35 apresenta os difratogramas dos arcabouços QG/HA reticulados com PA e GTA. Pode-se observar que a adição dos agentes reticulantes alterou os padrões de DRX quando comparados aos arcabouços não-reticulados. Observou-se o aumento da intensidade e pequenos deslocamentos dos picos característicos da HA.

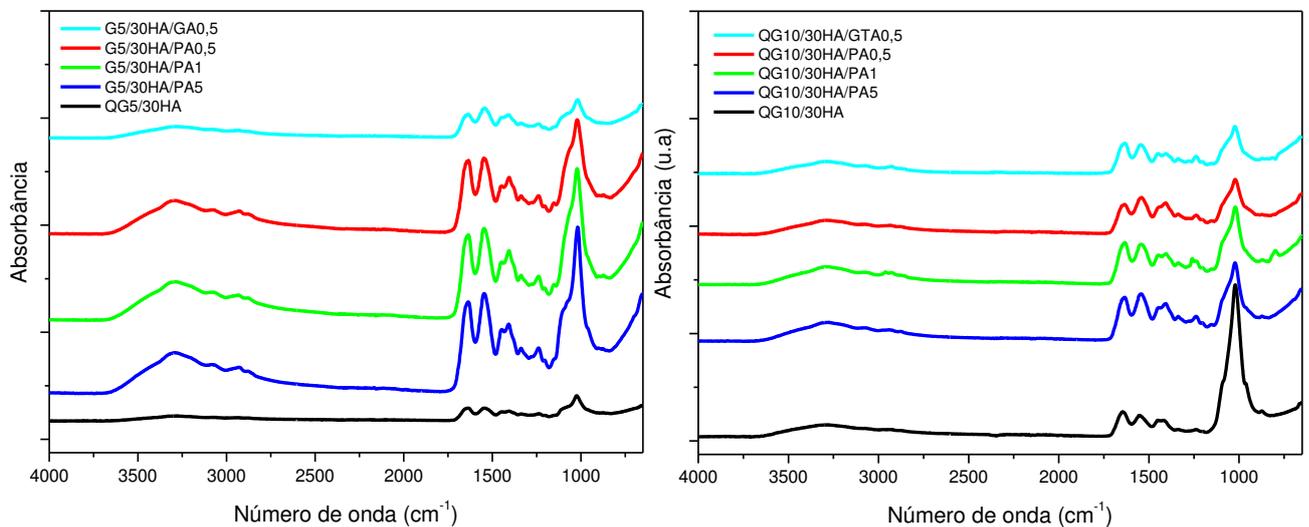
Figura 5.35- Difratomogramas dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA.



5.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 5.36 apresenta os espectros de FTIR dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados. Pode-se observar que a ação dos reticulantes PA e GTA foi mais efetiva no arcabouço com maior teor de gelatina. Observa-se que a PA atua nas cadeias poliméricas e compete com a interação das biocerâmicas, resultando na exclusão da HA, fenômeno comprovado pela liberdade de movimento dos grupos fosfatos e corrobora com os resultados da análise por DRX.

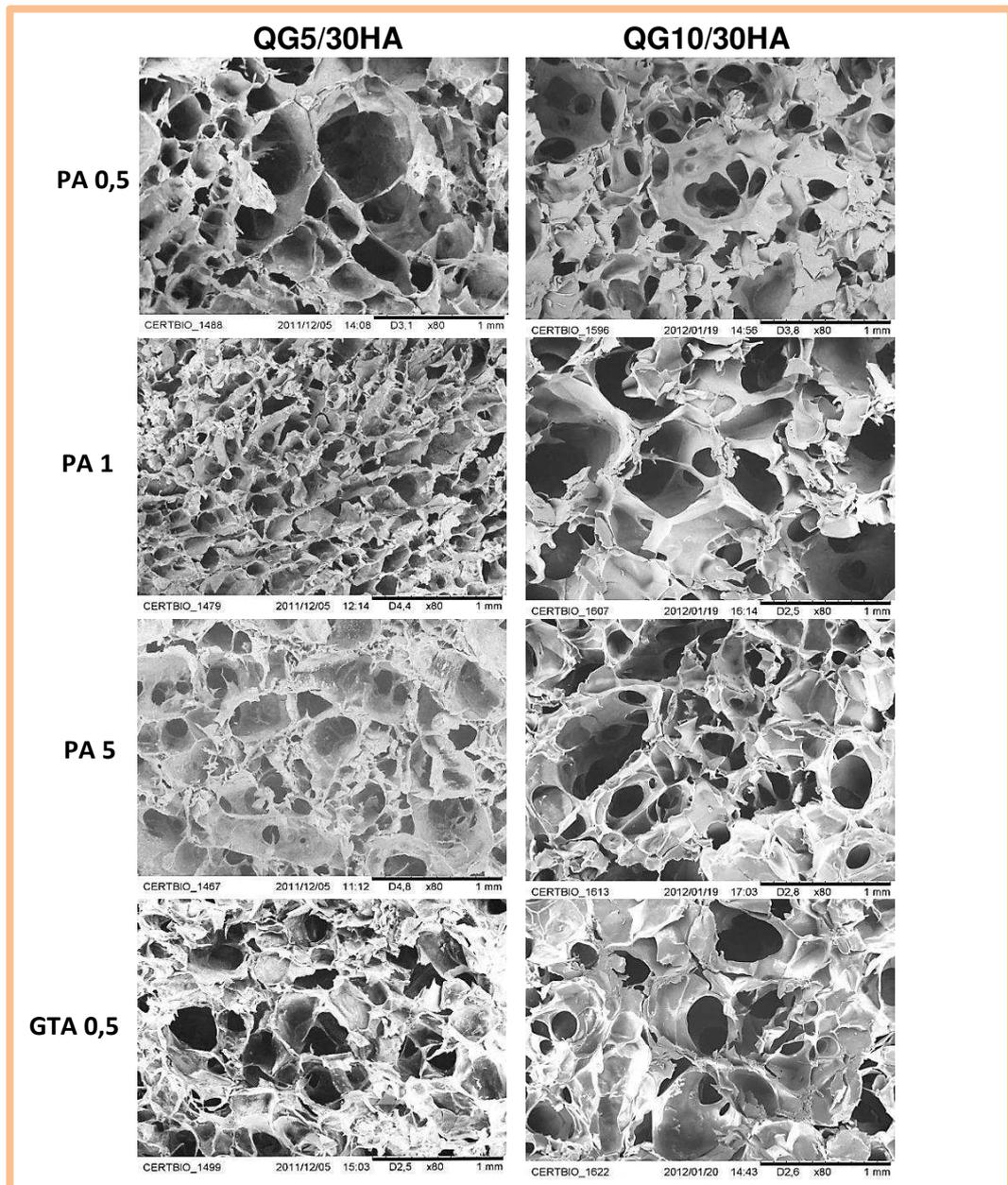
Figura 5.36 – Espectros de IV dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados. (a) QG5/30HA e (b) QG10/30HA.



5.4.4 Morfologia dos arcabouços QG/HA reticulados

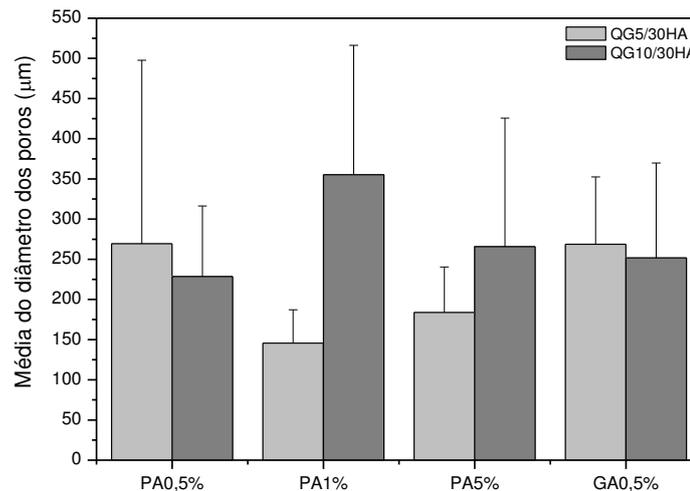
As micrografias dos arcabouços compósitos reticulados estão exibidas na Figura 5.37. Observaram-se estruturas altamente porosas com uma distribuição larga de tamanho de poros e porosidade interconectada em todos os arcabouços. Comparando as micrografias dos arcabouços reticulados e sem reticulação, observam-se modificações significativas. No caso do arcabouço QG5/30HA, houve uma tendência de diminuição do tamanho dos poros e no arcabouço QG10/30HA, porosidade mais aberta e interconectada.

