



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química – Departamento de Química Inorgânica

TESE DE DOUTORADO

**BIOMATERIAIS DERIVADOS DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA COM
POTENCIAL PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO**

Geovanna Pires

Orientadora: Prof^a Dr^a Inez Valéria Pagotto Yoshida

Co-Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Campinas, 27 Agosto de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

P665b	<p>Pires, Geovanna. Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo / Geovanna Pires. – Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p>Orientadora: Inez Valéria Pagotto Yoshida. Co-orientador: Celso Aparecido Bertran.</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Quitosana. 2. Hidroxiapatita. 3. Biomaterial. 4. Hidrogel. I. Yoshida, Inez Valéria Pagotto. II. Bertran, Celso Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Biomaterials derived from chitosan and hydroxyapatite with potential for bone ingrowth

Palavras-chaves em inglês: Chitosan, Hydroxyapatite, Biomaterial, Hydrogel

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Inez Valéria Pagotto Yoshida (orientador), Profa. Dra. Maria do Carmo Gonçalves (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Maria Isabel Felisberti (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Valdir Mano (DQ-UFSJ), Profa. Dra. Elizabete Yoshie Kawachi (DQ-ITA)

Data de defesa: 27/08/2010

Dedico este trabalho à minha mãe Aparecida, pelo amor e apoio em minhas decisões, ao meu pai João (sempre presente) que infelizmente não pode ver mais esta etapa de minha vida.

Este trabalho é especialmente dedicado ao meu namorado, Renato Ribeiro da Silva, sinônimo de companheiro e dedicação, que esteve do meu lado sempre me apoiando, me encorajando e acima de tudo me fazendo feliz.

Te amo.

*A vantagem de ter péssima
memória é divertir-se muitas vezes
com as mesmas coisas boas como se
fosse a primeira vez.*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos aos familiares e amigos – tanto aos ‘velhos’ e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo.

Não foi uma caminhada breve, nem mesmo fácil, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Esses obstáculos, longe de impedirem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga, cheia de amor, compreensão e paciência. Uma estrada cujo nome é esperança e cuja base é a busca de saberes. Dessa forma, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

- ❖ Primeiramente a Deus, por ser a razão de tudo na minha vida e por mostrar os caminhos a seguir.
- ❖ À Prof^a Dr^a Inez Valéria Pagotto Yoshida pelo aceite no programa e orientação deste trabalho.
- ❖ Ao Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran pela co-orientação e ao bom humor em todas as ocasiões.
- ❖ À Prof^a Dr^a Maria do Carmo Gonçalves pelas contribuições em microscopia eletrônica.
- ❖ À Prof^a Dr^a Maria Isabel Felisberti pela contribuição e convívio agradável.
- ❖ Aos amigos, Emerson, Eduardo, Jonathan, Caio, Valdir, Vivi, Juliana, Manu, Fabby, Mari, Sabrina, Rafa, Stella, Miguel, Raphael Lage (Rafinha), Sergio,

Rafael Enoque, Larissa, Patrícia, Daniel, Evandro, Dieguinho, Bruno, Ana Paula, Marcinha, por todos os momentos divertidos e agradáveis.

- ❖ A todos os funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, especialmente à Fabiana, Márcia, Diva, Raquel, Fabio, Daniel, pelo ótimo atendimento e serviços prestados.
- ❖ Á minha família, que mesmo distante torceram por mim.
- ❖ Á minha sogra Maria do Carmo e toda a sua família, que me acolheram com muito carinho.
- ❖ A Capes, pelo auxílio financeiro concedido.
- ❖ A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais

Nome: Geovanna Pires

Filiação: João Evangelista Pires e Josefina Aparecida de Nadai Fvardoski

Nascimento: 11/04/1978 – Foz do Iguaçu/PR – Brasil

e-mail: geovannapires@gmail.com

2. Formação Acadêmica

Mestrado em Química (2004-2006)

Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Ilha Solteira-SP, Brasil

Título: Materiais nanoestruturados do sistema epoxídico DGEBA/dietilenotriamina modificado com um éster de silsesquioxano: propriedades mecânicas e térmicas.

Orientador: Newton Luiz Dias Filho

Agência financiadora: CAPES

Bacharelado em Química (1998-2002)

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil

3. Artigos completos publicados em periódicos

1. DIAS FILHO, N. L.; OKAJIMA, G. L.; PIRES, G.; COSTA, R. M.; CARMO, D. R.; ROSA, A. H. Voltammetry of mercury(II) based on an organo-clay modified graphite electrode. **Portugaliae Electrochimica Acta**, 26, 2, 2008
2. DIAS FILHO, N. L.; PIRES, G.; AQUINO, H. A.; CAETANO, L.. Relationship between the dielectric and mechanical properties and the hybrid thermosetting polymers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 17, 533-541, 2006.
3. PIRES, G.; PEREIRA, D. S.; DIAS FILHO, N. L.; VECCHIA, G. D. Caracterização físico-química e mecânica do sistema éster de silsesquioxano/resina epóxi Dgeba/dietilenotriamina. **Matéria**, 10, 317-330, 2005.

4. Resumos publicados em anais de congressos

1. PIRES, G.; ZAMBUZZI, F. W.; FERREIRA, C. V.; BERTRAN, C. A.; YOSHIDA, I. V. P. A novel chitosan/hydroxyapatite biocomposite for tissue engineering applications. In: 11th International conference on advanced materials – ICAM 2009, Rio de Janeiro, 20-25 de Setembro, 2009
2. PIRES, G.; BERTRAN, C. A.; YOSHIDA, I. V. P. Chitosan/siloxane hybrid with application to hydroxyapatite nucleation in SBF. In: VII Encontro da SBPMAT 2008, 2008, Guarujá. VII Encontro da SBPMAT 2008, 2008.
3. PIRES, G.; BERTRAN, C. A.; YOSHIDA, I. V. P. Effect of siloxane on the morphology of chitosan-hydroxyapatite nanocomposite. In: 8th World Biomaterials Congress, 2008, Amsterdam. Anais em CD-ROM, 2008.
4. PIRES, G.; BERTAZZO, S.; BERTRAN, C. A. ; YOSHIDA, I. V. P. Comparation between bone and chitosan/calcium phosphate nanohybrids obtained by biomimetic method. In: European congress on advanced materials and processes, 2007, Nurnberg. Anais em CD-ROM, 2007.2007.
5. PIRES, G.; ALMEIDA, C. N. D. ; DIAS FILHO, N. L. ; JOB, A. E. . Sistemas epóxi reforçados com oligômeros poliedros de silsesquioxanos (POSS): propriedades mecânicas e térmicas. In: XXVIII Encontro nacional de física da matéria condensada, 2005, Santos. Anais em CD-ROM, 2005.

6. Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. PIRES, G.; DIAS FILHO, N. L.; ALMEIDA, C. N. D. ; PEREIRA, D. S. ; JOB, A. E. ; FERREIRA, A. G.. Efeito de um oligômero poliedro de silsesquioxano nas propriedades térmicas do sistema epóxi DGEBA/DETA. In: 8 Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Águas de Lindóia. Anais em CD-ROM, 2005.

7. Patente

PIRES, G.; ZAMBUZZI, W. F.; FERREIRA, C. V.; BERTRAN, C. A.; YOSHIDA, I. V. P.; **BIOMATERIAL DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA (CNHAP) PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DO MESMO.** Protocolo n° 018090056726.

RESUMO

BIOMATERIAIS DERIVADOS DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA COM POTENCIAL PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO.

Neste trabalho, foram preparados diferentes hidrogéis constituídos à base de quitosana (CN) de alta massa molar e hidroxiapatita (HA), esta última obtida por mineralização *in situ*, todos com razão fase orgânica/inorgânica próxima de 60:40, em massa, similar à média do tecido ósseo. Nas preparações utilizou-se também a razão Ca/P=1,67, semelhante à da hidroxiapatita biológica. Para alguns hidrogéis adicionou-se uma quantidade de Si (como precursor solúvel de SiO₂) próxima à encontrada nos ossos. Após a secagem dos hidrogéis, os materiais resultantes foram caracterizados por espectroscopia infravermelho, ressonância magnética nuclear de ³¹P, difração de raios X, termogravimetria, microscopias óptica e eletrônica de varredura. Foram efetuadas análises elementares de Ca e Si (por espectroscopia de absorção atômica) e de P (por espectrocolorimetria). A bioatividade dos hidrogéis foi avaliada pela imersão em solução denominada fluido corpóreo simulado (SBF), monitorando-se a formação de hidroxiapatita. Testes *in vitro* de viabilidade celular utilizando-se os seguintes procedimentos: redução do MTT; adesão e proliferação celular pela incorporação de cristal violeta; avaliação da expressão e dos níveis de fosforilação de proteínas por *immunoblotting* e diferenciação celular pela dosagem de fosfatase alcalina foram efetuados com os hidrogéis para a avaliação do seu potencial como biomaterial. Os resultados permitiram avaliar citotoxicidade, adesão e proliferação de células, expressão das proteínas cdk4/cdk6/ciclinaD1/ciclinaD3 e atividade enzimática. O teste de bioatividade em SBF mostrou que os hidrogéis são bioativos devido à nucleação de HA. Os hidrogéis CNHA (formado por CN e HA) e CNHAO (formado por CN, HA e Q₈⁸⁻) não apresentaram toxicidade celular *in vitro*, mostrando resultados bastante significativos de adesão e proliferação de células pré-osteoblastos. Estes hidrogéis demonstraram também características favoráveis para o seu emprego como biomaterial, sugerindo potencial para o uso como *scaffolds* em engenharia de tecido ósseo.

ABSTRACT

BIOMATERIALS DERIVED FROM CHITOSAN AND HYDROXYAPATITE WITH POTENTIAL FOR BONE INGROWTH

In this study, different hydrogels based on high molecular mass chitosan (CN) and hydroxyapatite (HA) were prepared, this last component obtained by the *in situ* mineralization, all with an organic/inorganic ratio of 60:40 (w/w), similar to the average composition of the bone tissue. These hydrogels were prepared with the Ca/P ratio = 1.67, similar to the biological hydroxyapatite. For some hydrogels an amount of Si (as SiO₂ soluble precursor), close to that found in the bones, was added. Dry hydrogels were characterized by infrared spectrum, ³¹P nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction, thermogravimetry, optical and scanning electron microscopies. The amount of Ca and Si incorporated in the materials was determined by atomic absorption spectroscopy, while the P content was determined by spectrophotometry. The bioactivity of the hydrogels was evaluated by immersion in a simulated body fluid (SBF), monitoring the hydroxyapatite formation. The assessment of the hydrogel potential as a biomaterial was performed with *in vitro* tests of cell viability, carried out by the following procedures: MTT reduction; cell adhesion and proliferation, by the incorporation of violet crystal; evaluating the expression and phosphorylation levels of proteins, by immunoblotting; and cell differentiation, by measuring the level of alkaline phosphatase. The results allowed evaluating the cytotoxicity, adhesion and proliferation of cells, expression of cdk4/cdk6/ciclinaD1/ciclinaD3 proteins and the enzymatic activity. The test of bioactivity in SBF showed that the hydrogels are bioactive due to the nucleation of HA, uniformly dispersed on their surface. The CNHA (composed by CN e HA) e CNHAO (composed by CN, HA e Q₈⁸⁻) hydrogels showed no *in vitro* cellular toxicity, with very significant results of adhesion and proliferation of pre-osteoblast cells. This characteristic was more evident in the rough surface of the hydrogels. These hydrogels also showed favorable characteristics for their use as a biomaterial, due to the easy handling and fractionation/molding, as well as by its nature, topography and morphology, similar to the bone tissue, suggesting potential as scaffolds in the bone tissue engineering.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Biomateriais.....	1
1.2. Osso	6
1.3. O papel do silício nos organismos vivos.....	9
1.4. Quitosana	11
1.5. Hidrogéis	19
1.6. Fosfatos de cálcio.....	22
1.7. Scaffold como matriz extracelular temporária para o crescimento ósseo.....	27
1.8. Testes biológicos.....	29
1.9. Considerações finais	31
2. OBJETIVOS	33
3. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Materiais de partida	35
3.2. Preparação dos hidrogéis.....	36
3.3. Síntese do octaânion de silicato do tipo Q_8^{8-}	36
3.4. Caracterização dos materiais	37
3.4.1. Análise elementar de Ca, P e Si.....	37
3.4.2. Espectroscopia infravermelho (IV).....	37
3.4.3. Ressonância magnética nuclear (RMN de ^{31}P)	38
3.4.4. Difração de raios X (DRX).....	38
3.4.5. Termogravimetria (TGA).....	38
3.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
3.4.7. Teste de bioatividade	39
3.4.8. Testes biológicos.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1. Formação dos hidrogéis de quitosana e hidroxiapatita	45
4.2. Avaliação da razão Ca/P e de Si nos hidrogéis.....	51
4.3. Caracterização estrutural dos hidrogéis	52
4.4. Avaliação do comportamento térmico dos hidrogéis	57
4.5. Avaliação da morfologia dos hidrogéis	59

4.6. Teste de bioatividade em solução de SBF	65
4.7. Testes biológicos.....	67
4.7.1. Teste de viabilidade celular	67
4.7.2. Teste de adesão e proliferação celular.....	69
4.7.3. Teste de expressão e níveis de fosforilação de proteínas.....	71
4.7.4. Teste de diferenciação celular.....	74
5. CONCLUSÕES	77
6. PROPOSTA FUTURA	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP = Fosfato de cálcio amorfo
Akt = Proteína Akt
ALP = Fosfatase alcalina
ASTM = American Society for Testing and Materials
Ca/P = Razão molar entre Ca e P
Cdk4 = Proteína Cdk4
Cdk6 = Proteína Cdk6
Ciclina D1 = Proteína ciclina D1
Ciclina D3 = Proteína ciclina D3
CN = Quitosana
CNHA = Hidrogel quitosana/hidroxiapatita
CNHA-L= Face lisa do hidrogel quitosana/hidroxiapatita
CNHAO = Hidrogel quitosana/hidroxiapatita/octaânion
CNHAO-L= Face lisa do hidrogel quitosana/hidroxiapatita/octaânion
CNHAO-R = Face rugosa do hidrogel quitosana/hidroxiapatita/octaânion
CNHA-R= Face rugosa do hidrogel quitosana/hidroxiapatita
CNHASi = Hidrogel quitosana/ácido silícico/hidroxiapatita
DA = Grau de acetilação
DCPA = Hidrogenofosfato de cálcio anidro
DCPD = Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado
DD = Grau de desacetilação
DRX =Difração de raios X
Erk = Proteína Erk
FAK = Quinase de adesão focal
HA = Hidroxiapatita
HPDEC = High Power Decoupling
ISO 10993 = International Standard Organization 10993
IV = Espectroscopia infravermelho
MC3T3-E1 = Células pré-osteoblastos provenientes de camundongos
MEC = Matriz extracelular
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
MTT = Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio

OCP = Fosfato de octacálcio
pAkt = Proteína Akt fosforilada
PBS = Tampão salino de fosfato
PGE = Poli(etilenoglicol)
pErk = Proteína Erk fosforilada
PHEMA = Poli(2-hidroxietil metacrilato)
pNPP = p-nitrophenyl phosphate
PLA = Polilactato
PS = Poliestireno
PVA = Poli(álcool vinílico)
RMN ^{31}P = Ressonância magnética nuclear de ^{31}P
SBF = Fluido biológico simulado
SDS = Duodecilsulfato de sódio
Src = Proteína Src
TBS = Tampão salino Tris
TCP = Fosfato tricálcio
TGA = Termogravimetria
 β -TCP = β - Fosfato tricálcio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações de hidrogéis em engenharia de tecidos.	21
Tabela 2. Características de alguns fosfatos de cálcio.	22
Tabela 3. Parâmetros de análises para rmn de ³¹ P (HPDEC)	38
Tabela 4. Sequência de adição dos sais, quantidade e grau de pureza para preparar 1 L da solução de SBF	40
Tabela 5. Porcentagem em massa dos elementos Ca, P e Si nos hidrogéis e a correspondente razão molar Ca/P. (1 ^a), (2 ^a) e (3 ^a) correspondem as três camadas nas quais a amostra CNHAO foi dividida.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama mostrando as diversas escalas da organização do osso. Figura adaptada de Balasundaram e colaboradores	7
Figura 2. Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana	12
Figura 3. Representação das estruturas químicas da quitina e quitosana. Figura adaptada de Khor e colaboradores	13
Figura 4. Conformações possíveis de quitina. Figura de Minke e colaboradores	14
Figura 5. Ligações de hidrogênio entre cadeias de α -quitina. Figura de Minke e colaboradores	15
Figura 6. Ligações de hidrogênio entre cadeias de β -quitina. Figura de Gardner e colaboradores	16
Figura 7. Exemplos de utilização de quitosana para uso na engenharia de tecidos. Figura adaptada de Di Martino e colaboradores	19
Figura 8. Concentrações das espécies iônicas formadas no equilíbrio triprótico para soluções de ácido fosfórico em função do pH. Figura adaptada de Lynn e colaboradores	23
Figura 9. Aplicações da hidroxiapatita no corpo humano. Figura retirada de Vaz	26
Figura 10. A influência da arquitetura do <i>scaffold</i> na adesão e proliferação celular. Figura adaptada de Stevens e colaboradores	28
Figura 11. Placas de cultivo celular	36
Figura 12. Diagrama da preparação do teste de viabilidade celular pela redução do MTT.....	42
Figura 13. Reação da redução do anel tetrazólio do sal de MTT para a formação de cristais de formazan.	42
Figura 14. Diagrama ilustrando o possível mecanismo de formação do CNHA pela precipitação <i>in situ</i> de HA no hidrogel de quitosana.....	46
Figura 15. Fotografias do hidrogel CNHA, superfície superior (CNHA-S), superfície inferior (CNHA-I) e corte.....	47
Figura 16. Diagrama representando a formação do CNHAO pela precipitação de HA/silicato/sílica no hidrogel de quitosana.	48
Figura 17. Fotografias do hidrogel CNHAO, superfície superior (CNHAO-S), superfície inferior (CNHAO-I) e corte.....	49
Figura 18. Fotografia dos hidrogéis CNHA (esquerdo) e CNHAO (direita).....	49
Figura 19. Diagrama representando a formação do CNHASi pela precipitação de HÁ/sílica/silicato no hidrogel de quitosana.	50

Figura 20. (a) espectro IV da HA comercial e da quitosana; (b) espectro IV dos hidrogéis secos CNHA, CNHAO e CNHAsi.....	54
Figura 21. Possíveis ligações de hidrogênio entre quitosana e HA. Figura adaptada de Cheng e colaboradores	55
Figura 22. Espectro de RMN ³¹ P da HA e dos hidrogéis secos CNHA, CNHAsi e CNHAO	56
Figura 23. Difrátogramas da quitosana em pó, HA comercial e dos hidrogéis secos CNHA, CNHAsi e CNHAO	57
Figura 24. (a) curvas termogravimétricas e a (b) derivada das curvas termogravimétricas para quitosana em pó, para os hidrogéis secos CNHA, CNHAsi e CNHAO.	59
Figura 25. Fotografias dos hidrogéis secos CNHAO e CNHAsi.....	61
Figura 26. Micrografia da superfície de fratura dos compósitos (a) CNHA, (b) CNHAsi e (c) CNHAO secos em estufa de circulação de ar.	62
Figura 27. Micrografia das superfícies de fratura dos hidrogéis secos em estufa a vácuo (a) CNHA, (c) ampliação de região de (a), (b) CNHAsi, (d) ampliação de região de (b) e (e) CNHAO.....	64
Figura 28. Micrografias da (a) pastilhas de quitosana pura antes e (b) depois da imersão em solução de SBF por 1 semana, e dos compósitos (c) CNHA, (d) CNHAsi e (e) CNHAO após serem imersos em solução de SBF por 1 semana e posteriormente secos.....	66
Figura 29. Análise da viabilidade celular de pre-osteoblastos crescidos sobre os hidrogéis. (a) CNHA e (b) CNHAO. PS foi considerado controle negativo. (*) p<0,05. ...	68
Figura 30. Níveis de adesão e proliferação celular. (a) CNHA e (b) CNHAO. O gráfico representa qualitativamente a quantidade de células aderidas pela incorporação do cristal violeta. Tempos de plaqueamento: 15 minutos, 6 horas e 48 horas de cultivo celular; (*) p<0,05; (**) p<0,01. PS foi considerado como grupo controle negativo.....	70
Figura 31. Expressão de proteínas relacionadas com a sobrevivência e viabilidade celular: a) Akt e b) Erk. PS foi considerado como controle negativo. Os gráficos representam a análise densitométrica das bandas obtidas por <i>immunoblotting</i>	72
Figura 32. Expressão de proteínas relacionadas com a adesão celular e o gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por <i>immunoblotting</i> . PS foi considerado como grupo controle negativo.....	73
Figura 33. Expressão de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular e o gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por <i>immunoblotting</i> . PS foi considerado como grupo controle negativo.	74
Figura 34. Análise da atividade de fosfatase alcalina de pre-osteoblastos cultivados sobre os diferentes materiais. PS foi considerado como grupo controle negativo. (ns) sem diferença estatística; (*) p<0,05; (**) p<0,01.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomateriais

O desenvolvimento de biomateriais mostra-se fundamentalmente importante para uma melhoria da qualidade de vida das pessoas, representado por um aumento na expectativa de vida, na saúde em geral e no bem estar da população. Dessa forma, observa-se nos últimos anos um enorme esforço no intuito de se produzir novos sistemas compostos que possam ser classificados como biomateriais.

Biomaterial, por definição clássica, é a parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo [1]. Por outro lado também se define biomateriais como materiais sintéticos ou naturais, sólidos ou líquidos, utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos [2].

O critério para a escolha de um biomaterial para uma determinada aplicação pode a ser feito de acordo com a similaridade química ou física que o material apresenta em comparação com o tecido a ser substituído [3]. Para isso há a necessidade do entendimento e do domínio, não apenas da preparação do biomaterial, mas também das respostas celulares que ele origina. Logo, um biomaterial tem como função principal, por exemplo, não só o preenchimento de um espaço vazio originado pela perda do tecido, como também promover resposta celular local adequada [3].

Para que um biomaterial seja adequado, ele não deve causar danos locais ou sistêmicos (tóxicos, carcinogênicos ou radioativos) e deve ser biocompatível. A biocompatibilidade é um fator de suma importância para o sucesso do uso de um biomaterial [3,4].

A chave para o entendimento da biocompatibilidade é a determinação dos mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos e outros que envolvem as interações do biomaterial com os tecidos do corpo humano.

Existe um conjunto de características importantes dos biomateriais que influem nas respostas dos organismos a sua presença e que devem ser consideradas na sua seleção para implante [5]:

- Micro- (ou nano)-estrutura e morfologia;
- Cristalinidade;
- Constante elástica;
- Presença de água, balanço hidrofóbico-hidrofílico;
- Macro-, micro- e nano-porosidade;
- Composição química, gradientes químicos e mobilidade molecular da superfície;
- Topografia de superfície;
- Energia superficial;
- Propriedade elétrica;
- Resistência à corrosão;
- Toxicidade;
- Degradação.

Os biomateriais são, geralmente, classificados em função de sua origem, da reação tecidual que geram ao organismo ou de sua natureza química. Com relação a sua origem, os biomateriais podem ser autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos.

Os materiais *autógenos* (provenientes do próprio organismo) têm como principal vantagem a possibilidade da manutenção da viabilidade celular, que depende da rápida revascularização do enxerto [6]. As desvantagens são as dificuldades de se obter em quantidade suficiente para o preenchimento total do defeito, possibilidades de danos ao local doador, inconveniência do ato cirúrgico, necessidade de anestesia geral, maior risco de infecção, hematomas e maior custo [7].

Os *alógenos* (provenientes de outros indivíduos da mesma espécie) possuem a vantagem de poderem ser obtido a partir de cadáveres e de serem processados e armazenados em bancos, como por exemplo, os ossos [6]. Suas desvantagens são infecções virais, bacterianas ou ainda fúngicas, as quais podem ser transmitidas [8,9].

Os *xenógenos* (provenientes de indivíduos de outras espécies) são muito empregados devido à vantagem de se obter facilmente, como por exemplo, osso bovino [6]. Entretanto, possuem desvantagens similares às apresentadas pelos alógenos [10].

Os *aloplásticos* compreendem biomateriais exclusivamente sintéticos e biocompatíveis encontrados comercialmente, como as biocerâmicas, fosfato tricálcio (TCP), hidroxiapatita, alguns materiais poliméricos, ligas de titânio etc. [6].

Em relação à reação tecidual, os biomateriais podem ser classificados em bioinerte, bioativo e bioabsorvível/biodegradável.

Bioinertes são materiais que são tolerados pelo organismo e que praticamente não liberam nenhum tipo de componente ou não provocam reação alguma com os tecidos vizinhos. Entretanto, esse termo é completamente inadequado, pois os tecidos usualmente apresentam uma resposta frente a todos os biomateriais, por menor que essa possa ser [9-12].

Bioativos são aqueles que favorecem a interação no local de implante. No caso de biomaterial bioativo na substituição do tecido ósseo, este deve favorecer a osteointegração, sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de seu recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química, e não física [3,11]. Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em: osteoindutores e osteocondutores. Os osteoindutores promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface biomaterial-tecido [13]. Os materiais osteocondutores promovem a formação de uma superfície biocompatível no local do implante, a qual favorece o desenvolvimento de

células ósseas, devido à resposta extracelular adequada na interface. A hidroxiapatita sintética é um exemplo de biomaterial desta classe [13].

Reabsorvíveis/biodegradáveis são aqueles materiais que podem ser degradados por um processo de remoção mediada por atividade celular, diretamente por fagocitose, ou indiretamente por ação enzimática e/ou por dissolução por difusão iônica contínua do biomaterial quando colocado em meios biológicos [14,15].

Além das classificações fundamentadas no comportamento, um biomaterial pode ser classificado pela sua natureza química em naturais ou sintéticos.

Entre os naturais encontra-se o colágeno puro ou em misturas com outros compostos, ossos retirados do mesmo indivíduo ou de outra fonte animal como o osso bovino.

Os sintéticos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e nanocompósitos. Metais como titânio, nióbio, tântalo e vanádio são considerados biomateriais e têm sido utilizados puros ou em ligas na recuperação das funções do esqueleto. As ligas dentais geralmente constituídas de mercúrio, prata e estanho, possuem elevada condutividade térmica, além de alta tenacidade, dureza, elasticidade, ductilidade, resistência à abrasão, à fratura e à fadiga e têm sido usadas para a reconstituição de dentes [16].

