

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

**ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA BIODEGRADAÇÃO DE  
FILMES DE QUITOSANA**

**KATHARINE LAURINDO DE CERQUEIRA MELO COUTO**

Campina Grande - PB  
Dezembro/2010

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

**ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA BIODEGRADAÇÃO DE  
FILMES DE QUITOSANA**

**KATHARINE LAURINDO DE CERQUEIRA MELO COUTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Campina Grande - PB

Dezembro/2010



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCCG

C871e Couto, Katharine Laurindo de Cerqueira Melo.

Estudo do efeito da temperatura na biodegradação de filmes de quitosana / Katharine Laurindo de Cerqueira Melo Couto. — Campina Grande, 2010.

67 f. : il.

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

Referências.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius lia Fook.

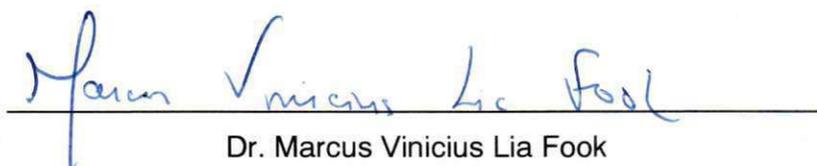
1. Engenharia de Materiais – Odontologia. 2. Biomateriais. 3. Membranas de Quitosana. 4. Lisozima. 5. Temperatura. I. Título.

CDU – 62:616.314(043)

ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA BIODEGRADAÇÃO DE FILMES  
DE QUISOTANA.

**Katharine Laurindo de Cerqueira Melo Couto**

Dissertação Aprovada em 28/12/2010 pela banca examinadora constituída dos  
seguintes membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador

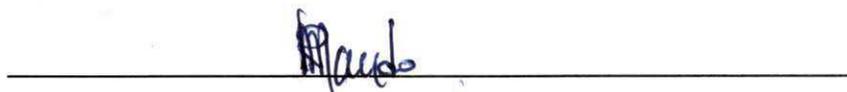
UAEMa – UFCG



Dr<sup>a</sup>. Maria Roberta de Oliveira Pinto

Examinadora Externa

CCT - UEPB



Dr. Reginaldo Severo de Macedo

Examinador Interno

UAEMa - UFCG

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pai que sempre foi inspiração para mim, a minha mãe, imagem viva de conhecimento, ao meu marido e meu filho que são os amores da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

De modo muito especial agradeço a Deus pela força, iluminação e por ter permitido que esta jornada produzisse frutos.

Ao meu marido Ricardo e meu filho Felipe pelo amor e paciência em minhas ausências.

Aos meus pais por me ensinarem o valor do conhecimento como meio de descortinar novas possibilidades.

Ao professor Marcus Vinicius Lia Fook pela orientação, sabedoria e exemplo de perseverança.

Aos meus colegas do grupo de biomateriais, especialmente Ediberto, Thiago e Rossemberg pela ajuda tão valiosa.

A todos os professores do curso de engenharia de materiais pelos ensinamentos transmitidos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do curso de engenharia de materiais pelos serviços prestados sempre com solicitude.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 GERAL .....	13
2.2 ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1 MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS E BIOABSORVÍVEIS .....	15
3.2 QUITOSANA .....	16
3.3 GRAU DE DESACETILAÇÃO (Cristalinidade) .....	17
3.4 BIODEGRADAÇÃO DA QUITOSANA .....	20
3.5 LABORATÓRIO DE ESCALA DOS AMBIENTES ACELERADOS SIMULADOS .....	24
3.6 MEMBRANAS POLIMÉRICAS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 MATERIAIS .....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Preparação da membrana de Quitosana .....	34
4.2.2 Processo de orientação molecular das membranas .....	35
4.2.3 Caracterização .....	35
4.2.3.1 <i>Difração de Raio X</i> .....	36
4.2.3.2 <i>Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de (FTIR) Fourier</i> .....	36
4.2.3.3 <i>Ensaio de Biodegradação in vitro</i> .....	36
4.2.3.4 <i>Perda de Massa</i> .....	37
4.2.3.5 <i>Tensão Superficial</i> .....	37
4.2.3.6 <i>Microscopia Ótica</i> .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X .....	38
5.1.1 Membranas de quitosana não orientadas .....	38
5.1.2 Membranas com orientação preferencial a 1% .....	40
5.1.3 Membranas de quitosana com concentração 2% .....	42

5.2 ESPECTROSCÓPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	44
5.2.1 Membranas de quitosana não degradadas .....	44
5.2.2 Membranas de quitosana degradadas .....	45
5.2.2.1 Concentração .....	45
5.3 TENSÃO SUPERFICIAL .....	46
5.3.1 Ângulo de contato para membranas com concentração 1% .....	47
5.3.2 Ângulo de contato para membranas com concentração 2% .....	47
5.4 BIODEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA .....	48
5.4.1 Perdas de massa para membranas de quitosana a 1% (m/v) .....	48
5.4.2 Perdas de massa para membranas de quitosana a 2% (m/v) .....	51
5.5 MICROSCOPIA ÓTICA .....	54
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Biotransformações de quitina e quitosana .....	22
Figura 2 – Esquema do dispositivo utilizado para a orientação preferencial das membranas de quitosana .....	35
Figura 3 – Difratoograma para membrana de quitosana a 1% sem orientação molecular preferencial.....	38
Figura 4 – Difratoograma para membrana de quitosana a 2% sem orientação molecular preferencial.....	39
Figura 5 – Difratoograma para membrana de quitosana a 1% com orientação molecular preferencial (placa pequena).....	40
Figura 6 – Difratoograma para membrana de quitosana a 1% com orientação molecular preferencial (placa grande).....	41
Figura 7 – Difratoograma para membrana de quitosana a 2% com orientação molecular preferencial (placa pequena).....	42
Figura 8 – Difratoograma para membrana de quitosana a 2% com orientação molecular preferencial (placa grande).....	43
Figura 9 – FTIR para membranas de quitosana não degradadas, a 1% .....	44
Figura 10 – FTIR para membranas de quitosana não degradadas, a 2% .....	44
Figura 11 – FTIR para membranas de quitosana degradadas .....	45
Figura 12 – FTIR das membranas de quitosana degradadas .....	46
Figura 13 – Medidas de ângulo de contato para membranas não orientadas e orientadas, com 1% (m/v).....	47
Figura 14 – Medidas de ângulo de contato para membranas não orientadas e orientadas, com 2% (m/v).....	48
Figura 15 – Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 38 °C .....	49
Figura 16 – Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 45 °C .....	49
Figura 17 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 38 °C.....	50
Figura 18 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 45 °C.....	50

Figura 19 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa grande à temperatura de 38 °C.....	51
Figura 20 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa grande à temperatura de 45 °C.....	51
Figura 21 – Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 38 °C .....	52
Figura 22 – Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 45 °C .....	52
Figura 23 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 38 °C.....	53
Figura 24 – Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 45 °C.....	53
Figura 25 – Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 1% não degradadas (a) sem orientação, (b) orientação placa pequena e (c) orientação placa grande. 3500 X .....	54
Figura 26 – Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 2% não degradadas (a) sem orientação, (b) orientação placa pequena e (c) orientação placa grande. 3500 X .....	55
Figura 27 – Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 1% degradadas (a) sem orientação por 30 dias e 38 °C, (b) sem orientação por 45 dias e 45 °C, (c) com orientação placa pequena, 45 dias e 45 °C e (d) com orientação, placa grande, 30 dias e 38 °C. 3500 X.....	56
Figura 28 – Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 2% degradadas (a) sem orientação por 30 dias e 45 °C, (b) sem orientação por 45 dias e 38 °C, (c) com orientação placa pequena, 45 dias e 38 °C e (d) com orientação, placa grande, 45 dias e 45 °C. 3500 X .....	57

## **ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA**

### **RESUMO**

A área de ciência à qual está incluída a engenharia de Materiais têm vindo a desenvolver em conjunto com outras áreas, importantes avanços no ramo dos biomateriais. Esses biomateriais são substâncias ou misturas de substâncias de natureza natural ou artificial, que atua nos sistemas biológicos tais como tecidos e órgãos. Nesta pesquisa foi realizada a degradação da quitosana em meio fisiológico em diferentes temperaturas, submetendo à ação da enzima lisozima. O objetivo foi avaliar o efeito da temperatura na biodegradação de membranas de quitosana com diferentes níveis de orientação molecular. As membranas produzidas nas concentrações de 1% e 2% (m/v), sem e com orientação preferencial, demonstraram-se sensíveis à ação de lisozima, nos períodos de 30 e 45 dias, independentemente das temperaturas estudadas.

**Palavras-Chave** – Biomateriais, membranas de quitosana, lisozima, temperatura.

## **STUDY OF EFFECT OF TEMPERATURE ON BIODEGRADATION OF CHITOSAN FILMS**

### **ABSTRACT**

The area of science which was included the Engineering Materials have been developed in conjunction with other areas, important advances in the field of biomaterials. These biomaterials are substances or mixtures of natural or artificial in nature, which acts in biological systems such as tissues and organs. This research was performed the degradation of chitosan in physiological medium at different temperatures, subjecting to the action of the enzyme lysozyme. The objective was to evaluate the effect of temperature on the biodegradation of chitosan membranes with different molecular orientation. The membranes produced at concentrations of 1% and 2% (w / v), with and without preferred orientation, were shown to be sensitive to the action of lysozyme, in periods of 30 and 45 days, regardless of temperatures.

**Key-words** – Biomaterials, membranes of chitosan, lysozyme, temperature.

## 1 INTRODUÇÃO

A conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982 definiu que biomaterial seria "Toda substância (com exceção de drogas) ou ainda combinação de substâncias, sendo de origem natural ou sintética, que durante um período de tempo indeterminado é utilizado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamentos, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais" (FOOK, 2005). Sendo assim, nesta categoria estão inseridos todos os materiais empregados em medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacológica, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo (SANTOS, 2008).

Na odontologia atual onde implantes são fixados de forma a restabelecer função e estética, temos a ausência óssea como grande fator limitante à fixação dos implantes em posição adequada (BUSER, 1993). Desta forma, aproveitando os avanços da engenharia de tecidos, vêm-se criando dispositivos que visam a neoformação óssea de forma segura e confiável. Neste contexto começaram a ser utilizadas membranas poliméricas para a regeneração óssea guiada. Membranas estas a princípio de material não biodegradável (DAHLIN et al., 1988) e depois de material biodegradável (LUNDGREN, 1997). Este último com a vantagem de não demandar segundo tempo cirúrgico, mas com a desvantagem de alto custo operacional (SANDBERG, 1993).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com membranas para Regeneração Óssea Guiada (ROG) onde a quitosana tem tido destaque especial devido às suas características de biocompatibilidade, biofuncionalidade e biodegradabilidade. Além disso, também têm o fato da quitosana advir de um recurso natural renovável (PARK et al., 2003).

A quitosana também apresenta características especiais como atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica (onde até os produtos de sua degradação mantêm tais características) hemostática, ação no combate ao colesterol sanguíneo, auxilia na perda de peso, dentre outras (BAE et al., 2006; JE; KIM, 2006; DALLAN, 2005; TORRES et al., 2005).

Porém, o entendimento total de seus mecanismos de degradação ainda não está totalmente elucidado e, sendo de fundamental importância sua compreensão quando se pretende a utilização na engenharia de tecidos (WELING et al., 2005).

Todo ato cirúrgico (como o necessário à implantação da membrana) desencadeia uma resposta inflamatória que eleva a temperatura corpórea local. Este acréscimo de temperatura pode interferir diretamente no tempo funcional da membrana polimérica de ROG acarretando o sucesso ou insucesso do tratamento. Nesta pesquisa será realizada a degradação da quitosana em meio fisiológico em temperaturas de 38° e 45°C, submetendo à ação da enzima lisozima, a fim de compreender melhor e avaliar as variáveis do processo de biodegradação deste polímero.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito da temperatura na biodegradação de membranas de quitosana com diferentes níveis de orientação molecular.

### **2.2 Específicos**

- Correlacionar esses estudos com as propriedades químicas, morfológicas e cristalinas das membranas;
- Investigar a relação da variação de temperatura com a biodegradabilidade;
- Avaliar o efeito da orientação molecular na biodegradação;
- Relacionar o efeito da concentração do filme de quitosana na degradação térmica.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

A busca por um aumento da expectativa de vida do homem tem logrado significantes resultados no último século, o que tem motivado o desenvolvimento de tecnologia que proporcione maior qualidade de vida a estes indivíduos (HOFFMAN et al., 1996).

E foi neste contexto que surgiu a engenharia de tecidos com potencial de desenvolver a reposição tecidual se tornando uma alternativa para tratar perda ou má função de tecidos ou órgãos, tendo a vantagem de não possuir as limitações das terapias convencionais. Além disso, apresenta um importante suporte para a utilização de biomateriais, consistindo em um conjunto de conhecimentos e técnicas utilizadas para a reconstrução de novos órgãos e tecidos e do restabelecimento de suas funções (LANZA; LANGER; VACANTI, s.d.).

A engenharia de tecidos pode ser definida como uma combinação de princípios e métodos das ciências da vida em conjunto com a engenharia, para elucidar o entendimento fundamental da relação estrutura-função em tecidos normais e doentes, com o propósito de desenvolver materiais e métodos para repor tecidos ou órgãos doentes ou danificados através da utilização de implantes permanentes ou temporários (BARBANTI et al., 2005; HONG et al., 2007). Esta é uma definição bastante ampla que pode incorporar tanto dispositivos celulares quanto acelulares.

Os biomateriais, muito utilizados na engenharia de tecidos, compreendem qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por dado período de tempo, com a finalidade de substituir tecido vivo que perdeu função, podendo ou não servir como veículo, matriz, estimulador ou suporte para o crescimento de novo tecido (WILLIAMS, 2008).