Figura 5.37- Micrografias MEV dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados.



Os resultados da média do diâmetro dos poros dos arcabouços reticulados calculados a partir das micrografias por MEV estão apresentados na Figura 5.38.

Figura 5.38- Média do diâmetro dos poros dos arcabouços compósitos reticulados. (n=12)



Os valores dos diâmetros dos poros apresentados pelos arcabouços variaram de acordo com os teores de gelatina e agente reticulante. Dentre os arcabouços QG5/30HA, a maior ($269,4 \pm 228,3\mu\text{m}$) e menor média ($145,71 \pm 41,44\mu\text{m}$) de diâmetro de poro foram apresentadas pelos arcabouços, QG5/30HA/PA0,5 e QG5/30HA/PA1, respectivamente. E entre os arcabouços QG10/30HA, o arcabouço QG5/30HA/PA0,5 apresentou média de $228,44 \pm 87,97\mu\text{m}$ e o QG10/30HA/PA1 $355,27 \pm 161,05$. Pode-se concluir que a reticulação dos arcabouços compósitos altera o tamanho dos poros, porém os resultados mostraram valores superiores a $100\mu\text{m}$, tamanho esse considerado como suficiente para acomodação das células ósseas (SÁLCEDO *et al.*, 2008).

5.4.5 Propriedades Mecânicas

A Tabela 5.6 apresenta os resultados dos ensaios de compressão dos arcabouços compósitos QG/HA reticulados.

Os resultados apresentados pelo arcabouço QG5/30HA revelaram que a reticulação com PA alterou a propriedade de resistência a compressão quando comparado aos valores dos arcabouços controle. No entanto, a reticulação com GTA resultou no decréscimo das propriedades estudadas. Analisando os resultados exibidos pelos arcabouços QG10/30HA, observou-se uma forte redução das propriedades mecânicas quando reticulados com PA, destacando-se os arcabouços QG10/30HA/PA0,5 e QG10/30HA/PA1. Porém, a resistência à compressão sofreu um aumento para valores próximos dos arcabouços controle nas composições QG10/30HA/PA5 e QG10/30HA/GTA0,5. O comportamento mecânico dos arcabouços pode ser atribuído à forte influência da morfologia dos arcabouços resultante da reação de reticulação comentada anteriormente (Fig.5.34).

Tabela 5.6- Influência da reticulação na resistência à compressão dos arcabouços QG5/30HA e QG10/30HA. Média \pm D.P. (n=5).

QG5/30HA	σ_{10} (Mpa)	QG5/30HA	σ_{10} (Mpa)
Controle	0,0678 \pm 0,0094	Controle	0,3575 \pm 0,0438
PA0,5	0,0604 \pm 0,0097	PA0,5	0,1941 \pm 0,0341
PA1	0,0500 \pm 0,0338	PA1	0,1896 \pm 0,0719
PA5	0,0579 \pm 0,0108	PA5	0,3064 \pm 0,0519
GTA0,5	0,0180 \pm 0,0026	GTA0,5	0,3752 \pm 0,0825

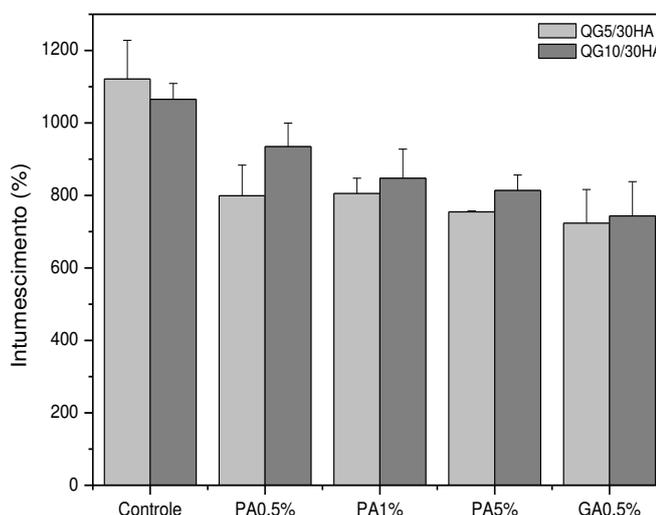
5.4.6 Grau de intumescimento

O comportamento do grau de intumescimento dos arcabouços compósitos com a adição dos agentes reticulantes foi investigado e está apresentado na Figura 5.39.

A capacidade de intumescimento dos arcabouços compósitos estudados sofreu uma redução com a reticulação com PA e GTA. Entre os arcabouços QG5/30HA e QG10/30HA, os que sofreram maior redução da capacidade de intumescimento foram os reticulados com PA 5% e GTA0,5%. Os arcabouços

QG5/30HA com decréscimos de 32,7% e 35,5%, respectivamente. E entre os arcabouços QG10/30HA o grau de intumescimento sofreu decréscimo de 23,6% e 30,2% em relação aos valores de controle. Portanto, os agentes reticulantes utilizados neste estudo potencializaram a diminuição do grau de intumescimento dos arcabouços compósitos.

Figura 5.39 – Efeito da reticulação no grau de intumescimento dos arcabouços compósitos com PA (0,5%, 1% e 5%) e GTA (0,5%).



5.4.7 Degradação *in vitro* dos arcabouços reticulados

Nesse estudo os arcabouços QG10/30HA com e sem reticulação foram escolhidos para avaliação da adição da HA e dos agentes de reticulação na degradação dos arcabouços compósitos. A Figura 5.40 apresenta o comportamento de degradação dos arcabouços em PBS e PBS com lisozima.

Inicialmente, pode-se observar que a introdução da HA no arcabouço QG resulta na redução substancial da taxa de biodegradação do arcabouço compósito. Como relatado anteriormente (Figura 5.22), em apenas 2 dias de exposição nas soluções, as amostras do arcabouço QG10 sem reticulação foram totalmente desintegradas. Esse comportamento pode ser atribuído a menor hidrofobicidade da

HA e a possível interação entre QG e HA, causando uma diminuição da força da ligação ponte de hidrogênio entre o meio aquoso e o complexo QG (LI *et al.*, 2012).

O comportamento dos arcabouços reticulados comprovou uma tendência de estabilização a partir do 2º dia de exposição, uma vez que a perda de massa sofreu um decréscimo quando comparado aos arcabouços sem reticulação. Essa tendência foi mais significativa no meio PBS com lisozima, principalmente para os arcabouços reticulados com PA nos teores 1 e 5%. O arcabouço reticulado com PA0,5% apresentou maior instabilidade nos meios, chegando a se degradar totalmente em 14 dias de exposição em PBS. A reticulação com o GTA resultou em arcabouços com menor perda de massa entre o 2º e o 7º dia de exposição, contudo no período até o 14º dia a taxa de degradação sofre um acréscimo.

A tendência à estabilização dos arcabouços durante o ensaio de degradação foi mais regular no meio PBS com lisozima. A Figura 5.41 demonstra o aspecto visual da amostra do arcabouço QG10/30HA/PA5 após 14 dias de ensaio de biodegradação no meio PBS/lisozima.

Figura 5.40 – Comportamento de degradação dos arcabouços QG10/30HA reticulados. (a) PBS e (b) PBS com concentração de lisozima. Média \pm D.P (n=3).