Uma das primeiras cerâmicas utilizadas em próteses ortopédicas foi a alfa alumina, que apresenta boa biocompatibilidade e alta resistência mecânica [17]. A utilização de fosfato de cálcio para reparo ósseo foi descrita pela primeira vez por Albee e colaborador em 1920 [18], porém, somente após cinquenta anos foram intensificados os estudos de cerâmicas à base de apatitas em aplicações médicas e dentárias. Os fosfatos de cálcio utilizados nestes estudos foram preparados a partir do mineral fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ [19,20]. Da década de 1970 até hoje, novos métodos de preparação de cerâmicas de fosfatos de cálcio, a partir de reagentes químicos comerciais, vêm sendo descritos [21-25].

Atualmente a hidroxiapatita (HA) ocupa posição de destaque entre os biomateriais, apresentando boa biocompatibilidade e alta resistência à compressão. A

hidroxiapatita vem sendo utilizada em reparos de ossos, juntas, dentes etc., apresentando como desvantagens o baixo limite de resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade e alta densidade, quando comparada aos polímeros.

Por sua vez, os biomateriais poliméricos têm encontrado varias aplicações biomédicas tais como: na confecção de próteses maxilofaciais, na construção de coração artificial e de válvulas cardíacas, de membranas de dialisadores e de oxigenadores, assim como suturas, dispositivos de administração de drogas, lentes de contato, cateteres, veias, entre outras aplicações. Entre os polímeros usados destacam-se: resina epoxídica, poliéster (Dacron), polietileno de alta densidade, polipropileno, politetrafluoretileno (Teflon), poliacetal (Delrin), poliuretanas, siliconas, poliamida (Nylon), policarbonato, poli(álcool vinílico) e poli(cloreto de vinila). Estes materiais poliméricos apresentam como vantagens a resiliência, a fácil fabricação e a baixa densidade. Como desvantagens, apresentam a baixa resistência mecânica e a degradação com o tempo [26-28].

Os compósitos são materiais constituídos pela combinação adequada de no mínimo dois componentes, elemento de reforço e matriz, unidos por uma interface, diferindo em forma e/ou composição, resultando em materiais com propriedades superiores às dos componentes individuais [29]. Esses materiais podem apresentar como vantagens boas biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão, elevado módulo de elasticidade e boa resistência mecânica. Como desvantagens, a pior delas reside na falta de reprodutibilidade na sua fabricação, por serem heterogêneos, e pelo fato de apresentarem propriedades que dependem de muitas variáveis [11,30,31].

Uma vasta gama de compósitos tem sido descritos, como: resina termofixa reforçada com fibras de carbono, polímero termoplástico reforçado com fibras de carbono, matriz de carbono vítreo reforçada com fibras de carbono (carbono-carbono), colágeno reforçado com fosfato de cálcio etc. Alguns destes compósitos têm sido utilizados em válvulas cardíacas artificiais, em juntas de joelho etc.

Nanocompósitos são materiais nos quais a fase dispersa apresenta pelo menos uma dimensão de tamanho nanométrico [32]. Vários nanocompósitos têm sido

estudados como biomateriais [33]. Mais recentemente, trabalhos sobre biovidros nanoestruturados e bionanocompósitos têm mostrado que esta classe de material oferece alternativas ainda não totalmente exploradas para aplicações ortopédicas, podendo apresentar boas propriedades mecânicas e de biocompatibilidade e exibir micro e nanoarquitetura similar a dos ossos. Bionanocompósitos, quando comparados com os biomateriais convencionais, apresentam potencial para o avanço na reparação ou na regeneração dos ossos, podendo desenvolver melhor adesão, proliferação e diferenciação celular, e atuar de forma mais eficiente no processo de biomineralização

1.2. Osso

O osso é um material nanoestruturado conforme mostrado no diagrama na Figura 1 [34]. Os ossos são formados por uma matriz orgânica constituída de colágeno, proteínas etc, e uma matriz inorgânica a hidroxiapatita (HA), a qual é formada por um processo conhecido por biomineralização, no qual a matriz orgânica é a base e fornece a orientação para a deposição do material inorgânico [35-37]. Para que o processo de biomineralização seja bem sucedido, é crucial haver uma boa adesão na interface entre o componente orgânico e inorgânico e defeitos na interface conduzem à falha na formação do osso [38].

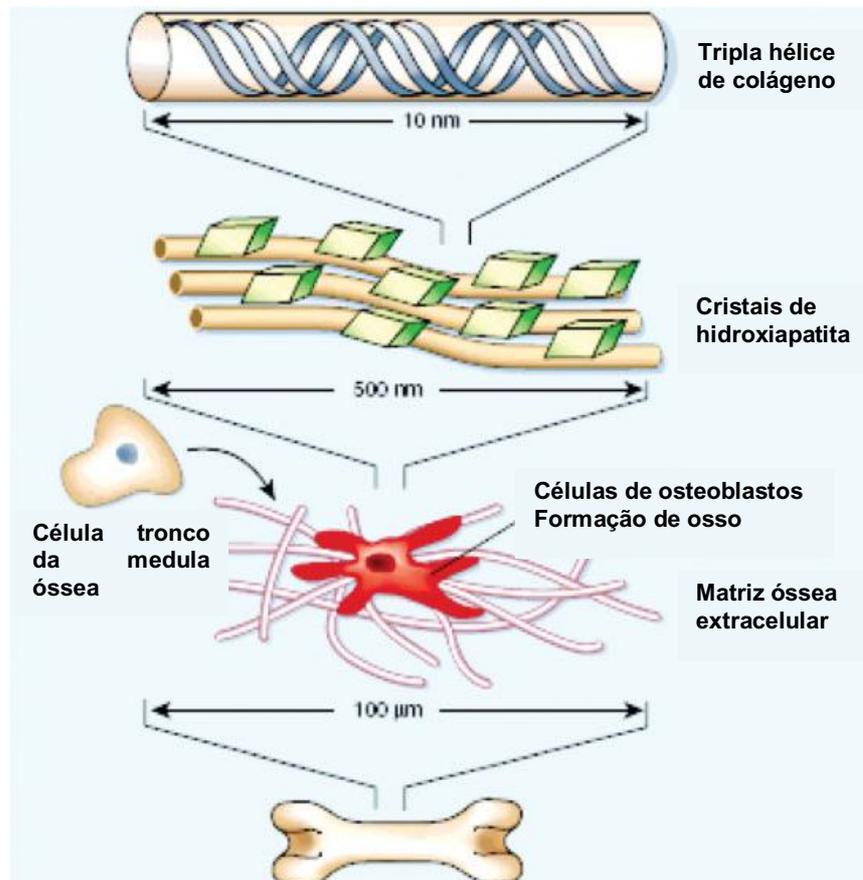


Figura 1. Diagrama mostrando as diversas escalas da organização do osso. Figura adaptada de Balasundaram e colaboradores [34].

Na Figura 1 observa-se que a matriz óssea é formada por fibras menores de colágeno orientadas em tripla hélice resultando em fibras de ~10 nm com posterior nucleação de nanocristais de hidroxiapatita. Numa escala de ~500 nm observa-se a presença da matriz óssea envolvida pela matriz extracelular constituída de diversas células, as quais pelo processo de maturação óssea darão origem, em uma maior escala, ao tecido ósseo.

Os ossos desempenham diversas funções na manutenção do corpo. Protegem os órgãos vitais, atuam como suporte e fornecem apoio para a fixação de músculos, auxiliando a locomoção. Os ossos também representam um reservatório de cálcio, fosfatos e outros íons importantes para a renovação tecidual [39].

A atividade anabólica do osso (formação) é mediada pelos osteoblastos, que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo e são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos do osso (colágeno) e, conseqüentemente, pela mineralização do tecido ósseo. A atividade catabólica (reabsorção) é mediada pelos osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos, as quais produzem um grande número de enzimas. Os osteócitos são células maduras de osteoblastos responsáveis pela manutenção da integridade da matriz óssea, os quais sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz [40].

A diferenciação de osteoblastos *in vivo* envolve, predominantemente, três fases: a primeira fase está associada à expressão de genes relacionados ao ciclo celular, aumentando sua taxa proliferativa; a segunda refere-se à diminuição da atividade proliferativa e, simultaneamente, ao aumento da atividade da fosfatase alcalina, dando início à maturação da matriz extracelular, e, finalmente a terceira, o aumento na expressão de osteocalcina (proteína sintetizada pelos osteoblastos com função de ligação do cálcio à matriz óssea) e osteopontina (glicoproteína presente em tecidos e fluidos envolvida em vários processos patológicos que incluem inflamação, proliferação celular, invasão da matriz extracelular, progressão tumoral e metástase) que iniciam o período de mineralização da matriz óssea, a qual induz modificações metabólicas e morfológicas nos osteoblastos [41,42].

O osso é um exemplo de bionanocompósito possuindo uma composição variada em função da idade e do tipo de osso, podendo ser formado por aproximadamente 80% de hidroxiapatita (HA) e 20% de material orgânico [43]. Além dos principais componentes citados, o osso possui ainda em sua composição outros elementos em pequenas quantidades, como o silício, o qual tem um papel importante na sua formação. Em 1970 Carlisle [44] observou, em uma série de experimentos *in vivo*, a presença de silício (~0,5% em massa) na região de mineralização da tíbia de osso removido de ratos jovens. Neste estudo o autor também propôs que o silício é um dos constituintes fundamentais para a formação do colágeno e, conseqüentemente, o silício influenciaria não só a formação da fase inorgânica como também da fase orgânica do

osso [45]. Porter [46] confirmou a presença de silício, em diversas concentrações, tanto na matriz inorgânica como na orgânica dos ossos.

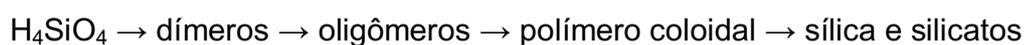
Enquanto a estrutura dos ossos está razoavelmente bem definida, a sua formação ainda não é claramente descrita.

1.3. O papel do silício nos organismos vivos

Sílica e silicatos são nomes dados à família de óxidos de silício relacionados a compostos derivados do ácido silícico $\text{Si}(\text{OH})_4$. Este ácido é fraco, com valores de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} de 9,9, 11,8 e 12, respectivamente. Em soluções de ácido silícico estão presentes quatro espécies H_4SiO_4 , H_3SiO_4^- , $\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}$ e HSiO_4^{3-} , e a espécie predominante depende do pH do meio [47].



O ácido silícico é encontrado em águas naturais, e pode ser obtido a partir da acidificação de silicato de sódio ou metassilicato. A unidade monomérica deste ácido ($\text{Si}(\text{OH})_4$) tem uma grande propensão à condensação formando ligações Si-O-Si [47].



Assim, a sílica ou silicato são os produtos mais estáveis da condensação do ácido silícico, e o grau de condensação depende das condições do meio. A taxa de policondensação do ácido silícico é dependente do pH e é influenciada pela

concentração deste ácido. A policondensação é rápida em pH neutro e levemente alcalino, e lenta em valores de pH entre 2 e 3. Sílica e silicatos em solução são encontrados como partículas coloidais de tamanhos polidispersos, e podem permanecer em suspensão por tempo indeterminado [47].

A importância dos silicatos para a vida, no caso de plantas e microorganismos que vivem no solo, está associada à fertilidade do solo, a qual depende em grande parte do processo da capacidade de absorção e liberação de água e de diversos cátions pelos silicatos, os quais são indispensáveis para a nutrição das plantas. Este processo é fundamental para a vida das plantas, e com base nestes, a vida dos animais que se alimentam dessas plantas. Os dados sobre a ação fisiológica de espécies de silício são limitados, exceto para algumas espécies, que é bem fundamentado que sua presença é necessária para o crescimento normal e estabilidade mecânica de algumas plantas [47,48].

O silício desempenha um papel importante nas células dos organismos vivos. Grandes quantidades de sílica são encontradas na casca de arroz, grama, bambu, entre outras. A presença do silício contribui para a resistência mecânica das folhas e caules, e para o esqueleto de diatomáceas, as quais são formadas por quantidades considerável de SiO_2 [47,48].

Compostos de silício são componentes vitais para o metabolismo de muitas bactérias, especialmente aquelas que vivem em fontes termais. O silício também está presente como um elemento traço em animais e no ser humano, em quantidade média de 10 mg/kg. É um elemento essencial nas células do tecido conjuntivo e está envolvido na biossíntese de colágeno e na formação do tecido ósseo [47,48]. Entretanto, o nível de silício nos ossos decresce com o progresso da mineralização [49].

Como a importância do Si no processo de desenvolvimento do tecido ósseo é ainda pouco explorada, autores têm descrito que grupos Si-OH são sítios favoráveis para a nucleação de HA. Biomateriais contendo SiO_2 são bioativos, como por exemplo, o Bioglass®, que tem sido utilizado clinicamente pela habilidade de ligação com o tecido ósseo [33]. Além disso, tem sido descrito o efeito de íons silicatos na

substituição parcial de íons fosfatos na HA (Si-HA) em materiais para aplicações em implantes ósseos. O Si-HA, quando comparado à HA pura, apresenta propriedades mais favoráveis à indução da formação de tecidos ósseos [46].

O volume de evidências mostrando a importância do Si para os organismos vivos, principalmente nos processos envolvendo a recuperação óssea, foi determinante nesta tese de doutorado para a proposição do estudo da influência de algumas espécies de Si em biomateriais para regeneração de tecido ósseo. Algumas das espécies de Si solúveis em sistema aquoso, que podem fornecer íons para substituir o fosfato na HA, são o ácido silícico, assim como espécies de silicatos existentes em pH básico, como por exemplo uma solução de silicato nanoestruturado na forma de octaânion $(\text{Si}_8\text{O}_8)^{8-}$ ou $(\text{Q}_8)^{8-}$.

1.4. Quitosana

Quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da quitina existente nas carapáceas de crustáceos. A transformação da quitina em quitosana resulta da desacetilação alcalina de ligações N-acetil presentes na quitina, promovendo a formação de D-glicosamina, que contém um grupo amino livre, como ilustrado na Figura 2 [50].

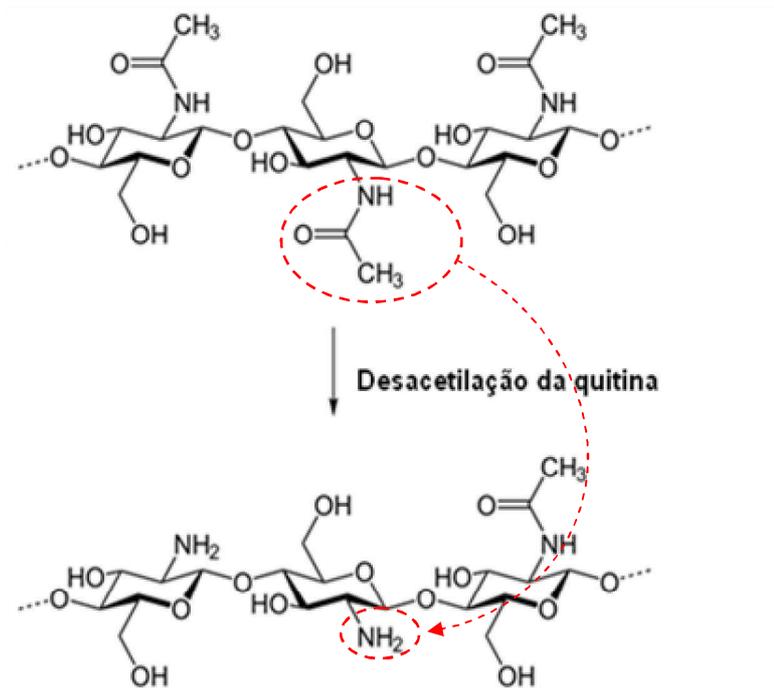


Figura 2. Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana [50].

A diferença entre a quitina e a quitosana está na quantidade de grupos acetila (Figura 3). Quando o número de grupos acetila é maior que 50%, o biopolímero é denominado de quitina, e quando é menor que 50% tem-se a quitosana [51].

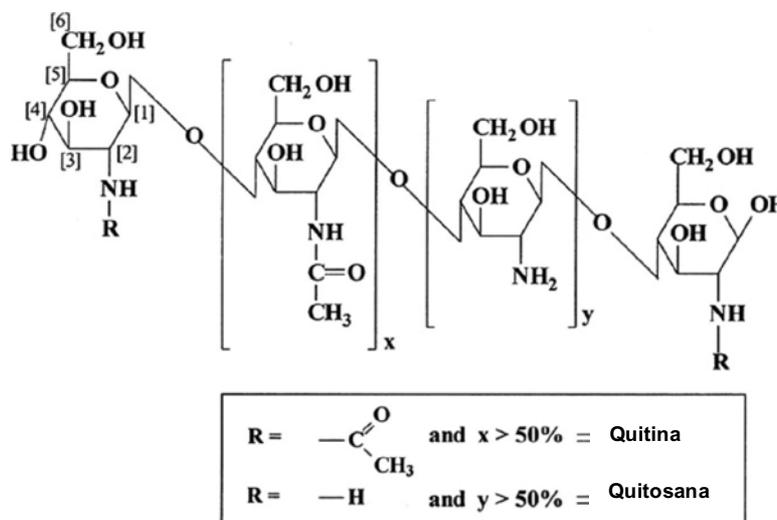


Figura 3. Representação das estruturas químicas da quitina e quitosana. Figura adaptada de Khor e colaboradores [51].

Na terminologia para quitina, o número de grupos acetoamido é determinado pelo grau de acetilação (DA). Por outro lado, quando o grau de desacetilação (DD) é elevado ou o grupo amino é predominante, o biopolímero é chamado de quitosana. Logo, a quitosana é constituída por um conjunto de cadeias poliméricas parcialmente desacetiladas [52]. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho das cadeias poliméricas [53]. Este é um polímero parcialmente cristalino, e o grau de cristalinidade depende do grau de desacetilação.

Na natureza a quitina pode ser encontrada em três diferentes formas de arranjo estrutural de suas cadeias: alfa, beta e gama, sendo a última a mais difícil de ser encontrada. A Figura 4 [54] representa esquematicamente estes arranjos.

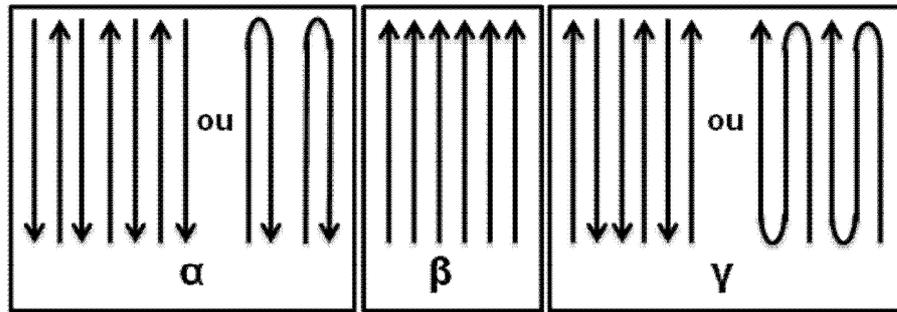


Figura 4. Conformações possíveis de quitina. Figura adaptada de Minke e colaboradores [54].

A configuração da α -quitina é uma estrutura altamente organizada com fortes ligações de hidrogênio inter e intracadeias de quitina que a levam a ser rígida e insolúvel (Figura 5) [54]. Por outro lado, na β -quitina as interações intermoleculares são mais fracas, predominando as ligações de hidrogênio intramoleculares (Figura 6) [55,56].

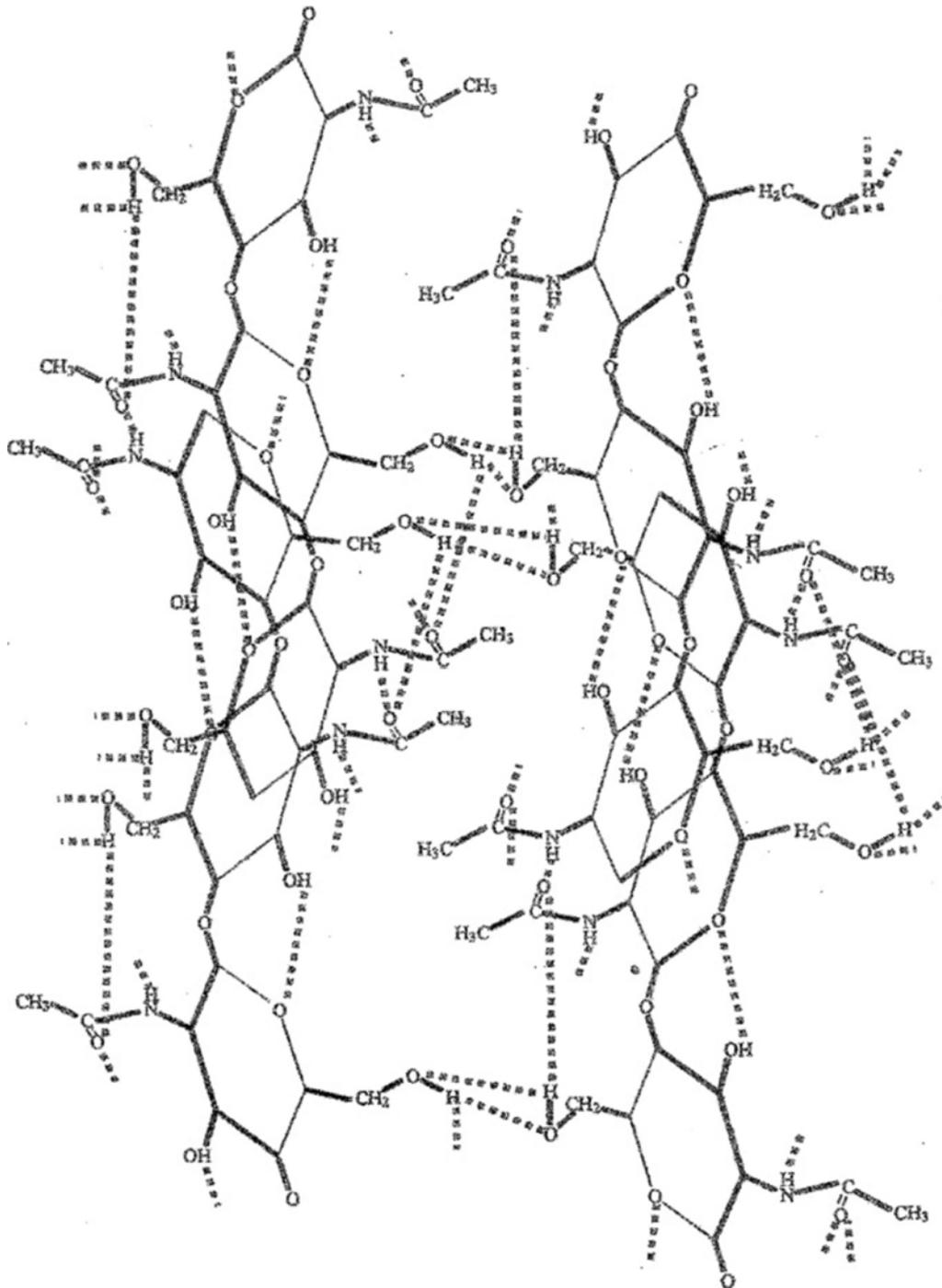


Figura 5. Ligações de hidrogênio entre cadeias de α -quitina. Figura retirada de Minke e colaboradores [54].

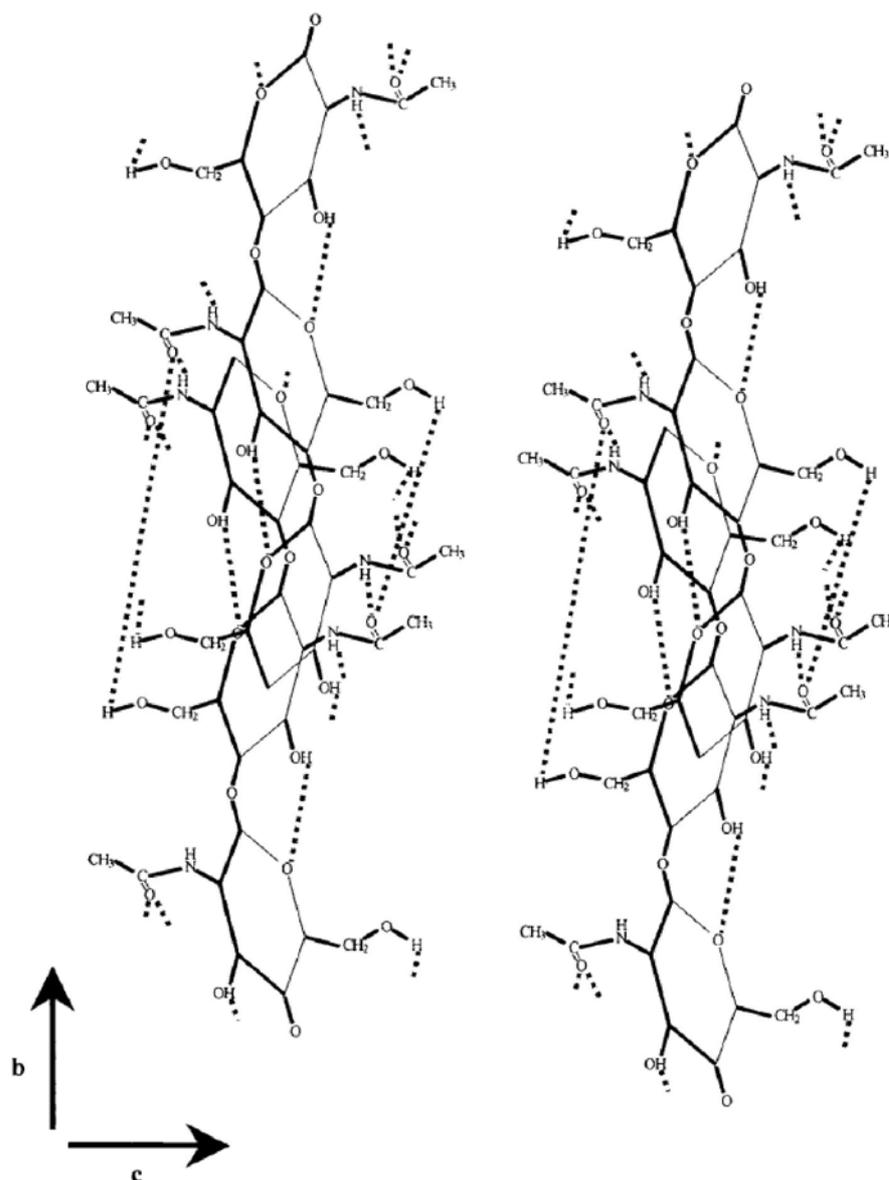
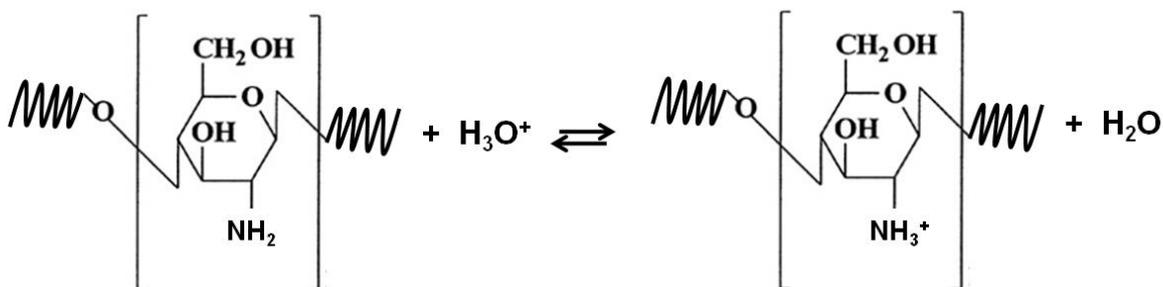


Figura 6. Ligações de hidrogênio entre cadeias de β -quitina. Figura retirada de Gardner e colaboradores [55].