Os biomateriais podem ser classificados em sintéticos (cerâmicos, metais, polímeros sintéticos), naturais (colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais) e compósitos (compostos por mais de um tipo de material) (SILVER; DOAILLON, 1989).

Os biomateriais também podem ser classificados de acordo com sua biocompatibilidade, biofuncionalidade e biodegradação. A biocompatibilidade ocorre quando um biomaterial é capaz de desenvolver respostas teciduais adequadas ao

sistema hospedeiro. Enquanto a biofuncionalidade é referente ao desempenho de suas propriedades mecânicas, químicas, ópticas, elétricas, etc. permitindo o desempenho das funções almejadas pelo tempo desejado. E a biodegradação é termo conferido ao biomaterial que pode ser degradado por enzimas ou microrganismos específicos presentes no corpo do hospedeiro ou no meio ambiente (RATNER et al., 1996).

Um biomaterial pode ser só biocompatível, biocompatível e biofuncional, biocompatível e biodegradável ou biocompatível, biofuncional e biodegradável. Quando um material atende a estes três requisitos diz-se um biomaterial de terceira geração. A escolha de uso de um biomaterial está atrelada ao seu uso, pois de acordo com o local e a finalidade desejada há propriedades consideradas fundamentais e outras não desejáveis (MARK; CALVERT, 1994; RATNER et al., 1996; DALLAN, 2005).

Levando em consideração a aplicação dos biomateriais, se faz necessário conhecer além das características inerentes do material também sua interação com o organismo vivo, daí a necessidade da interdisciplinaridade exigida quando se pesquisa biomateriais. Os biomateriais têm sido empregados como biosensores, implantes, liberação controlada de drogas, lentes intraoculares, substituintes de órgãos etc. As inovações neste campo se encontram em progresso, principalmente na área dos biomateriais voltados para regeneração tecidual (SAN ROMÁN e REIS, 2004).

### 3.1 MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS E BIOABSORVÍVEIS

Os biomateriais no que se refere à biodegradabilidade podem ser classificados como bioestáveis (ou permanentes) e biodegradáveis (ou temporários). Os biomateriais permanentes substituem o tecido lesado por tempo indeterminado onde deve manter suas características mecânicas e físico-químicas por longo período. Enquanto que os biomateriais biodegradáveis são degradados tanto in vitro quanto em vivo, sendo indicados como dispositivos temporários (DALLAN, 2005).

A compreensão da química e da cinética permite uma previsão da estabilidade, visto que para algumas aplicações biomédicas a bioestabilidade é desejada, como no caso de implantes dentários, próteses articulares, materiais para isolamento elétrico intracorpóreo. Dependendo da aplicação, esta característica

poderia ser também uma desvantagem, como no caso das membranas para regeneração óssea guiada e de liberação controlada de fármacos (KHOR e LIM, 2003).

No caso onde os biomateriais são biodegradáveis é considerado o fato de que os tecidos naturais são reparados e remodelados de forma contínua ajustando-se às inúmeras mudanças que ocorrem no sistema fisiológico (OREFICE, 2006). Algumas evidências desse fato são as hipertrofias de músculos muito solicitados, a remodelação óssea das articulações frequentemente submetidas a forças não fisiológicas, hiperplasias gengivais em áreas de trauma, dentre outras.

Haja vista que um biomaterial não possui esta característica inerente de um organismo vivo, e que não são capazes de mimetizar as funções orgânicas de modo 100% efetivo, um biomaterial ideal para muitas finalidades seria aquele que eventualmente desaparece, sendo substituído por tecido natural. Desta forma, os polímeros biodegradáveis são de grande interesse para a engenharia biomédica (GRIGOLON, 2001).

A princípio, os biomateriais foram criados para serem inertes ao organismo, tendo os estudos voltados para prevenção e diminuição de reações teciduais orgânicas. Com o desenvolvimento científico, os biopolímeros são desenvolvidos para uma interação com os tecidos orgânicos desencadeando respostas fisiológicas desejáveis como crescimento e diferenciação celular no sítio de implantação (LANZA; LANGER e VACANTI, s.d.)

### 3.2 QUITOSANA

A quitosana pode ser definida como um copolímero de 2 – amino – 2 – desoxi – D – glicopirranose e 2 – acetamida – 2 – desoxi – D – glicopirranose, tendo sua composição variando em função do grau residual de acetilação (CAMPANA FILHO et al., 2007).

A preparação de estruturas de quitosana vale-se da sua natureza policatiónica, sendo as estruturas mais frequentemente sintetizadas por secagem ou coagulação de soluções aquosas de quitosana levemente acidificadas. Posteriormente, ainda é possível realizar modificações ou derivatizações específicas dos grupos funcionais. (SIGNINI, 2002).

A quitosana pode ser moldada em várias formas (membranas, blocos, tubos e microesferas) e possui excelente habilidade para formar estruturas porosas (TAN et al., 2009).

Várias composições têm sido associadas à quitosana para que sejam produzidas estruturas de quitosana com tamanho de poro e propriedades mecânicas desejáveis (HSIECH; CHANG; LIN, 2007 e URAGAMI, 1997).

É solúvel em meio ácido e insolúvel em meio alcalino. Em pH fisiológico se comporta como polieletrólito, apresentando alta densidade de carga (uma carga positiva por unidade de glicosamina) (DALLAN, 2005). Estas características são fundamentais visto que solúvel em meio aquoso ácido e carregada positivamente a quitosana tem características, ideais para interagir com biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos, ácidos graxos entre outras (CHANDY e SHARMA, 1990).

A quitosana tem propriedades interessantes para aplicação na engenharia de tecidos: biocompatibilidade, biodegradabilidade, aceleração na recuperação de lesões, redução do nível do colesterol sanguíneo, estimulante do sistema imunológico, bacteriostático, fungistático, analgésico além de efeito antitumoral (BERGER et al., 2004).

### 3.3 GRAU DE DESACETILAÇÃO (CRISTALINIDADE)

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importante da quitosana, pois determina a quantidade de grupos amínicos livres no polissacarídeo influenciando de forma decisiva sua solubilidade (HEJAZI e AMIJI, 2003).

Weling e colaboradores (2005) estudaram o efeito do grau de desacetilação da quitosana na cristalinidade, tração e compatibilidade com células Schawrm concluindo que, para um mesmo peso molecular, quanto maior o grau de desacetilação maior seria a cristalinidade, a resistência à tração e afinidade da quitosana com as células em estudo.

O grau de acetilação pode ser obtido usando a expressão abaixo, segundo Barros et al. (2003):

$$GA = [(I_{met}/3)I_{H2}] \times 100$$

Onde GA é o grau de acetilação (%),  $I_{met}$  é a intensidade da integral do sinal dos prótons metila dos grupos acetamida,  $I_{H2}$  é a intensidade da integral do sinal do hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel glicosídico.

A cristalinidade da quitosana depende do grau de acetilação e do processo pelo qual o polissacarídeo foi obtido e influencia nas propriedades de permeabilidade ao transporte de íons e absorção de água (fundamentais no processo de degradação).

Além disso, teremos a cristalinidade da quitosana diretamente relacionada com propriedades mecânicas e algumas propriedades biológicas (como a degradação na presença da enzima lisozima).

A difração de raios-X é apropriada para determinar os índices de cristalinidade da quitosana e este índice pode ser obtido através da equação:

$$I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} \times 100$$

Sendo  $I_C$  e  $I_A$  as intensidades dos sinais das regiões cristalinas ( $2\theta \cong 20^\circ$ ) e amorfas ( $2\theta \cong 120$ ) respectivamente (ANTONINO, 2007).

Apesar da importância do grau de desacetilação e da cristalinidade, autores enfatizam que a distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e seu peso molecular também são determinantes no que se refere às propriedades da quitosana.

O efeito da seqüência dos monômeros e a distribuição de seus grupos são de importância inquestionável no que se refere à degradação polimérica. Co-polímeros têm uma maior taxa de degradação que homopolímeros. Os grupos secundários afetam a conformação das cadeias poliméricas afetando suas características e sua degradabilidade (LYU e UNTEREKER, 2009).

Segundo Prasitsilp et al., (2000), que estudaram o comportamento biológico dos fibroblastos quando em contato com membrana sintetizadas com quitosana (de 76 a 90% de desacetilação), o aumento no grau de desacetilação favorece a adesão celular.

A velocidade de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade e ao grau de desacetilação.

Maeda e Kimura (2004) avaliaram o efeito do peso molecular da quitosana na sua atividade antitumoral e observaram que as moléculas de menor peso molecular promoveram uma diminuição no crescimento de tumores.

Kurita (1998) avaliou o efeito do peso molecular na atividade antibacteriana da quitosana contra algumas espécies de *Streptococcus* e constatou que quanto maior o peso molecular, maior a repressão do crescimento desta bactéria.

A atividade antibacteriana da quitosana é apresentada como função das interações eletrostáticas entre grupos amino e grupos aniônicos nas paredes celulares das bactérias provenientes de resíduos de ácidos carboxílicos e fosfolípidos (GOY; BRITO e ASSIS, 2009).

O efeito antimicrobiano da quitosana (sobre vírus, bactérias e fungos) é influenciado pelas propriedades da quitosana (origem, peso molecular, grau de desacetilação e modificações químicas), condições ambientais (pH, temperatura, concentração de sal) e as espécies de microrganismos (JING et al., 2007).

Liu et al. (2001) mostraram que o efeito antibacteriano da quitosana (DDA: sobe 73 a 85%) com o peso molecular, mas apenas se o peso molecular for menor que 91600Da. Se o peso molecular for acima deste limite este efeito foi revertido. O efeito antibacteriano da quitosana aumentou com o crescente grau de desacetilação aumenta (LIU et al., 2001; CHUNG et al., 2004). A influência do pH também foi foco de muitas investigações. TSAI e SU (1999) concluíram que em pH ácido a atividade antibacteriana aumentou enquanto que em um pH maior que 7 houve a inibição do efeito antibacteriano. Também concluíram que temperaturas mais elevadas (25 e 37°C) aumentam o efeito bactericida e que altas concentrações de sal dificultam o efeito antibacteriano da quitosana.

Citando exemplos de bactérias sensíveis ao efeito antibacteriano da quitosana teremos estudos que comprovam sua atividade contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *klebsiela pneumoniae* onde a quitosana de baixo peso molecular reduziu a multiplicação destes microrganismos, a mobilidade, atração e interação iônica. E o tamanho molecular foi determinante na absorção e no efeito sobre a superfície das membranas dos microrganismos (GOY; BRITO e ASSIS, 2009).

Similarmente, porém em diferente intensidade, a atividade antimicrobiana da quitosana melhorou quando o grau de acetilação é menor. Neste estudo foram analisados os fungos: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Cândida albicans* (ANDRES et al., 2007).

De forma similar a bactérias, a atividade da quitosana contra fungos é fungistática em vez de fungicida. A quitosana é geralmente relatada como sendo muito eficaz na inibição da elongação do tubo de germinação dos esporos do germe e do crescimento radial (ASSIS, 2008).

Jolles e Muzzarelli (1999) inibiram completamente o crescimento do tóxico *Aspergillus flavus* em milho e em amendoim após tratamento com quitosana. Também foi inibido o crescimento de *Botrytis spp* quando a berinjela recebeu o mesmo tratamento. Utilizaram ainda a quitosana no revestimento de frutas e vegetais para prevenção de microrganismos patogênicos conseguindo um aumento na qualidade e no tempo de armazenamento do produto. Concluíram também que a fonte da quitosana influi diretamente na sua atividade antimicrobiana. Apesar de poder ser obtida de bactérias, fungos e crustáceos é a partir desses últimos que ela apresenta um maior número de mecanismos antimicrobianos (incluindo a indução da quitosanase, formação de componentes fenólicos e capacidade de bloqueio de nutrientes, inibindo a multiplicação de microrganismos). Soluções de quitosana preparados com ácido acético exibiram contra fungos efeitos mais imediatos em comparação com soluções preparadas com ácido láctico.

Zheng e Zhu (2003) pesquisaram a atividade antimicrobiana da quitosana em diferentes condições e obtiveram resultados conflitantes. Quando *Staphylococcus aureus* foi usado como microrganismo indicador, os resultados mostraram que o efeito é maior quando a quitosana tem baixo peso molecular. Mostraram também que o efeito da atividade microbiana sobre o *E. coli* reduziu com o aumento do peso molecular da quitosana. De acordo com o pesquisador há indicações que o peso molecular da quitosana mais apropriada para a atividade antimicrobiana é 1,5 KDa. Outros experimentos mostraram que na concentração de 0,5% estes oligossacarídeos podem inibir o crescimento de *E. coli* completamente.