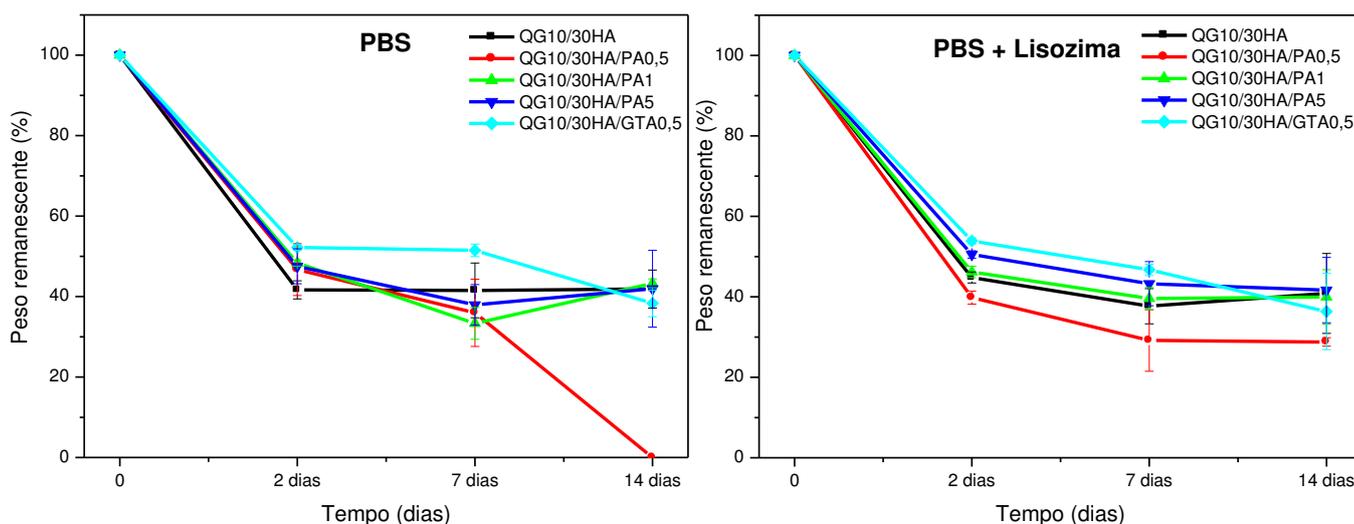


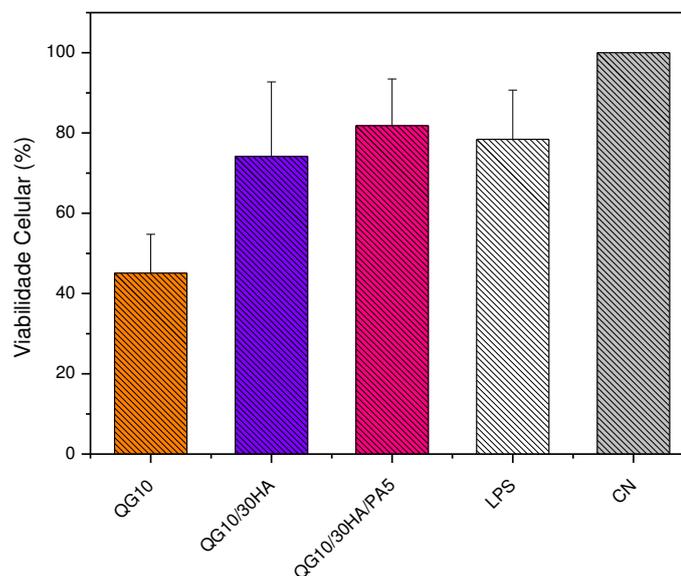
Figura 5.41- Amostra do arcabouço QG10/30HA/PA5 após 14 dias de ensaio de biodegradação no meio PBS/lisozima.



5.4.8 Estudo de Viabilidade Celular dos arcabouços compósitos

O estudo da viabilidade celular por MTT foi realizado para avaliar o efeito da incorporação de HA e da reticulação com PA na citocompatibilidade dos arcabouços compósitos quando colocados em contato direto com as células e os resultados estão exibidos na Figura 5.42. Nessa etapa foram selecionados como representantes do grupo os arcabouços QG10/30HA e QG10/30HA/PA5.

Figura 5.42- Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos arcabouços.



A incorporação da HA na composição do arcabouço provocou um aumento da viabilidade acima de 65% em relação ao arcabouço QG10, alcançando uma viabilidade celular de 74,2%. O arcabouço QG10/30HA/PA5 exibiu uma viabilidade celular de aproximadamente 82%, valor acima da viabilidade celular do controle positivo que exibiu um valor de 78,4%. Os resultados de MTT mostraram que os arcabouços compósitos não exerceram nenhum efeito citotóxico nas células, uma vez que apresentaram uma viabilidade celular acima de 50% (BISPO, 2009). Peter e colaboradores (2010) reportaram em seu estudo que a resposta biológica das células MG-63 nos arcabouços nanocompósitos QG/HA foi superior ao arcabouço QG exibindo um aumento do ataque, proliferação e expansão celular (PETER *et al.*, 2010).

Estudos prévios têm mostrado que arcabouços compósitos de quitosana/gelatina com HA aumentam a resposta biológica de células osteoblásticas (ZHAO *et al.*, 2006). Tang *et al.* (2008) mostraram que os compósitos hidroxiapatita e quitosana apresentam uma boa biocompatibilidade com o tecido duro e uma excelente osteocondutividade. Segundo Thein-Han e Misra (2009) a adição de nanopartículas de HA em arcabouços de quitosana resultou em um maior ataque celular, alta proliferação e uma morfologia melhor distribuída quando comparada com os arcabouços apenas de quitosana.

Li *et al.* (2009) prepararam filmes de HA/QG via biomineralização dos filmes reticulados de QG em uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-Na}_3\text{PO}_4$ em condições alcalinas e todas as composições apresentaram excelente biocompatibilidade.

Ma *et al.* (2001) avaliaram a resposta biológica de células osteoblásticas em arcabouços compósitos PLLA e PLLA-HA. As células, além de penetrar profundamente nos arcabouços PLLA-HA, distribuíram-se uniformemente. A viabilidade e proliferação celular, bem como a expressão de marcadores de diferenciação óssea, foram maiores para os arcabouços compósitos quando comparado ao PLLA puro.

Chen *et al.* (2009) desenvolveram um compósito biodegradável formado por gelatina reticulada com procianidinas oligoméricas (PCOs) e fosfato tricálcico para aplicação como substituto ósseo. Ensaios de degradação *in vivo* e biocompatibilidade foram realizados através de implante subcutâneo em ratos e os resultados das análises radiográficas demonstraram um maior crescimento de tecido ósseo no interior do compósito quando comparado ao osso bovino desproteínizado

no mesmo tempo de implantação; e indicaram que a taxa de degradação *in vivo* foi substancialmente atenuada em concentrações de PCO acima de 5,0%. O autor afirma que a progressiva substituição do compósito pelo novo tecido é consequência da osteocondução e biodegradação e que a composição estudada apresenta grande potencial para melhorar o reparo ósseo.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos estabelecidos neste trabalho: arcabouços com e sem reticulação constituídos por Quitosana/Gelatina e Quitosana/Gelatina/Hidroxiapatita para aplicação como biomateriais para potencial utilização na engenharia de tecido ósseo. Pode-se concluir que:

- Arcabouços Quitosana/Gelatina

Os resultados das caracterizações de DRX e FTIR revelaram que o aumento do teor de gelatina modificou o grau de interação entre os polímeros, e conseqüentemente, as propriedades foram alteradas, destacando-se os aumentos do grau de intumescimento e da resistência à compressão dos arcabouços.

Como conseqüência da reticulação química com a procianidina (PA), o grau de intumescimento sofreu um decréscimo com o aumento do teor do agente reticulante. Do ponto de vista mecânico, a resistência à compressão foi reduzida, resultado da modificação morfológica com aumento da porosidade e formação de macroporos.

Quanto ao ensaio de degradação *in vitro*, os arcabouços mostraram-se totalmente biodegradáveis em apenas 2 dias de exposição nos meios estudados.

Todos os sistemas avaliados se mostraram não tóxicos e biocompatíveis.

- Arcabouços Quitosana/Gelatina/Hidroxiapatita

Os resultados das caracterizações de DRX e FTIR dos arcabouços compósitos indicaram a interação existente entre os componentes polimérico e cerâmico. O aumento do teor de HA alterou significativamente as propriedades dos arcabouços compósitos, tais como, diminuição do grau de intumescimento e aumento da resistência à compressão com a adição de teores de até 50% de HA.