O pK_a das unidades glicosamina na cadeia de quitosana varia de 6,2 a 6,4 [57]. Em soluções aquosas ácidas, unidades glucosamina são protonadas gerando quitosana solúvel ou na forma de gel que tem características de um polycátion, conforme reação a seguir:



Autores como Muzzarelli [56], Rinaudo [58,59] e Kurita [60] concluíram que a temperatura e a densidade de carga elétrica (íons NH₃⁺) da macromolécula afetam o volume hidrodinâmico e a flexibilidade das cadeias de quitosana. Outros autores afirmam que a solubilidade da quitosana pode também ser influenciada pela interação entre as cadeias de hidrocarbonetos dos contra-íons, quando ácidos carboxílicos são utilizados em sua dissolução [61,62]. A polaridade do solvente, a natureza do contra-íon e a presença de ligações de hidrogênio também afetam a conformação desta macromolécula. A repulsão eletrostática intra e intermolecular devido à protonação dos grupos glucosaminos da quitosana é aumentada a valores de pH reduzidos, gerando separação das cadeias e aumentando, com isto, seu volume hidrodinâmico. Na presença de concentração elevada de contra-íons pequenos, tais como Cl⁻, a viscosidade do gel também decresce com a diminuição do pH, resultando no aumento da flexibilidade das cadeias de quitosana.

O interesse tecnológico pela quitosana é crescente. Atualmente, encontram-se como principais aplicações: tratamento de água (derramamento de petróleo, captura de metais pesados), agricultura (protetor de sementes, agente antimicrobiano para plantas, agente liberador de pesticidas e herbicidas). Devido à segurança da quitosana para o consumo humano, e ainda pelo fato de possuir propriedades bastante conhecidas como bactericida e fungicida, ela tem sido bastante utilizada na área alimentícia (clarificante de vinhos, estabilizante de aromas, protetor de frutas e verduras, fibra dietética – alimento funcional) e farmacêutica (curativos, ataduras e suturas, pele artificial, agente hemostático, membranas para órgãos artificiais, agente liberador de drogas, proteção gástrica, agente hipocolesterêmico e agente lipofílico) [52,63,64]. Em aplicações

biomédicas, a quitosana é utilizada tanto pura como combinada com fosfatos de cálcio devido às características osteogênica, osteocondutora e de osteointegração, aplicações que têm sido muito investigadas nos últimos anos [52,65]. Além disso, a união da quitosana com fosfatos de cálcio cria um compósito com sinergismo nas propriedades mecânicas, tais como a flexibilidade que vem do polímero e a resistência e dureza do mineral. Outro aspecto é o relato de que compósitos quitosana/hidroxiapatita promovem biomineralização *in vivo* e resistência mecânica superiores a estes materiais individuais [66].

Várias formas de preparação de compósitos quitosana/hidroxiapatita têm sido descritas, tais como misturas de hidroxiapatita na forma de pó em soluções de quitosana, formando um “cimento”, ou filmes de quitosana revestidos por hidroxiapatita [66,67]. Entretanto, estes compósitos são macroscopicamente heterogêneos e freqüentemente causam inflamações quando implantados.

Para contornar os inconvenientes dos compósitos heterogêneos, Yamaguchi e colaboradores [68] propuseram o método de co-precipitação, no qual uma solução de quitosana contendo ácido fosfórico foi adicionada a uma suspensão de hidróxido de cálcio. Um processo similar foi utilizado por Chang e colaboradores [69] para obter nanocompósitos quitosana/gelatina. Outros autores utilizaram quitosana na forma sólida em solução de fluido biológico simulado (SBF) [70]. Outra abordagem foi usada por Hu e colaboradores [71] na qual o hidrogel de quitosana foi mineralizado pelo controle *in situ* do processo de difusão iônica. As abordagens citadas resultaram na incorporação do material inorgânico à matriz polimérica com partículas de tamanhos da ordem de micro ou nanômetro. Outro uso para a quitosana foi reportado por Di Martino e colaboradores [72] que descreveram algumas possibilidades para a preparação de materiais contendo quitosana para uso na engenharia de tecidos, conforme ilustrados na Figura 7.

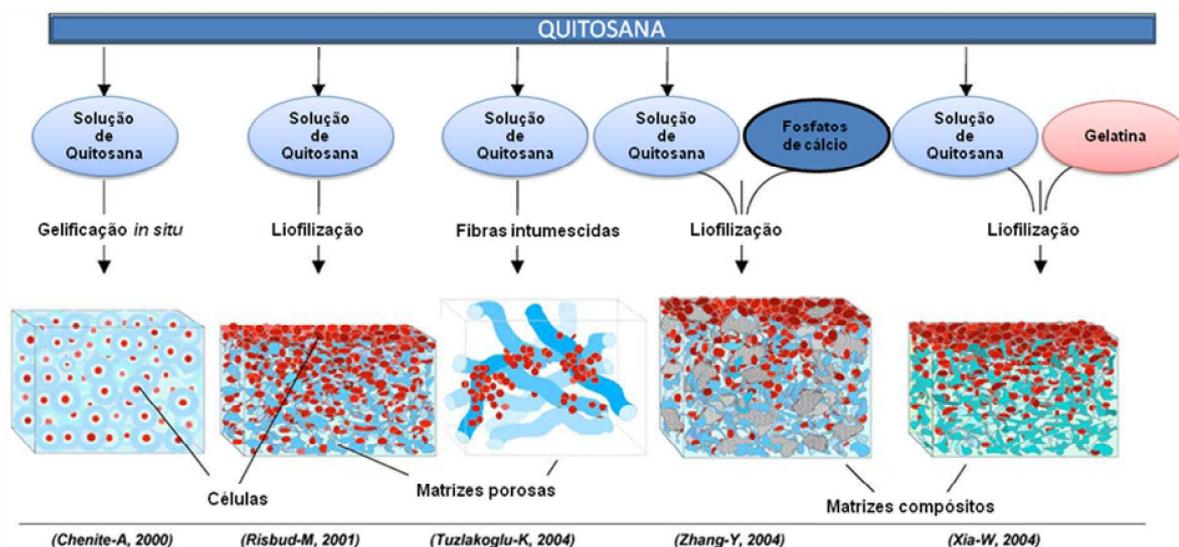


Figura 7. Exemplos de utilização de quitosana para uso na engenharia de tecidos. Figura adaptada de Di Martino e colaboradores [72].

Diversas patentes também podem ser encontradas envolvendo quitosana e hidroxiapatita e/ou outros fosfatos de cálcio, sendo a maioria correspondente à obtenção do biomaterial pela mistura mecânica dos componentes [73-78].

1.5. Hidrogéis

Hidrogéis são constituídos de uma rede tridimensional formada por ligações cruzadas de homopolímeros ou copolímeros. Estes polímeros intumescem e retêm água, e têm sido muito usados em aplicações biomédicas. Polímeros sintéticos usados na engenharia de tecido para preparação de hidrogéis incluem poli(etilenoglicol) (PEG), poli(álcool vinílico) (PVA) e poliacrilatos tais como poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA). Além de polímeros sintéticos, têm sido usados polímeros naturais como agarose, alginato, quitosana, fibrina, colágeno, dentre muitos outros [79].

Em geral, a estrutura reticulada dos hidrogéis é caracterizada por ligações cruzadas que podem ser formadas por ligações covalentes, iônicas ou por interações mais fracas como a formação de ligações de hidrogênio [79].

Em termos de cargas iônicas, hidrogéis podem ser neutros, catiônicos, aniônicos, ou anfóteros, em função da natureza de seus grupos funcionais.

Hidrogéis carregados para aplicações na engenharia de tecido tendem a facilitar a proliferação celular e promover uma melhor adesão celular quando comparado com os hidrogéis não carregados ionicamente [79]. Além disso, os hidrogéis mais utilizados na medicina regenerativa são sintetizados a partir de macrômeros naturais, os quais são tipicamente iônicos ou ionizáveis.

Existem diversas aplicações na medicina regenerativa em que os hidrogéis têm encontrado utilidade. Hidrogéis vêm sendo utilizados como *scaffold*, para promover suporte mecânico e/ou auxiliar/guiar a organização celular, e também para atuar como estrutura de preenchimento de vazios entre tecidos e bioadesivo. Além disso, os hidrogéis podem ser usados como depósito ativo de fármacos e agente de liberação de drogas, em situações que estimulam o processo de regeneração de tecido, além de encapsulante/liberador de células [79].

Alguns exemplos de hidrogéis sintéticos que têm sido usados com sucesso na engenharia de tecidos são mostrados na Tabela 1 [79].

Tabela 1. Aplicações de hidrogéis em engenharia de tecidos.

Tipo de implante	Tipos de células estudadas	Tipos de hidrogéis	Função
Osso	Osteoblastos	PEG-PLA	Encapsulamento, liberação controlada de droga
Osso	Fibroblastos	PEG	<i>Scaffold</i>
Cardiovascular	Células de medula óssea	Fibrina	Liberação de células, <i>scaffold</i>
Cartilagem	Condrócitos	PVA	Encapsulamento
Cartilagem	Condrócitos	PGE	Encapsulamento
Olhos	-	PHEMA	<i>Scaffold</i>
Facial	Condrócitos	Alginato	Encapsulamento, implante
Intraperitoneal	-	PEG	Liberação controlada de droga
Pele	-	Colágeno	Liberação controlada de droga
Pele	Fibroblastos	Ácido hialurônico	<i>Scaffold</i>
Vascular	-	Gelatina	Liberação controlada de droga
Cordas vocais	-	Colágeno, alginato	<i>Scaffold</i>

1.6. Fosfatos de cálcio

Fosfatos de cálcio compreendem uma classe ampla de compostos e estão presentes em tecidos como, por exemplo, nos ossos e nos dentes. Dentre os fosfatos mais importantes para uso na área biomédica, estão hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD), hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA), fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato de octacálcio (OCP) e hidroxiapatita (HA). Na Tabela 2 encontram-se algumas características importantes dos principais fosfatos de cálcio [80,81].

Tabela 2. Características de alguns fosfatos de cálcio.

Nome	Fórmula	Razão Ca/P	pK _{PS} a 37°C
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	116,8
Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$ $x(0 < x < 1)$	1,5-1,67	~85,1
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n=3-4,5	1,2-2,2	-
α -Fosfato tricálcio (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5
β -Fosfato tricálcio (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9
Fosfato octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	96,6
Hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	6,59
Hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA)	CaHPO_4	1,0	6,90

A razão cálcio/fósforo (Ca/P) é um parâmetro importante a ser considerado em fosfatos de cálcio, pois a partir dele é possível sugerir a fase de fosfato presente num determinado material, bem como estimar sua solubilidade [80].

É bem conhecido que o tipo de fosfato de cálcio formado num sistema depende das condições do meio, tais como: temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P, dentre outros. As propriedades das soluções de fosfatos refletem fortemente as condições do pH do meio. Devido ao equilíbrio triprótico do ácido fosfórico, as variações do pH alteram as concentrações relativas das quatro espécies de fosfatos possíveis provenientes da dissociação do ácido fosfórico (Figura 8) e, assim, influenciam tanto a composição química quanto a razão Ca/P promovida pela precipitação direta de fosfatos de cálcio. Este equilíbrio permite o controle e a previsão para a formação dos diferentes fosfatos de cálcio num determinado meio [82].

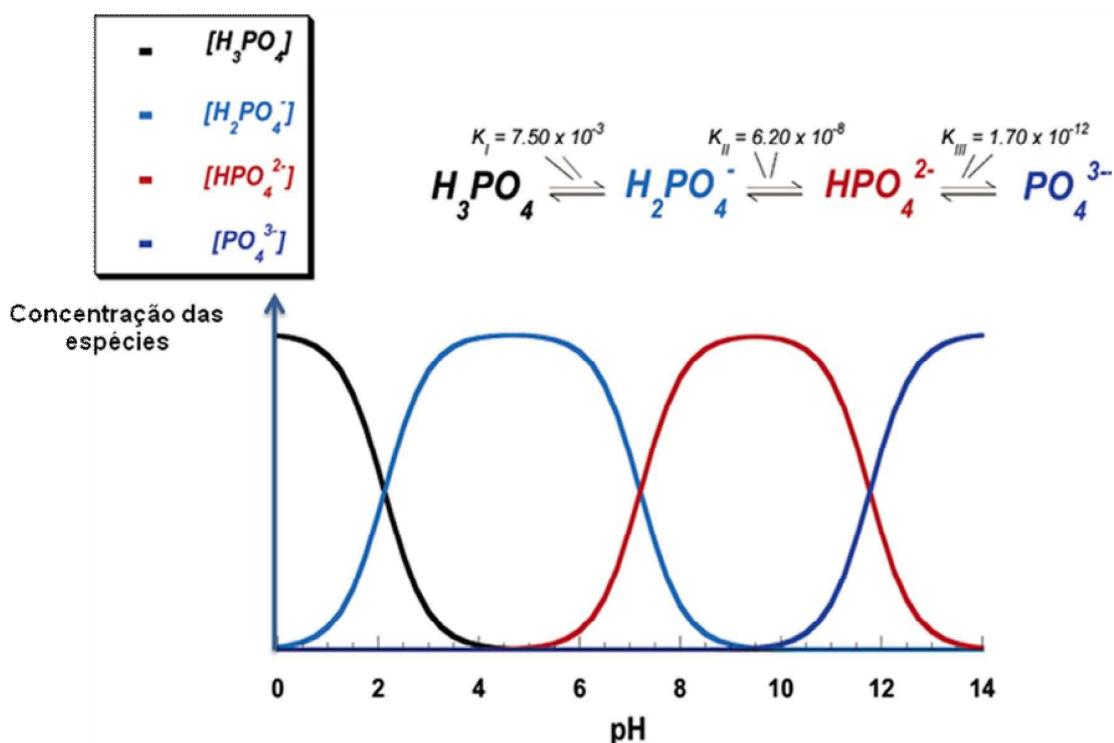
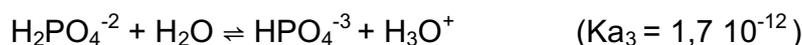
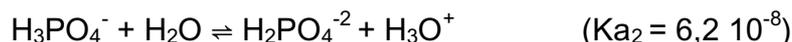
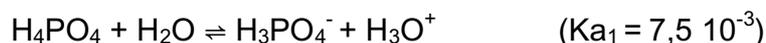


Figura 8. Concentrações das espécies iônicas formadas no equilíbrio triprótico para soluções de ácido fosfórico em função do pH. Figura adaptada de Lynn e colaboradores [82].

Como indicado na Figura 8, no pH fisiológico de ~7,4 as espécies H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} são as predominantes e estão presentes no equilíbrio em concentrações próximas.



Durante a formação de fosfatos de cálcio em sistemas vivos, o pH do meio desempenha um papel importante na determinação das propriedades das partes orgânica e inorgânica que estão presentes nesses sistemas. Além de determinar a natureza dos íons presentes no meio e, portanto, a composição do fosfato de cálcio, variações no pH induzem também modificações na fase orgânica que alteram a absorção de água, a conformação e até a organização a longa distância. Além disso, o pH pode afetar a solubilidade das espécies inorgânicas durante a sua formação, a qual é uma propriedade particularmente importante, não apenas para a distinção entre os fosfatos de cálcio, mas também para a composição orgânica/inorgânica do sistema [83].

Geralmente, a obtenção de compósitos sintéticos de fosfatos de cálcio/componente orgânico ocorre pela técnica de precipitação simultânea dos componentes inorgânico e orgânico, chamada de coprecipitação. Esta técnica resulta em materiais com tamanhos de cristalitos de fosfatos de cálcio da ordem de nanômetros [83]. Normalmente, os métodos para produzir fosfatos de cálcio utilizam uma única fonte de cálcio, na maioria das vezes hidróxido de cálcio [84] ou nitrato de cálcio [85].

Sabe-se que entre os fosfatos de cálcio a hidroxiapatita é a fase menos solúvel e, conseqüentemente, a mais estável, na faixa de pH 4,5-13. Já, quando o pH da solução é inferior a 4,5, as fases com maiores estabilidades são DCPA (CaHPO_4) e DCPD, ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), as quais predominam em baixos pH [80].

A HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um dos principais componentes do tecido ósseo. A hidroxiapatita biológica contém além de Ca^{2+} outros íons, como defeitos, tais como: Mg^{+2} , Na^+ , CO_3^{-2} e outros. Possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração [86], favorecendo o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutividade) e estabelecendo interações químicas com o tecido ósseo (bioatividade). Desta forma, permite a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras), as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica similaridade química superficial da HA com o osso. Embora o fosfato de cálcio presente no tecido ósseo seja normalmente denominado hidroxiapatita, ele difere deste material sintético por apresentar substituições iônicas em sua estrutura e apresentar uma cristalinidade menor. Estas diferenças entre a hidroxiapatita sintética e a “hidroxiapatita biológica” desempenham um papel importante no comportamento biológico dos dois materiais.

A Figura 9 ilustra algumas das possibilidades do uso da hidroxiapatita sintética no corpo humano [87].

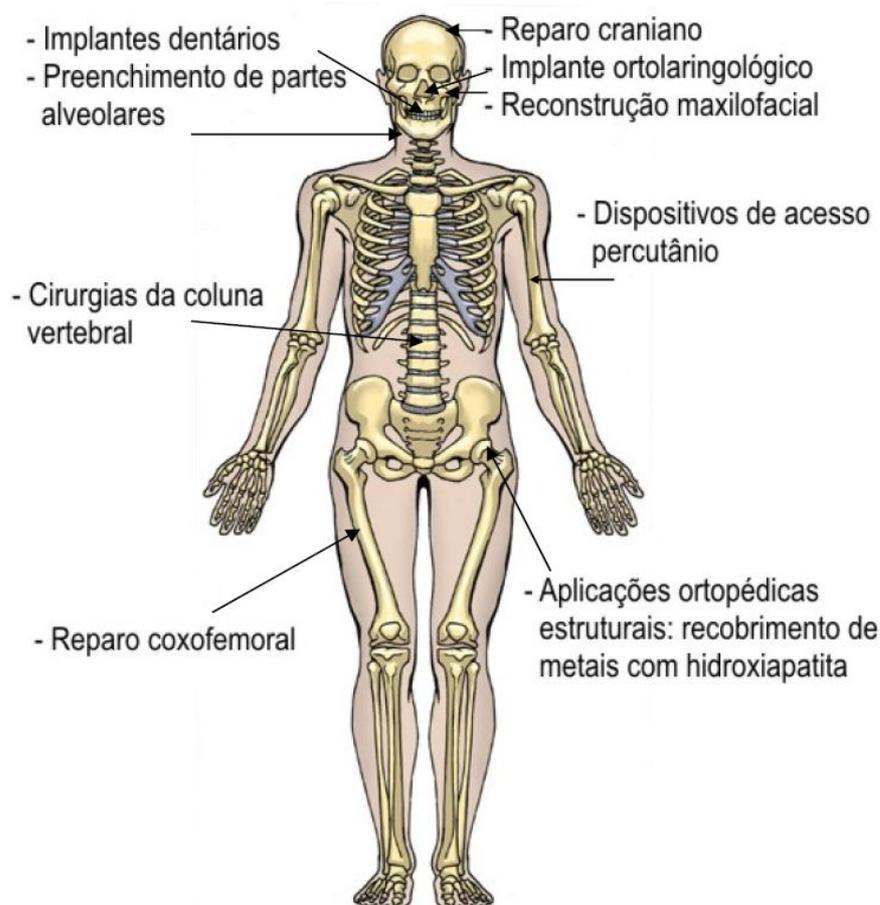


Figura 9. Aplicações da hidroxiapatita no corpo humano. Figura retirada de Vaz [87].

Na ortopedia existe um particular interesse em usar a hidroxiapatita sintética, como revestimento de próteses metálicas para promover uma ligação interfacial estável e adequada entre o material implantado e o tecido vivo [88]. No tratamento de tumores ósseos, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de drogas de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente [88,89].

Na área odontológica a hidroxiapatita é utilizada para reparar perda óssea após a restauração ou extração de um dente e ainda em revestimentos de pinos de titânio usados como implantes na substituição da raiz [90].

1.7. Scaffold como matriz extracelular temporária para o crescimento ósseo

Qualquer tecido do organismo vivo consiste de uma matriz com um ou mais tipos de células. A matriz é, *in vivo*, um alojamento para as células, e providencia para elas uma arquitetura específica e ambiente tecidual apropriado. Mais detalhadamente, ela serve como um reservatório de água, nutrientes, citosinas (grupo de células que têm como função regular respostas inflamatórias), fatores de crescimento etc. Neste sentido, para restaurar funções ou regenerar tecidos, muitas vezes há necessidade de um *scaffold* (suporte) que atue temporariamente como matriz para auxiliar na proliferação celular e deposição da matriz extracelular, para a troca progressiva por uma estrutura regenerada e reconstituída. Os *scaffolds* funcionais são essenciais para algumas soluções da bioengenharia. Em muitos casos, o *scaffold* ideal deve ser biodegradável numa velocidade proporcional ao crescimento do tecido a ser reconstruído, para garantir a integridade estrutural do mesmo [90].

Os *scaffolds* cerâmicos de fosfatos de cálcio, desenvolvidos nos últimos anos, foram idealizados para contribuir no controle da reposição celular na reconstrução do tecido ósseo. A Figura 10 ilustra a influência da arquitetura do *scaffold* na adesão, e, conseqüentemente, na sinalização e na proliferação celular. Os receptores celulares são ativados de modos diferentes nas estruturas A, B e C, sendo a resposta da célula aderida também diferente. Células distintas também podem ser sensibilizadas pelo mesmo conjunto codificado do *scaffold*, mas de maneiras diferentes, dependendo das características dos seus receptores [90].

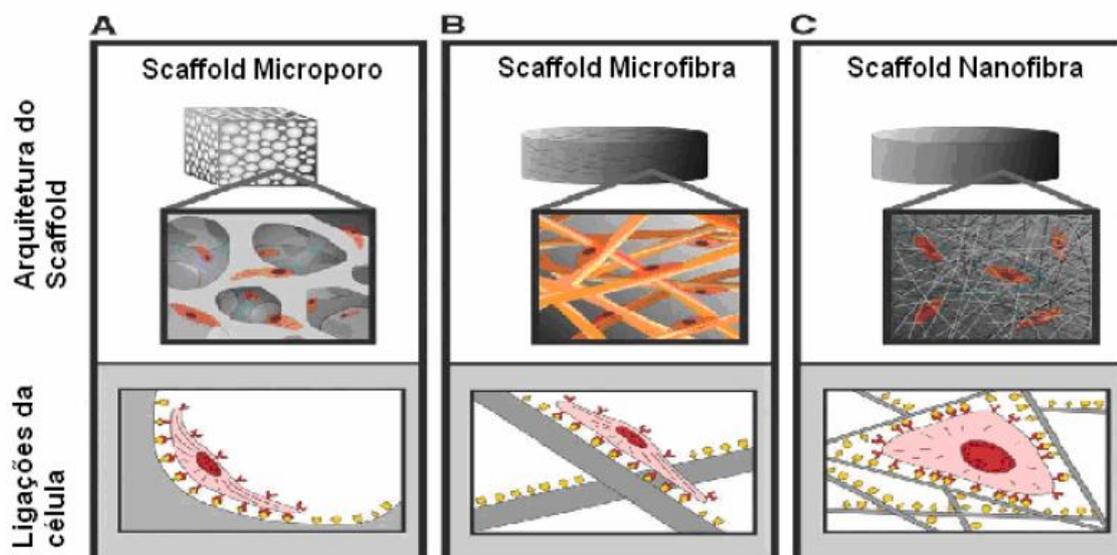


Figura 10. A influência da arquitetura do *scaffold* na adesão e proliferação celular. Figura adaptada de Stevens e George [90].

Observa-se que as células aderem de forma diferente em scaffolds com arquiteturas diferentes. Em ambos os *scaffolds*, microporosos como microfibras, a área superficial é menor, tornando as células menos aderidas ao material, enquanto que em *scaffolds* nanofibras a área superficial é maior, refletindo em uma melhor adesão celular.

Com o objetivo de desenvolver *scaffolds* com potencial para engenharia de tecido, pesquisadores vêm utilizando materiais que proporcionam o controle da estrutura porosa. Um material bastante promissor para o uso como *scaffold* é a quitosana, a qual é um biopolímero facilmente moldado em várias formas e pode produzir *scaffolds* com porosidade controlada. Entretanto, *scaffolds* de quitosana não estão ainda disponíveis no mercado industrial. A maioria dos estudos apresenta ênfase em cultura de células [91-94].

1.8. Testes biológicos

Assim como a caracterização física, química e mecânica de biomateriais, a caracterização biológica por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* é extremamente necessária para a avaliação do potencial para o uso na engenharia de tecidos [95-101].

Neste tópico só serão abordadas as técnicas *in vitro*, uma vez que estas são as de interesse para este trabalho. Os testes *in vivo*, embora indispensáveis na avaliação de um biomaterial, apresentam custo elevado, têm severas restrições éticas, além de exigir um grande número de amostras de análise e de condições altamente controladas.

A primeira técnica *in vitro* utilizada neste trabalho é a imersão do material em solução de fluido corpóreo simulado (SBF). A utilização de soluções que simulam o fluido corpóreo acelular tem se intensificado nos últimos anos, principalmente depois que Kokubo e colaboradores [102] definiram como critério de bioatividade para implantes ósseos a capacidade que materiais, com potencial para serem usados para regeneração óssea, têm de desenvolverem uma camada de apatita sobre sua superfície após imersão nesta solução. Esta camada de apatita formada pode atuar como sinalizadora para as células que se proliferam e se diferenciam para produzir colágeno e hidroxiapatita. Desde então, várias soluções, que diferem entre si pela composição química, têm sido propostas com esta finalidade [103].

A facilidade de execução e a boa correlação entre a resposta positiva dos materiais no teste de imersão em solução de SBF faz deste teste a primeira escolha para a avaliação da bioatividade de um biomaterial. Os materiais que respondem positivamente ao teste da imersão são geralmente submetidos a testes (*in vivo*) mais refinados como a cultura celular.