### 3.4 BIODEGRADAÇÃO DA QUITOSANA

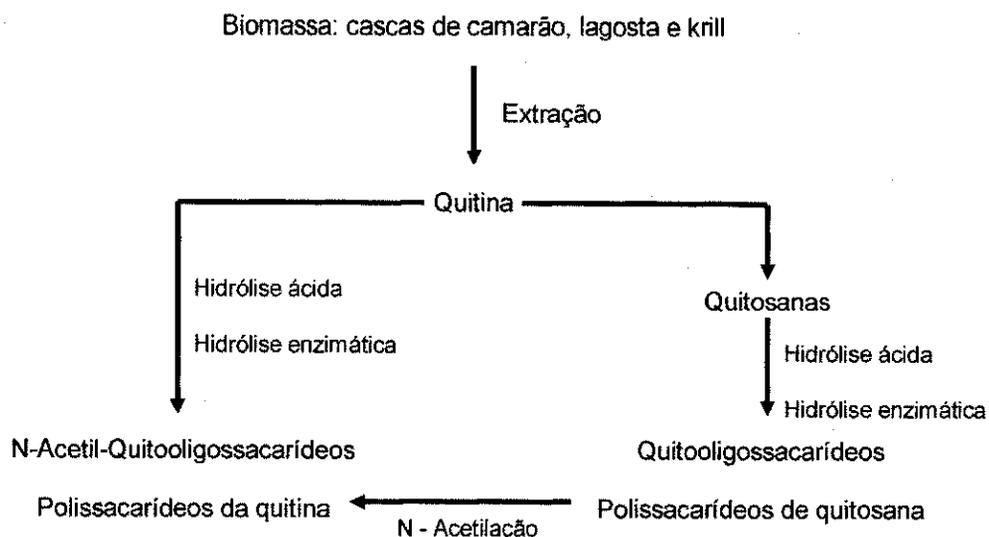
A degradação de um biomaterial em meios biológicos tem suma relevância quando se trata da aplicação deste em dispositivos médicos e odontológicos visto que influencia, dentre outras coisas, no tempo de vida útil após o início de sua utilização pelo paciente (MARTINE, 1995). Uma membrana, por exemplo, que visa à manutenção de um espaço para a formação óssea pode perder sua função se antes

do período da formação do osso esta entrar em degradação, perdendo propriedades mecânicas e induzindo a uma resposta inflamatória. Este período de tempo onde um polímero é capaz de manter suas funções e propriedade é denominado tempo funcional. Por outro lado o tempo decorrido para um polímero se degradar completamente e perder sua massa é denominado tempo de desaparecimento. No decorrer deste tempo de desaparecimento um material pode perder sua funcionalidade inicial, mas ainda liberar produtos de degradação. A depender das propriedades físicas, químicas e taxas de liberação, os produtos de degradação podem causar efeitos não previstos (LYU e UNTEREKER, 2009).

Desta forma, para a adequação de um polímero a determinada aplicação torna-se fundamental compreender seu tempo funcional, tempo de desaparecimento, produtos de degradação e taxas de liberação e para se ter estes conhecimento é necessário elucidar seus mecanismos de degradação.

A quitosana, polímero biodegradável de fonte renovável, tem como unidade monomérica principal D-glicosamina (2 – amino – 2 desoxi – D – glicose) a qual pode ser obtida pela hidrólise ácida da quitina (GRIGOLON, 2001).

Estudos recentes também apontam para um substrato da hidrólise da quitosana, os quitoooligômeros. Estes apresentam maior solubilidade que a quitosana, mantendo os efeitos terapêuticos desejáveis de ação antibacteriana (CRAVEIRO et al., 1999), antifúngica, antitumoral além de ter efeito imunomodulador (FLEURI et al., 2009). Estes quitoooligômeros por serem moléculas de menor tamanho ainda apresentam maior facilidade de penetração nas células (FLEURI et al., 2009). O processo de obtenção dos quitoooligômeros pode ser ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Biotransformações de quitina e quitosana

Fonte: Fleuri et al., (2009).

Há quatro principais mecanismos de degradação de biopolímeros: hidrólise química, oxidação, hidrólise enzimática e degradação física (por exemplo, a absorção de água pelo polímero, carga mecânica e de desgaste) (LYU e UNTEREKER, 2009).

A degradação física ocorre principalmente em decorrência do atrito mecânico associado com o movimento sob pressão e a absorção de água pelo polímero (hidratação). Esta última pode ocasionar mudanças significativas na temperatura de transição vítrea, geometria e propriedades mecânicas de tal forma a alterar o seu tempo funcional. (LYU e UNTEREKER, 2009).

A quitosana pertence ao grupo dos polímeros hidrogéis, pois possui capacidade de absorver desde dezenas até centenas de vezes sua massa seca em água, estando suas cadeias úmidas por interações moleculares e/ou forças secundárias. Na quitosana dentre as diversas interações destacam-se as pontes de hidrogênio intermoleculares que lhe confere estrutura semicristalina (KURITA, 2001). Esta estrutura é importante se considerarmos que tanto as propriedades mecânicas como a permeabilidade, transporte de íons e degradação estão relacionados com a cristalinidade dos polímeros.

A hidratação da quitosana ocorre em três etapas. Primeiramente teremos os grupos hidrofílicos hidratados, seguida pela hidratação dos grupos hidrofóbicos,

sendo as águas da hidratação conhecidas como primária e secundária, respectivamente. Após longo período em contato com a água a estrutura polimérica da quitosana incorpora uma maior quantidade de água que preenche os espaços existentes entre as cadeias poliméricas e/ou centro dos poros, caso existam (CLARINVAL e HALLEUX, 2005).

A quitosana, sendo um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução, sendo neste caso quebradas as ligações do complexo polimérico que se unem aos íons  $H^+$  e  $OH^-$  da água (QU et al., 2000). Nesta degradação hidrolítica a reatividade química de ligações da quitosana, as taxas de difusão de reagentes e produtos (incluindo a água) os íons do meio de ensaio de degradação e interações termodinâmicas polímero-água estão envolvidos.

A reticulação de membranas de quitosana com glutaraldeído produz uma menor afinidade com a água aumentando seu caráter hidrofóbico e diminuído, pois sua degradação (TORRES et al., 2005).

Em um estudo que avaliou a degradação da quitosana em Tampão PBS conclui que, quando da exposição das membranas de quitosana à lisozina e quando da exposição somente ao tampão PBS, a degradação das membranas se deu basicamente à presença do tampão PBS e não à ação da enzima. Sendo que as membranas não neutralizadas com solução de hidróxido de sódio apresentaram acentuada instabilidade e alto percentual de degradação (MARTINI, 1995; ROBERTS, 1992).

A respeito da composição do meio fisiológico de degradação, Lyu e Untereker (2009) afirmaram que sais têm solubilidade muito baixa em polímeros com alto peso molecular. Sendo assim os íons do meio de ensaio não afetariam a degradação da amostra global. Entretanto podem alterar a degradação da camada superficial.

Em relação à hidrólise química, outro mecanismo de degradação da quitosana, esta foi testada pela primeira vez por Horowitz et al. (1957) quando a quitosana foi hidrolizada utilizando-se HCl a 35% a 53°C durante 8 horas de reação. Neste experimento pioneiro foram obtidos oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) de 1 a 5 unidades monoméricas.

Desde então a hidrólise ácida tem sido experimentada por diversos pesquisadores em diversas condições para obtenção de quitooligômeros. Sendo testados outros ácidos como o fluorídrico (BOSSO et al., 1986), ácido fosfórico (HASEGAWA et al, 1993) e  $HNO_2$  (CAFESSE, et al., 1990).

Porém a hidrólise por ácido, apesar de ser um método simples e de bom rendimento, é de difícil controle além de também ser difícil a remoção dos ácidos residuais. Outra desvantagem da hidrólise química é que pode haver uma mudança estrutural dos substratos finais esperados, especialmente quando utilizado o  $\text{HNO}_2$  (PATEL et al., 2006).

A hidrólise enzimática é a reação de hidrólise quando a mesma é catalizada por enzimas. As enzimas funcionam baixando a energia de ativação aumentando a taxa de reação mesmo em ambientes onde a reação mesmo em ambientes onde a reação não é favorecida. Para uma potencialização de sua atividade. Algumas enzimas (que são moléculas protéicas) associam-se a co-fatores que podem ser íons metálicos ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ ). As enzimas são específicas a cada ambiente no qual sua atividade é otimizada. No caso de enzimas que atuam em seres humanos as condições consideradas ideais à sua atividade ótima são solução aquosa pH 6-8, força iônica de 0,15 molar, temperatura entre 35 a 40°C. Mudanças neste ambiente podem inativar as enzimas (ORÉFICE et al., 2006).

A hidrólise enzimática é, portanto mais bem controlada que a química porém a necessidade da utilização de enzimas e o custo destas torna este processo muito dispendioso quando se pensa em escala industrial (ASSIS et al., 2008).

As principais enzimas para degradação da quitosana são a quitonase (enzima específica para quitosana), a lisozima (enzima que no organismo humano e em outros animais é a responsável pela degradação deste polímero) (LYU e UNTEREKER, 2009).

Existem vários tipos de ensaios que visam mensurar esta biodegradação que podem ser: ensaio de enzima teste de respiração, Gás ( $\text{CH}_4$  ou  $\text{CO}_2$ ) e experimentação de campo, polímeros marcados radioativamente e laboratório de escala dos ambientes acelerados simulados.

Nos a teremos mais a este último, visto que é de maior relevância para este trabalho.

### 3.5 LABORATÓRIO DE ESCALA DOS AMBIENTES ACELERADOS SIMULADOS

O princípio deste método consiste em que a biodegradação de um material polimérico é geralmente associada à mudança nas propriedades físicas, químicas e mecânicas do material, e são justamente estas mudanças que tornam o processo de

biodegradação interessante principalmente visando sua aplicação. Estas propriedades são passíveis de ser mensuradas em função da duração da exposição a um meio biótico, acompanhando-se as consequências do processo de biodegradação sobre o material (BASTIOLI, 2005).

Os meios bióticos podem ser projetados em laboratório mimetizando os naturais com um máximo de controle de variáveis como pH, temperatura, comunidade microbiana, agitação mecânica e fornecimento de oxigênio. O controle destas variáveis melhora a reprodutibilidade do experimento podendo ainda acelerar o processo de degradação. Simulação de ambientes bióticos em laboratório também pode ser usada para a avaliação dos efeitos em longo prazo ou de dosagem contínua da atividade do ambiente e do melhor sistema de escoamento (BASTIOLI, 2005).

Várias propriedades podem ser acompanhadas durante o processo de degradação, portanto, é importante escolher um que seja relevante para a utilização do material. A perda do peso é um parâmetro frequentemente seguido porque demonstra claramente a desintegração de um produto biodegradável. A tração também pode ser monitorada, porém nenhuma significativa mudança pode ser observada se o mecanismo de biodegradação envolve bioerosão (clivagem hidrolítica ou enzimática na superfície) para estes (GRIGOLON, 2001).

Biodegradação completa ocorre quando nenhum resíduo permanece, e mineralização total é estabelecida quando o substrato original é totalmente convertido em sais. No entanto, a mineralização é um processo muito lento, em condições naturais, porque alguns dos polímeros submetidos à biodegradação vão inicialmente ser transformados em biomassa. Portanto, a mineralização de biodegradação completa não é objetivo mensurável para avaliar a remoção do meio ambiente, porque alguns polímeros são biodegradáveis e outros não (BASTIOLI, 2005).

Embora a biodegradação seja geralmente definida como a degradação causada pela atividade biológica (especialmente ação enzimática), geralmente ocorrem simultaneamente e às vezes é mesmo iniciado por degradação abiótica como fotodegradação e hidrólise. Existem casos em que o exame visual da superfície com diversas técnicas de microscopia também pode dar informações sobre o processo de biodegradação. Da mesma forma, alterações químicas ou físicas do polímero podem ser acompanhadas combinando-se técnicas específicas

tais como infravermelho, ou espectroscopia UV, medidas de ressonância magnética nuclear, difratometria de raios-X e calorimetria diferencial de varredura.

A desvantagem destes métodos que acompanham as propriedades mecânicas, perda de peso, peso molecular ou qualquer parâmetro que se baseia na natureza macromolecular do substrato é que, apesar de sua sensibilidade, estes apenas podem abordar as fases iniciais do processo de biodegradação. Além disso, estes parâmetros não fornecem nenhuma informação sobre o grau de mineralização (ASSIS et al., 2008).

Especialmente em copolímeros a hidrólise de um componente pode causar significativa perda de peso e propriedades de tração parecendo até indicar para uma elevada biodegradação mesmo enquanto seus outros componentes possam persistir no ambiente (BASTIOLI, 2005).

Vários fatores afetam a biodegradabilidade de um polímero e parece indubitável que o ambiente é de muita relevância no que se refere à biodegradação. E neste contexto, compreender o efeito da temperatura na cinética de degradação é importante não só para prever o comportamento da degradação do material, mas também extremamente útil para desenvolver um método de ensaio acelerado de degradação. Testes de degradação em altas temperaturas foram relatados. Onde a degradação resulta da superposição tempo-temperatura (BASTIOLI, 2005).

A composição química do polímero é, no entanto outro aspecto fundamental visto que a química do polímero governa suas propriedades químicas e físicas e sua interação com o ambiente biológico. A acessibilidade do polímero para veiculação hídrica de sistemas enzimáticos é de suma importância no que tange a biodegradação, visto que enzimas extracelulares degradam o polímero em produtos pequenos o suficiente para serem assimilados. Também o estado físico do material e a superfície oferecida para o ataque enzimático. Outro fator não menos importante é a natureza hidrofílica (molhabilidade) e cristalinidade do polímero. A natureza semicristalina tende a limitar a acessibilidade e efetivamente limitar a degradação às regiões amorfas do polímero (LYU e UNTEREKER, 2009).

As propriedades químicas que são importantes incluem ligações químicas na cadeia principal do polímero e os grupos funcionais (sua posição e atividade química). Ligações envolvendo hetero átomos na cadeia principal são consideradas suscetíveis à degradação enzimática (com exceção das poliamidas, poliésteres aromáticos dentre outros). Ligações amida, éster, uréia e uretana contêm ligações

hidrolisáveis que podem ser degradados por microrganismos e enzimas hidrolíticas. Dessa forma, a presença de tais grupos funcionais aumenta a biodegradabilidade do polímero. Além disso, enzimas proteolíticas agem na hidrólise de ligações peptídicas adjacentes as substituintes em proteínas. Substituintes estes que quando contêm benzil, hidroxila, carboxila, metila e grupos fenila aumenta a biodegradação (OREFICE et al., 2006).

A estereoquímica das unidades de monômero na cadeia polimérica também influencia as taxas de biodegradação uma vez que uma propriedade inerente de muitas enzimas é sua seletividade estereoquímica (FLEURI et al., 2009).