A ação do agente reticulante (PA) foi significativa nas composições contendo o teor de 5%, no que diz respeito, principalmente, a diminuição do grau de intumescimento e a manutenção da propriedade mecânica.

Quanto ao ensaio de degradação *in vitro*, os arcabouços mostraram uma maior estabilidade durante a exposição nos meios estudados.

Na avaliação da viabilidade celular todos os sistemas avaliados se mostraram não tóxicos e biocompatíveis.

Em resumo, os arcabouços QG e QG/HA oferecem de acordo com os resultados das propriedades avaliadas uma ampla faixa de escolhas para potencialmente serem usados em aplicações biomédicas, tais como, biomaterial, veículo de liberação controlada de drogas, e arcabouço para engenharia de tecido ósseo e cartilaginoso. Destaca-se também neste trabalho a possibilidade do aumento da estabilidade e biocompatibilidade desses arcabouços com a procianidina (PA), um agente reticulante natural, em substituição aos agentes reticulantes tradicionais.

REFERÊNCIAS

- AHN, E.S.; GLEASON, N.J.; NAKAHIRA, A.; YING, J.Y. Nanostructure processing of hydroxyapatite-based bioceramics. *Nano Lett.*, v.1, p. 149–53, 2001.
- AMARAL, I.F.; LAMGHARI, M.; SOUSA, S.R.; SAMPAIO, P.; BARBOSA, M.A. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. *J Biomed Mater Res.* 75A: 387-397, 2005.
- AOKI, H. *Science and medical applications of hydroxyapatite*. Tokyo: Takayama Press System Center , 1991. 230 p.
- ARCA, H.C.; GUNBEYAZ, M.; ŞENEL, S. Chitosan based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines* 8: 937-953, 2009.
- ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, v.95, p. 2126-2146, 2010.
- 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.
- BALAJI, S.; KUMAR, R.; SRIPRIYA, R.; KAKKAR, P.; RAMESH, D.V.; REDDY,P.N.K.; SEHGAL, P.K. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C* (2012), doi:10.1016/j.msec.2012.02.023
- BATICH, C.; LEAMY, P. *Biopolymers*. In: Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design., ed. Kutz M, Mc Graw Hill; p. 4-6, 2003.
- BEDRAN-RUSSO, A.K.; PASHLEY, D.H.; AGEE, K.; DRUMMOND, J.L.; MIESCKE, K.J. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*, v.86, p.330–334, 2008.
- BERRY, C.C.; CAMPBELL, G.; SPADICINO, A.; ROBERTSON, M.; CURTIS, A.S. The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. *Biomaterials*,v25, p.5781–5788, 2004.
- BERTAZZO, S. *Solubilidade de fosfatos de cálcio em fluido corpóreo simulado. Biocompatibilidade e propriedades da interface fosfato de cálcio/solução*. 2004. 112

p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BEST, S.; SIM, B.; KAYSER, M.; DOWNES, S. Dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* v.8, p: 97-103, 1997.

BIGI, A.; BRACCI, B.; PANZAVOLTA, S. "Effect of added on the propreties of calcium phosphate cement". *Biomaterials*, v.25, p. 2893-2899, 2004.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, v.23, p. 4827-4832, 2002.

BILLOTTE, W.G. *Ceramic Biomaterials*. The Biomedical Engineering Handbook: 2. ed., Boca Raton: CRC Press LLC, 2006.

BISPO, V. M. *Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. 206f, 2009. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BLAZSO, G.; GABOR, M.; ROHDEWALD, P. Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from *Pinus pinaster* Ait. After oral and cutaneous application. *Pharmazie*, v.52, n.5, p.380–382, 1997.

BONUCCI, E. *Basic Composition and Structure of Bone*. In *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*. ed. An, Y.H. and Draughn, R.A. Boca Raton: CRC Press, 2000.

BRUGNEROTTO, J. *et al.* Na infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v.42, p. 3569-80, 2001.

BUCKLEY, C.T.; O'KELLY, K.U. "Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering". *Topics in Bio-Mechanical Engineering*, p. 147-166, 2004

BUENO, D.F.; KERKIS, I.; COSTA, A.M.; MARTINS, M.T.; *et al.* New Source of Muscle-Derived Stem Cells with Potential for Alveolar Bone Reconstruction in Cleft Lip and/or Palate Patients. *Tissue engineering. Part A*, v.15, n.2, p. 427–35, 2009.

CALAPODOPULOS, C.J.; VOLPON, J.B. "Ensaio clínico do enxerto ósseo desmineralizado". *Rev. Bras. Ortop*, v.29, n. 4, 1994.

CAMPOS, S.D. *et al.* “Biomateriais à base de $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade”. *Cerâmica*, v. 51, p. 274-279, 2005.

CARSTENS, M.H.; CHIN, M.; LI, X.J. In situ osteogenesis: regeneration of 10-cm mandibular defect in porcine model using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP- 2) and Helistat absorbable collagen sponge. *The Journal of craniofacial surgery*, 2005. 16(6): p. 1033–42.

CARVALHO, E.B. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. 2007. 193f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade do Porto, Faculdade de Ciências. Portugal, 2007.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F.; SOBRAL, P. J. A. Effect of chemical treatment on the mechanical properties, water vapor permeability and sorption isotherms of gelatin-based films. *Packaging Technology & Science*, v.21, n.3, p.165-169, 2008.

CGEE. Materiais avançados 2010-2022. Brasília: CGEE, 2010.

CHANG, M.C.; KO, C.; DOUGLAS, W.H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*, v. 24, p. 2853–2862, 2003.

CHANG, Y.; LEE, M.H.; LIANG, H.C.; HSU, C.K.; SUNG, H.W. Acellular bovine pericardium with distinct porous structures fixed with genipin as an extracellular matrix. *Tissue Eng*, v.10, p.881–892, 2004.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v.22, p:261-8, 2001.

CHAUDRY, Z.; ROCHA, J.L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. *Polímeros*, v.7, pp. 40-46, 1997.

CHEN, C-H.; WANG, F-Y.; MAOA, C-F.; LIAO, W-T.; HSIEH, C-D. Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.43, p. 37–42, 2008.

CHEN, F.; FENG, X.; WU, W.; OUYANG, H.; GAO, Z.; CHENG, X.; HOU, R., MAO, T. Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. v.36, n.9. p. 822–7, 2007.

CHEN, K-Y.; SHYU, P-C.; DONG, G-C.; CHEN, Y-S.; KUO, W-W., YAO, C-H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*, v. 30, p. 1682–1688, 2009.

CHEN, S.C.; WU, Y.C.; MI, F.L.; LIN, Y.H.; YU, L.C.; SUNG, H.W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J Control Release*, v.96, p.285–300, 2004.

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M.D.; HOEMANN, C.D.; LEROUX, J.C.; ATKINSON, B.L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, v.21, p. 2155–2161, 2000.

CHIELLINI, E.; CINELLI, P.; CORTI, A.; KENAWY, E. R. Composite films based on waste gelatin: thermal e mechanical properties and biodegradation testing. *Polymer Degradation and Stability*, v.73, n.3, p.549-555, 2001a.

CHOW, L.C. “Next generation calcium phosphate-based biomaterials”. *Dental Materials Journal*, v.28, n.1, p.1-10, 2009.

CHUNG, T. W.; YANG, J.; AKAIKE, T.; CHO, K. Y.; NAH, J. W.; KIM, S.; CHO, C.S. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, v. 23, p. 2827–2834, 2002.

CIOBANU, C.S.; ANDRONESCU, E.; PREDOI, D. BET and XRD studies on the hydroxyapatite and europium doped hydroxyapatite *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 6, n. 3, p. 1239-1244, 2011.

CONNOLLY, J.F., Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clinical orthopaedics and related research*, v. 313, p. 8–18, 1995.

COSTA Jr., E. S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 6, 1460-1466, 2008.

CRUZ, F. *Fabrication of HA/PLLA Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Using Additive Manufacturing Technologies*. Biopolymers. Magdy Elnashar, 2010.