A cultura de células de mamíferos constitui-se em uma ferramenta muito útil para a avaliação biológica dos biomateriais, seja na determinação de possíveis efeitos citotóxicos ou da influência destes no processo de adesão, proliferação e diferenciação celular [104].

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, houve a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que

avaliam a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos [105,106]. A norma ISO 10993 (*International Standard Organization*) fornece uma série de procedimentos e padrões para a avaliação biológica de dispositivos médicos e o documento ASTM F 813-83 fornece um método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células, enquanto que o documento ASTM F 895-94 descreve o método de difusão em Agar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade. A norma ISO 10993 é dividida em dezesseis partes compreendendo a fabricação, a esterilização, a caracterização e a resposta biológica local e sistêmica do biomaterial. Pela norma ISO, os testes de toxicidade consistem em colocar o biomaterial direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes métodos. Além de aspectos referentes ao procedimento, há também especificação quanto à linhagem celular, ao meio de cultura e às técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, a norma ISO 10993 especifica os materiais que podem ser utilizados como controle positivo (substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível) e negativo (substância que não produz efeito citotóxico).

Deste modo, os testes *in vitro* permitem com que se faça uma rápida pré-seleção de materiais, os quais serão posteriormente avaliados por testes *in vivo*, diminuindo o número de amostras com potencialidade de serem estudadas.

Os testes de citotoxicidade representam a fase inicial de ensaios de avaliação da biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas. Assim, são utilizados em uma pré-seleção para a detecção se o material em questão promove a morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares [107]. Para que um biomaterial seja considerado não citotóxico, este, necessariamente, não deve causar a morte de células e nem mesmo afetar suas funções. A avaliação da citotoxicidade pode ser realizada por análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular, da proliferação celular e da atividade biossintética, dentre outros métodos [108].

Um resultado negativo de citotoxicidade indica que o material está livre de componentes danosos ou que os têm em quantidade insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Entretanto, deve-se considerar

que o teste de citotoxicidade é apenas o primeiro passo. Por outro lado, um resultado positivo indica que o material contém uma ou mais substâncias tóxicas que são extraídas e que podem promover efeitos indesejáveis *in vivo* [109].

Dentre as diferentes metodologias descritas para avaliar a citotoxicidade, as técnicas que avaliam a proliferação celular são as mais comumente empregadas. O reagente MTT [brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio] [110] é a substância frequentemente utilizada nestes testes. O MTT é um sal amarelo solúvel em água, metabolizado pelas células metabolicamente ativas, transformando-se em um produto azul insolúvel. Desta forma a mortalidade/morbididade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação deste corante [104]. O produto formado, um precipitado azul denominado *formazan*, pode ser quantificado por espectrofotometria, sendo sua quantidade proporcional ao número de células vivas existentes, quando utilizada uma população homogênea de células. Este procedimento é simples e permite a análise da citotoxicidade de um maior número de amostras. O reagente MTT tem sido utilizado em vários trabalhos para a avaliação da citotoxicidade, assim como, adesão e proliferação celular, inclusive em materiais à base de quitosana [111-117].

1.9. Considerações finais

A introdução apresentada nos tópicos anteriores fundamenta o propósito desta Tese de Doutorado de se obter hidrogéis para serem utilizados em processos de regeneração óssea, utilizando-se a quitosana como componente orgânico e hidroxiapatita como componente inorgânico, com potencialidade para o uso em engenharia de tecidos ósseos.

A escolha por este material compósito é consequência das propriedades da quitosana e da hidroxiapatita como mostrada a seguir.

Os monômeros D-glucosamina e N-acetilglucosamina da quitosana são substâncias que ocorrem amplamente nos tecidos animais, sendo de grande importância em diversos processos metabólicos [50]. O processo de degradação dos

biomateriais à base de quitosana é realizado por enzimas largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais e das plantas, além de estarem presentes em microorganismos do solo [52]. A quitosana possui alta solubilidade em ácidos orgânicos e inorgânicos, permitindo, portanto, a obtenção de filmes e membranas (combinados ou não com outras substâncias), apresentando também propriedade de formar gel em soluções ácidas, o que possibilita seu uso como *scaffolds*. Devido à compatibilidade da quitosana com os tecidos dos animais, os hidrogéis produzidos com este polissacarídeo podem ser absorvidos pelo organismo durante a regeneração óssea desde que seja empregada quitosana com grau de desacetilação adequado, evitando, portanto, a total degradação antes da recuperação do tecido ósseo. Além disso, tais hidrogéis podem apresentar atividade antimicrobiana e cicatrizante.

A hidroxiapatita, selecionada como componente inorgânico dos hidrogéis, além de ser o principal componente inorgânico encontrado nos tecidos ósseos, possui características biológicas adequadas para a utilização como biomaterial na regeneração de ossos.

A adição de Si na forma de ácido silícico ou do octaânion $\text{Si}_8\text{O}_8^{8-}$ ou Q_8^{8-} nos hidrogéis estudados deve-se à importância deste elemento na formação dos tecidos ósseos [44].

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de biomateriais constituídos de quitosana/HA, contendo ou não Si, e a avaliação comparativa de seu desempenho biológico. Neste contexto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Preparar hidrogéis compósitos quitosana/hidroxiapatita, com ou sem a presença de Si, investigando as características estruturais e morfológicas do material formado e o efeito da mineralização *in situ* de hidroxiapatita na matriz polimérica de quitosana.
- Introduzir Si solúvel nos hidrogéis quitosana/hidroxiapatita, pela adição de uma solução de octaânion de silicato (Q_8^{8-}) ou de ácido silícico, e observar o efeito desta introdução na mineralização da hidroxiapatita.
- Comparar o desempenho biológico dos hidrogéis compósitos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais de partida

A quitosana utilizada neste trabalho foi de alta massa molar e grau de desacetilação >75 %, na forma de flocos e pó, de procedência Aldrich, utilizando-se diferentes lotes deste material. A quitosana foi previamente peneirada em peneira de 50 mesh. O nitrato de cálcio foi de procedência Merck. H_3PO_4 (do tipo P.A.) e hidróxido de amônio de procedência Synth. Hidróxido de tetrametilamônio e tetraortossilicato (TEOS) foram de procedência Aldrich, utilizando-se diferentes lotes deste material. Amostras de HA sintéticas, utilizadas para comparação, foram de procedência Aldrich. Todos os componentes foram utilizados sem tratamento prévio. Ácido silícico foi obtido a partir de solução de silicato de sódio eluída em resina de estireno/divinilbenzeno sulfonada [118]. A solução de octaânion de silicato, Q_8^{8-} , foi preparada conforme o procedimento descrito no item 3.3.

Placas de cultivo celular de poços de poliestireno, PS, de procedência TPP (Techno Plastic Products), foram utilizadas como controle negativo para o cultivo de células (Figura 11). As células MC3T3-E1 (pré-osteoblastos, subclone 4, camundongos) utilizados nos testes de citotoxicidade, biocompatibilidade e viabilidade celular foram de procedência ATCC. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram obtidos da Cell Signaling Technology. pNPP (p-nitrofenilfosfato), usado para medida da atividade de fosfatase alcalina, e MTT [brometo de dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] foram adquiridos da Sigma.

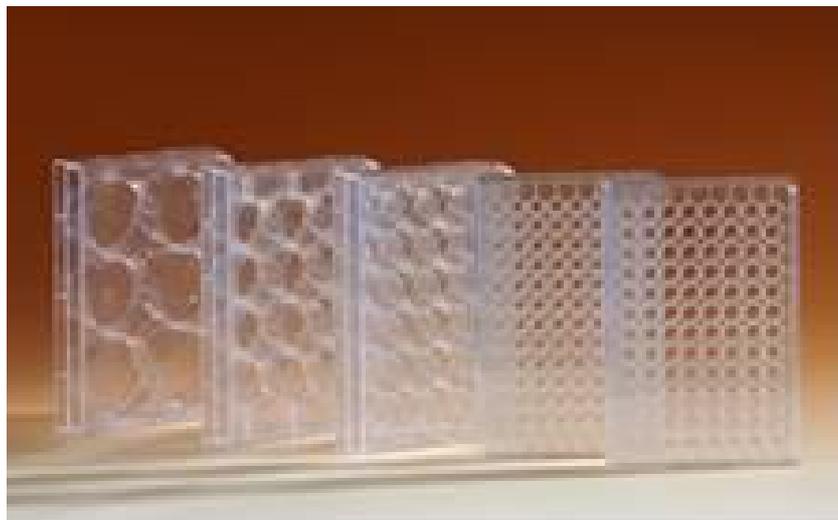


Figura 11. Placas de cultivo celular.

Os testes biológicos foram realizados no Instituto de Biologia da Unicamp em colaboração com a Prof. Dra. Carmen Veríssima Ferreira e o Dr. Willian Fernando Zambuzzi.

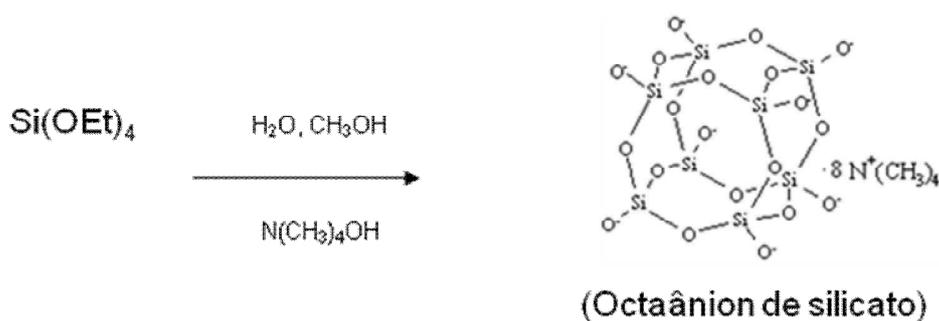
3.2. Preparação dos hidrogéis

O processo de obtenção dos hidrogéis derivados de quitosana/hidroxiapatita, CNHA, de quitosana/hidroxiapatita/octaânion, CNHAO, no qual o Si foi introduzido na forma de silicato do tipo Q_8^{8-} , e de quitosana/hidroxiapatita/Si, CNHASi, em que o Si foi introduzido na forma de ácido silícico, foi desenvolvido neste trabalho e é inédito, sendo protegido por pedido de patente protocolado em 12 de dezembro de 2009 com o n° 018090056726.

3.3. Síntese do octaânion de silicato do tipo Q_8^{8-}

A síntese do octaânion Q_8^{8-} foi realizada em uma única etapa, conforme reação a seguir, segundo o procedimento descrito na literatura [119,120]. Em um balão reacional de 2,0 L de três saídas foram adicionados 100,0 mL de hidróxido de tetrametilamônio,

49,0 mL de metanol e 37,0 mL de água destilada, sob agitação e banho de gelo. Com o auxílio de um funil de adição foram gotejados 54,0 mL de tetraetilortossilicato por aproximadamente 2 horas. Após o término da adição, a solução tornou-se incolor e foi mantida a agitação em banho de gelo por 12 horas. Em seguida o material foi filtrado por filtração simples para garantir a preservação apenas da espécie de Si solúvel.



3.4. Caracterização dos materiais

3.4.1. Análise elementar de Ca, P e Si

A determinação de Ca, P e Si nos hidrogéis foi efetuada em amostras de tamanho original de ~3 cm de diâmetro e 1 cm de espessura, as quais foram secas, trituradas, homogeneizadas e submetidas à fusão alcalina oxidante. A dosagem de Ca e Si foi efetuada por espectroscopia de absorção atômica, em um equipamento Varian – Modelo AA240FS. A dosagem de fósforo foi realizada por colorimetria em um espectrocolorímetro Hach Modelo DR-2000. As análises foram realizadas pela empresa Puriquima [121].

3.4.2. Espectroscopia infravermelho (IV)

O espectro infravermelho foi obtido em um espectrômetro *Bomem B100*, utilizando-se a técnica de transmissão, de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

Os hidrogéis foram previamente secos, triturados e misturados em KBr, numa concentração de ~1 % em massa.

3.4.3. Ressonância magnética nuclear (RMN de ^{31}P)

O espectro de RMN de ^{31}P foi obtido à temperatura ambiente em amostra sólida dos hidrogéis secos e triturado, em um equipamento BRUKER, modelo DRX 400. O espectro foi adquirido em HPDEC, desacoplamento com pulso contínuo de ^1H , a uma frequência de 161,97 MHz com um campo magnético $B_0 = 9,4$ T. Os parâmetros de análises encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de análises para RMN de ^{31}P (HPDEC)

Núcleo	Frequência de rotação (kHz)	Pulso de $\pi/2$ no ^1H (μs)	Tempo de repetição (s)	Nº de aquisições	Tempo de aquisição (ms)	Tempo de contato (ms)	Seqüência de pulso
^{31}P	10	4	60	64	16	5	-

3.4.4. Difração de raios X (DRX)

A análise por difração de raios X dos hidrogéis secos e triturados, foi efetuada em um difratômetro *XRD6000* da Shimadzu, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54060$ Å), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA.

3.4.5. Termogravimetria (TGA)

A perda de massa dos hidrogéis secos e triturados foi analisada em uma termobalança *TGA 2950*, TA Equipaments, em uma faixa de temperatura de 25 a 1000 °C, com taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹, sob atmosfera oxidante de ar sintético.

3.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos hidrogéis secos, CNHA, CNHAO e CNHASi, foi observada em um microscópio eletrônico de varredura, JEOL, JSM-6360 LV, operado a 20 kV e/ou microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo da JEOL, JSM-6340 F, operado a 3 kV. Foram analisadas a superfície ou a superfície de fratura criogênica dos materiais. As amostras foram previamente recobertas com ouro em um metalizador modular de alto vácuo, Baltec MED 020.

3.4.7. Teste de bioatividade

O teste de bioatividade aplicado às amostras de hidrogéis CNHA, CNHAO e CNHASi, foi efetuado por imersão destas amostras em solução de SBF e avaliação da formação de HA por microscopia eletrônica de varredura.

A solução de SBF foi preparada de acordo com a metodologia descrita na proposição de norma internacional ISO (ISO FDIS 23317, 2005) citada por Abe e colaboradores [122]. Na Tabela 4 estão apresentados os reagentes utilizados segundo a ordem de adição, quantidade e pureza de cada um deles uma vez que a solução de SBF é supersaturada em relação ao equilíbrio. As quantidades apresentadas correspondem à preparação de 1 L de solução de SBF.

Tabela 4. Seqüência de adição dos sais, quantidade e grau de pureza para preparar 1 L da solução de SBF.

Ordem	Sais	Quantidade (g)	Pureza (%)
1	NaCl	5,403	99,0
2	NaHCO ₃	0,740	99,7
3	Na ₂ CO ₃	2,046	99,7
4	KCl	0,226	99,0
5	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,172	98,0
6	MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,311	99,0
7	CaCl ₂	0,293	96,0
8	Na ₂ SO ₄	0,072	99,0

Os hidrogéis foram previamente lavados em água deionizada e em seguida foram imersos em um frasco de vidro contendo 30 mL da solução de SBF. Após a imersão dos hidrogéis na solução de SBF, os frascos foram hermeticamente fechados. Estas amostras ficaram em contato com a solução durante 7 dias. Os ensaios foram realizados em condições fisiológicas, ou seja, a 37 °C e pH em torno de 7,4. Depois de atingido o tempo pré-determinado, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura de 37 °C em estufa de circulação. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicatas.

3.4.8. Testes biológicos

Os testes biológicos foram efetuados nas amostras dos hidrogéis CNHA, CNHAO e CNHASi, pelo cultivo de células pré-osteoblastos sobre a superfície dos hidrogéis e como controle negativo foram utilizados os poços de cultura vazios, sendo considerada

a superfície inferior no poço de PS. Diferentes testes foram feitos, como se detalha a seguir.

A cultura de pré-osteoblastos pelo cultivo das células MC3T3-E1 (pré-osteoblastos, subclone 4, camundongos) para a avaliação da biocompatibilidade dos hidrogéis foi realizada em meio contendo 100 células/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10 % de soro fetal bovino. A densidade celular utilizada para os testes foi de 3×10^4 células/mL e cultivadas em atmosfera umidificada, 5 % de CO₂, a 37 °C. A manutenção da cultura das células foi realizada a cada 2 a 3 dias. Para possibilitar a diferenciação destas células foram utilizados β-glicerofosfato (10 mmol/L) e ácido ascórbico (50 µg/mL).

3.4.8.1. Teste de viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular diretamente relacionada à citotoxicidade do material, foi realizada pela redução do MTT conforme diagrama ilustrado na Figura 12. Neste ensaio, foi avaliada a sobrevivência das células na presença dos hidrogéis. O MTT, quando incubado com células vivas, é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose, conforme a reação ilustrada na Figura 13.

Para a realização do experimento as células (50×10^3 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços com e sem os hidrogéis e após 24 e 48 horas. O meio de cultura foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante (1 mg/mL). As células foram incubadas durante 4 horas. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e o corante (formazan) restante foi solubilizado em 1 mL de etanol. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância medida a 570 nm com um equipamento UV/Vis. Os valores da viabilidade celular, diretamente ligados à citotoxicidade do material, foram expressos em percentagem relativa à absorbância determinada nas células controle (poços sem amostra).

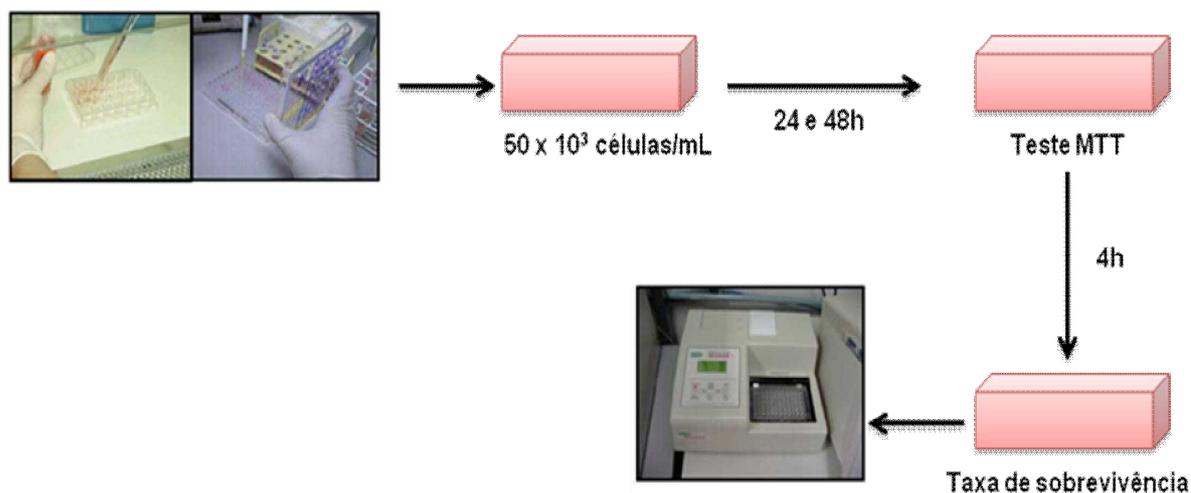


Figura 12. Diagrama da preparação do teste de viabilidade celular pela redução do MTT.

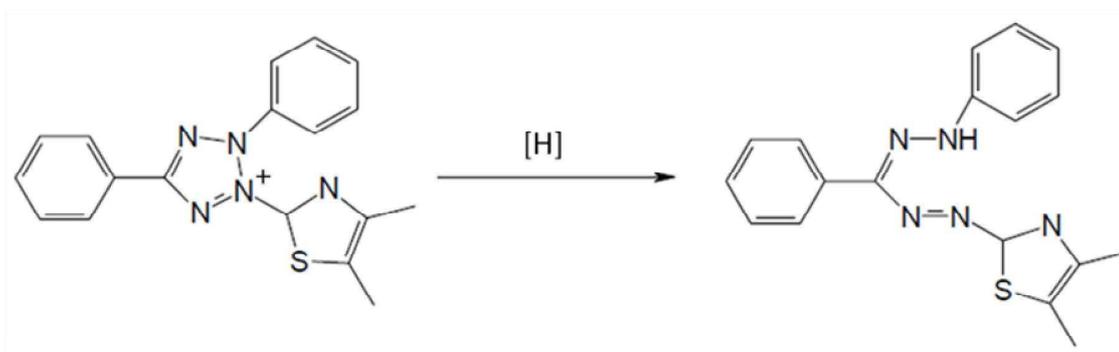


Figura 13. Reação da redução do anel tetrazólio do sal de MTT para a formação de cristais de formazan.

3.4.8.2. Teste de adesão e proliferação celular

A adesão e proliferação celular foram avaliadas pela incorporação de cristal violeta. Este teste avalia a adesão das células sobre a superfície dos hidrogéis e o crescimento do número de células sobre os mesmos. Neste teste, as células (50×10^3 células/mL) foram cultivadas por 15 minutos, 6 horas e 48 horas em placas de 24 poços

com e sem os hidrogéis. As células aderidas sobre as superfícies dos hidrogéis foram rapidamente lavadas em PBS (tampão salino de fosfato), e fixadas em uma solução de etanol e ácido acético glacial (3:1) por 10 minutos à temperatura ambiente e deixadas secar. Depois, as células foram coradas com 0,1% de cristal violeta por 10 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por decantação. Logo após, as células foram lavadas 2 vezes com água destilada. O corante ligado à cromatina foi solubilizado em uma solução de 10% de ácido acético e a absorbância medida a 550 nm usando um leitor de microplaca.

3.4.8.3. Teste de expressão e níveis de fosforilação de proteínas

A avaliação da expressão e níveis de fosforilação de proteínas foi efetuada com o objetivo de avaliar a sobrevivência das células sobre as superfícies dos hidrogéis por identificação de algumas proteínas ligadas ao ciclo celular, pois se proteínas forem sinalizadas durante a adesão das células o material será promissor para ser utilizado como biomaterial.

Este ensaio foi realizado por *Immunoblotting*, no qual as células foram lisadas em 200 µL de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4, 1 % Tween 20, 0,25 % desoxicolato de sódio, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1,0 mmol/L o-vanadato, 1,0 mmol/L NaF), e inibidores de proteases [1,0 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mmol/L 4-(cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila)] por 2 horas em gelo. Os extratos protéicos foram centrifugados e a concentração de proteínas determinada pelo método de *Lowry* [123]. Aos extratos foi adicionado tampão de amostra na proporção 1:1. O tampão de amostra foi preparado a partir de: 4 % dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 6,8), 200 mmol/L de ditioneitol (DTT), 0,1 % azul de bromofenol e 20 % de glicerol. Os extratos celulares foram resolvidos por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (SDS)-poliacrilamida (PAGE) e transferidos para membranas de PVDF. Os géis após eletroforese foram bloqueadas em 1 % de leite desnatado ou soroalbumina bovina (2 %) em tampão salino Tris (TBS)-Tween 20 (0,05 %) e incubadas por uma noite a 4 °C com os anticorpos primários

específicos, diluídos na proporção 1:1000. Após lavagem em TBS-Tween 20 (0,05 %), os géis foram incubadas com anticorpos secundários (anti-“coelho” e anti-“rato”) conjugados com peroxidase, em diluição 1:2000, em tampão de bloqueamento, por 1 hora. A detecção foi feita por quimioluminescência.

As imagens obtidas pela quimioluminescência dos géis foram digitalizadas e importadas para um programa de computador específico para a realização da densitometria óptica das bandas. Para cada banda estudada foram consideradas as áreas de pico correspondentes como valor da densitometria óptica. Para a análise estatística, foram utilizadas 3 amostras de cada hidrogel na realização do teste.

3.4.8.4. Teste de diferenciação celular

A diferenciação celular é o processo pelo qual as células vivas se especializam para realizar uma determinada função, podendo se agrupar e se transformar em tecidos como, por exemplo, o tecido ósseo. A diferenciação celular foi avaliada pela dosagem de fosfatase alcalina.

A atividade enzimática da fosfatase foi determinada a 37 °C, pela formação do p-nitrofenol (coeficiente de extinção molar de $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando-se um tampão glicina 25 mmol/L, pH 9,4, contendo 2,0 mmol/L de MgCl_2 e 5,0 mmol/L de p-nitrofenilfosfato em um volume final de 1,0 mL [124].

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Formação dos hidrogéis de quitosana e hidroxiapatita

O processo de formação da HA no hidrogel de quitosana é resultante da nucleação e crescimento de partículas/cristais de HA entre as cadeias de quitosana neste hidrogel.

Soluções aquosas de ácido fosfórico promovem um ambiente complexo para a formação do hidrogel de quitosana, pois variações de pH do meio alteram as concentrações relativas das espécies iônicas provenientes da dissociação deste ácido, variando a composição química e a razão Ca/P final do hidrogel. Deste modo, em todas as precipitações o pH inicial foi de ~2 na obtenção do hidrogel ácido de quitosana. A leitura do pH do hidrogel foi efetuada com pHmetro, Modelo 827 da Metrohm, com eletrodo de vidro, adequado para soluções viscosas.

Em pH ~2, os grupos NH_2 presentes na cadeia de quitosana estão protonados e associados aos contra-íons H_2PO_4^- . A quitosana utilizada é altamente desacetilada, e, portanto seu correspondente hidrogel ácido tem um grande número de espécies $-\text{NH}_3^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$. A adição progressiva da base no hidrogel resulta no deslocamento do equilíbrio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ na direção do aumento da concentração da espécie HPO_4^{2-} , concomitantemente com a desprotonação dos íons $-\text{NH}_3^+$. Estes dois fenômenos simultâneos dão início ao processo de precipitação *in situ* de espécies insolúveis de fosfato de cálcio (provavelmente o núcleo de precipitação é o $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$), ao mesmo tempo que promove a coagulação do hidrogel de quitosana. Com o aumento contínuo do pH até valores próximos de 14, o equilíbrio $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ se desloca aumentando a concentração de PO_4^{3-} , resultando no crescimento dos cristais de hidroxiapatita, enquanto que mais grupos $-\text{NH}_3^+$ são desprotonados, levando à formação de um hidrogel de quitosana insolúvel em água. Esta precipitação *in situ* de HA ocorre na região inter-cadeias e sobre o gel de quitosana, gerando o hidrogel CNHA, conforme o esquema ilustrado na Figura 14. A desprotonação do gel em pH=14 resulta em uma profunda modificação na interação entre as cadeias de quitosana.

Imagens do hidrogel CNHA obtido são mostradas na Figura 15. Este hidrogel apresentou características mecânicas que permitem a sua manipulação, aceitando inclusive cortes para moldagem em outras formas geométricas, se necessárias. O hidrogel é constituído por ~80% de água, determinada por secagem até peso constante. Após seco, o processo de hidratação é irreversível.

A estrutura porosa dos hidrogéis, como os obtidos neste trabalho, abre a possibilidade de seu uso na área médico odontológico para reconstrução tecidual, uma vez que, ela é adequada para armazenar fármacos e substâncias endógenas.