A distribuição de peso molecular do polímero pode ter um efeito enorme sobre as taxas de despolimerização. Além disso, interações com outros polímeros também afetam a biodegradação. Estes materiais adicionais podem agir como barreiras impedindo a migração de microrganismos, enzima, e ou oxigênio para o interior do polímero.

### 3.6 MEMBRANAS POLIMÉRICAS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Em regiões onde o defeito ósseo está em íntimo contato com tecido conjuntivo, a principal dificuldade para a regeneração óssea (na área de defeito) consiste no fato de que o tecido conjuntivo fibroso tem formação mais rápida que a osteogênese, invadindo a região da falha óssea e preenchendo-a com tecido fibroso (CAFFESSE et al., 1990).

Dessa Forma, a técnica de regeneração óssea guiada tem como princípio a exclusão de células do tecido conjuntivo fibroso do defeito ósseo possibilitando a criação de um espaço (preenchido pelo coágulo sanguíneo) onde será formada matriz óssea.

Segundo Hardwick et al (1995) o princípio da exclusão é apenas um dentre os vários fatores envolvidos no processo de regeneração óssea. Além da exclusão de tecido conjuntivo fibroso deve haver também ausência de inflamação decorrente de infecção bacteriana, estabilidade, criação e manutenção de espaço preenchido por coágulo sanguíneo (SCHENK et al., 1994).

Para a exclusão de tecido conjuntivo têm se usado as membranas de regeneração óssea guiada. A literatura reporta que as características ideais para este fim seriam biocompatibilidade, exclusão celular, manutenção de espaço,

integração nos tecidos e manuseio clínico satisfatório (SCANTLEBURY, 1993). Mais recentemente Tatakis et al. (1999) incluíram também atividade biológica.

A aplicação como membranas na regeneração óssea guiada exige características mecânicas ou estruturais que permitam que a membrana suporte forças exercidas pela tensão dos retalhos ou decorrentes da mastigação, prevenindo o colapso da mesma sobre o defeito, reduzindo o espaço da ferida.

Por outro lado, a formação óssea requer dois fatores individuais: amplo suporte sanguíneo e suporte mecânico. Os osteoblastos (células formadoras de matriz óssea) produzem matriz óssea apenas nas proximidades dos vasos sanguíneos. Sendo uma característica desejável as membranas estimularem de algum modo a angiogênese (SCHMID et al., 1997).

Estas membranas ainda devem ter uma facilidade de manuseio podendo ser recortadas para moldar-se ao contorno do tecido ósseo e não apresentar características de memória que as façam retornar à forma original.

O primeiro estudo em animais, com o objetivo de avaliar a possibilidade da regeneração óssea guiada foi conduzido por Dahlin et al. (1988). Defeitos ósseos do tipo "lado a lado" com 5 mm de diâmetro, no ângulo da mandíbula de ratos recobertos com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) tiveram completo preenchimento ósseo no lado teste após 6 semanas. No lado controle, nenhum preenchimento ósseo foi observado.

Desde então, muitos estudos foram direcionados a estas membranas e, com o objetivo de verificar se o princípio da ROG poderia ser aplicado também em animais de maior porte, e possivelmente, com menor atividade osteogênica, e visando a resolução de um problema com importância clínica, Dahlin et al. (1990) simularam defeitos ósseos periapicais em incisivos laterais superiores em macacos. A análise histológica, após três meses, mostrou preenchimento ósseo quase que completo nos defeitos recobertos com membranas de PTFE-e presença de tecido conjuntivo fibroso no lado controle.

A sequência da neoformação óssea em defeitos protegidos por membranas em cães foi caracterizada por Schenk et al. (1994). Após quatro meses da exodontia dos pré-molares inferiores, dois defeitos ósseos regulares foram criados em cada lado da mandíbula. No grupo controle, houve apenas diminuição nas dimensões do tamanho do defeito. No grupo teste, a neoformação óssea iniciou-se nas superfícies ósseas expostas, em direção ao centro de defeito, mas aos 4 meses, não estava

completa. A membrana com reforço de titânio manteve sua forma, enquanto a membrana de PTFE-e sem reforço colapsou parcialmente.

Estes estudos demonstram que apesar de a regeneração óssea guiada ser uma realidade a escolha do material para sua composição está ainda longe de ser o ideal. Ora por não serem reabsorvíveis necessitando de um segundo tempo cirúrgico (causando desconforto ao paciente e uma reabsorção parcial do osso neoformado), ora por não serem capazes de, por si só, manterem características de estabilidade mecânica tendo uma falha prematura do material, colapso da membrana ou uma não formação óssea nas regiões de colapso devido à inflamação subsequente a tal processo (RASMUSSEN, 1997).

Com a finalidade de melhorar a estabilidade as membranas de PTFE-e para ROG estas começaram a ser fabricadas experimentalmente com duas configurações diferentes numa mesma membrana, a estrutura do PTFE-e apresentando porosidade entre 5 e 10mm em sua porção mais central, sendo oclusiva à penetração de células do tecido conjuntivo. A porção mais periférica apresentando uma micro-estrutura mais aberta, permitindo o crescimento de células do tecido conjuntivo, garantindo a estabilidade da membrana (SIMIONE et al, 1990).

Simione et al. (1990), ao tentarem em cães 3 tipos de membranas de PTFE-e com microestruturas diferentes, observaram que melhores resultados foram obtidos com membranas que apresentavam a porção periférica com microestrutura aberta (poros entre 20 a 25mm) e a porção central totalmente oclusiva. Apesar da resposta biológica mais satisfatória, a remoção da membrana após 6 meses foi extremamente difícil. Por este motivo, os autores sugeriram que tais características sejam aplicadas apenas a membranas reabsorvíveis.

Estes estudos deixam claro que o ideal seria que estas membranas não precisassem ser removidas e assim membranas reabsorvíveis começaram a ser pesquisadas. As membranas compostas de ácido polilático e poliglicólico são atualmente as membranas para ROG mais utilizadas na odontologia, sendo alvo de inúmeras pesquisas.

Membranas reabsorvíveis com várias concentrações de ácido polilático e poliglicólico foram comparadas a membranas de PTFE-e, em defeitos de tamanho crítico em mandíbulas de ratos. Após períodos de reparação de 1 a 12 semanas, as barreiras reabsorvíveis foram bem toleradas pelos tecidos, e ambos os tipos foram igualmente eficazes na regeneração óssea (SANDBERG et al. 1993). Estes mesmos

resultados foram encontrados por Piattelli et al. (1996) e Lundgren et al. (1997), ao avaliarem a regeneração óssea sob membranas reabsorvíveis de ácido polilático e sob membranas não reabsorvíveis de PTFE-e, em tibia de coelhos.

Superioridade da membrana não reabsorvível, com maior quantidade de tecido ósseo regenerado, foi observada por Hüzeler et al. (1997), McGinnis et al. (1998), Kohal et al (1999) sendo esta diferença de neoformação óssea atribuída a uma falta de uniformidade do tempo funcional das membranas reabsorvíveis.

Membranas reabsorvíveis também foram empregadas para ROG em humanos. Em relatos de casos, utilizando membranas reabsorvíveis de ácido polilático e ácido polilático/ácido poliglicólico, respectivamente, Lundgren et al. (1994) e Mayfield et al. (1997) verificaram que ambos os tipos de membranas promoveram neoformação óssea ao redor de implantes com deiscências ou fenestrações. Simione et al. (1996), comparando a regeneração óssea ao redor de implantes osseointegrados, em humanos, empregando-se membranas de PTFE-e e membranas de ácido polilático/ácido poliglicólico, puderam concluir que ambas as membranas levaram à neoformação óssea, sendo que as membranas não reabsorvíveis proporcionaram maior formação óssea que membranas reabsorvíveis.

Relato da superioridade de formação óssea no uso das membranas reabsorvíveis foi relatado e atribuído ao fato de que, superados os tempos iniciais de pesquisa com as membranas reabsorvíveis, (onde a espessura de tais membranas teve de ser ajustada à demanda de forças na região alveolar) estas membranas mantêm sua integridade, estrutura e suas características pelo tempo necessário à neoformação óssea (TATAKIS et al, 1999).

Nas membranas reabsorvíveis (biodegradáveis) têm-se, após um tempo inicial, a perda das propriedades mecânicas desejáveis iniciando a despolimerização de suas cadeias. Se este tempo inicial, até que se perca a estabilidade mecânica destas membranas, não for suficientemente longo para que haja a neoformação óssea esta terá sua finalidade frustrada. Estudos estão sendo feitos a fim de se estabelecer uma melhor compreensão do tempo de biodegradação destes materiais de modo a fazer ajustes e melhorar seu desempenho (PARK et al, 2003, BASTIOLI, 2005; LYU e UNTEREKER, 2009).

Porém, se a biodegradação ocorrer em tempo favorável e ainda ser meio de liberação de substâncias osteoindutoras esta biodegradação tornaria-se ainda mais

vantajosa. E é isso que promete a nova geração de membranas para regeneração óssea guiada, onde a quitosana tem tido especial destaque (WELING et al, 2005).

Recentemente, pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais capazes de serem associados a outras substâncias que favoreçam a formação óssea, especialmente os biopolímeros naturais, em particular a quitosana, que pode apresentar potencial na reparação de defeitos ósseos, a despeito das limitações de outros biomateriais (PARK et al, 2003; FILHO et al, 2007).

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina (termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento), e que designa um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente (SENEL; McCLURE, 2004).

A quitosana normalmente é insolúvel em soluções aquosas, com pH superior a 7. Entretanto, em ácidos, os grupos amino livres são protonados e a molécula torna-se altamente solúvel em pH ácido (OKAMATO et al., 1995).

A solubilidade da quitosana estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entra as cadeias e também maior a sua solvatação em água (SANTOS et al., 2003).

A dissolução da quitosana dá origem a géis, que podem ser utilizados diretamente ou transformados em outros materiais na tentativa de utilização como biomateriais. A quitosana conjuga as propriedades de adsorção, permitindo que seja utilizada até mesmo em terapias genéticas, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da adsorção de partículas de origem alimentar (MOFFAT e COOKSON, 1999).

Biomateriais de quitosana também têm sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento. Também acelerariam a infiltração de linfócitos polimorfo nucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização. Quitosana fomenta o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente (UENO et al., 1999).

Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, característica extremamente importante especialmente nos estágios iniciais de formação óssea (MUZZARELLI, C. e MUZZARELLI, R. A., 2002).

Dados iniciais sugerem um período de degradação dependente do grau de acetilação de quitosana utilizada, fator que também interfere na resistência mecânica do biomaterial avaliado, e a possibilidade de associação de outras substâncias à quitosana nas membranas (ZHANG et al., 2007).

Uma das possibilidades mais promissoras dos biomateriais obtidos da quitosana é sua capacidade em formar estruturas porosas, contendo fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas ou fatores de crescimento vascular em sua composição, e que podem ser utilizados como moldes para crescimento celular, para posterior implantação em defeitos extensos (MADHALLY e MATHEW, 1999; ZHANG et al., 2006).

Recentemente, hidrogéis de quitosana foram utilizados como carreadores para proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-2) e implantados em defeitos ósseos críticos criados na calvária de ratos. Proporcionando regeneração tecidual otimizada, quando compara ao uso dessas proteínas isoladamente (ISSA et al., 2007).

Porém, o grande problema que existe quando se pretende aplicar a quitosana em regiões com comprometimento sistêmico, tais como defeitos ósseos críticos, é o fato de sua esterilização se tornar necessária. Métodos comuns para esterilização de produtos médicos e farmacêuticos incluem a exposição ao calor seco, vapor pressurizado, óxido de etileno e radiação gama. Antes de qualquer um desses métodos serem considerados como método de escolha para esterilização dos biomateriais da quitosana, seus efeitos sobre as propriedades do polímero devem ser mais bem estudados. Isso traz à tona alguns problemas deste biomaterial, que, quando exposto a temperaturas maiores que 120°C, sofre alterações em seu grau de solubilidade, aparência e estrutura física, e quando exposto à radiação gama, sofre fissuras e um decréscimo de viscosidade que é dose-dependente (LIM; KHOR, 1998) o que provavelmente irá alterar suas propriedades biológicas. Sendo a degradação deste polímero em diversas temperaturas muito relevante para sua utilização.

Portanto, do ponto de vista da aplicação clínica no estágio atual do desenvolvimento tecnológico da membrana biodegradável deve-se considerar a obtenção de membranas com cinética de degradação que inibam ou eliminem a invaginação de tecido conjuntivo durante o período de formação óssea considerando as alterações de temperatura produzidas pela inflamação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

A quitosana (CS) foi adquirida na forma de pó pela Polymar – Fortaleza/CE com grau de desacetilação de 90% e utilizada sem prévia purificação. O ácido acético glacial, fornecido pela Vetec, foi usado como solvente para a quitosana. Hidróxido de sódio, também fornecido pela Vetec, será usado para neutralizar o pH das membranas de quitosana. Para o ensaio de degradação enzimática foram utilizados a enzima lisozima e o tampão fosfato (PBS), obtidos da Sigma Aldrich Brasil Ltda.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparação da Membrana de Quitosana

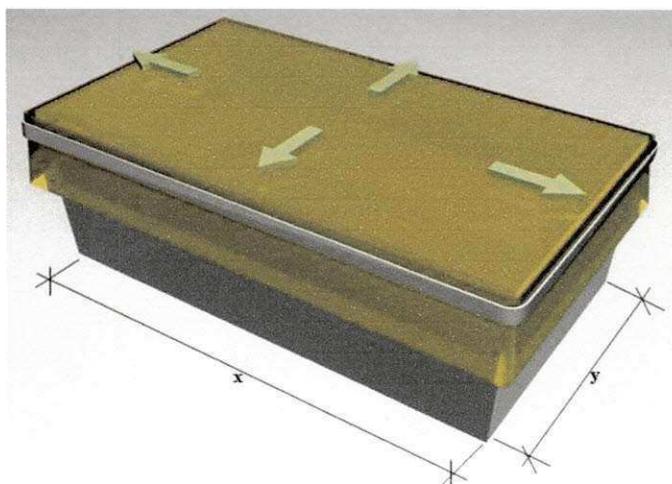
A preparação das membranas de quitosana foi conduzida conforme procedimento realizado pelo Grupo de Biomateriais da UFCG: uma solução de quitosana a 1% e 2% (m/v) foi preparada através de dissolução de 1,0 g de quitosana em 100 mL e 2,0 g de quitosana em pó uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial, sob agitação magnética a 45°C por 2h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remoção de material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de petri com diâmetros de 143,50 mm e acondicionado em estufa a 50°C por 20 h para evaporação do ácido e formação do filme. Após a secagem dos filmes, os mesmos foram retirados da estufa e 40 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 1 Mol/L foram adicionados, com o objetivo de assegurar a completa neutralização das membranas. Em seguida, os filmes foram lavados em água corrente para retirada da solução de hidróxido de sódio e posteriormente submersos em um recipiente com água destilada em quantidade e por um tempo suficiente para que a neutralização dos filmes seja atingida. Depois da neutralização dos filmes, os mesmos foram secos por 12h a temperatura ambiente.