DALLAN, P.R.M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. 2005. 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DE OLIVEIRA, A.A.R. *et al.* "Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos". *Revista Matéria*, v.12, p. 140 – 149, 2007.

DEVILLE, S., Freeze-casting of porous ceramics: a review of current achievements and issues. *Adv. Eng. Mater.*, v. 10, p.155–169, 2008.

DEVILLE, S.; SAIZ, E.; TOMSIA, A.P. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.27 p.5480–5489, 2006.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 5983–5990, 2005.

DONGMO, A.B.; KAMANYI, A.; ANCHANG, M.S.; NKEH, B.C.; NJAMEN, D.; NGUELEFACK, T.B., *et al.* Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extracts of *Erythrophleum suaveolens* (Caesalpinaceae). Guillemin & Perrottet. *J Ethnopharmacol*, v.77, p. 137–141, 2001.

DHERT, W.J.A.; KLEIN, C.P.A.T.; WOLKE, J.G.C.; VAN DER VELDE, E.A.; DE GROOT, K.; ROZING, P.M. Mechanical investigation of fluorapatite, magnesium whitlockite and hydroxyapatite plasma sprayed coatings in goats. *J. Biomed. Mater. Res.* v.25, p. 1183-1200, 1991.

EGGLI, P.S.; MULLER, W.; SCHENK, R.K. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clin. Orthop. Rel. Res.* v.232, p: 127-138, 1988.

EICHERT, D.; DROUET, C.; COMBES, C.; REY, C.; SFIHIA, H. Nanocrystalline Apatite-based Biomaterials. Nova Science Publishers, 2009.

FERNANDES, L.L.; RESENDE, C.X.; TAVARES, D.S.; SOARES, G.A.; CASTRO, L.O.; GRANJEIRO, J.M. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Polímeros*, v.21, n.1, p. 1-6, 2011.

FERNÁNDEZ, K.; AGOSIN, E. Quantitative Analysis of Red Wine Tannins using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* ,v.55, p. 7294-7300, 2007.

FERNANDEZ-TRESGUERRES-HERNANDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M.A.; DEL CANTO PINGARRON, M.; JEREZ, L.B. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.11, p.: E47-E51, 2006.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C.; ISETTA, A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. v. 131, n.2, p. 165-172, 1990.

FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; VOICU, G.; GHITULICA, C.; VASILE, B. S.; FICAI, D.; TRANDAFIR, V. Self assembled collagen/ hydroxyapatite composite materials. *Chem. Eng. J.*, v.160, p. 794–800, 2010.

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

FILHO CERRUTI, H., *et al.*, Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artificial organs*, v.31, n.4, p. 268–73, 2007.

FINISIE, M.R; JOSUE, A.; FAVERE, V.T, *et al.* Synthesis of Calcium-Phosphate and Chitosan Bioceramics for Bone Regeneration. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 73, n. 4, 2001.

FOOK, A.C.B.M. Desenvolvimento de Biocerâmicas porosas para regeneração óssea. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2008.

FREIER T.; KOH S.; KAZAZIAN K.; SHOICHET S., “Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation”, *Biomaterials*, **26**, 5872–5878, (2005)

GALEA, L. G. *et al.* “Bone substitute: Transforming β -tricalcium phosphate porous scaffolds into monetice”. *Biomaterials*, v.29, p. 3400-3407, 2008.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia em Cores. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*, v. 94, p. 57-63, 1986.

GIBSON, L.J.; ASHBY, M.F. Cellular solids: structure and properties. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1997.

GOMES, M.E.; REIS, R.L. Tissue Engineering: Key Elements and Some Trends, *Macromolecular Bioscience*, v. 4, p. 737-742, 2004,

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; ULMO, N.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, v.16, n.1, p. 25-34, 2002.

GOODELL, M.A., *et al.*, Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 938, p. 208–18, 2001.

GRIFFITH, C.K.; MILLER, C.; SAINSON, R.C.; CALVERT, J.W.; JEON, N.L.; HUGHES, C.C., *et al.* Diffusion limits of an *in vitro*s thick prevascularized scaffold. *Tissue Eng.* v.11, p.257–66, 2005.

GUALANDI, C. *Porous polymeric bioresorbable scaffolds for tissue engineering*, Springer Theses 2011, doi: 10.1007/978-3-642-19272-2.

GUINESI, L.S.; ESTEVES, A.A.; CAVALHEIRO, É.T.G. “Adsorção de íons cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico”. *Quím. Nova*, vol.30, n.4, p. 809-814. 2007.

HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI, M.E. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A.*, v.65, n. 1, p. 118-24, 2003.

HANDSCHEL, J., *et al.*, Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head & face medicine.* v 4, p. 10, 2008.

HE, L.; MU, C.; SHI, J.; ZHANG, Q.; SHI, B.; LIN, W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.48, p. 354–359, 2011.

HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 74, p.1487-1510, 1991.

HOLLISTER, S. J.; TABOAS, J.M.; SCHEK, R.M.; LIN, C.; CHU, T.M. *Bone tissue engineering: Design and Fabrication of Bone Tissue Engineering Scaffolds*. ISBN 0-8493-1621-9, 2005.

HOLMES, R.E.; MOONEY, V.; BUCHOLZ, R.; TENCER, A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *Clin. Orthop. Rel. Res.* v. 188, p. 252-262, 1984.

HOWARD, D., *et al.*, Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, v.213, n.1, p. 66–72, 2008

HU, Q.; LI, B.; WANG, M.; SHEN, J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/ hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, v.25, p. 779-785, 2004.

HUANG, Y.; ONYERI, S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; MADIHALY, S. In vitro characterization of chitosan gelatin scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 7616-27, 2005.

HULBERT, S.F.; MORRISON, S.J.; KLAWITTER, J.J. Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. *J Biomed Mater Res.*, v.6, n.5, p.:347–74, 1972.

INGRAM, R.T.; CLARKE, B.L.; FISHER, L.W.; FITZPATRICK, L.A., Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res*, v.8, p. 1019–29, 1993.

ISHIKAWA, M.; MAKI, K.; TOFANI, I.; KIMURA, K.; KIMURA, M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *European Journal Oral Sciences*, v.113, p.47–52, 2005.

ISIKLI, C.; Hasirci, V.; Hasirci, N. Development of porous chitosan–gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2011.

JATARIU, A.N.; POPA, M.; CURTEANU, S.; PEPTU, C.A. Covalent and ionic co-cross-linking - An original way to prepare chitosan—gelatin hydrogels for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, v. 98A, p.342–350, 2011.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv* 28: 142-150, 2010.

JEE, W.S.S. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: COWIN, S.C. (Ed.). *Bone mechanics handbook*. Boca Raton, FL: CRC, 2001. Cap1, 1.1-1.68.

JIANKANG, H.; DICHEN, L.; YAXIONG, L.; BO, Y.; HANXIANG, Z.; QIN, L.; BINGHENG, L.; YI, L. Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 453–461, 2009.

JONES. J.R.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; ATWOOD, R.C.; BERNARD, D.; LEE, P.D. Nondestructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials*, v.28, n.7, p.1404–1413, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAPANEN, A. *Biocompatibility of orthopaedic implants on bone forming cells*. 2002. Thesis (Master). Department of Anatomy and cell biology and biocenter Oulu, University of Oulu, Finland, 2002.

KAPLAN, F.S.; HAYES, W.C.; KEAVENY, T.M.; BOSKEY, A.; EINHORN, T.A.; IANNOTTI, J.P. Form and function of bone. In: Simon SR, editor. *Orthopaedic basic science*. Rosemont: *American Academy of Orthopaedic Surgeons*; p. 128–84, 1994.

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

KASAHARA, H.; TANAKA, E.; FUKUYAMA, N.; SATO, E.; SAKAMOTO, H.; TABATA, Y., *et al.* Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, v.41, n.6, p. 1056–1062, 2003.

KATTI, K.S. *Biomaterials in total joint replacement: colloids and surfaces* B. *Biointerfaces*, v.39, p.133-142, 2004.

KAVUKCUOGLU, N.B.; PATTERSON-BUCKENDAHL, P.; MANN, A.B. Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones. *J Mech Behav Biomed Mater*, v. 2, p. 348–54, 2009.