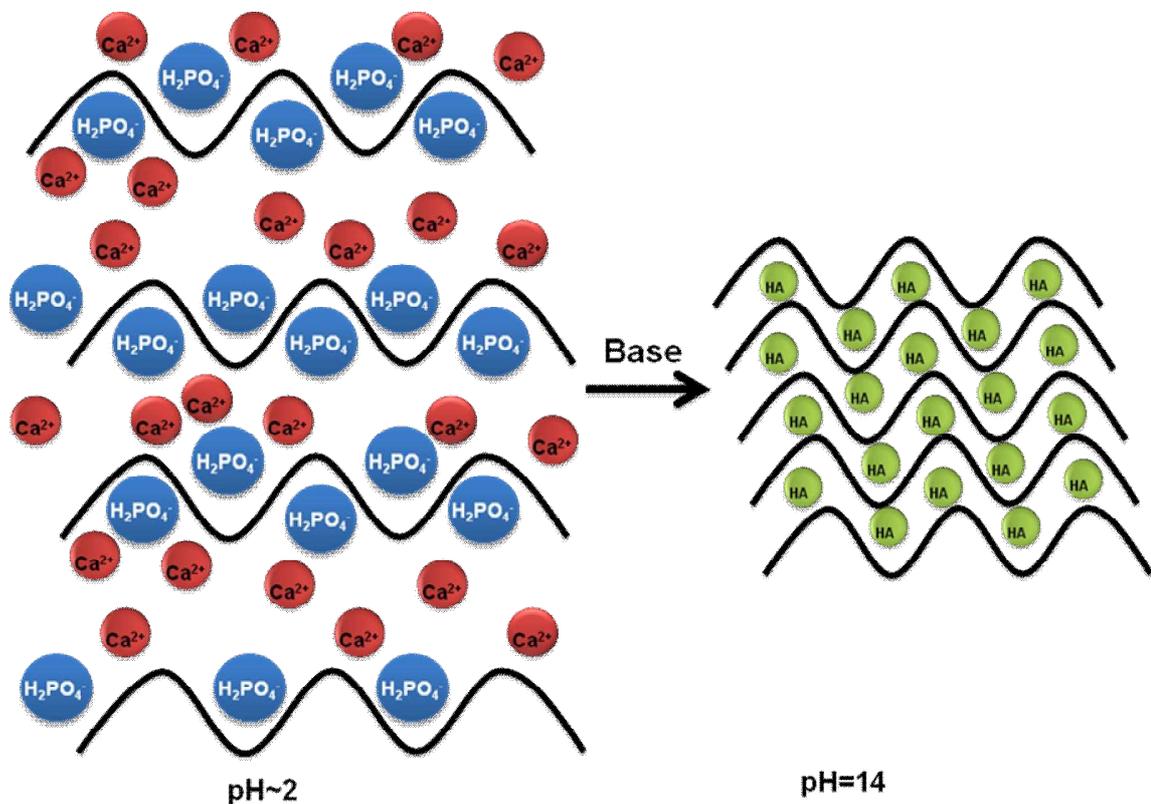


Figura 14. Diagrama ilustrando o possível mecanismo de formação do CNHA pela precipitação *in situ* de HA no hidrogel de quitosana.

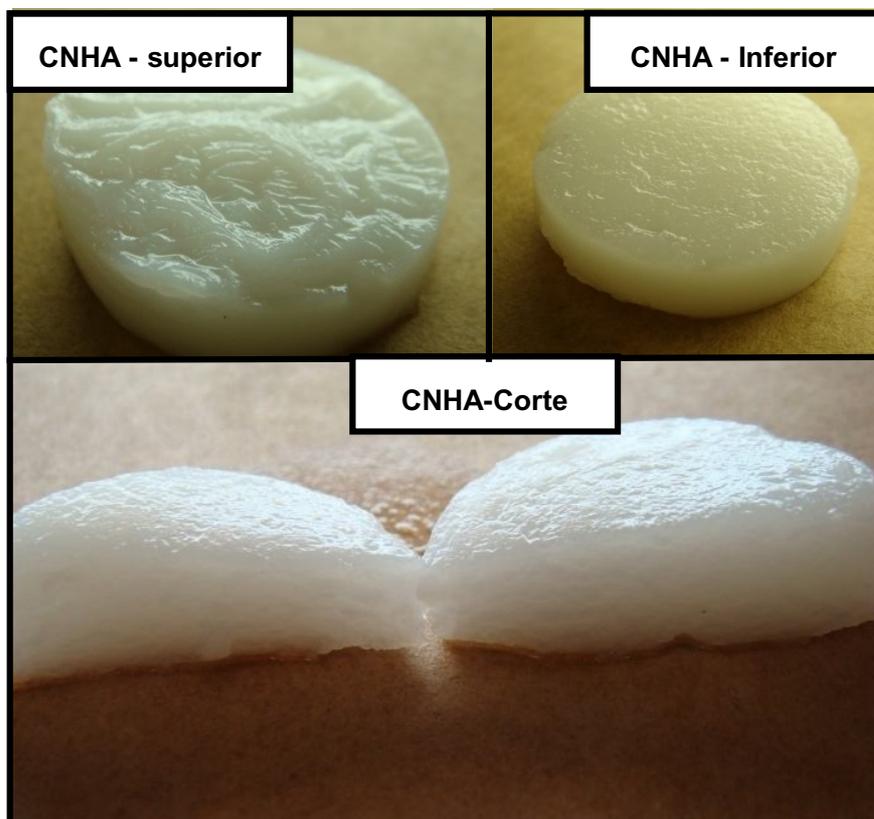
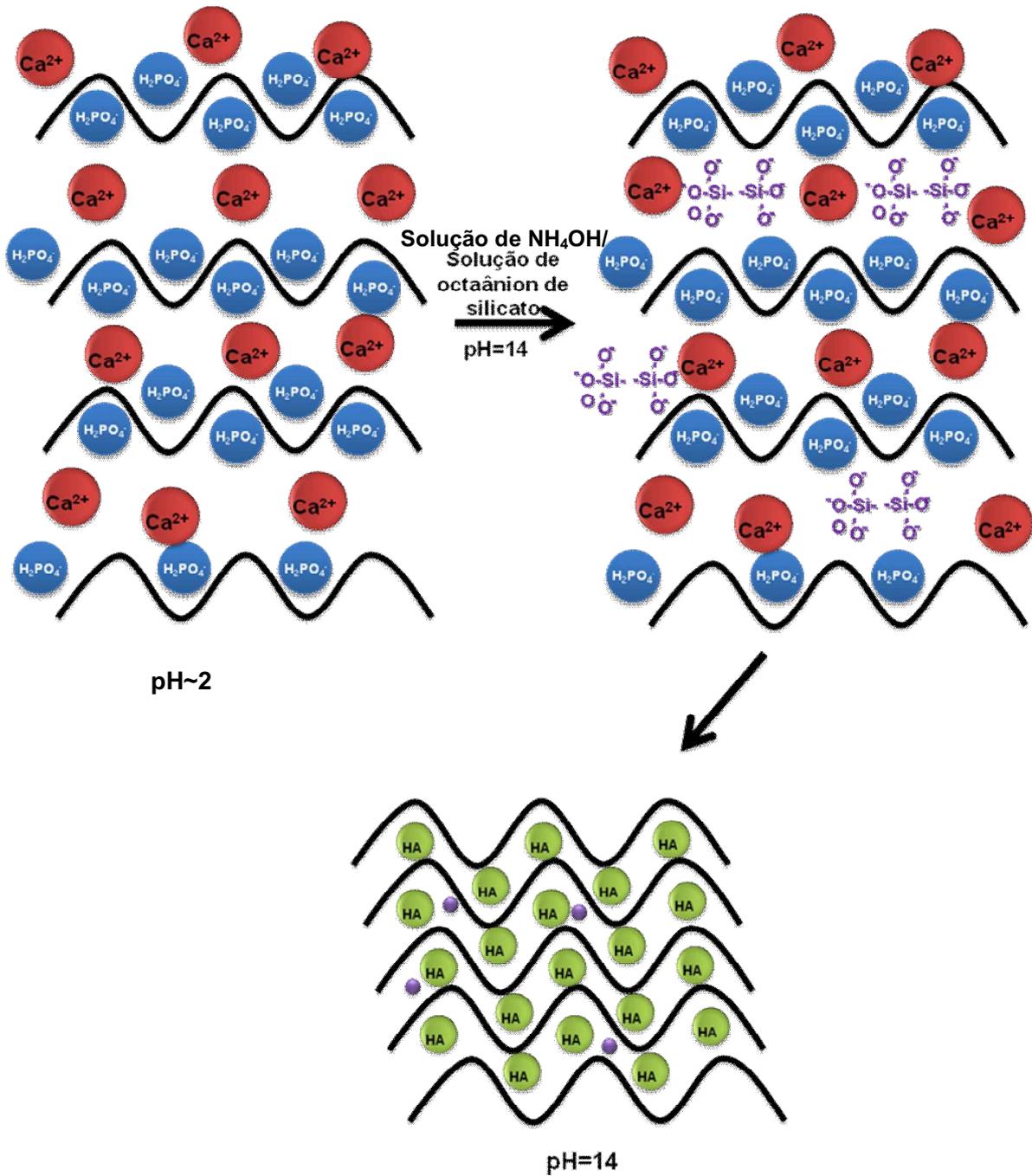


Figura 15. Fotografias do hidrogel CNHA, superfície superior (CNHA-S), superfície inferior (CNHA-I) e corte.

O hidrogel CNHAO foi preparado pela adição de octaânion de silicato, em $\text{pH}=14$, ao gel de quitosana. Esta fonte de Si aniônico solúvel permeou pelo gel acidulado substituindo, em parte, íons H_2PO_4^- , e também atuando como contra-íon do NH_3^+ , competindo com o H_2PO_4^- . O aumento do pH promoveu a nucleação *in situ*, seguida da precipitação de domínios de HA e de silicato/silica por todo o hidrogel. O diagrama da preparação e as fotografias do hidrogel CNHAO são ilustrados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.



Em que  = sílica/silicato

Figura 16. Diagrama representando a formação do CNHAO pela precipitação de HA/silicato/sílica no hidrogel de quitosana.

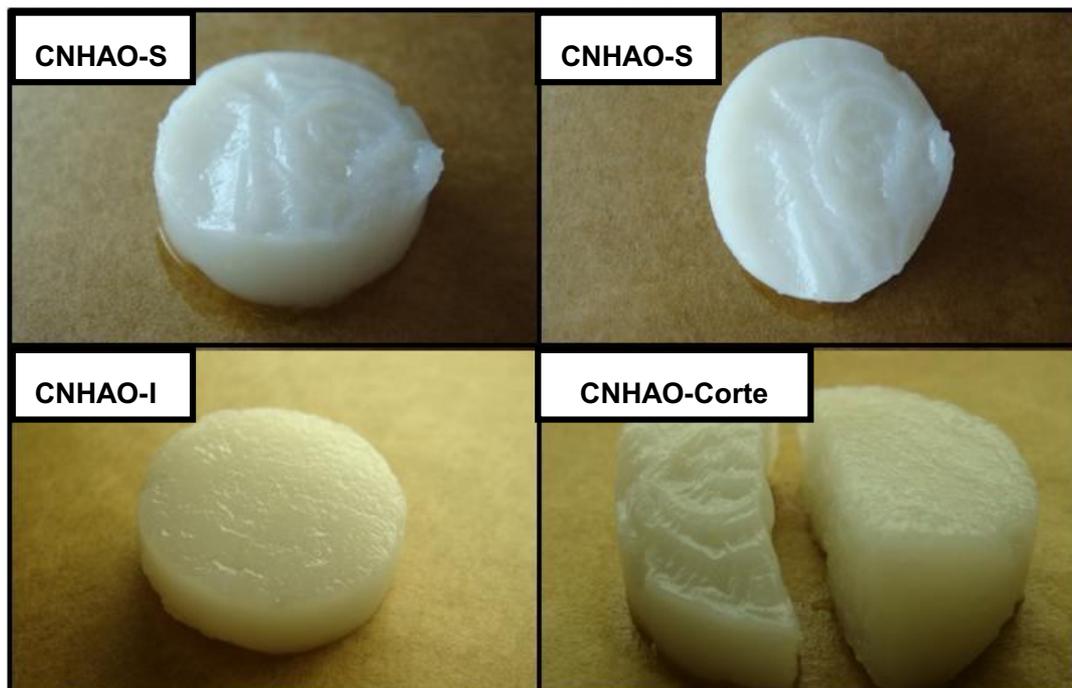


Figura 17. Fotografias do hidrogel CNHAO. Superfície superior (CNHAO-S), superfície inferior (CNHAO-I) e corte.

O hidrogel CNHAO apresentou-se macroscopicamente semelhante ao hidrogel CNHA, como pode ser observado na Figura 18, provavelmente pela pequena quantidade de silicato incorporado e distribuído no hidrogel.

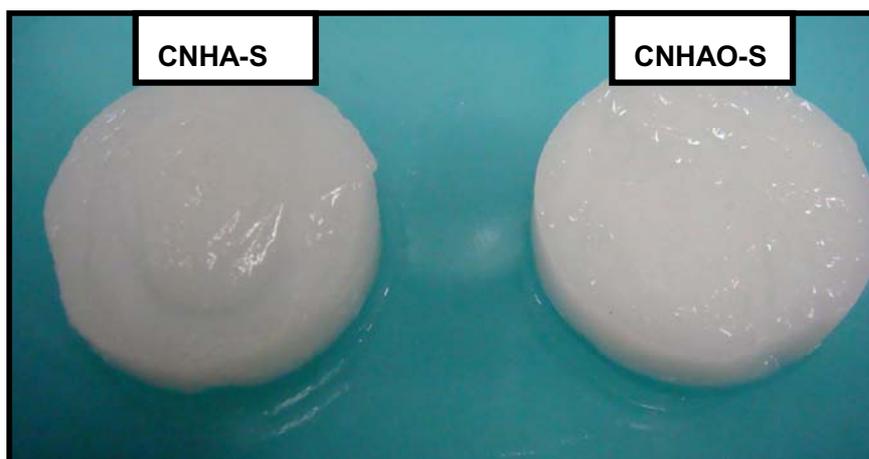


Figura 18. Fotografia da superfície superior dos hidrogéis CNHA e CNHAO.

No caso do hidrogel CNHASi, o ácido silícico, $\text{Si}(\text{OH})_4$, adicionado no gel em pH ~ 2 , também atua na protonação dos grupos NH_2 , permanecendo como o contra íon H_3SiO_4^- , ou como ânions oligoméricos, associados aos NH_3^+ das cadeias da quitosana. Com o aumento do pH ocorre a nucleação do silicato, que pode formar uma rede finamente dispersa de silicato ou sílica entre as cadeias da quitosana, ao mesmo tempo que ocorre a nucleação de HA. Pode também ocorrer, nesta condição, a dopagem de domínios de HA não cristalina por HSiO_4^{3-} , em substituição ao PO_4^{3-} [125]. Esta condição experimental promoveu ao hidrogel CNHASi uma maior estabilidade dimensional entre as amostras preparadas. O esquema de preparação do hidrogel CNHASi está ilustrado na Figura 19.

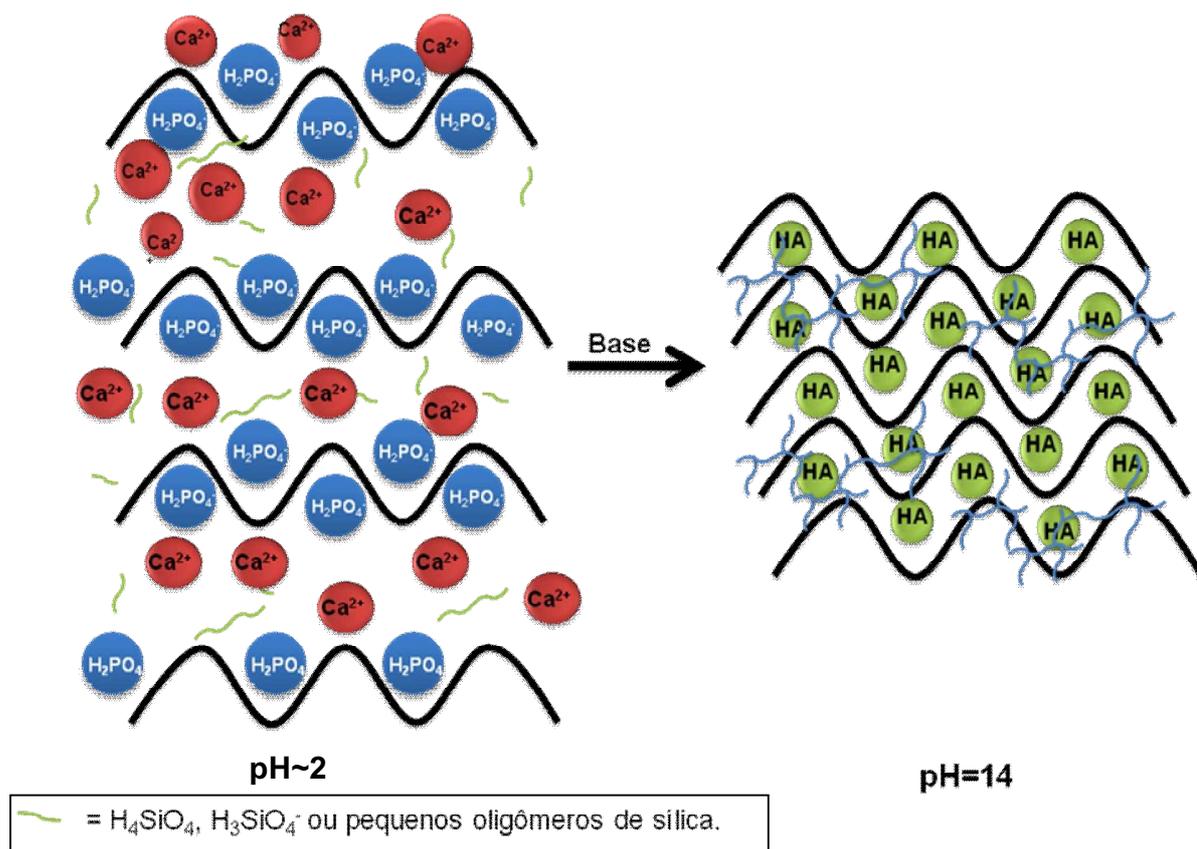


Figura 19. Diagrama representando a formação do CNHASi pela precipitação de HA/sílica/silicato no hidrogel de quitosana.

4.2. Avaliação da razão Ca/P e de Si nos hidrogéis

Conforme descrito na Introdução, a razão molar Ca/P é um parâmetro importante na caracterização de biomateriais, especialmente na avaliação da potencialidade de serem empregados na substituição de tecidos ósseos, pois com ela é possível sugerir a fase de fosfato presente, bem como a sua solubilidade [126]. Se a razão molar Ca/P for menor que 1 a solubilidade é alta, à medida que a razão aumenta a solubilidade diminui até atingir um valor próximo de 1,67, correspondente à HA, a qual é insolúvel [127].

A Tabela 5 indica a porcentagem em massa determinada para os elementos analisados em cada amostra, assim como, a correspondente razão Ca/P. Para a realização destas análises, as amostras utilizadas correspondem aos hidrogéis secos até peso constante, conforme descrito no item 3.4.1. As amostras foram separadas em grupos em função dos lotes de quitosana e da preparação dos hidrogéis. Esta divisão assegura que, em cada grupo, as amostras, contendo ou não Si, foram preparadas a partir do mesmo hidrogel de quitosana, eliminando possíveis alterações na composição provenientes de lotes distintos deste polímero. Desde modo, em cada grupo as amostras envolveram quitosana de mesma distribuição de massas molares e, principalmente, de mesmo grau de desacetilação. Esses parâmetros podem influenciar no consumo do ácido fosfórico e na reprodução do hidrogel de quitosana. No grupo 1, a amostra CNHAO foi dividida em 3 camadas, para avaliar a distribuição de Si nas mesmas, sendo todas submetidas à análise.

Como pode ser observado, houve variação da razão molar Ca/P em CNHA em função do lote, e em função da preparação. Nos grupos 1 e 4, as amostras CNHA foram ricas em Ca^{2+} , acima do estabelecido para HA, podendo ter também ocorrido contaminação de CaCO_3 nestas amostras. O hidrogel CNHASi apresentou um aumento na razão Ca/P quando comparado ao hidrogel CNHA preparado simultaneamente, nas mesmas condições experimentais. A incorporação de Si, proveniente de H_4SiO_4 , foi a mais efetiva e contribuiu para uma diminuição da quantidade de H_3PO_4 . Além disso, espécies de silicato como HSiO_4^{3-} podem substituir PO_4^{3-} em HA não cristalina, resultando em uma maior razão molar Ca/P do hidrogel. O hidrogel CNHAO apresentou valor de Ca/P menor que o hidrogel CNHA. A incorporação de Si, proveniente do

octaânion Q_8^{8-} , promoveu uma diminuição da razão molar Ca/P, em relação ao correspondente hidrogel sem Si. Este fato sugere que o ânion Q_8^{8-} , na etapa de lavagem do hidrogel com água deionizada, promoveu uma lixiviação de nanopartículas de silicato de cálcio, provavelmente nanopartículas mais superficialmente aderidas ao hidrogel. Como consequência, a camada interna do hidrogel foi a que incorporou mais Si.

Tabela 5. Porcentagem em massa dos elementos Ca, P e Si nos hidrogéis e a correspondente razão molar Ca/P. (1^a), (2^a) e (3^a) correspondem as três camadas horizontais nas quais a amostra CNHAO foi dividida.

<i>Amostras</i>	<i>Material</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>P (%)</i>	<i>Si (%)</i>	<i>*L.D</i>	<i>Ca/P (razão molar)</i>
Grupo 1	CNHA	17,74	7,18	-	0,01	1,91
	(1 ^a)	17,27	8,84	0,06	0,01	1,48
	CNHAO (2 ^a)	16,50	8,73	0,09	0,01	1,46
	(3 ^a)	5,74	2,85	0,04	0,01	1,59
Grupo 2	CNHA	9,30	4,86	-	0,01	1,48
	CNHASi	8,51	4,35	0,22	0,01	1,57
Grupo 3	CNHA	17,80	8,22	-	0,01	1,63
Grupo 4	CNHA	10,52	4,37	-	0,01	1,86

* L.D.= Limite de Detecção dos métodos utilizados nas análises de Ca, P e Si.

4.3. Caracterização estrutural dos hidrogéis

Os espectros IV da quitosana, empregada na obtenção dos hidrogéis, e da hidroxiapatita comercial encontram-se na Figura 20A; os espectros dos hidrogéis secos

estão na Figura 20B. Estes hidrogéis apresentaram as absorções características da quitosana, conforme esperado. A banda intensa e larga com máximo em 3450 cm^{-1} está associada ao ν O-H, correspondente aos grupos C-OH e H_2O fisicamente adsorvida, com um ombro em $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ atribuído ao ν N-H dos grupos NH_2 . Entre $2930\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ encontram-se os ν C-H de grupos CH, CH_2 e CH_3 . As absorções entre 1420 e 1320 cm^{-1} são características de diferentes modos de δ C-H (CH, CH_2 , CH_3). Os grupos amidas podem ser caracterizados pelos modos C=O, N-H e C-N, os quais encontram-se razoavelmente associados. A literatura descreve-os de forma típica, sendo a banda de amida I, a qual tem contribuição principal do ν C=O, observada em 1658 cm^{-1} , enquanto que a Amida II (δ NH_2) ocorre em 1566 cm^{-1} . Além dessas amidas descritas anteriormente, pode-se observar uma banda fraca em $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ referente à amida III, associada principalmente ao ν CN. Na região de 720 a 600 cm^{-1} , observam-se os modos das amidas IV, V e VI, associados a deformações fora do plano de NH da quitosana. A banda larga e intensa com máximo em 1030 cm^{-1} está associada ao ν C-O-C da cadeia da quitosana. O grupo PO_4^{3-} da HA é caracterizado pela absorção intensa do ν PO_4 em $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$, o qual na prática coincidiu com a absorção intensa da CN, citada anteriormente, além das bandas em 597 e 557 cm^{-1} referentes à δ PO_4 . Este modo, em fosfatos iônicos de simetria T_d , aparece apenas como uma única absorção. O desdobramento observado sugere abaixamento de simetria para C_{3v} , provavelmente pela presença de HPO_4^{2-} na fase não cristalina do HA [128,129].

As amostras contendo Si, CNHAO e CNHASi, mostraram um alargamento da região entre 1200 e 1000 cm^{-1} , a qual além de apresentar as absorções dos grupos C-O-C e PO_4^{3-} , de CN e HA, respectivamente, tem a contribuição do modo intenso e largo do ν Si-O-Si do siloxano (silicato). Na amostra de HA comercial, a absorção fina em 3570 cm^{-1} corresponde ao ν O-H de grupos hidroxilas livres, não associados, usualmente encontrados em fase não cristalina ou na superfície de HA. O desaparecimento desta absorção nos compósitos sugere que esta hidroxila está associada por ligação de hidrogênio entre HA e grupos $-\text{NH}_2$, C=O ou $\text{CH}_2\text{-OH}$ das cadeias de quitosana, conforme ilustrado na Figura 21, concordando com a proposta de associação de grupos entre CN e HA de Cheng e colaboradores [93].