#### 4.2.2 Processo de orientação molecular das membranas

Finalmente, os filmes são preparados para receberem o processo de orientação molecular. Serão preparados filmes com dois diferentes tipos de orientação em dispositivos desenvolvidos pelo Grupo de Biomateriais da UFCG.

As membranas produzidas serão submetidas à degradação em duas temperaturas de 38° e 45°C.

As membranas foram estiradas e orientadas, seguindo metodologia proposta por Ponciano (2010). Foram utilizados dispositivos de vidro retangulares com duas dimensões diferentes: Placa Grande: 98,83 mm x 58,19 mm e Placa Pequena: 100,65 mm x 48,77 mm. Em seguida as membranas foram secas por 24h a temperatura ambiente.



**Figura 2.** Esquema do dispositivo utilizado para a orientação preferencial das membranas de quitosana.

Fonte: Ponciano, 2010.

#### 4.2.3 Caracterização

Posteriormente, as membranas obtidas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas:

#### 4.2.3.1 Difração de Raios X

A difração de Raios X foi aplicada para comprovar a efetiva orientação do polímero, através da mudança do perfil organizacional das moléculas. As amostras foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular  $5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$ , na montagem de Bragg-Brentano, sistema  $\theta$ - $2\theta$ , utilizando-se radiação de Cu ( $K\alpha_1$ ) com varredura no passo de 0,02 ( $2\theta$ ), com intervalo de 0,5 segundo para cada amostra.

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

A espectroscopia na região do infravermelho foi aplicada para a identificação dos principais grupos funcionais presentes na quitosana, bem como identificar o processo de biodegradação das membranas, através de mudanças nos espectros. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier em um espectrômetro Spectrum 400 PerkinElmer (UAEMA/CCT/UFCG) e com varredura de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3.3 Ensaio de Biodegradação *in vitro*

O estudo da taxa de biodegradação dos filmes orientados foram realizados com a exposição dos filmes orientados e sem orientação em solução preparada de lisozima e PBS, com tempo de exposição de 30 e 45 dias, a 38 e 45°C, com atmosfera controlada.

A metodologia foi empregada com base na norma ASTM F1635-04 (*Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*). Os filmes foram cortados na dimensão de 1,5 x 2,5  $\text{cm}^2$ , pesadas em balança analítica e desinfetadas utilizando-se o etanol 70%. Os filmes foram colocados para biodegradar em uma solução de lisozima/PBS com concentração de 5g/L. As amostras foram incubadas por um período de 30 e 45 dias em estufa microbiológica à temperatura de 38, e 45°C.

#### 4.2.3.4 *Perda de Massa*

Ao final do experimento, as amostras foram lavadas com água destilada, secas em um intervalo de 5 a 8 minutos em estufa a 50°C e pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação enzimática dos filmes.

#### 4.2.3.5 *Tensão Superficial*

A energia superficial e o caráter hidrofílico/hidrofóbico foram avaliados pela medida da tensão superficial em equipamento desenvolvido e instalado no laboratório de caracterização da UAEMa/CCT/UFCG. A medida por ângulo de contato possui um grande potencial de aplicação. Ela pode ser mensurada em um nível macroscópico para caracterizar a molhabilidade média dos materiais.

#### 4.2.3.6 *Microscopia Ótica*

A microscopia ótica foi aplicada para uma visualização macroscópica das superfícies das membranas de quitosana, sem orientação e com orientação preferencial e não degradadas. Além disso, para visualização dos efeitos da biodegradação enzimática na superfície das membranas de quitosana, sem orientação e com orientação preferencial. As amostras foram caracterizadas em um Vídeo Microscópio Óptico (SHX- 13M) Hirox 05008 (UAEMa/CCT/UFCG).

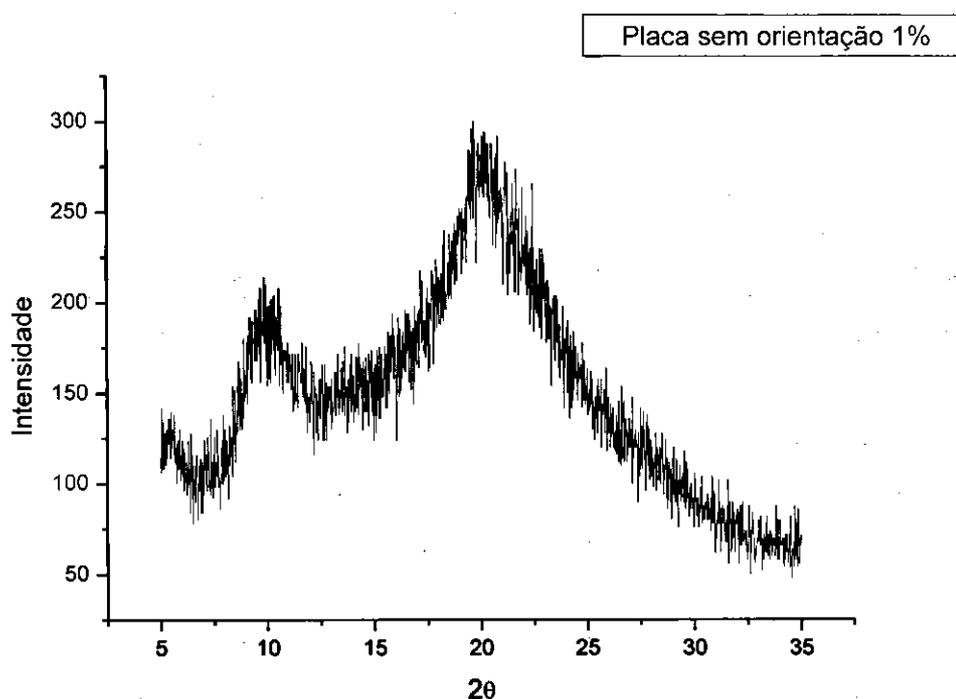
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para os ensaios de difração de Raios X, só foi possível submeter à análise as amostras que não foram submetidas ao processo de degradação enzimática, pois as mesmas foram degradadas numa condição que impossibilitou os ensaios.

#### 5.1.1 Membranas de quitosana não orientadas

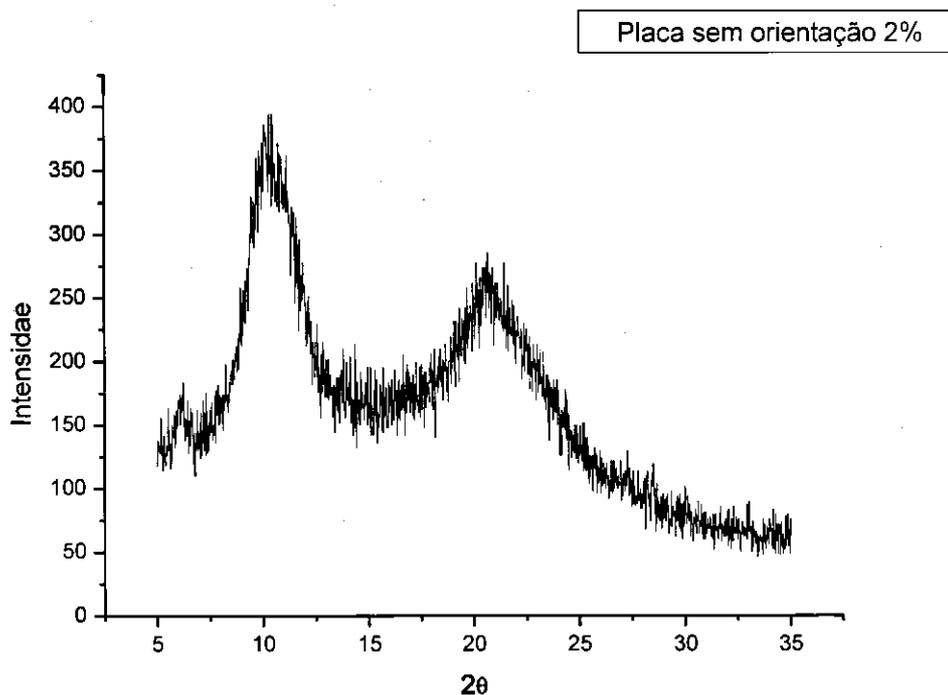
Os difratogramas de raios X obtidos das membranas de quitosana sem orientação preferencial, com concentração de 1% e 2% (m/v) estão apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.



**Figura 3.** Difratograma para membrana de quitosana a 1% sem orientação molecular preferencial.

Observando os resultados de DRX para a amostra processada sem orientação preferencial, com concentração de 1% (m/v), nota-se um perfil semicristalino, típico de materiais poliméricos, bem como, um perfil típico de

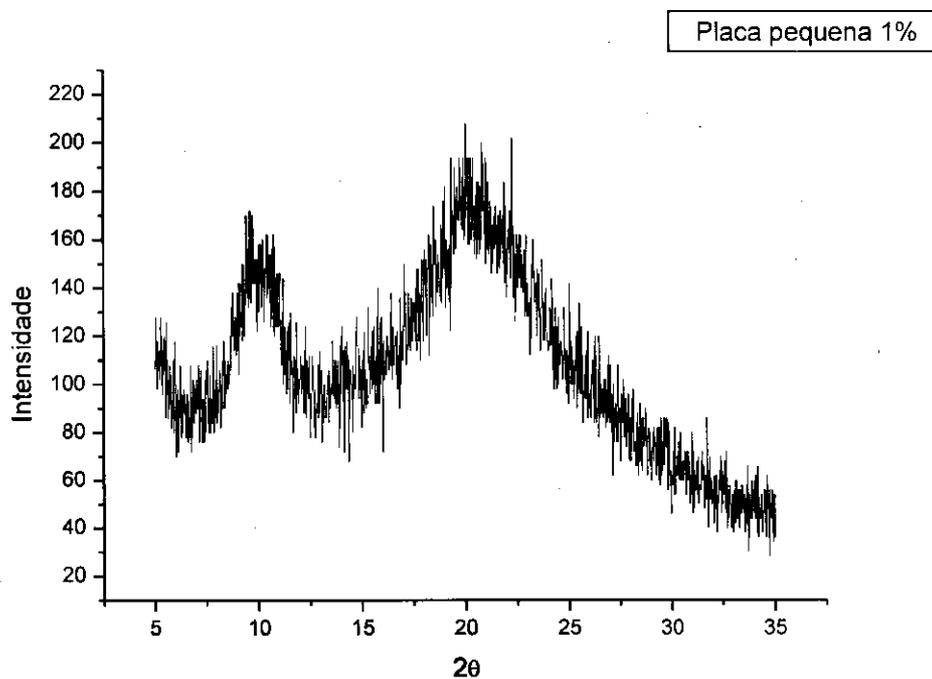
quitosana (FIDÉLES, 2010), com intensidade nas regiões de  $2\theta = 10^\circ$  (fase orientada) e  $2\theta = 20^\circ$  (fase amorfa). Observa-se ainda que a intensidade relativa à fase amorfa é maior que a cristalina.



**Figura 4.** Difratograma para membrana de quitosana a 2% sem orientação molecular preferencial.

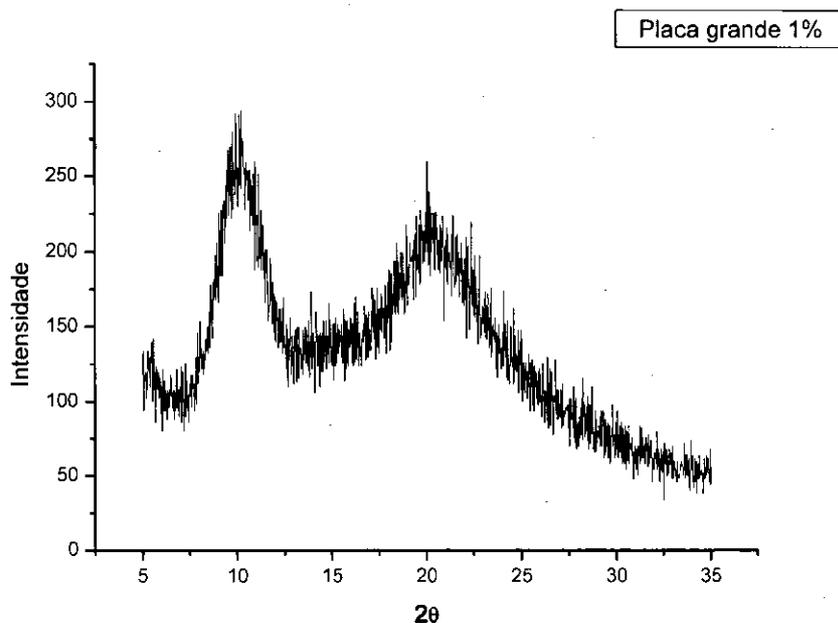
Observado o resultado para as amostras sem orientação preferencial, com concentração de 2% (m/v), observa-se que, quando comparado às amostras preparadas a 1%, o pico localizado na região  $2\theta = 10^\circ$  se apresenta com maior intensidade, enquanto que o pico localizado na região  $2\theta = 20^\circ$  se mostrou menos intenso. Constata-se em ambos os casos a manutenção do caráter amorfo dos filmes obtidos.