KAWACHI, E.Y. *et al.* “Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de Uma Área Interdisciplinar”. *Química Nova*, v. 23, n. 4, 2000.

KIDOAKI, S.; KWON, I.K.; MATSUDA, T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*, v.26, p.37–46, 2005.

KIM, H.; KIM, H., SALIH, V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, p. 5221–5230, 2005.

KIM, S.H.; LIM, B.K.; SUN, F.; KOH, K.; RYU, S.C.; KIM, H.S., *et al.* Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan. *Polym Bull*, v. 62, p.111–8, 2009.

KLAWITTER, J.J.; HULBERT, S.F. Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, v. 2, n. 161, 1971.

KOLHE, P.; KANNAN R. Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions. v. 4, p. 173-180, 2003.

KOUMOULIDIS, G. C.; KATSOULIDIS, A.P.; LADAVOS, A.K.; POMONIS, P.J.; TRAPALIS, C.C.; SDOUKOS, A.T.; VAIMAKIS, T.C. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 259, p. 254–260, 2003.

KOYANO, T.; MINOURA, N.; NAGURA, M.; KOBAYASHI, K.; Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/chitosan-blended hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 39, 1998.

KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M. *et al.* BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.39, n.2, p.190–199, 1998.

KULAKOV, A.A., *et al.*, Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced déficit of the maxillary and mandibular bone tissue. *Bulletin of experimental biology and medicine*, v. 146, p. 522–5, 2008.

LEE, E-J.; KOH, Y-H.; YOON, B-H; KIM, H-E.; KIM, H-W. Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting. *Materials Letters*, v. 61, p. 2270–2273, 2007.

LEE, S.B.; KIM, Y.H.; CHONG, M.S.; HONG, S.H.; LEE, Y.M.. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials*, v.26 p.1961–8, 2005.

LI, J.; CHEN, Y.; YIN, Y.; YAO, F.; YAO, K. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan–gelatin network film in situ. *Biomaterials*, v. 28, p. 781–790, 2007.

LI, J.; DOU, Y.; YANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, H.; YAO, F.; WANG, H.; YAO, K. Surface characterization and biocompatibility of micro- and nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin network films. *Materials Science and Engineering C*, v.29, p.1207–1215, 2009.

LI, X.; NAN, K.; SHI, S.; CHEN, H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, p. 43 – 49, 2012.

LIAPIS, A. I.; PIKAL, M. J.; BRUTINI, R. Research and development needs and opportunities in freeze drying. *Drying Technology*, v. 14, n.6, p. 1265- 1300, 1996.

LIEBSCHNER, M.A.K.; WETTERGREEN, M.A. *Topics in tissue Engineering*; Ashammakhi & Ferretti, USA, 2003.

LIEN, S.-M.; KO, L.-Y.; HUANG, T.-J. Effect of crosslinking temperature on compression strength of gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v.30, p. 631-635, 2010.

LIANG, H.C.; CHANG, W.H.; LIN, K.J.; SUNG, H.W. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*, v. 65, p.271–282, 2003.

LIU, W.B. *et al.* Influence of pH values on preparation of hydroxyapatite/gelatin composites. *J. Mater. Sci.*, v.41, p. 1851-1853, 2006.

LUO, Y. *et al.* Three-Dimensional Scaffolds. Principles of Tissue Engineering, 3 ed., 2007.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, p.4833–4841, 2003.

MA, P. X.; ZHANG, R. Y. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, v.56, p.469–77, 2001.

MA, P.X.; ZHANG, R.; XIAO, G.; FRANCESCHI R. Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomed. Mater. Res.*, v.54, p. 284-293, 2001.

MACHADO DO REIS, L.; KESSLER, C.B.; ADAMS, D.J.; LORENZO, J.; JORGETTI, V.; DELANY, A.M. Accentuated osteoclastic response to parathyroid hormone undermines bone mass acquisition in osteonectin-null mice. *Bone*, v.43, p. 264–73, 2008.

MADIHALLY, S. V; MATTHEW, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133- 1142, 1999.

MALAFAYA, P.B.; REIS, R.L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 644–660, 2009.

MANO, J.F.; NEVES, N.M.; REIS, R.L. Mechanical Characterization of biomaterials. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2005.

MAO, J.S.; ZHAO, L.G.; YIN, Y.J.; YAO, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*, v. 24, p. 1067–1074, 2003.

MARKS JR., S.C.; ODGREN, P.R. Structure and development of the skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 3–15.

MAROLT, D.; KNEZEVIC, M.; NOVAKOVIC, G.V. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. p. 1-10, 2010.

MARTIN, R.B.; BURR, D.B.; SHARKEY, N.A., Skeletal Tissue Mechanics. 1998, Springer.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A.P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J.M.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M.S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, v.82, p.305–315, 2010.

MCCANN, J.T.; MARQUEZ, M.; XIA, Y. Highly porous fibers by electrospinning into a cryogenic liquid. *J. Am. Chem. Soc.* v.128, p.1436–7, 2006.

MIAO, X.; HU Y.; LIU, J.; WONG, A.P. Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. *Materials Letters*, v. 58 n.3-4, p. 397-402, 2004.

MODRZEJEWSKA, Z.; MANIUKIEWICZ, W.; WOJTASZ-PAJAŁK, A. Determination of Hydrogel Chitosan Membrane Structure. *Polish Chitin Society, Monograph XI*, 2006.

MOFFAT, K.L.; MARRA, K.G. Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked with genipin for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B.*, v.71, p.181–187, 2004.

MONTEIRO JR., O. A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p.119–128, 1999.

MOONEY, D.J.; BALDWIN, D.F.; SUH, N.P.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-coglycolicacid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, v.17, p.1417–22, 1996.

MORAES JÚNIOR, E.F. Enxerto autógeno para aumento em espessura e ou altura do processo ósseo alveolar, transtornos de técnica cirúrgica, complicações e sobrevivência dos implantes. 2002. P.136. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2002.

MOROZ, A. *et al.* “ Gel de plaquetas: Arcabouço 3D para cultura celular”. *Act. Ortop. Bras.*, v.17, n.2, p.43-45, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MOTA, N. L.; CASTRO JÚNIOR, A. F.; CASTRO, B. K.; SILVEIRA NETO, L. L.; AARESTRUP, B. J. V. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 27-32, 2008.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*, v.25, p.3829-3835, 2004.

NARBAT, M. K.; ORANG, F.; HASHTJIN, M. S.; GOUDARZI, A. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Iranian Biomedical Journal*, v. 10, n.4, p. 215-223, 2006.

NORDTVEIT, R. J.; VARUM, K. M.; SMIDSRØD, O. (1996) Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme, *Carbohydr. Polymers* 29, 1632167.

O'BRIEN, F.J. Biomaterial and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v.14, n.3, p. 88-95, 2011.

O'BRIEN, F.J.; HARLEY, B.A.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen–GAG scaffolds. *Biomaterials*, v.25, p.1077–86, 2004.

OCHSNER, A.; WINTER, W.; KUHN, G. On elastic-plastic transition zone in cellular metals. *Archive of Applied Mechanics*, v. 73, p. 261-269, 2003.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci Biotech Biochem*; v. 56, p. 858-62, 1992.

OLIVEIRA, R.C. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. *Rev. Bras. Ortop.*, v.38, n.9, 2003.

OLIVEIRA, J.M.; RODRIGUES, M.T.; SILVA, S.S.; MALAFAYA, P.B; GOMES, M.E.; VIEGAS, C.A.; DIAS, I.R.; AZEVEDO, J.T.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, v.27, p.6123–6137, 2006.

OLSSON, D.C. “Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea”. *Ciência Rural*, v.38, n.8, 2008.

OLSZTA, M. J.; CHENG, X.; JEE, S. S.; KUMAR, R.; KIM, Y. Y.; KAUFMAN, M. J.; DOUGLAS, E. P.; GOWER, L. B. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R*. v. 58, p.77-116, 2007.

OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. “Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics”. *Bone*, v. 25, n. 2, p. 5S-9S, 1999.

OTSUKI, B.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, v.27, n.35, p.5892–5900, 2006.