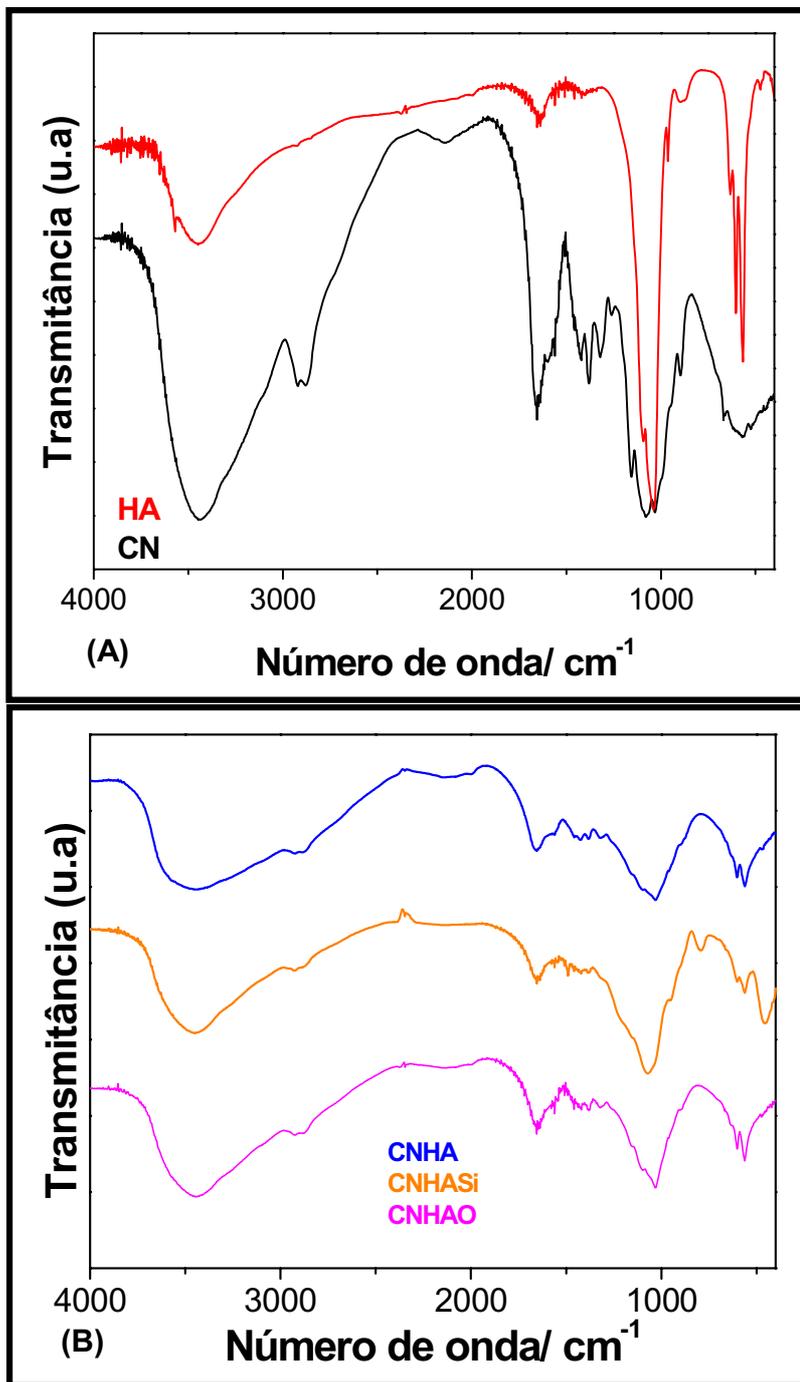
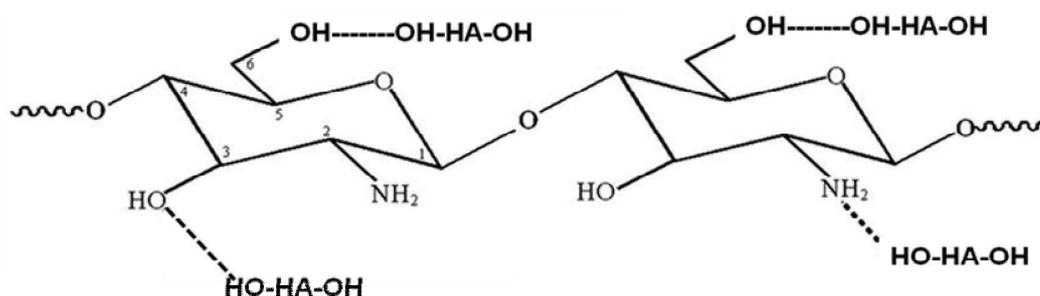


Figura 20. (A) Espectro IV da HA comercial e da quitosana; (B) espectro IV dos hidrogéis secos CNHA, CNHAO e CNHASi.



HO-HA-OH = hidroxiapatita contendo HPO_4^{2-} ou H_2O fortemente adsorvidos.

Figura 21. Possíveis ligações de hidrogênio entre quitosana e HA. Figura adaptada de Cheng e colaboradores [93].

Para uma melhor análise estrutural da fase de HA foi obtido espectro de RMN ^{31}P dos hidrogéis secos e triturados, conforme ilustrado na Figura 22. Em todas as amostras, independente da composição e da presença ou não de Si, observou-se um único pico de P, idêntico ao da HA comercial, o qual sugere a presença de um único sítio para este elemento, com $\delta=2,9$ ppm, que corresponde à formação de somente um tipo de fosfato de cálcio, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, associado por ligação de hidrogênio à HA [127].

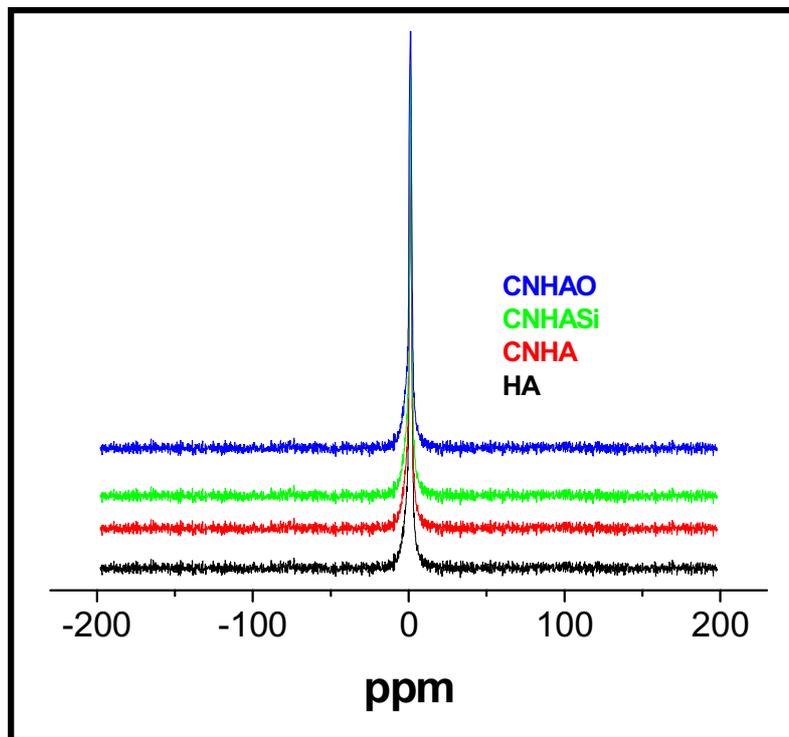


Figura 22. Espectro de RMN ^{31}P da HA e dos hidrogéis secos CNHA, CNHAO e CNHASi.

Foram obtidos difratogramas de raios X para os hidrogéis secos e triturados, com o objetivo de avaliar a cristalinidade da fase de HA presente nestes materiais, conforme apresentado na Figura 23. Enquanto o difratograma da quitosana em pó apresenta apenas um halo intenso e relativamente fino em $\sim 20^\circ$ (2θ) e outro de menor intensidade em $\sim 10,5^\circ$ (2θ), sugerindo uma parcial organização intercadeias da CN, para os hidrogéis secos CNHA, CNHAO e CNHASi observou-se uma diminuição na intensidade relativa do halo mais intenso, o desaparecimento do halo em $10,5^\circ$ (2θ) e o aparecimento de difrações em $26,2^\circ$ (002), $28,5^\circ$ (210), $31-35^\circ$ (211, 112 e 300) e 40° (310) (2θ) típicas da hidroxiapatita, conforme pode ser comparado ao difratograma da HA comercial [130]. Estes perfis de difração sugerem que nos compósitos ocorre uma desorganização intercadeias da fase CN, promovida pelos íons PO_4^{3-} e/ou pela fase de HA ou silicato formado. Em CNHAO observou-se uma maior intensidade relativa das difrações correspondentes à fase de HA, sugerindo uma maior cristalinidade desta fase,

a qual pode ter sido induzida pela presença da fase de silicato estruturado como o octaânion.

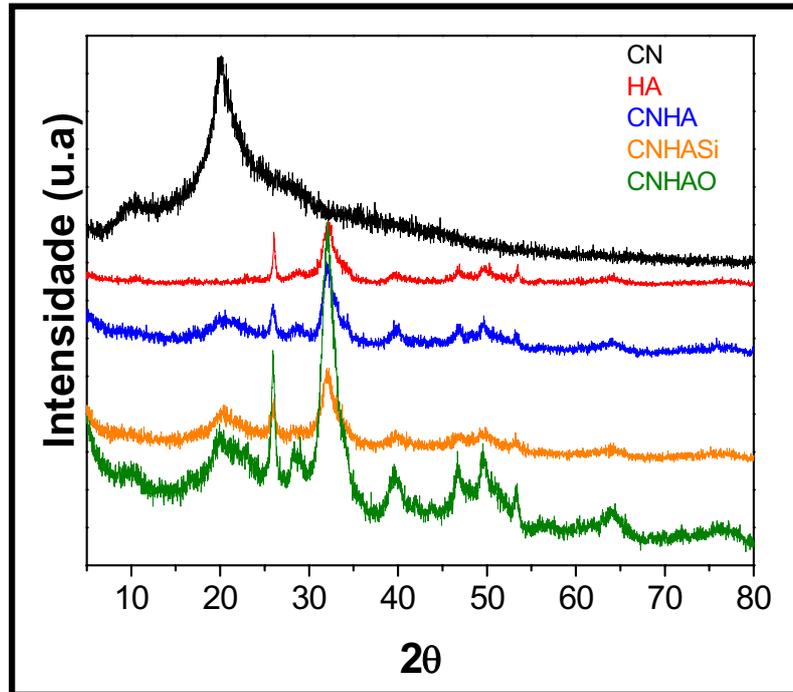


Figura 23. Difratogramas da quitosana em pó, HA comercial e dos hidrogéis secos CNHA, CNHASi e CNHAO.

4.4. Avaliação do comportamento térmico dos hidrogéis

As curvas termogravimétricas obtidas para a quitosana pó e para os hidrogéis secos CNHA, CNHAO e CNHASi encontram-se na Figura 24A, bem como as correspondentes derivadas (Figura 24B). Entre 60 e 180 °C ocorre apenas a perda de água adsorvida nos materiais analisados. Duas etapas principais de degradação são observadas para CN: de 280 a ~350°C e de ~350 a ~570 °C, a primeira correspondente à desacetilação e desaminação, ou seja, o evento localizado principalmente na cadeia lateral do polímero, e a segunda à degradação das unidades glucosídicas, com 0% de resíduo a 600 °C, correspondente à evolução de H₂O, CO₂, CH₄ e NH₃ do material [131,132]. Nos hidrogéis secos observou-se um comportamento similar até 600 °C,

quando ocorre mineralização da amostra. O resíduo a 600 °C deve corresponder a fosfato de cálcio. A porcentagem de resíduo obtido foi de 41,4 % (CNHA), 39,1 % (CNHASi) e 43,9 % (CNHAO), evidenciando uma substancial formação e retenção da fase inorgânica de HA nos hidrogéis. Os resíduos destes últimos dois hidrogéis também deve possuir uma pequena contribuição de SiO₂ e/ou SiC_xO_y, proveniente do siloxano inserido. A presença de Si nos materiais não alterou o comportamento da curva de degradação dos hidrogéis.

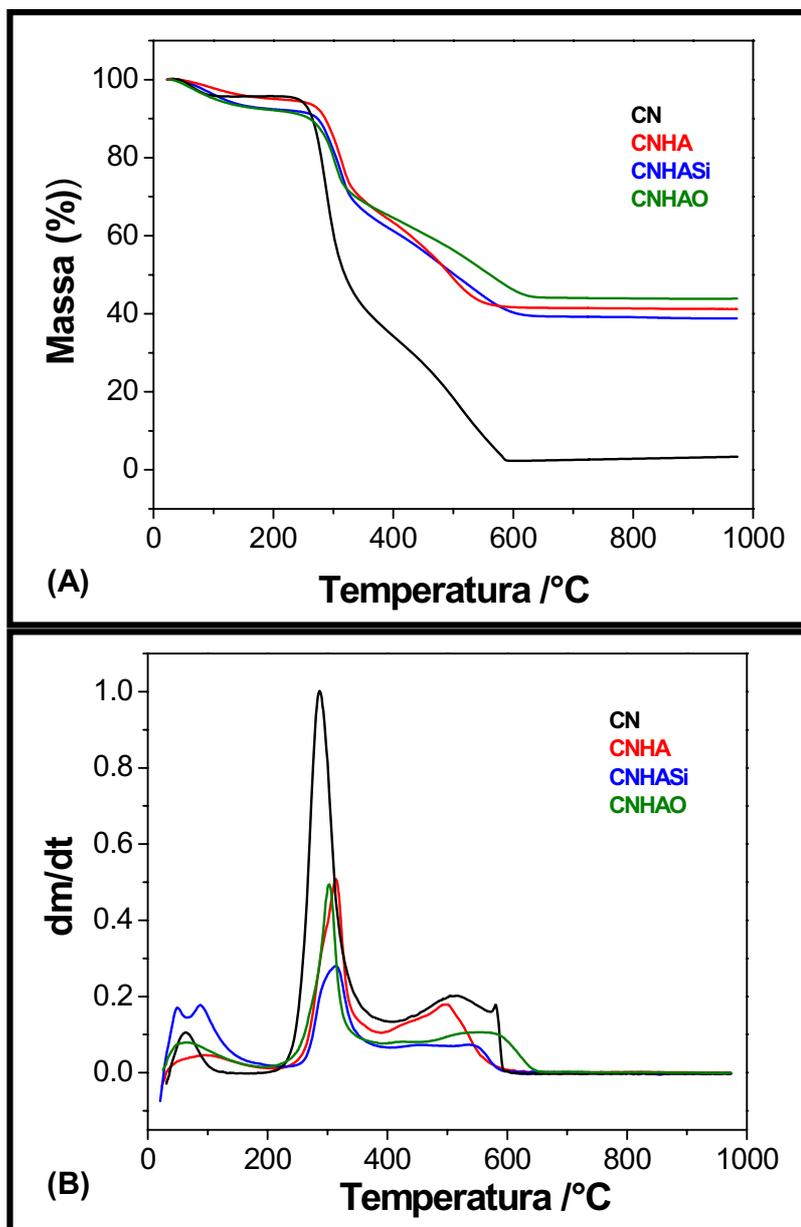


Figura 24. (A) Curvas termogravimétricas e a (B) derivada das curvas termogravimétricas para quitosana em pó, para os hidrogéis secos CNHA, CNHASi e CNHAO.

4.5. Avaliação da morfologia dos hidrogéis

Os hidrogéis obtidos apresentaram características mecânicas que permitem a sua manipulação, aceitando inclusive cortes para moldagem em outras formas

geométricas, se necessárias. Estes hidrogéis são constituídos de uma rede de cadeias de quitosana entrelaçadas com partículas de fosfato de cálcio, e silicato no caso dos hidrogéis com Si distribuídos uniformemente pela rede. A distribuição uniforme pela rede é comprovada pela igualdade das quantidades de Ca, P e Si detectadas em diferentes regiões das amostras, com exceção da amostra CNHAO do grupo 1. Nos vazios desta rede existe água.

Após a secagem dos hidrogéis em estufa de circulação de ar, observou-se uma redução do seu volume, tornando-os mais compactos pela remoção da água e pela contração promovida pela desidratação do material (Figura 25). O hidrogel CNHASi apresentou uma redução menor de volume em relação aos hidrogéis CNHA e CNHAO, o que foi associado à maior estabilidade dimensional de suas paredes, pela presença do silicato incorporado pela introdução do ácido silícico. A secagem efetuada em estufa a vácuo promoveu uma menor diminuição do volume dos hidrogéis, pela eliminação rápida da água, dificultando a coalescência dos poros, dando origem a um material com poros conectados com tamanhos adequados para crescimento celular e vascularização (poros $\sim 100 \mu\text{m}$), o que os tornam promissores para uso como *scaffolds* (Figura 25).



Figura 25. Fotografias dos hidrogéis secos CNHAO e CNHASi.

A Figura 26 mostra as micrografias eletrônica de varredura da superfície de fratura criogênica dos hidrogéis secos em estufa a vácuo CNHA, CNHAO e CNHASi. Pode se observar nas micrografias que a fase de HA mineralizada *in situ* é formada por aglomerados globulares, com baixa polidispersão de tamanhos, constituídos de partículas nanométricas, independente da presença ou não de Si, em toda a extensão dos materiais. A morfologia de CNHA se apresentou em camadas ou placas destes aglomerados (Figura 26A), enquanto que nos hidrogéis CNHASi e CNHAO ocorreu a formação de aglomerados globulares maiores recobertos pela fase orgânica, evidenciando também a presença de poros avaliada apenas visualmente (Figura 26B e 25C).

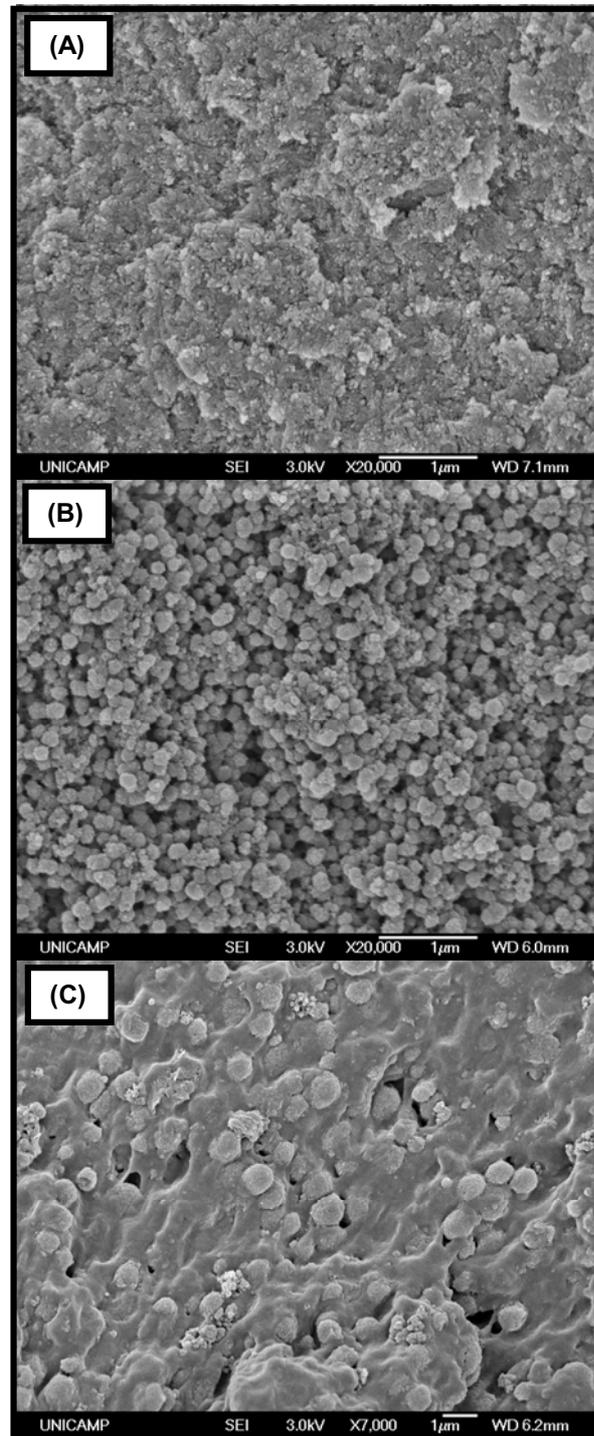


Figura 26. Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos compósitos (A) CNHA, (B) CNHASi e (C) CNHAO secos em estufa de circulação de ar.

Na Figura 27 pode se observar que os hidrogéis secos em estufa a vácuo apresentam uma estrutura mais porosa que os anteriormente mostrados, podendo ser notada uma rede de poros intercomunicantes de tamanhos polidispersos.

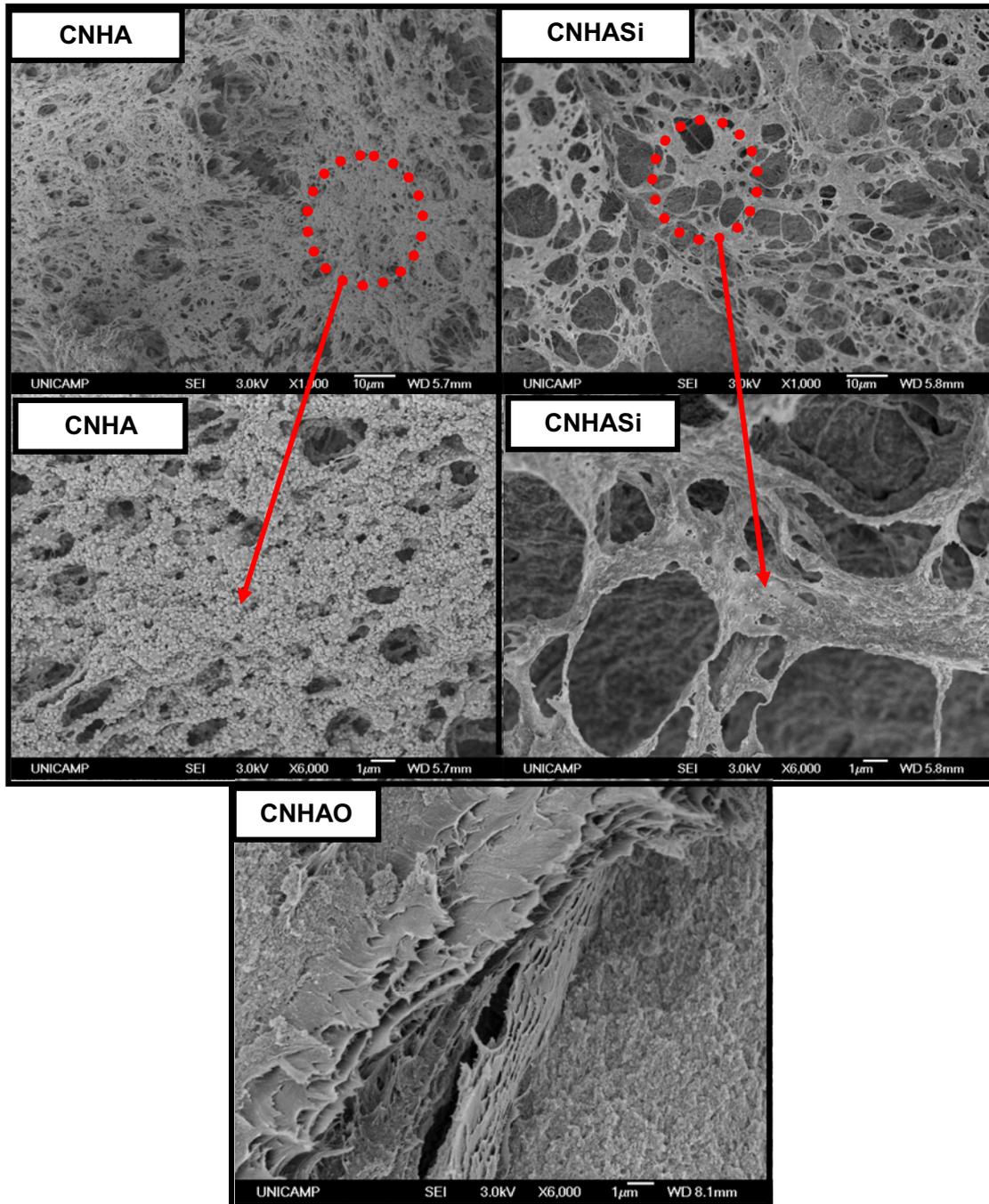


Figura 27. Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos hidrogéis secos em estufa a vácuo CNHA, CNHASi, CNHAO.

Os resultados obtidos permitiram verificar que há uma influência positiva da adição de Si nos hidrogéis de quitosana/hidroxiapatita, pois as amostras CNHAO e CNHASi não mostraram alteração no comportamento térmico quando comparado ao CNHA, e apresentaram melhores características mecânicas que CNHA, ou seja, melhor estabilidade dimensional.

4.6. Teste de bioatividade em solução de SBF

O teste *in vitro* de bioatividade, representado pela imersão do material a ser testado em SBF por períodos variados, seguida da observação da formação da HA na superfície imersa, tem sido considerado um teste preliminar para a avaliação da bioatividade de um material com potencial para regeneração óssea. A facilidade de execução e a boa correlação entre resposta positiva, neste teste simples, com as respostas positivas em testes refinados, fazem da imersão em SBF a primeira escolha para a avaliação da bioatividade de um material.

Vários pesquisadores têm descrito o uso do teste de bioatividade em diferentes materiais usando solução de SBF. Como exemplo, Araújo e colaboradores [133] avaliaram a bioatividade de um material constituído de quitosana/poli(ácido láctico)/HA em SBF, evidenciando uma excelente bioatividade, devido à nucleação de HA por toda a superfície do material, em pequenos períodos de tempo de imersão.

A comparação dos resultados da imersão em SBF para os materiais, pastilha de quitosana pura, hidrogéis CNHA, CNHASi e CNHAO são mostrados na Figura 28, a qual indica que houve uma intensa deposição de fosfato de cálcio em todos os materiais analisados. A morfologia dos depósitos é semelhante à reportada para quitosana e para compósitos de quitosana/hidroxiapatita [134,135]. Os resultados indicam que houve uma intensa nucleação de fosfato de cálcio na superfície dos materiais imersos indicando que a incorporação de Si não causou perda de biocompatibilidade quando comparado com o compósito CNHA.