## 5.1.2 Membranas com orientação preferencial a 1%



**Figura 5.** Difratograma para membrana de quitosana a 1% com orientação molecular preferencial (placa pequena).

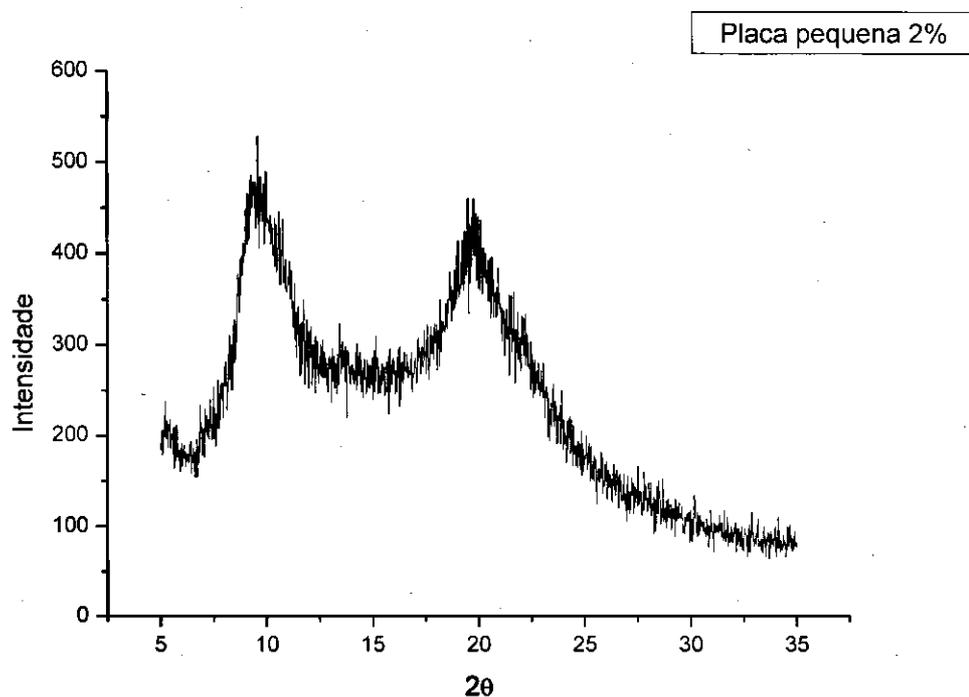
Analisando os resultados por difração de raios X para a amostra submetida ao processo de orientação molecular preferencial, na placa pequena, pode-se observar que o processo de orientação modificou sutilmente o difratograma quando comparado com a amostra sem orientação preferencial ocorrendo uma diminuição na intensidade na região localizada em  $2\theta = 20^\circ$ .



**Figura 6.** Difratograma para membrana de quitosana a 1% com orientação molecular preferencial (placa grande).

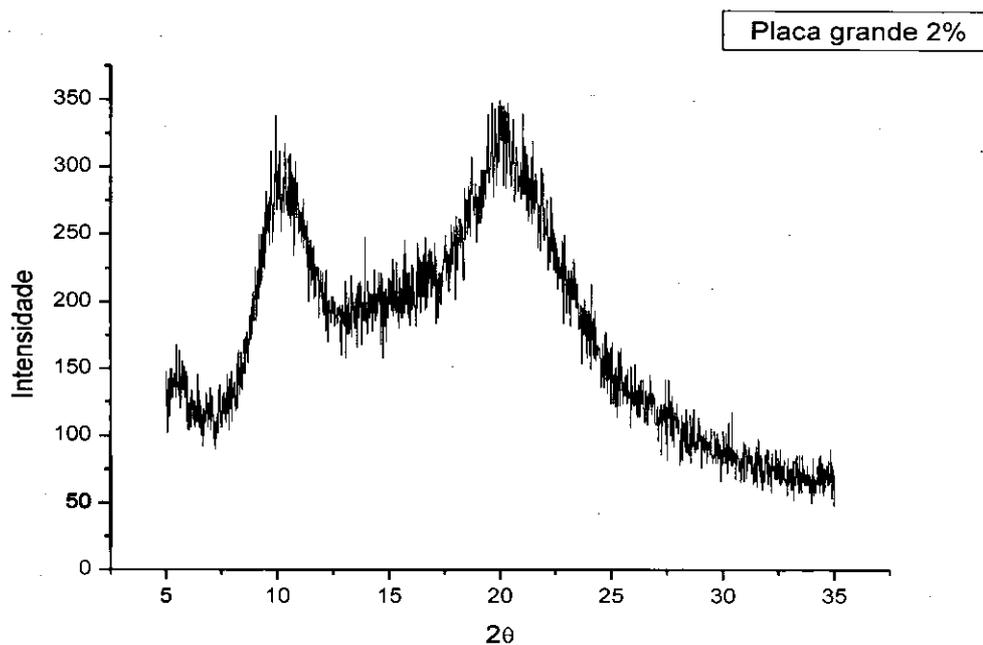
Observando os resultados do DRX para a amostra com orientação preferencial realizada na placa Y. Observa-se um aumento de intensidade na região de  $2\theta = 10^\circ$  (fase cristalina). Com isso, pode-se constatar um aumento na cristalinidade nas duas condições, comportamento esse esperado no processo de orientação.

### 5.1.3 Membranas de quitosana com concentração 2% (m/v)



**Figura 7.** Difratograma para membrana de quitosana a 2% com orientação molecular preferencial (placa pequena).

Observando os resultados para a amostra preparada com orientação na placa X, observa-se que o processo de orientação molecular aumentou a intensidade não só na região relativa a  $2\theta = 10^\circ$ , mas também na região de  $2\theta = 20^\circ$ .



**Figura 8.** Difratograma para membrana de quitosana a 2% com orientação molecular preferencial (placa grande).

Observando os resultados de DRX para a amostra preparada com orientação molecular preferencial, nota-se que a intensidade relativa à região  $2\theta = 10^\circ$  baixou um pouco em relação à amostra preparada sem orientação preferencial e com orientação preferencial (placa X). Contudo, o pico relativo a região  $2\theta = 20^\circ$  aumentou quando comparado com a amostra sem orientação e se manteve com o mesmo valor encontrado com a amostra preparada na placa X.

## 5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

### 5.2.1 Membranas de quitosana não degradadas

Os resultados obtidos por espectroscopia na região do infravermelho, para as amostras com concentração 1% (m/v) e 2% (m/v), sem orientação preferencial e com orientação preferencial, não degradadas, estão ilustrados, nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

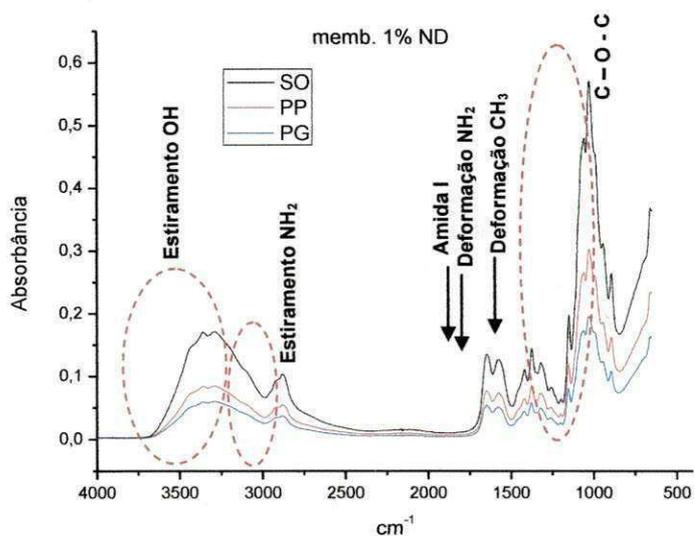


Figura 9. FTIR para membranas de quitosana não degradadas, a 1%.

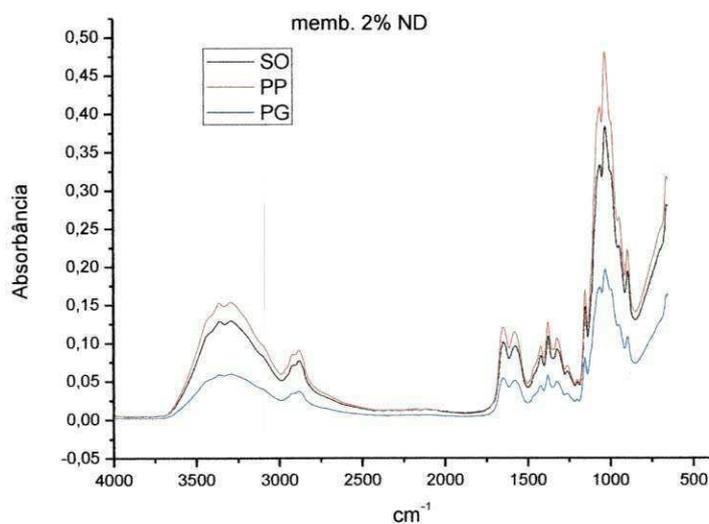


Figura 10. FTIR para membranas de quitosana não degradadas, a 2%.

Observando ambos os espectros de FTIR para os filmes de quitosana, não orientados e orientados, sem degradação enzimática, nota-se na região entre 1500 e 2000  $\text{cm}^{-1}$ , absorções típicas da quitosana, como absorções relativas à Amida I, relativo ao grupamento acetamida, comprovando que a quitosana não é 100% desacetilada, deformações relativas à  $\text{NH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Além disso, possuem ainda, na região de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações da ligação C – O – C, que caracterizam o anel polimérico. Nas regiões entre 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , apresentam estiramento OH, com a presença de um ombro entre 2900 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , relativo ao estiramento  $\text{NH}_2$ . Essas absorções são formadas devido às pontes de hidrogênio presentes entre as cadeias poliméricas.

## 5.2.2 Membranas de quitosana degradadas

### 5.2.2.1 Concentração 1%

Os resultados de infravermelho para as membranas de quitosana, com 1% e 2%, sem orientação e com orientação preferencial, submetidas à degradação enzimática por 30 e 45 dias e a Temperaturas de 38 e 45°C estão ilustrados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