PARK, S.-H.; LLINÁS, A.; GOEL, V.K.; Hard tissue replacements. *The Biomedical Engineering Handbook: 2. Ed.*, Boca Raton: CRC Press LLC. v.45, n.1, 2006.

PATIST, C. M.; MULDER, M. B.; GAUTIER, S. E.; MAQUET, V.; JEROME, R.; OUDEGA, M. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. v.25, p.1569–82. 2004.

PEÑA, C D.; CABA, K.; ECEIZA, A.; RUSECKAITE, R.; MONDRAGON, I. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6836–6842, 2010.

PENG, H.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant immunology*, v.12, p. 311–9, 2004.

PETER, M.; GANESH, N.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, v.80, p. 687–694, 2010.

PING, L.; PIZZI, A.; GUO, Z. D.; BROSSE, N. Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 13-20, 2012.

POMPE, W.; WORCH, H.; EPPLE, M.; FRIESS, W.; GELINSKY, M.; GREIL, P.; HEMPEL, U.; SCHARNWEBER, D.; SCHULTE, K.. Functionally graded materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng A* 362: 40–60, 2003.

PORTO, L. C.; LIMA, A. M. F.; SOLDI, V. Propriedades de filmes de gelatina e poli(acrilamida-coácido Acrílico) reticulados por hidrocloreto de 1-etil-(3-3-Dimetilaminopropil) carbodiimida. In: 17^o CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu, 2006.

PRABAKARAN, K.; RAJESWARI, S. Development of Hydroxyapatite from Natural Fish Bone Through Heat Treatment. *Trends Biomater. Artif. Organs*, v.2, p. 20-23, 2006.

QIAN, L.; ZHANG, H. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.86, p. 172–184, 2011.

RAMAY, H. R.; ZHANG, M. “Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods”. *Biomaterials*, v. 24, p. 3293-3302, 2003.

RAO, P. S. et al. Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. *Separation and Purification Technology*, v.48, p.244-254, 2006.

RATNER, B. D. *et al. An introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press, 1996.

RAUCCI, M.G.; D'ANTÒ, V.; GUARINO, V.; SARDELLA, E.; ZEPPESELLI, S.; FAVIA, P.; AMBROSIO, L. Biomineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.4090–4099, 2010.

REDLICH, A., *et al.*, Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v.1, n.12, p. 767–72, 1999.

REICHERT, J. C.; HUTMACHER, D.W. Bone Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, Ed: N. Pallua & C.V. Suscheck, Springer. (2011) ISBN: 3642028233.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 3413–3431, 2006.

RISBUD, M.; RINGE, J.; BHONDE, R.; SITTINGER, M. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant*, v.10, n. 8, p.755–63, 2001.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A., 2002, “Biocompatibility of Anionic Collagen Matrix as Scaffold for Bone Healing”, *Biomaterials*, Vol. 23, p. 449-456.

ROKHADE, A. P. *et al.* Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymer*, v.67, p.605-613, 2007.

RODAN, G. A. Introduction to bone biology. *Bone*. v.13,S3-S6,1992.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. V. “Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita”. *Pesqui Odontol Brás*, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.

ROSSI, A. M. *et al.* “A Ciência e tecnologia das biocerâmicas”. *Revista do CBPF*. Disponível em: <http://portal.cbpf.br/protected/Pages/divulgacao/pdfs/BioMat.pdf>. Acesso em: Julho, 2011.

ROY, M. E.; NISHIMOTO, S. K.; RHO, J. Y.; BHATTACHARYA, S. K.; LIN, J. S.; PHARR, G. M., Correlations between osteocalcin content, degree of mineralization, and mechanical properties of C-Carpio rib bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.54, p. 547–553, 2001.

RUNGSİYANONT, S.; DHANESUAN, N.; SWASDISON, S.; KASUGAI, S. Evaluation of Biomimetic Scaffold of Gelatin–Hydroxyapatite Crosslink as a Novel Scaffold for Tissue Engineering: Biocompatibility Evaluation with Human PDL Fibroblasts, Human Mesenchymal Stromal Cells, and Primary Bone Cells. *Journal of Biomaterials Applications*, 2010.

SÁLCEDO, S.; ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Upgrading calcium phosphate scaffolds for tissue engineering applications, *Key Eng. Mater.*, v.377, p. 19–42, 2008.

SALEH, J. *et al.* “Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo”. *IN: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 16. Porto Alegre, 2004.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* v.4, p.743–765, 2004.

SALEEM, M. A.; AZHARUDDIN, SK. M. D.; ALI, S.; PATIL, P. P. Studies on different chitosan polyelectrolyte complex hydrogels for modified release of diltiazem hydrochlorid. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p. 64-67, 2010.

SAMPAIO, G. Y. H. Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2008.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, n. 7, p. 1094-1117, 2000.

SCHANTZ, J. T., *et al.*, Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system. *Tissue engineering*, 2003.9: p. S113–26.

ŞENEL, S.; MCCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1467-1480, 2004.

SENGERS, B.G. *et al.* “Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds”. *Biomaterials*, v. 28, p. 1926–1940, 2007.

SHANMUGASUNDARAM, N.; RAVICHANDRAN, P.; REDDY, P. N.; RAMAMURTY, N.; PAL, S.; RAO, K. P. Collagen chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, v.22, p. 1943-1951, 2001.

SHE, Z.; ZHANG ,B.; JIN, C.; FENG, Q.; XU, Y. Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, p. 1316–1322, 2008.

SHEN, H.; HU, X.; YANG, F.; BEI, J.; WANG, S. An injectable scaffold: rhBMP-2-loaded poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite microspheres. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.455–465, 2010.

SHERWOOD, J.K.; RILEY, S.L.; PALAZZOLO, R.; BROWN, S.C.; MONKHOUSE, D.C.; COATES, M.; GRIFFITH, L.G.; LANDEEN, L.K.; RATCLIFFE, A. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, v.23, p.4739–4751, 2002.

SHIKINAMI, Y.; OKAZAKI, K.; SAITO, M.; OKUNO, M.; HASEGAWA, S.; TAMURA, J.; FUJIBAYASHI, S.; NAKAMURA, T. Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction. *J. R. Soc. Interface*. v.3, p. 805–821, 2006.

SINHA, A.; INGLE, A.; MUNIM, K. R.; VAIDYA, S N.; SHARMA, B. P.; BHISEY, A. N. Development of calcium phosphate based bioceramics. *Bull. Mater. Sci.*, v. 24, n.6, p. 653-657, 2001.

SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T. Evaluating conditions for the formation of chitosan/gelatin microparticles. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 2, p. 1-5, 2009.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.J.; WESS, T.J.; Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, v.25, p. 795–801, 2004.

SOARES, G.A. *Biomateriais*. Fórum de Biotecnologia Biomateriais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

SOLTAN, M., SMILER, D.; CHOI, J.H. Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration, *Implant. Dent.*, v.18, n.2, p.132-141, 2009.

SOMMERFELDT, D. W.; RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine J.*, v. 10, S86-S95, 2001.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. *Adv. Polym. Sci.* v. 243, p. 23–54, 2011.

SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.E.; MOUTOUNET, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* v.43, n. 2, p. 509-512, 1996.

STAINSBY, G. (1987). Gelatin gels. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.), *Advances in meat research, collagen as a food*, v. 4 (pp. 209 e 222). New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc.

STRATES, B. S.; NIMNI, M. E. Mineralization and bone induction in crosslinked collagen and demineralized bone. *Journal of Dental Research*, v.76. p. 1629–1629, 1997.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. *Annual Review of Medicine*, v.52, p.443-451. 2001.

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

SUN, L. P.; WANG, S.; ZHANG, Z. W.; WANG, X. Y.; ZHANG, Q. Q. Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomed. Mater*, v.4, p.1–6, 2009.

SUNDARAM, J.; TIMOTHY D.; DURANCE, T. D.; WANG, R. Porous scaffold of gelatin–starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying. *Acta Biomaterialia*, v. 4, p.932–942, 2008.

SUNG, H. W.; HUANG, R. N.; HUANG, L. L.; TSAI, C. C.; CHIU, C. T. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *J Biomed Mater Res.*, v.42, p.560–567, 1998.