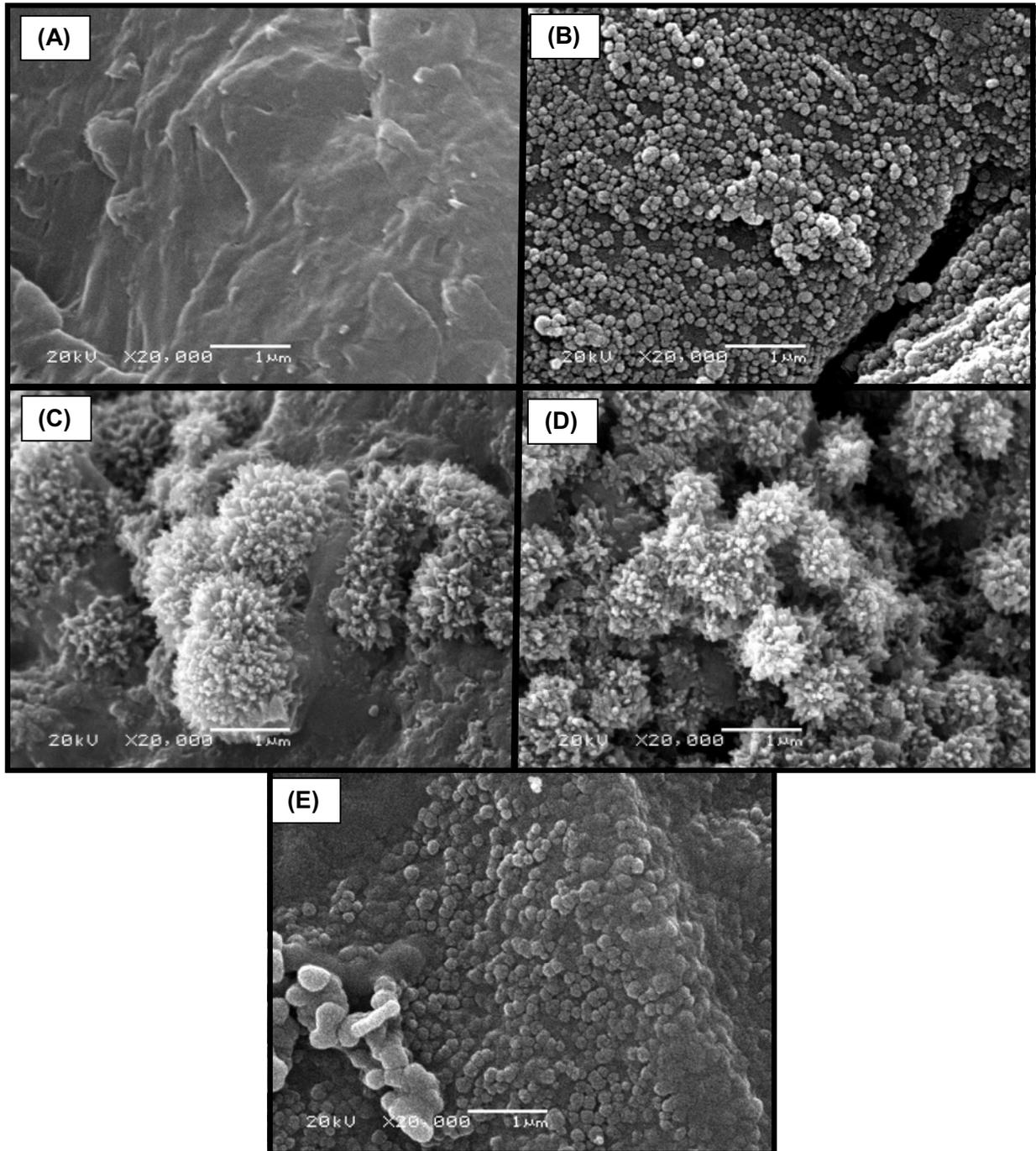


Figura 28. Micrografias eletrônica de varredura da (A) pastilhas de quitosana pura antes e (B) depois da imersão em solução de SBF por 1 semana, e dos compósitos (C) CNHA, (D) CNHASi e (E) CNHAO após serem imersos em solução de SBF por 1 semana e posteriormente secos.

4.7. Testes biológicos.

Os resultados de imersão em SBF mostrados no item 4.5 indicam que todos os materiais preparados neste trabalho apresentaram bioatividade, que pode ser um indício de biocompatibilidade dos materiais.

Porém como discutido anteriormente, o teste de imersão em SBF é um teste de avaliação preliminar de biomateriais. Testes envolvendo citotoxicidade e expressões de proteínas relacionadas à atividade celular são essenciais para a completa caracterização dos materiais como bioativos.

Neste trabalho os hidrogéis CNHA (Grupo 1 e 2), CNHASi (Grupo 2) e CNHAO (Grupo 1) foram caracterizados por testes de citotoxicidade e por expressão de proteínas. Os hidrogéis CNHA dos Grupos 1 e 2 apresentaram resultados similares, e, portanto, serão referidos apenas como CNHA nos testes biológicos realizados.

4.7.1. Teste de viabilidade celular.

Neste ensaio a viabilidade celular foi avaliada pelos resultados de citotoxicidade determinados pela redução do MTT. No ensaio as células foram cultivadas em poços de poliestireno, que foi utilizado como controle negativo, sobre hidroxiapatita comercial (HA) e sobre os hidrogéis CNHA, CNHASi e CNHAO. Os hidrogéis CNHA e CNHAO apresentaram viabilidade celular, ou seja, as células continuaram “vivas” no período analisado, enquanto que o hidrogel CNHASi apresentou toxicidade às células de pré-osteoblastos MC3T3-E1, sendo portanto, excluído de outros testes biológicos.

O resultado de toxicidade do hidrogel CNHASi pode estar associado à presença de resíduos de monômeros ou oligômeros de estireno ou divinil benzeno, da resina catiônica de estireno/divinilbenzeno sulfonado utilizada na preparação do ácido silícico.

As Figura 29A e Figura 29B ilustram os resultados da viabilidade celular nos hidrogéis CNHAO e CNHA, respectivamente, com os respectivos níveis de viabilidade celular. Os resultados encontrados para os materiais avaliados foram similares para o período de 24h. No período de 48h, o hidrogel CNHA superfície superior (S), (CNHA-S)

apresentou um maior nível de viabilidade celular. O hidrogel CNHAO-S também apresentou um bom desempenho neste período, comparado com o do controle negativo PS.

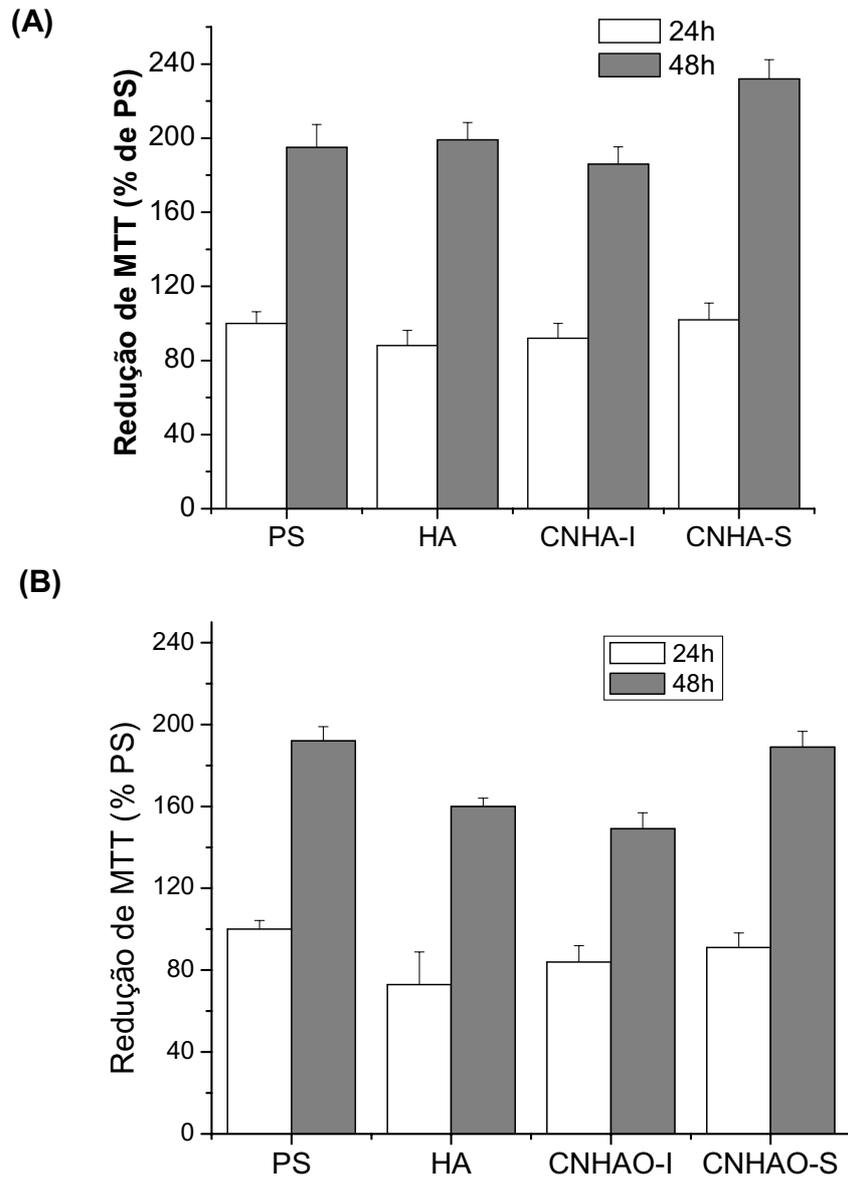


Figura 29. Análise da viabilidade celular de pre-osteoblastos crescidos sobre os hidrogéis. (A) CNHA e (B) CNHAO. PS foi considerado controle negativo. (*) $p < 0,05$.

4.7.2. Teste de adesão e proliferação celular

A importância da adesão de osteoblastos na superfície de materiais tem sido bastante destacada, porém poucos avanços na explicação desses eventos foram alcançados. Juntos, adesão e proliferação celular representam as primeiras etapas da interação célula-biomaterial e a sua eficácia influencia nas etapas posteriores de diferenciação. Sabe-se também que a superfície de fosfato de cálcio é capaz de promover a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, e que um comportamento dinâmico de adesão focal pode estar envolvido nos mecanismos moleculares promovendo diferenciação osteogênica [136].

Neste teste a adesão e proliferação celular foram avaliadas pela incorporação de cristal violeta pelas células. Foram avaliados os hidrogéis CNHA e CNHAO e os resultados mostrados nas Figura 30A e Figura 30B, respectivamente.

Os hidrogéis CNHA e CNHAO promoveram a adesão e a proliferação de osteoblastos. Observou-se que houve um aumento na adesão celular com o tempo de plaqueamento (15 minutos, 6 horas e 48 horas). Os resultados obtidos em 48 horas mostraram um aumento na taxa proliferativa das células cultivadas sobre os hidrogéis acompanhando o mesmo comportamento do controle PS. A superfície superior do hidrogel CNHA promoveu uma melhor adesão e proliferação celular que a superfície inferior, provavelmente devido à topografia do material oferecer uma maior área superficial e, conseqüentemente, permitir uma maior proliferação de células. A adesão celular em CNHAO-S foi similar, dentro do desvio da medida, à adesão observada na superfície inferior (CNHA-I).

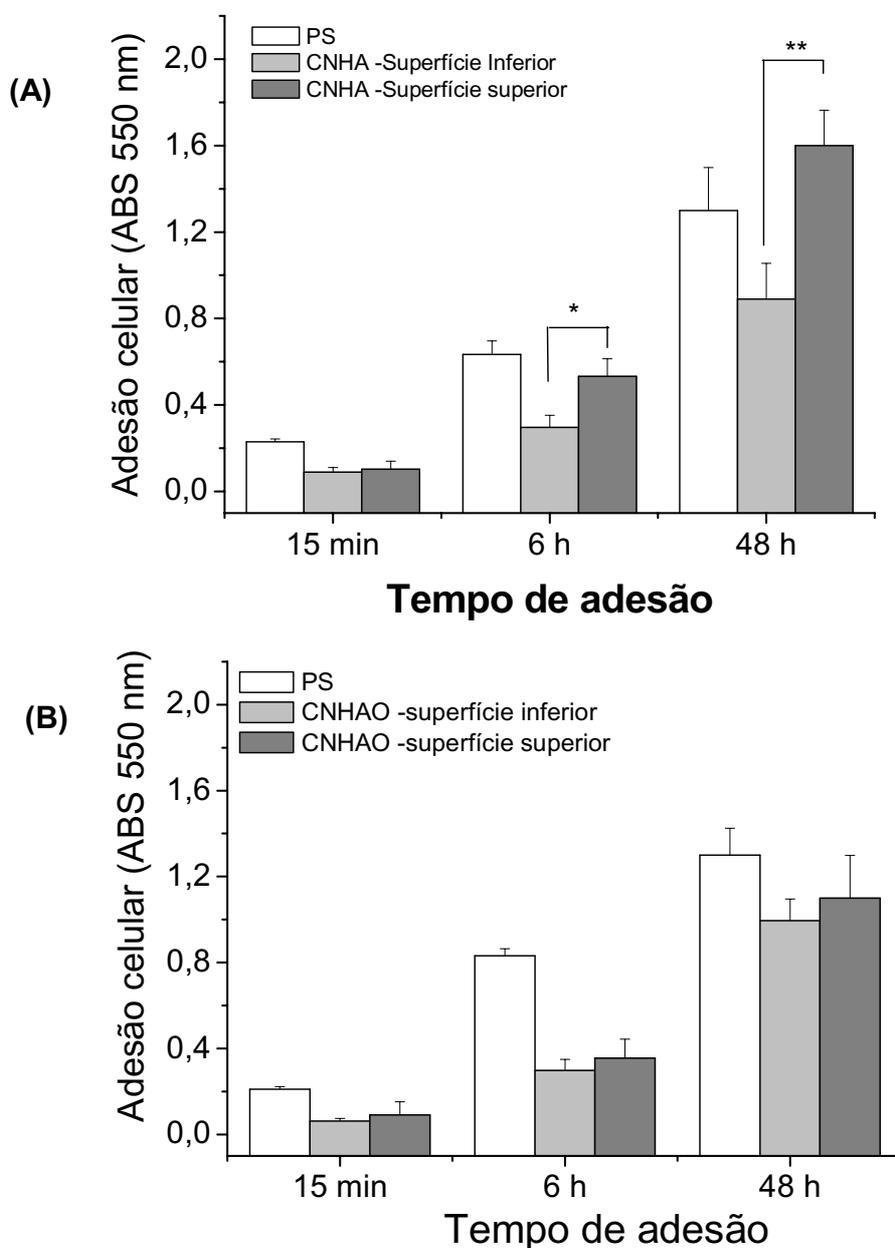


Figura 30. Níveis de adesão e proliferação celular. (A) CNHA e (B) CNHAO. O gráfico representa qualitativamente a quantidade de células aderidas pela incorporação do cristal violeta. Tempos de plaqueamento: 15 minutos, 6 horas e 48 horas de cultivo celular; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. PS foi considerado como grupo controle negativo.

Kong e colaboradores [137] também descreveram a influência da composição, morfologia e topografia de *scaffolds* de quitosana com nanopartículas de HA na adesão, proliferação e diferenciação celular pelo método de cultura de pré-osteoblastos. Eles sugeriram que materiais com nanopartículas de HA uniformemente distribuídas promovem maior nucleação de HA em soluções de SBF, resultando em uma maior bioatividade. A avaliação dos *scaffolds* compósitos como biomaterial foi feita também pela adesão e proliferação celular de pré-osteoblastos, o qual mostrou que o aumento da área superficial promovida pela deposição de nanopartículas de HA sobre a superfície do compósito aumenta a adesão e proliferação celular quando comparado a *scaffolds* de quitosana pura, resultando num material biocompatível com grande potencial para engenharia de tecido ósseo.

Como o melhor resultado de adesão e proliferação de osteoblastos foi obtido com o hidrogel CNHA, particularmente em sua face superior, os demais ensaios biológicos foram efetuados apenas neste hidrogel.

4.7.3. Teste de expressão e níveis de fosforilação de proteínas

A viabilidade celular no hidrogel CNHA foi verificada pela expressão de proteínas relacionadas com vias de transdução de sinal, que são relacionadas com a sobrevivência celular, como foi o caso de proteína Akt (Figura 31A) e de proteínas Erk (Figura 31B). Ambas as proteínas foram expressas e estavam ativas em células crescidas sobre o CNHA. No caso da proteína Akt, a melhor expressão e atividade foram observadas para CNHA-S, ou seja, para a superfície superior, a qual foi similar ao controle negativo PS. Por outro lado, para a família da proteína Erk, analisando p44 e p42, também relacionadas ao ciclo celular, o melhor resultado ocorreu na face inferior, CNHA-I, para Erk(p44), embora a superfície superior também tenha apresentado expressão e atividade de proteína superior ao controle negativo de PS. Além disso, a expressão de Erk(p44) foi maior que Erk(p42), em ambas as superfícies do hidrogel.

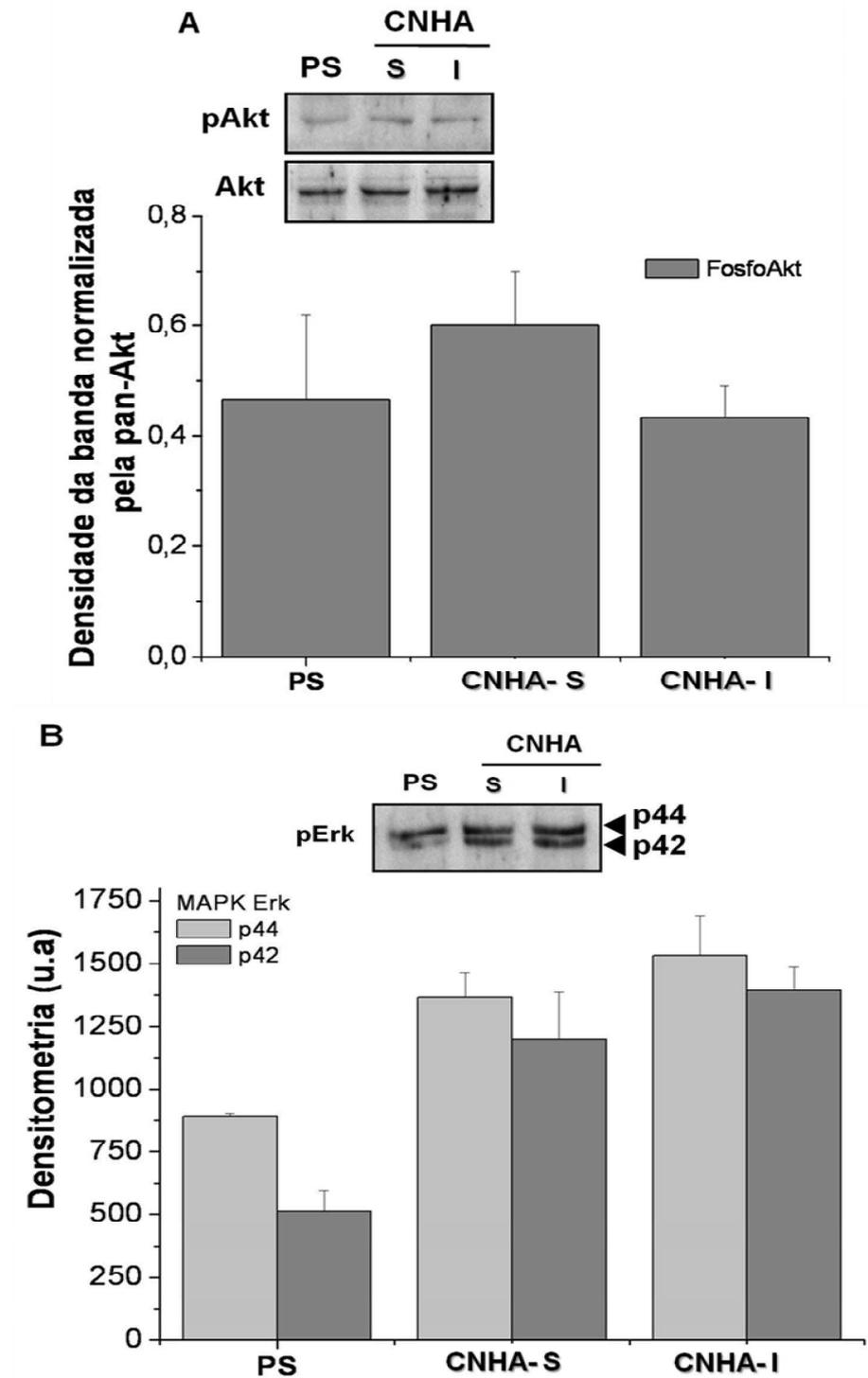


Figura 31. Expressão de proteínas relacionadas com a sobrevivência e viabilidade celular: A) Akt e B) Erk. PS foi considerado como controle negativo. Os gráficos representam a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*.

Outro teste biológico realizado no hidrogel CNHA relacionado à adesão celular foi a avaliação das proteínas fosforiladas relacionadas com pontos de adesão focal, como Src (Y416) e FAK (Y397), conforme os resultados apresentados na Figura 32. FAK são proteínas dinâmicas associadas com o citoesqueleto que dão forma às células, bem como promovem a adesão das mesmas à matriz extracelular. Por outro lado, Src é uma família de proteínas tirosina quinase, que tem função de ponte entre matriz extracelular e a matriz intracelular, com grande importância em diversos processos celulares. Em ambas as superfícies do hidrogel CNHA, foi observada a fosforilação das proteínas de forma superior ao controle PS.

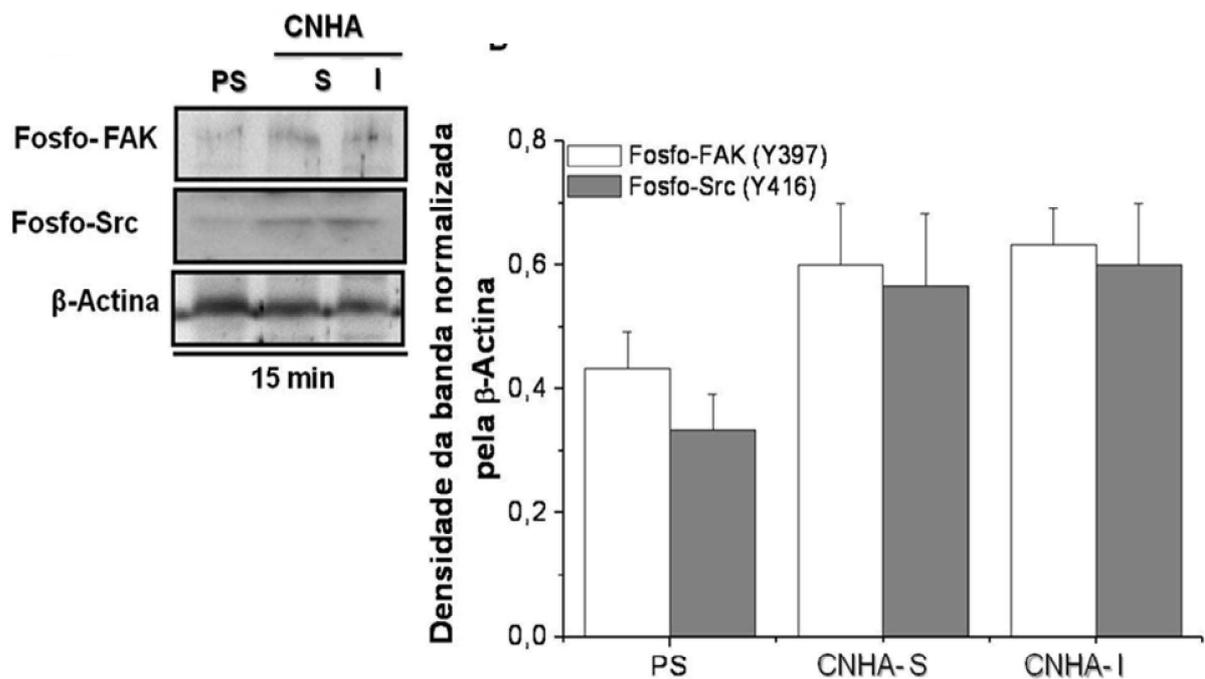


Figura 32. Expressão de proteínas relacionadas com a adesão celular e o gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*. PS foi considerado como grupo controle negativo.

As proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular também foram avaliadas por ensaios de *immunoblotting*, os quais mostraram que CNHA-S promoveu,

de um modo geral, um aumento da expressão das proteínas cdk4, cdk6, ciclinaD1 e ciclinaD3, comparado ao controle PS (Figura 33). Apenas para a proteína ciclina D1, o resultado foi mais expresso na superfície inferior do hidrogel (CNHA-I).

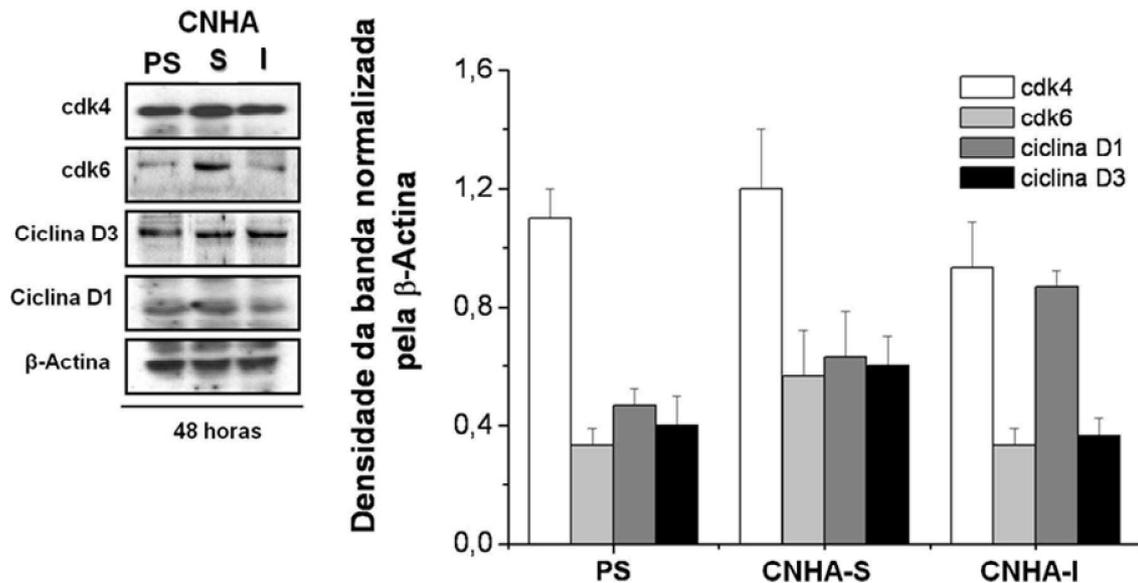


Figura 33. Expressão de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular e o gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*. PS foi considerado como grupo controle negativo.

4.7.4. Teste de diferenciação celular

Após avaliar os processos de adesão e proliferação, a diferenciação celular é uma etapa muito importante entre os eventos celulares. Assim, a capacidade de estimular a diferenciação de osteoblastos sobre CNHA foi identificada pela dosagem da atividade de fosfatase alcalina (ALP), um bem aceito biomarcador na avaliação da diferenciação de osteoblastos. A ALP é uma proteína relacionada ao mecanismo de mineralização de ossos, conhecida desde 1920. Essa proteína está relacionada à fase inicial do processo de mineralização do tecido ósseo [138].

A Figura 34 mostra a atividade da ALP determinada para cultura de células com tempos de 3, 7 e 14 dias. Os resultados mostraram que a atividade celular aumenta

com o tempo de cultura. O hidrogel CNHA favoreceu a atividade da ALP, ou seja, a atividade dos osteoblastos. Para a cultura de 14 dias o CNHA-I apresentou um resultado similar ao controle PS, enquanto que para o CNHA-S ele foi significativamente maior. Estes resultados sugerem que a proteína relacionada à progressão do ciclo celular foi específica e sinalizou de forma mais intensa a adesão de pré-osteoblastos na superfície superior de CNHA no período de 14 dias [136].