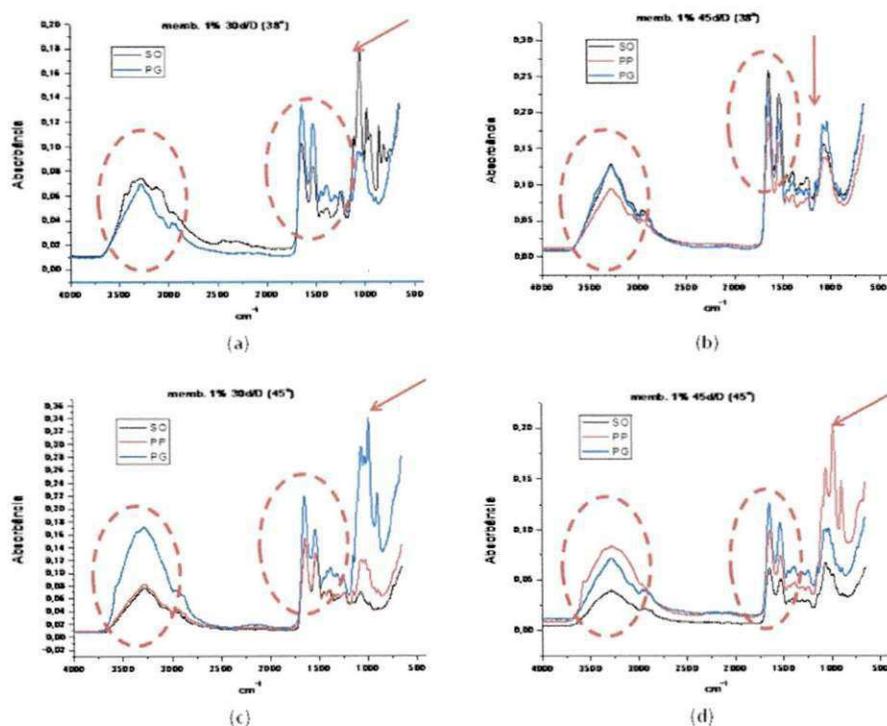


Figura 11. FTIR das membranas de quitosana degradadas

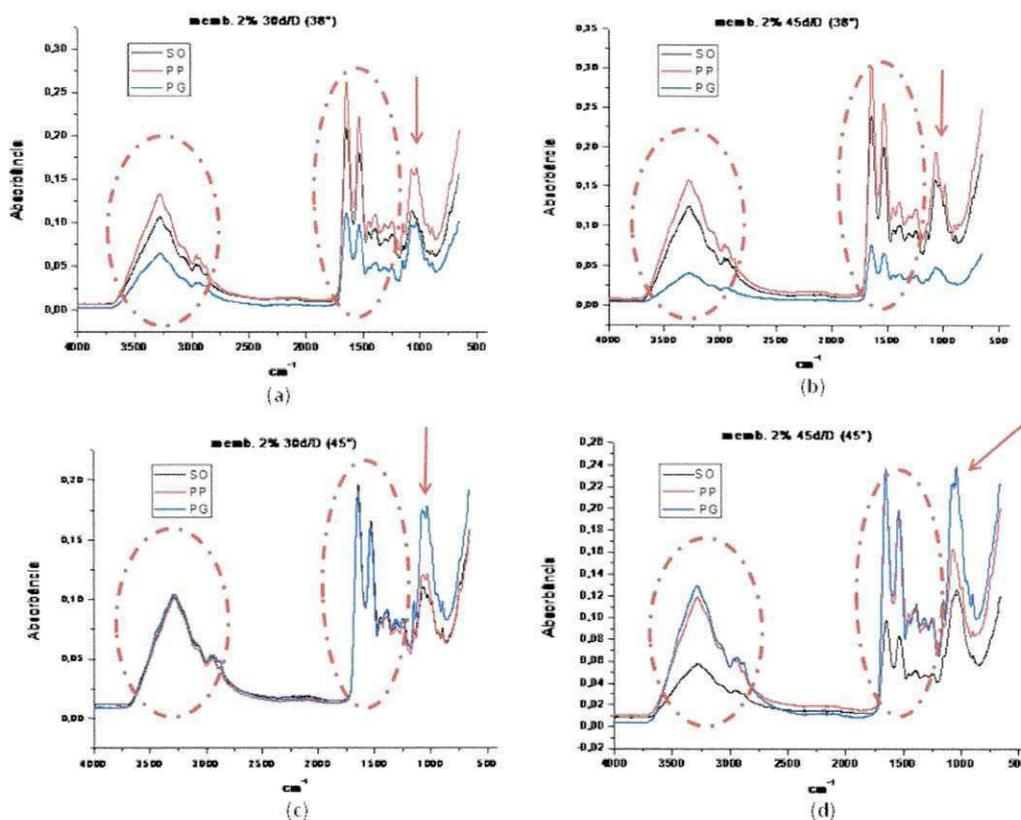


Figura 121. FTIR das membranas de quitosana degradadas

Observando os resultados de FTIR para as amostras preparadas com 1% e 2%, submetidas ao processo de biodegradação enzimática, a temperaturas de 38° e 45 °C, por 30 e 45 dias, observa-se que houve um comportamento constante ao longo dos gráficos. Observa-se também que não houve mudanças significativas nos perfis de espectros obtidos, mesmo variando o tempo e a temperatura no processo. Na região característica das vibrações C – O – C, localizada na região de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , percebe-se que após o processo de biodegradação houve uma diminuição na intensidade das absorbâncias, indicando que, provavelmente, ocorreu neste processo uma despolimerização. As absorções referentes a deformação  $\text{NH}_2$  e amida I, localizadas entre 1500 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  sofreram um aumento na intensidade.

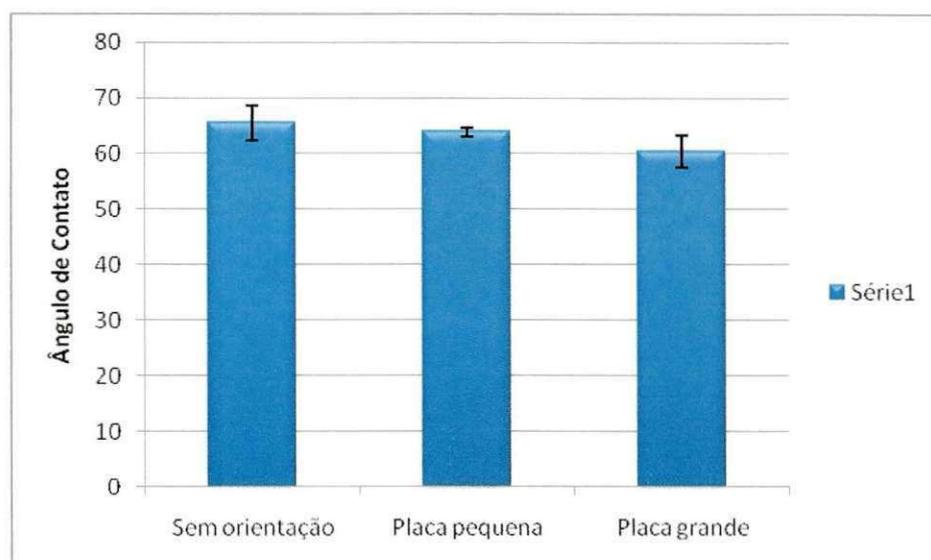
### 5.3 TENSÃO SUPERFICIAL

Foi utilizada a técnica da medida do ângulo de contato visando analisar o grau de hidrofobicidade das membranas. Foram realizados ensaios apenas para as membranas com concentração de 1% e 2% não submetidas ao processo de

biodegradação enzimática, devido as amostras submetidas à biodegradação se encontraram quase que 100% deterioradas, impossibilitando assim as análises.

### 5.3.1 Ângulo de contato para membranas com concentração 1%

Os resultados das medidas de ângulo para as membranas com concentração de 1% (m/v), não orientadas e orientadas, estão ilustrados na Figura 13.

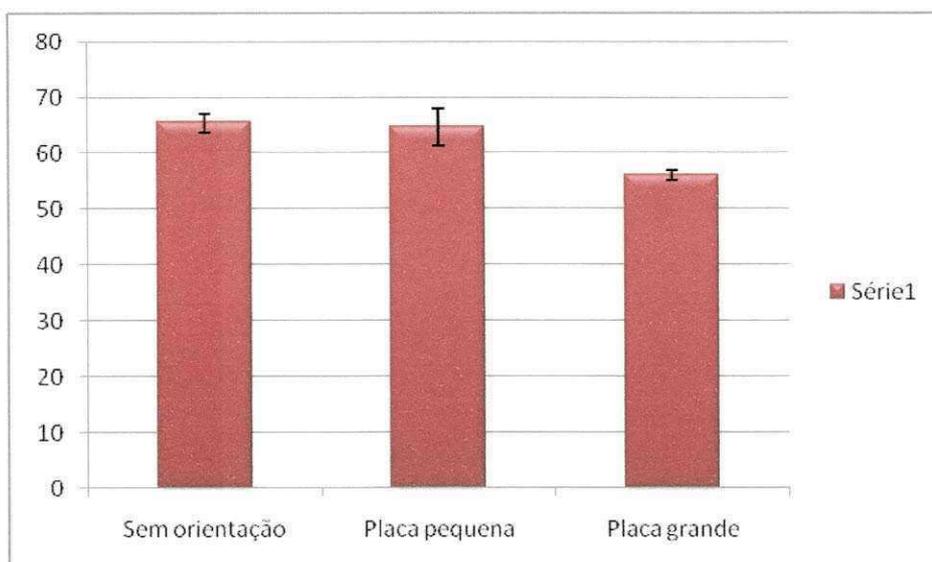


**Figura 13.** Medidas de ângulo de contato para membranas não orientadas e orientadas, com 1% (m/v).

Observando os resultados das análises de ângulo de contato para as membranas de quitosana de concentração de 1% (m/v), que estão ilustrados na Figura 13, pode-se notar que não houve diferenças significativas entre as medidas, mesmo para as medidas das membranas submetidas aos processos de orientação preferencial.

### 5.3.2 Ângulo de contato para as membranas com concentração 2%

Os resultados das medidas de ângulo para as membranas com concentração de 2% (m/v), não orientadas e orientadas, estão ilustrados na Figura 14.



**Figura 14.** Medidas de ângulo de contato para membranas não orientadas e orientadas, com 2% (m/v).

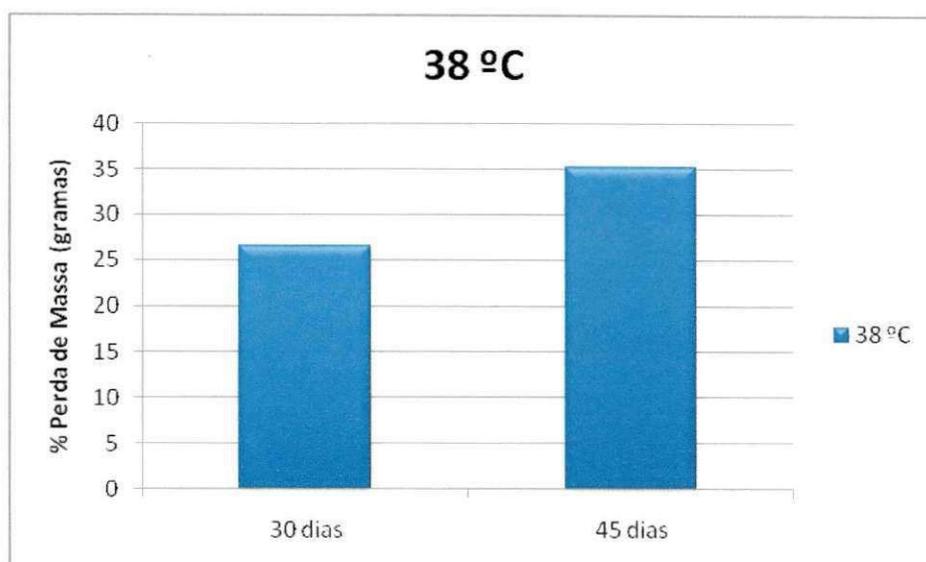
Observando os resultados das análises de ângulo de contato para as membranas de quitosana de concentração 2% (m/v), que estão ilustrados na Figura 14, nota-se que a membrana submetida ao processo de orientação preferencial na placa grande apresentou valores menores de ângulo de contato. Os valores obtidos para as membranas sem orientação preferencial e a membrana orientada na placa pequena não apresentaram diferenças significativas.

#### 5.4 BIODEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

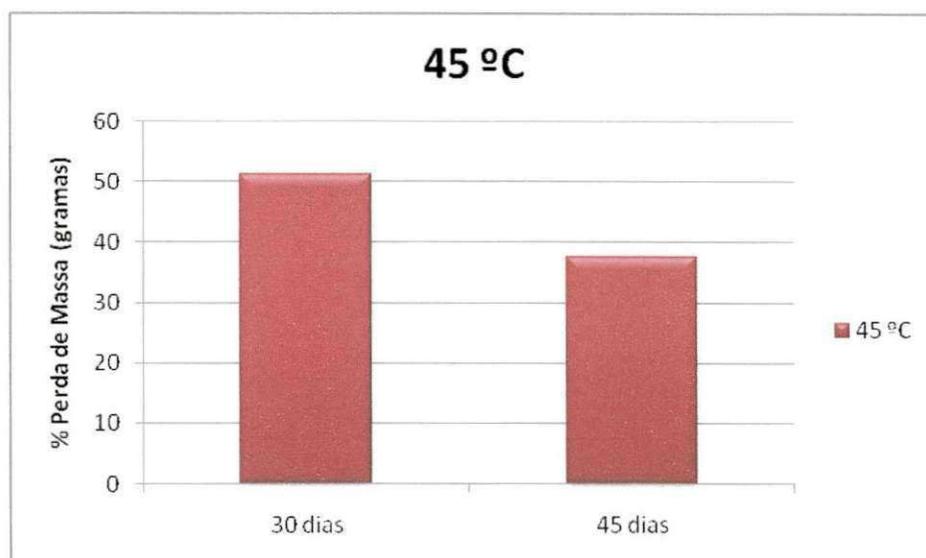
Os resultados obtidos com os ensaios de biodegradação enzimática realizados após os períodos de 30 e 45 dias, sob temperaturas de 38° e 45°C, respectivamente, foram mensurados não apenas com ensaios físico-químicos, mas também com relação à perda de massa das membranas ao longo do processo de biodegradação.

##### 5.4.1 Perdas de Massa para membranas de quitosana a 1% (m/v)

Os resultados para os cálculos de perda de massa para as membranas de quitosana com concentração de 1% (m/v), sem orientação e com orientação preferencial, após o processo de biodegradação, estão ilustrados nas Figuras 15 a 18, respectivamente.



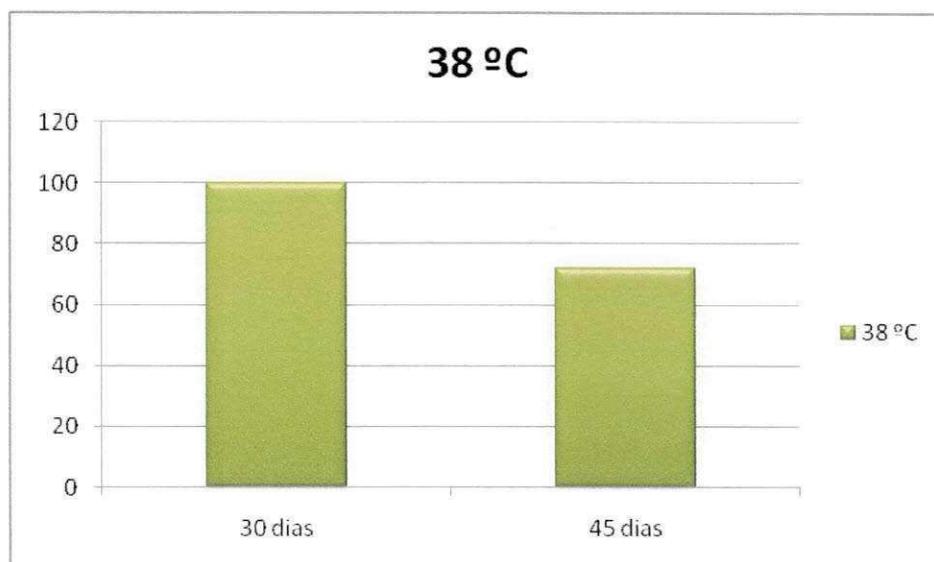
**Figura 15.** Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 38°C.