TABATA, Y., Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue engineering*, v. 9, p. 5–15. 2003.

TADIC, D. *et al.* “A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering”. *Biomaterials*, v. 25, p. 3335 – 3340, 2004.

TAKAMORI, E. R. Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado. 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2004.

TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SZONTAGH, F.; LANDI, E. Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity. *J. Mater. Sci. Med.*, v.8, p. 29-37, 1997.

TANG, X.; GUI, L.; LU, X. Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite. *Biomed. Mater.* v.3, 044115, 9p, 2008.

TEIXEIRA, S.; RODRIGUEZ, M.A.; PENA, P.; DE AZA, A.H.; DE AZA, S.; FERRAZ, M.P.; MONTEIRO, F.J. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v.29, p.1510–1514, 2009.

TENG, S. H.; LEE, E. J.; YOON, B. H.; SHIN, D. S.; KIM, H. E.; OH, J. S. Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 88A, p.569–580, 2009.

TIAN, X.F., *et al.*, Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, v 68, p. 58–67, 2008.

TIGLI, R. S.; KARAKECILI, A.; GUMUSDERELIOGLU, M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 18, p.1665–1674, 2007.

THEIN-HAN, W. W.; SAIKHUN, J.; PHOLPRAMOO, C.; MISRA, R. D. K.; KITTIYANANT, Y. Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: Physical-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP- buffalo embryonic stem cells. *Acta Biomaterials*, v.5, p. 3453-3466, 2009.

THEIN-HAN, W.W.; MISRA, R.D.K. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. v.5, p.1182–1197), 2009.

THOMSON, R.C.; YASZEMSKI, M. J.; POWERS, J.M.; MIKOS, A.G. Hydroxyapatite fiber reinforced poly (α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials*, v. 19, p. 1935-1943, 1998.

TOH, S.L.; TEH, T.K.H.; VALLAYA, S.; GOH, J.C.H. Novel silk scaffolds for ligament tissue engineering applications. *Key Eng Mater.*, v.1, p.326–328, 2006.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TORO, C.; ROBIONY, M.; ZERMAN, N.; POLITI, M. Resorbable plates in maxillary fixation. A 5-year experience. *Minerva Stomatol.*, v.54, n.4, p.199-206, 2005.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TSAI, S-P.; HSIEH, C-Y.; HSIEH, C-Y.; WANG, D-M.; HUANG, L. L-H.; LAI, J-Y.; HSIEH, H-J. Preparation and Cell Compatibility Evaluation of Chitosan/Collagen Composite Scaffolds Using Amino Acids as Crosslinking Bridges. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 105, p. 1774–1785, 2007.

TYLER, M. S.; MCCOBB, D. P. The genesis of membrane bone in the embryonic chick mandible: epithelial-mesenchymal tissue recombination studies. *J. Embryol. exp. Morph.* v. 56, p. 269-281, 1980.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M. "Calcium phosphates as substitution of bones tissues". *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, p. 1-31, 2004.

VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Ver. Ass. Med. Brasil*, v.43, n.4. p. 367-70, 1997.

VAZ, G.J.O. *et al.* "Cerâmicas com Alta Porosidade para Scaffolds". *IN: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, 4. Agosto, 2006.

VERCIK, L. C. O. *et al.* "Recobrimento de Apatitas "In Vitro" sobre Titânio: Influência do Tratamento Térmico". *Eclética Química*, v. 28, n. 1, 2003.

VERMA, D.; KATTI, K. S.; KATTI, D. R. Effect of biopolymers on structure of hydroxyapatite and interfacial interactions in biomimetically synthesized hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Ann. Biomed. Eng.*, v.36, p.1024–1032, 2008.

VITAL, C.C. *et al.* "Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos". *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.175-183, 2006.

VOLKMER, T. M.; BREUER, D.; SANTOS, L. A. "Avaliação da Microestrutura de Blocos Porosos Obtidos por Gelcasting de Espumas". *IN: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, 4. Agosto, 2006.

WANG, T, *et al.* Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International*, v.53, p.911-918, 2004.

WANG, L., WANG, A. Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite. *J Hazard Mater.* v.147, n.3. p. 979–85, 2007.

WANG, X.; NYMAN, J. S.; DONG, X.; LENG, H.; REYES, M. *Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering*. Morgan & Claypool, 2010.

WAINWRIGHT, F. W. (1977). Physical tests for gelatin and gelatin products. In A. G. Ward, & A. Coutts (Eds.), *The science and technology of gelatin* (pp. 507e534). New York: Academic Press.

WOLFE, P. S.; SELL, S. A.; ERICKSEN, J. J.; DAVID, G.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G.L. The Creation of Electrospun Nanofibers from Platelet Rich Plasma. *J Tissue Sci Eng.*,v. 2, p. 1-7, 2011.

WILLEMS, N. M. B. K.; BANK, R. A.; MULDER, L.; LANGENBACH, G. E. J.; GRUNHEID, T.; ZENTNER, A.; VAN EIJDEN, T. M. G. J., Mineralization Is Related to Collagen Cross-links in Growing Cancellous and Cortical Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.23. p. S155-S155, 2008.

WU, X.; LIU, Y.; LI, X.; WEN, P.; ZHANG, Y.; LONG, Y.; WANG, X.; GUO, Y.; XING, F.; GAO, J. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*, v.6, p. 1167–1177, 2010.

XIA, W. Y.; LIU, W.; CUI, L.; LIU, Y. C.; ZHONG, W.; LIU, D. L.; *et al.* Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan–gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res*, v.71B, p.373–380, 2004.

XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; WU, C.D. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *Journal of Dentistry*, v. 36, p. 900–906, 2008.

XIONG, J. P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, v. 296, n. 5565, p. 151-155, 2002.

YAMAKOSHI, J; KATAOKA, S.; KOGA, T.; ARIGA, T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, v. 142, p. 139–149, 1999.

YANG, C.; XU, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; WANG, M. ; HAN, Y; ZHAI, M.; WEI, S.; LI, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, v.82, p. 1297–1305, 2010.

YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.F.; HAYES, W.C.; LANDER, R.; MIKOS, A.G. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* v.17, p. 175–85, 1996.

YIN, Y.; LI, Z.; SUN, Y.; YAO, K. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of Materials Science*, 2005.

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.67A , p. 844-855, 2003.

YIN, Y.J.; ZHAO, F.; SONG, X.F.; YAO, K.D.; LU, W.W.; LEONG, J.C. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite/Chitosan–Gelatin Network Composite. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 77, p. 2929–2938, 2000.

YUNOKI, S.; IKOMA, T.; MONKAWA, A.; OHTA, K.; KIKUCHI, M.; SOTOME, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth. *Materials Letters*, v. 60, p. 999–1002, 2006.

ZHANG, H.; COOPER, A.L., Thermoresponsive “particles pump”: activated release of organic nanoparticles from open-cell macroporous polymers. *Adv. Mater.*, v. 19, p. 2439–2444, 2007.

ZHANG, Y.; ZUO, K.; ZENG, Y-P. Effects of gelatin addition on the microstructure of freeze-cast porous hydroxyapatite ceramics. *Ceramics International*, v. 35, p. 2151–2154, 2009.

ZHANG, Z.; WANG, S.; TIAN, X.; ZHAO, Z.; ZHANG, J.; LV, D. A new effective scaffold to facilitate peripheral nerve regeneration: Chitosan tube coated with maggot homogenate product. *Medical Hypotheses*, v.74, p. 12-14, 2010.

ZHAO, F.; GRAYSON, W. L.; MA, T.; BUNNELL, B.; LU, W. W. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan–gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. *Biomaterials*, v.27, p. 1859–1867, 2006.

ZHAO, J.; Xiao, S.; Lu, X.; Wang, J.; Weng, J. A study on improving mechanical properties of porous HA tissue engineering scaffolds by hot isostatic pressing. *Biomed. Mater.*, v. 1, p. 188-192, 2006.

ZHAO, F.; YIN, Y.; LU, W.W.; LEONG, J.C.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; *et al.* Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan–gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 23, p. 3227–3234, 2002.

ZHUANG, H.; ZHENG, J.P.; GAO, H. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.18, p.951–957, 2007.