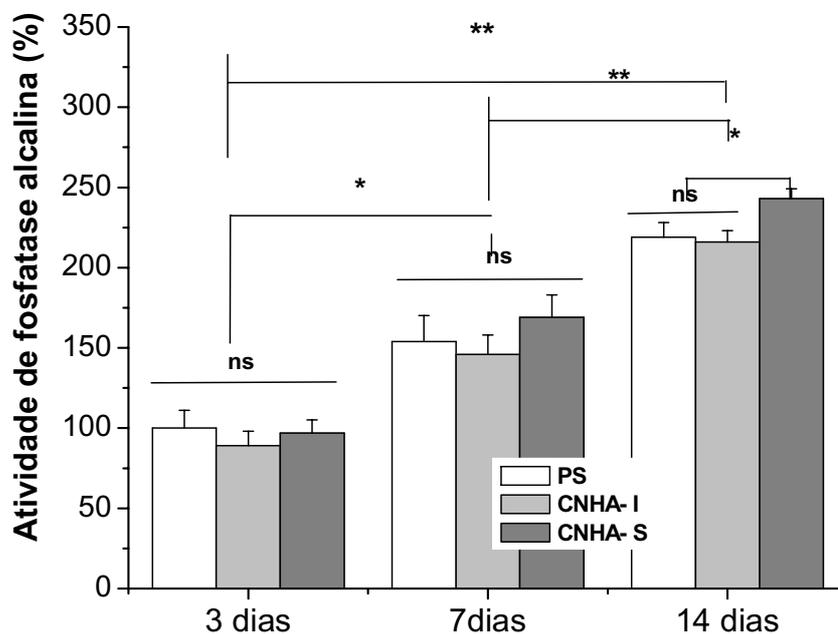


Figura 34. Análise da atividade de fosfatase alcalina de pre-osteoblastos cultivados sobre os diferentes materiais. PS foi considerado como grupo controle negativo. (ns) sem diferença estatística; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Resultados similares aos obtidos neste trabalho, relacionados à viabilidade celular, foram descritos por Xu e colaboradores [139], os quais avaliaram a biocompatibilidade de *scaffold* compósito preparado pela mistura mecânica de quitosana e cimento de fosfato de cálcio CPC [fosfato de tetracálcio (TTCP) e fosfato de dicálcio anidro (DCPA)]. Os resultados obtidos para o compósito CPC-quitosana mostraram viabilidade e adesão celular similar ao CPC, indicando que o compósito é

biocompatível e que a presença da quitosana melhorou as propriedades mecânicas do material, a adesão e a proliferação de células de osteoblastos, bem como a formação de poros permitindo a migração de células pelo material. A presença da quitosana no compósito CPC-quitosana aumentou de forma relevante o nível da enzima ALP, comparada ao CPC puro [140].

Membranas de quitosana com diferentes quantidades de nanopartículas de HA avaliada em trabalho de Teng e colaboradores [141] também apresentaram viabilidade celular, alta adesão e proliferação celular, além de alto nível de expressão de ALP, indicando a diferenciação de células de osteoblastos.

Comparando-se os vários compósitos de fosfatos de cálcio/quitosana preparados nesta Tese de Doutorado, a proposta desenvolvida neste projeto levou à obtenção de dois hidrogéis, CNHA e CNHAO, biocompatíveis e com características desejáveis para substituição/regeneração de tecidos ósseos e, portanto, com grande potencial na engenharia de tecido. Na classificação apresentada inicialmente de biomaterial, os hidrogéis CNHA e CNHAO podem ser classificados como “biomaterial aloplástico e bioativo”.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo foram preparados biomateriais aloplásticos e bioativos na forma de hidrogéis porosos à base de quitosana e hidroxiapatita, contendo ou não Si. Estes mostraram excelentes características mecânicas e biocompatibilidade favoráveis para o seu emprego como biomateriais, incluindo a topografia e a morfologia, com potencial para engenharia de tecido ósseo, especialmente para o preenchimento ósseo. O hidrogel CNHASi, também com características biocompatíveis, apresentou propriedades físico-químicas e morfológicas adequadas para biomaterial, entretanto mostrou-se citotóxico. CNHA e CNHAO não apresentaram toxicidade celular *in vitro*. Neste último, a introdução de Si (como silicato) favoreceu a cristalização da hidroxiapatita.

Os hidrogéis CNHA e CNHAO apresentaram um comportamento similar frente à viabilidade celular, e os melhores resultados foram obtidos para a superfície superior, provavelmente devido à maior área superficial. A adesão e a proliferação de células foram observadas nas superfícies superior e inferior destes hidrogéis, sendo mais significativa para a superfície superior destes. Além dessas informações, pôde-se avaliar também a capacidade de diferenciação celular do CNHA pela dosagem da atividade de fosfatase alcalina, a qual mostrou que após 14 dias o resultado da superfície inferior foi similar ao PS. A superfície superior do CNHA apresentou melhor desempenho na diferenciação celular.

O conjunto de resultados obtidos neste estudo permite sugerir que os hidrogéis de quitosana/hidroxiapatita, com ou sem Si, apresentam grande potencialidade para aplicações em engenharia de tecido ósseo, necessitando ainda de testes *in vivo* para uma completa avaliação de sua biocompatibilidade com organismos vivos.

6. PROPOSTA FUTURA

Realização dos testes *in vivo* nos hidrogéis CNHA e CNHAO para uma melhor avaliação da biocompatibilidade com organismos vivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials Selection**, In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, Part A, 1, 27-59 (1995)
- 2 RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, Second edition (2004)
- 3 WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials**, New York, Elsevier, 72 (1987)
- 4 ROGERO, S. O.; MALMONGE, S. M.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; MIYAMARU, L.; CRUZ, A. S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials, **Artificial Organs**, 27, 5, 424-427 (2003)
- 5 WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility, **Biomaterials**, 29, 2941-2953 (2008)
- 6 ALMEIDA FILHO, E.; ASSIS, C. M.; VERCÍK, L. O.; GUASTALDI, A. C. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica, **Química Nova**, 30, 5, 1- 10 (2007)
- 7 TAGA, E. M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, 11 (1996)
- 8 KAYAIGA, R.; MILLER, W. V.; GUDINO, M. D. L. Tissue transplant transmitted infections. **Transfusion**, 31, 277-284 (1991)
- 9 STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering, Review, **Materials today**, 5, 11, 18-25 (2008)
- 10 BENKE, D.; OLAH, A. E.; MOHLER, H. Protein chemical analysis of Bio-oss bone substitute and evidence on its carbonated content. **Biomaterials**; 22;1005-12 (2001)
- 11 HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**, World Scientific Publishing Company (1993)
- 12 CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Biomedical surface science: Foundations to frontiers, **Surface Science**, 500, 28-60 (2002)
- 13 CAO, W.; HENCH, L.L. Bioactive materials, **Ceramics International**, 22, 6, 493-507 (1996)
- 14 RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics-Materials, Properties and Applications**. Chapman & Hall, 422 (1992)
- 15 HENCH, L. L. Bioceramics: From concept to clinic. **Journal American Ceramic Society**. 74, 1487-1510 (1991)
- 16 SOARES, G. A. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Biomateriais**, http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10_biomateriais.pdf, Rio de Janeiro (2005), acesso em 19 de abril de 2010

- 17 KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar– **Química Nova**, 23, 4, 518-522 (2000)
- 18 ALBEE, F. H.; MORRISON, H. F. Studies in bone growth: triplecalcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Annals of Surgery**. 71, 32-36 (1920)
- 19 MONROE, Z. A.; VOTAWA, W.; BASS, M. C.; MULLER, J. – **Journal of Dental Research**, 50, 860-2 (1971)
- 20 LEVITT, G. E.; CRAYTON, P. H.; MONROE, E. A.; CONDRATE, R. A. Forming methods for apatite prosthesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, 3, 2, 683-685 (1969)
- 21 PONOMAREVA, N. I.; POPRYGINA, T. D.; KARPOV, S. I.; LESOVOI M. V.; AGAPOV, B. L. Microemulsion method for producing hydroxyapatite, **Russian Journal of General Chemistry**, 80, 5, 905-908 (2010)
- 22 KAWAI, T.; FUJISAWA, N.; SUZUKI I. Control of setting behavior of calcium phosphate paste using gelatinized starch. **Journal of the Ceramic Society of Japan**. 118, 1378, 421-424 (2010)
- 23 YOKOI, T.; KATO, H.; KAMITAKAHARA, M. Formation of octacalcium phosphate with incorporated succinic acid through gel-mediated processing, **Journal of the Ceramic Society of Japan**, 118, 1378, 491-497 (2010)
- 24 Makarov, C.; Gotman, I.; Jiang, X. In situ synthesis of calcium phosphate-polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions, **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, 21, 6, 1771-1779 (2010)
- 25 FATIMI, A.; TASSIN, J. F.; AXELOS, M. A. V.; WEISS, P. The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, 21, 6, 1799-1809 (2010)
- 26 PARK, J. B. – **Biomaterials Science and Engineering**, Plenum Press/New York and London (1990)
- 27 PARK, J. B. – **In Biomaterials An Introduction**; Plenum Press/New York (1980)
- 28 AOKI, H. – **Transactions JWRI**, 17, 107 (1988)
- 29 MATHEWS, F. L.; RAWLING, R. D.; **Composite Materials: Engineering and Science**; Chapman & Hall: London (1994)
- 30 PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial, **Biomaterials**, 20, 1-25 (1999)
- 31 LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical application of Collagen, **International Journal of Pharmaceutics**, 221, 1-22 (2001)
- 32 PAVILIDOU, S.; PAPASPYRIDES, C. D. Nanocompósitos de PVC com Argila Organicamente Modificada: Efeitos do Processamento e do Método de Incorporação da Argila. **Progress in Polymer Science**, 28, 1539 (2008)

- 33 ALVES, N. M.; LEONOR, I. B.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Designing biomaterials based on biomineralization of bone, **Journal of Materials Chemistry**, 20, 2911-2921 (2010)
- 34 BALASUNDARAM, G.; WEBSTER, T. J. An overview of nano-polymers for orthopedic applications, **Macromolecular Bioscience**, 7, 635-642 (2007)
- 35 ALMQVIST, N.; THOMSON, N. H.; SMITH, B. L.; STUCKY, G. D.; MORSE, D. E.; HANSMA, P. K. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science and Engineering**, 7, 37-43 (1999)
- 36 ZHANG, X.; LIU, C.; WU, W.; WANG, J. Evaporation self-assembly of organic-inorganic ordered nanocomposite thin films that mimic nacre. **Materials Letters**. 60, 2086-2089 (2006)
- 37 AVNIR, D.; CORADIN, T. LEV, O.; LIVAGE, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**. 16, 1013-1030 (2006)
- 38 ZHANG, F.; WANG, J.; HOU, Z.; YU, M.; XIE, L. Study of growth of calcium carbonate crystals on chitosan film. **Materials and Design**, 27, 422-426 (2006)
- 39 TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage, **Biomaterials**, 21, 431-440 (2000)
- 40 SIMÕES, C. M. O.; CARVALHO, J. G.; MORAIS, M. B. M. **Osteoporose - Composição corporal óssea**, www.saudeemmovimento.com.br, 03 de fevereiro de 2010
- 41 ZAMBUZZI, W. F.; Mecanismo de transdução de sinal envolvidos com a diferenciação de osteoblastos e osteócitos, Tese de doutorado, Instituto de Química da Unicamp (2008)
- 42 LEITÃO, G. M. **Osteopontina como marcador de resposta à radioterapia e quimioterapia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado**, Tese de doutorado, Faculdade de Medicina USP (2008)
- 43 KAFLAK, A.; CHMIELEWSKI, D.; GÓRECKI, A.; SLOSARCZYK, A.; KOŁODZIEJSKI, W. Efficiency of $1\text{H} \rightarrow 31\text{P}$ NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, 29, 345-348 (2006)
- 44 CARLISLE, E. M. Silicon: A Possible factor in bone calcification, **Science**, 167, 279, (1970)
- 45 PÉREZ-GRANADOS, A. M.; VAQUERO, M. P. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: Essentiality human health implications, **The Journal of Nutrition, Health & aging**. 6, 2 (2002)
- 46 PORTER, A. E. Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodeling processes at the bone-implant interface. **Biomaterials**, 25, 3303-3314 (2004)
- 47 NING, R. Y. Discussion of silica speciation, fouling, control and maximum reduction. **Desalination**, 151, 67-73 (2002)

- 48 BISSÉ, E.; EPTING, T.; BEIL, A.; LINDINGER, G.; LANG, H. HEINRICH WIELAND. Reference values for serum silicon in adults, **Analytical Biochemistry** 337, 130–135, (2005)
- 49 NIELSEN, F. H.; Ultratrace elements of possible importance for human health: an update, **Nutritional**, 380, 355-376 (1993)
- 50 EHRLICH, H.; KRAJEWSKA, B.; HANKE, T.; BORN, R.; HEINEMANN, S.; KNIEB, C.; WORCH, H. Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system. **Journal of Membrane Science** 273, 124-128 (2006)
- 51 KHOR , E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan, **Biomaterials**, 24, 2339–2349 (2003)
- 52 KHOR, E. **Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise**. First edition, Elsevier Applied Science, capítulo 1, 1-8 (2001)
- 53 PERCOT, A.; VILTON, C.; DOMARD, A. Optimization of Chitin Extraction from shrimp shells, **Biomacromolecules**, 4, 12-18 (2003)
- 54 MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. **Journal of Molecular Biology**, 120, 2, 167-181 (1978)
- 55 GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of structure of beta-chitin, **Biopolymers**, 14, 1581 (1975)
- 56 MUZZARELLI, R. A. A.; **Chitin**, Pergamon, Oxford, 380 (1997)
- 57 HAMDINE, M.; HEUZEY, M-C.; BÉGIN, A. Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. **International journal of Biological Macromolecules**. 37, 134-142 (2005)
- 58 RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, 40, 7029-7032 (1999)
- 59 RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium, **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, 5, 267-276 (1999)
- 60 KURITA, K.; KAMIYA, M.; NISHIMURA, S-I. Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial *N*-Acetylation of chitosan to develop solubility. **Carbohydrate Polymers**, 16, 83-92 (1991)
- 61 CHEN, R. H.; LIN, W. C.; LIN, J.H. Effects of pH, ionic-strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions. **Acta Polymerica**, 45, 41-46 (1994)
- 62 SHAMOV, M. V.; BRATSKAYA, S. Y.; AVRAMENKO, V. A. Interaction of carboxylic acids with chitosan: effect of pK and hydrocarbon chain length. **Journal of Colloid and Interface Science**. 249, 316-321 (2002)

- 63 LIU, Y-L.; SU, Y-H.; LAI, J-Y. Insitu crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hybrid membranes with using γ -glycidocypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. **Polymer**, 45, 6831-6837 (2004)
- 64 RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications, **Reactive & Functional Polymer**, 46, 1-27 (2000)
- 65 ZHOU, G.; LI, Y.; ZHANG, L.; ZUO, Y.; JANSEN, J. A. Preparation and characterization of nano-hidroxyapatite/chitosan/konjac glucomannan composite. **Journal Biomedical Materials Research 83A**, 931-939 (2007)
- 66 DAVIDENKO, N.; CARRODEGUAS, R. G.; PENICHE, C.; SOLÍS, Y.; CAMERON, R. E. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals, **Acta Biomaterialia**, 6, 466–476 (2010)
- 67 VARMA, H. K.; YOKOGAWA, Y.; ESPINOSA, F. F.; KAWAMOTO, Y.; NISHIZAWA, K.; NAGATA, F. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. **Biomaterials**, 20, 879–84 (1999)
- 68 YAMAGUCHI, I.; TOKUCHI, K.; FUKUZAKI, H.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; MONMA, H.; Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. **Journal Biomedical of Materials Research**, 55, 1, 20–7 (2001)
- 69 CHANG, M.C.; KO, C. C.; DOUGLAS, W. H. Preparation of hydroxyapatite–gelatine nanocomposites. **Biomaterials**, 24 17, 2853–62 (2003)
- 70 BEPPU, M.; SANTANA, C. C. In vitro mineralization of chitosan. **Key Engineering Materials**, 192–195, 31–4 (2001)
- 71 HU, Q. L.; LI, B. Q.; WANG, M.; SHEN, J. C. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. **Biomaterials**, 25, 5, 779–85 (2004)
- 72 DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, 26, 5983-5990 (2005)
- 73 ITO, M.; SHIOJIRI, N. Osteoinduction substance, method of manufacturing the same, and a bone filling material including the same, **EP0754466B1**
- 74 KATTI, K.; VERMA, D.; KATTI, D. R. Composites and methods of preparation and use thereof, **WO 2008/063791 A2**
- 75 GOWER, L. B.; OLSZTA, M. J.; DOUGLAS, E. P.; MUNISAMY, S.; WHEELER, D. L.; GOWER, L.; OLSZTA, M.; DOUGLAS, E.; WHEELER, D.; Organic/inorganic composite useful for treating a bone defect comprises an organic fluid-swellable, fibrous matrix and an inorganic mineral phase deposited on matrix, and aligned along long axis of each fiber of matrix, **WO2005081699-A2**; **EP1744793-A2**; **WO2005081699-A3**
- 76 CHIANG, H.; JIANG, C.; LIAO, C.; LIN, Y.; Multi-layered implant, which is bone implant, prepared by a method of tissue repair comprising providing multi-layered matrix,

- seeding cell block into hollow cavity of matrix and implanting matrix into defect site, useful for tissue repair, **US2009210057-A1**
- 77 RIMAN R, SEVER C, Preparation of nanoscale hydroxyapatite particles for composite material used in article including intervertebral dowels, involves combining calcium ion source, which is water soluble under ambient conditions, and tribasic phosphate salt, **WO2009088519-A1**
- 78 KATTI D R, KATTI K S; Composite, useful for e.g. treating a patient having damaged bone by injury or disease, where the damaged bone is a portion of a joint, and in bone tissue engineering, comprises chitosan, montmorillonite and hydroxyapatite, **US2009169524-A1**
- 79 SLAUGHTER, B. V.; KHURSHID, S. S.; FISHER, O. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; PEPPAS, N. A. Hydrogels in regenerative medicine, **Advanced Materials**, 21, 3307-3329 (2009)
- 80 ELLIOTT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**, Amsterdam, 389p. (1994)
- 81 DOROZHKIN, S. V. Bioceramics based on calcium orthophosphates (Review). **Glass and Ceramics**, 12, 26-31, (2007)
- 82 LYNN, A. K.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M.; BROOKS, R. A.; RUSHTON, N.; BONFIELD, W. Phase mapping: a novel design approach for the production of calcium phosphate-collagen biocomposites. **KEY ENGINEERING MATERIALS**, 254-256, 593-596 (2004)
- 83 KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo*. **Biomaterials**, 22, 1705-1711 (2001)
- 84 FERREIRA, A.; OLIVEIRA, C.; ROCHA, F. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dihydrate. **Journal of crystal growth**, 252, 599-611 (2003)
- 85 KUMAR, R. R.; WANG, M. Growth of Brushite Crystals in Sodium Silicate Gel and Their Characterization. **KEY ENGINEERING MATERIALS**. 192-1, 19-22 (2000)
- 86 EANES, E.D. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues, **Progress in Crystal Growth and Characterization**, 3, 1, 3-15 (1980)
- 87 VAZ, G. J. O. **Propriedades de biorâmicas porosas de fosfatos de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética**. Tese de Doutorado, REDEMAT, Novembro (2007)
- 88 FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W., Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 3, 299-305 (1992)
- 89 LIU, DEAN-MO, Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. **Journal of materials science: materials in medicine**, 8,227-232 (1997)

- 90 STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Review, Materials and Biology, SCIENCE**, 310, 1135-1138 (2005)
- 91 AUSTIN, K.; Scaffold design: Use of chitosan in cartilage tissue engineering, **MMG 445 Basic Biotechnology**, 3, 62 (2007)
- 92 LU, Y.; ZHU, A.; WANG, W.; SHI, H. New bioactive hybrid material of nano-hydroxyapatite based on N-carboxylchitosan for bone tissue engineering. **Applied Surface Science, Article in Press** (2010)
- 93 CHENG, X.; LI, Y.; ZHANG, Y. LI, J.; WANG, H. Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, **Materials Science and Engineering C**, 29, 29-35 (2009)
- 94 ZHANG, Y.; NI, M.; ZHANG, M.; RATNER B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Tissue Engineering**, 9, 2 (2003)
- 95 KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3, 3, 303-311 (2000)
- 96 LI, J.; ZHONG, Y.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Chitosan conduit for peripheral nerve regeneration. **Tsinghua Science and Technology – Digital Periodical**, 4, 3, 1515-1518 (1999)
- 97 LIMA, A. M. F. **Matrizes porosas de quitosana**. São Carlos: IQ, USP. Dissertação de mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo, 75 (2002)
- 98 MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, 22, 331-336 (2001)
- 99 MI, F-L.; SHYU, S-S.; WU, Y-B.; LEE, S-T.; SHYONG, J-Y., HUANG, R-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, 22, 165-173 (2001)
- 100 RISBUD, M.; HARDIKAR, A.; BHONDE, R. Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: Implications for wound management? **Journal of Bioscience**, 25, 1, 25-31(2000)
- 101 TMIHATA, K.; IKADA, Y.; *In vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, 18, 7, 567-575 (1997)
- 102 KOKUBO, T., TAKADAMA, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, **Biomaterials**, 27, 2907-2915 (2006)
- 103 RESENDE, C. X.; PLATT, G. M.; BASTOS, I. N.; SOARES, G. D. A. Estudo teórico e experimental da Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB). **Matéria** 12, 2 (2007)
- 104 SANTOS JR., A. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico**. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 150 (2001)

- 105 ROGERO, S. O; MALMONGE, S. M.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; MIYAMARU, L.; CRUZ, A. S. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials, **Artificial Organs**, 27, 5 (2003)
- 106 ROGERO, S. O; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs, **Toxicology in Vitro**, 14, 497-504 (2000)
- 107 BLACK, J. **Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility**, Marcel Dekker, New York, 463 (1992)
- 108 FRESHNEY, R.I. **Animal cell culture – A practical approach**, IRL Press, 329 (1989)
- 109 CIAPETTI G, GRANCHI D, VERRI E, SAVARINO L, CAVEDAGNA D, PIZZOFERRATO A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials, **Biomaterials**, 17, 13, 1259-1264 (1996)
- 110 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 1-2, 55–63 (1983).
- 111 CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, 22, 261-268 (2001)
- 112 HU, S-J.; FERNADEZ, R. e JONES, J.W. Cyclosporine A stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells and enhances monocyte adhesion to vascular smooth muscle cells. **Transplantation Proceedings**, 31, 663-665 (1999)
- 113 MILLER, R. R. e MCDEVITT, C.A. A quantitative microwell assay for chondrocyte cell adhesion. **Analytical Biochemistry**, 192, 380-383 (1991)
- 114 MORI, T.; OKUMURA, M.; MATSUURA, M.; UENO, K.; TOKURA, S.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S. e FUJINAGA, T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, 18, 13, 947-951 (1997)
- 115 PRASITSILP, M.; JENWITHISUK, R.; KONGSUWAN, K.; DAMRONGCHAI, N. e WATTS, P. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. **Journal of Materials Science - Materials in Medicine**, 11, 773-778 (2000)
- 116 RISBUD, M.; HARDIKAR, A. e BHONDE, R. Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: Implications for wound management? **Journal of Bioscience**, 25, 1, 25-31 (2000)
- 117 ZABALA, A.; MARTÍN, R.; HAZA, A.; FERNÁNDEZ, L.; MORALES, P. e RODRÍGUEZ, J.M. Inhibition of the proliferation of myeloma cells by the meta origin strain *Enterococcus faecium* CH₃. **Meat Science**, 59, 79-85 (2001)
- 118 SILVA, N. T. **Síntese, caracterização e cinética de cristalização de pós precursores de cordierita por sol-gel coloidal sob ação de ácido cítrico**. Tese de Doutorado, Instituto de química, Unicamp, 27-28 (2003)

- 119 HASEGAWA, I., ISHIDA, M., MOTOJIMA, S., Synthesis of silylated derivatives of the cubic octameric silicate species $\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{O}^-)_8$. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, 24, 1099-1110 (1994)
- 120 HASEGAWA, I.; KURODA, K.; KATO, C. BULL., The effect of tetraalkylammonium ions on the distribution of the silicate anions in aqueous-solutions. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 59, 2279-2283 (1986)
- 121 **Puriquima**, <http://www.puriquima.com.br/estrutura.htm>, Rua Aldeia Vinte de Setembro, 18 - Vila Guilherme, São Paulo – SP
- 122 ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process, **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, 1, 233-238 (1990)
123. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. I., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent, **The Journal of Biological Chemistry**. 193, 265 - 275 (1951)
- 124 CIANCAGLINI, P.; PIZAURO M. J.; LEONE, A. F. Mechanism of action of cobalt ions on rat osseous plate alkaline-phosphatase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 60, 3, 155-162 (1995)
- 125 BALAS, F.; PEREZ-PARIENTE, J.; VALLET-REGI, M. In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. **Journal of Biomedical Materials Research**, 66A, 364-375 (2002)
- 126 VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues, **Progress in Solid State Chemistry**, 32, 1-2, 1-31 (2004)
- 127 ELLIOTT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**, Amsterdam, 389 (1994)
- 128 BELLAMY, L.J. **The Infra-red Spectra of Complex Molecules**. John Wiley & Sons, London, 2a. edição, cap. 20 (1958).
- 129 NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, Part A: Theory and applications in inorganic chemistry**. John Wiley & Sons, Inc. Fifth Edition.
- 130 SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursors alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, 30, 3, 29-35 (2005)
- 131 KIM, S-H.; LIM, B-K.; SUN, F.; KOH, K. RYU, S-C.; KIM, H-S.; LEE, J. Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan, **Polymer Bulletin**, 62, 111-118 (2009)
- 132 DON, T-M.; CHUANG, C-Y.; CHIU, W-Y.; Studies on the degradation behavior of chitosan-g-poly (acrylic acid) copolymers, **Tamkang Journal of Science and Engineering**, 5, 4, 235-240 (2002)

- 133 ARAÚJO, A. B. A.; LEMOS, A. F.; FERREIRA, J. M. F. Rheological, microstructural, and in vitro characterization of hybrid chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 916-922 (2009)
- 134 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**, 80 687–694 (2010)
- 135 XIAO, X.; LIU, R.; HUANG, Q.; DING, X.; Preparation and characterization of hydroxyapatite/polycaprolactone-chitosan composites, **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, 20, 1573-4838 (2009)
- 136 ZAMBUZZI, W. F.; BRUNI-CARDOSO, A.; GRANJEIRO, J. M.; PEPPELENBOSCH, M. P.; CARVALHO, H. F.; AOYAMA, H.; FERREIRA, C. V. On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, 108, 134–144 (2009)
- 137 KONG, L.; GAO, Y.; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, **European Polymer Journal**, 42, 3171-3179 (2006)
- 138 GOLUB, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1592-1598 (2009)
- 139 XU, H. H. K.; SIMON JR, C. G. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility, **Biomaterials**, 26, 1337-1348 (2005)
- 140 MOREAU, J. L.; XU, H. H. K.; Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate – Chitosan composite scaffold, **Biomaterials**, 30, 2675-2682 (2009)
- 141 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 guide bone regeneration, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 569-580 (2009)