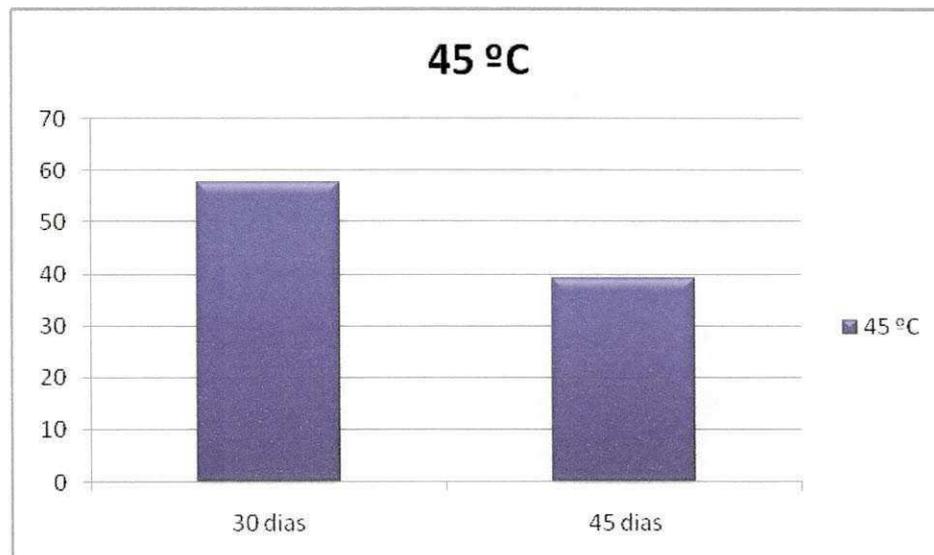
**Figura 26.** Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 45°C.

Observando os resultados de perda de massa para as membranas de quitosana com concentração de 1% (m/v) e sem orientação preferencial, nota-se que, para as temperaturas de 38°C, o percentual de perda de massa se apresentou maior nas amostras que ficaram por 45 dias expostas ao meio enzimático. Este comportamento era esperado, já que mais dias em contato com o substrato, maior seria a ação da enzima. Contudo, ao observar os resultados para as membranas submetidas ao processo de biodegradação a 45°C, as amostras expostas por 45

dias mantiveram a percentagem de perda de massa praticamente a mesma que a 38°C. Entretanto, as amostras expostas a 30 dias, a percentagem de perda de massa praticamente dobrou.



**Figura 17.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 38°C.

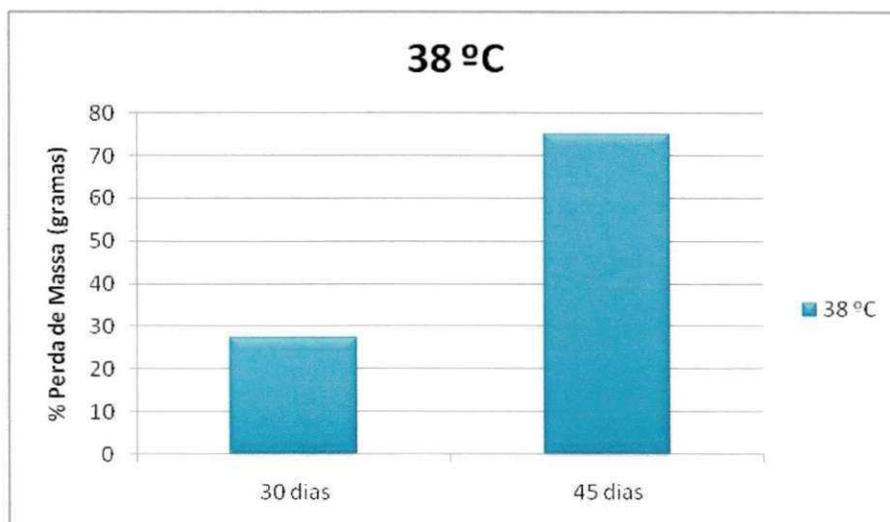


**Figura 18.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 45°C.

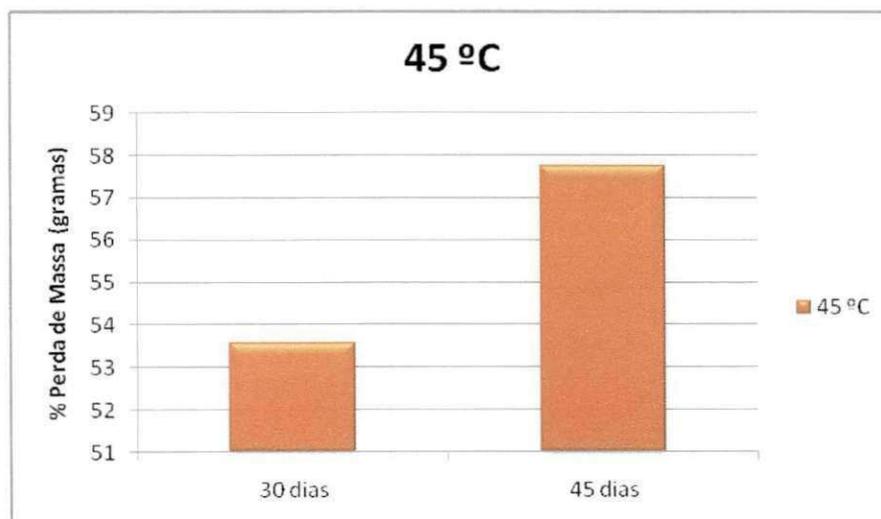
Observando os resultados das perdas de massa para as membranas de quitosana submetidos ao processo de orientação preferencial nas placas pequenas, nota-se que para as duas faixas de temperaturas estudadas, o percentual de perda de massa foi praticamente o mesmo, com as membranas expostas por 30 dias ao meio enzimático apresentando um maior percentual.

#### 5.4.2 Perdas de Massa para membranas de quitosana a 2% (m/v)

Os resultados para os cálculos de perda de massa para as membranas de quitosana com concentração de 2% (m/v), sem orientação e com orientação preferencial, após o processo de biodegradação, estão ilustrados nas Figuras 19 a 24, respectivamente.



**Figura 19.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa grande à temperatura de 38°C.



**Figura 20.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa grande à temperatura de 45°C.

Os resultados de perda de massa para as membranas orientadas nas placas grandes apresentaram um efeito contrário ao que ocorreu com as placas pequenas,

para as duas faixas de temperatura estudadas. O maior percentual de perda de massa apresentado foi para as amostras expostas ao meio enzimático por 45 dias.

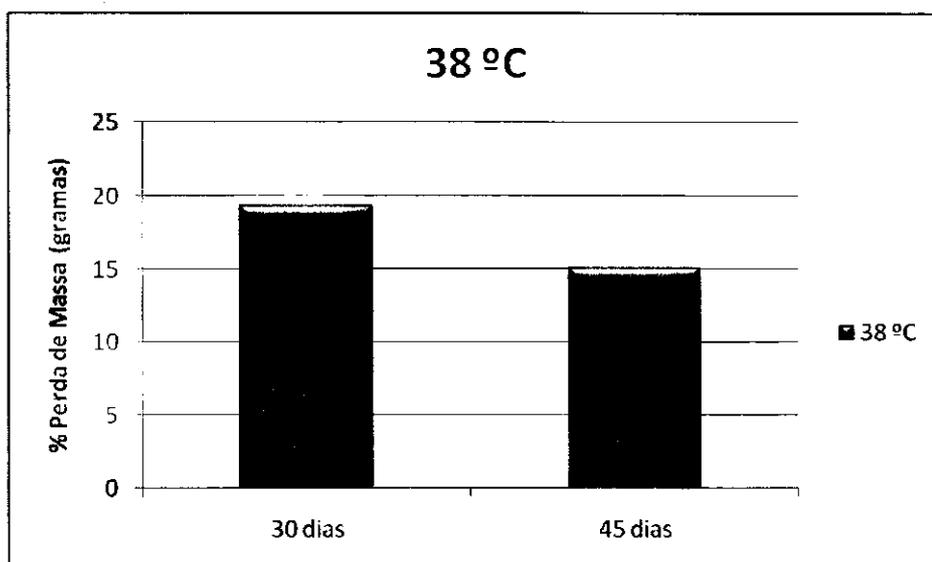


Figura 21. Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 38°C.

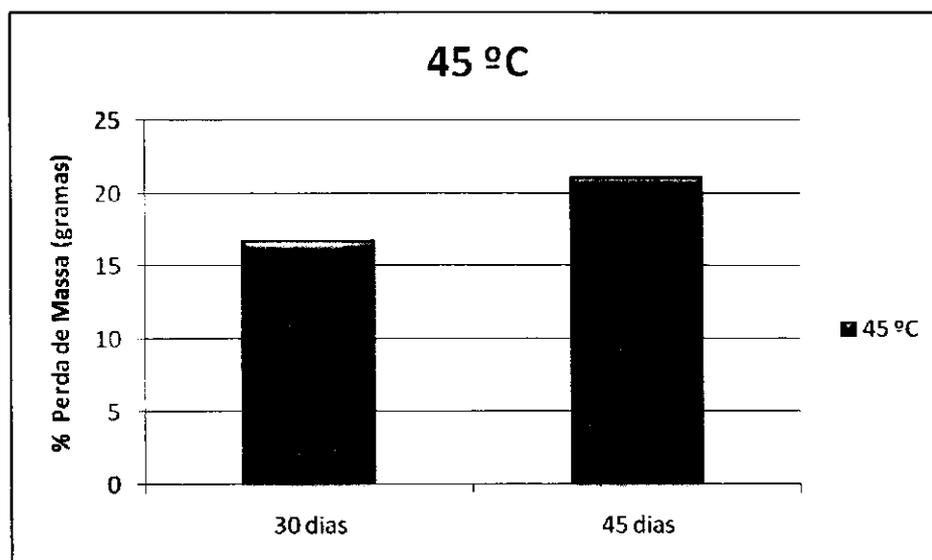
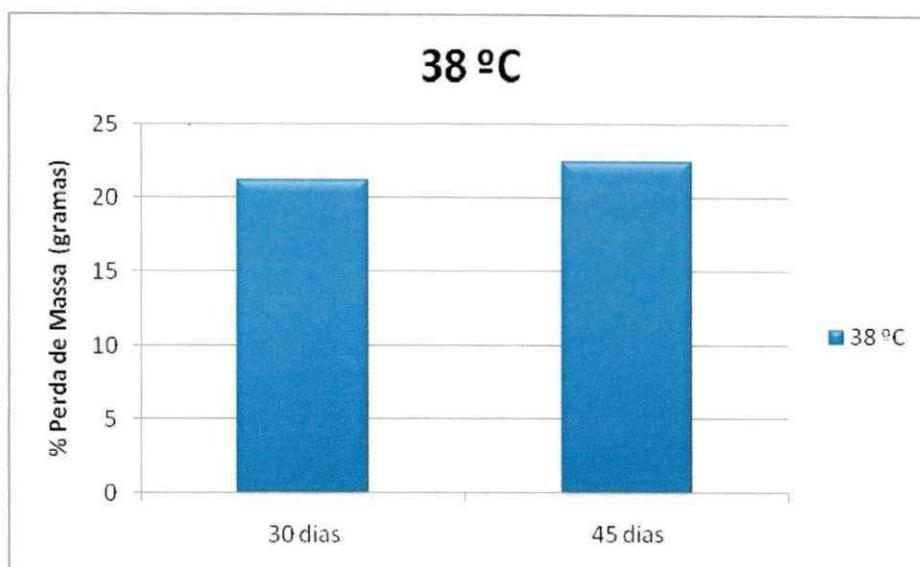
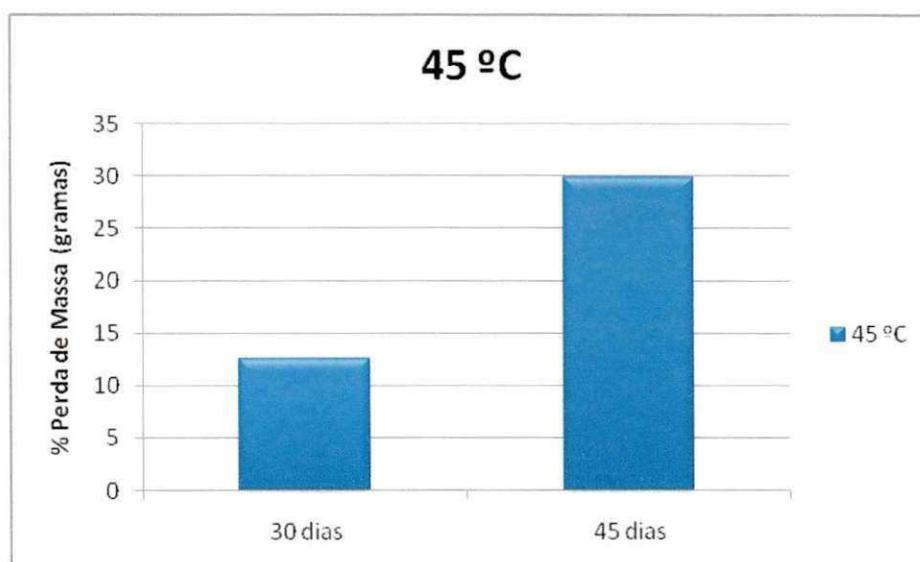


Figura 22. Porcentagem de perda de massa das amostras sem orientação preferencial à temperatura de 45°C.

Observando os resultados de perda de massa para as membranas com concentração de 2% (m/v), sem orientação preferencial, nota-se que para a temperatura de 38°C, o percentual de perda de massa para as amostras expostas por 30 dias ao meio enzimático, foi maior, enquanto que, para a temperatura de 45°C, as amostras com 45 dias de exposição apresentaram um maior percentual de perda de massa.



**Figura 33.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 38°C.

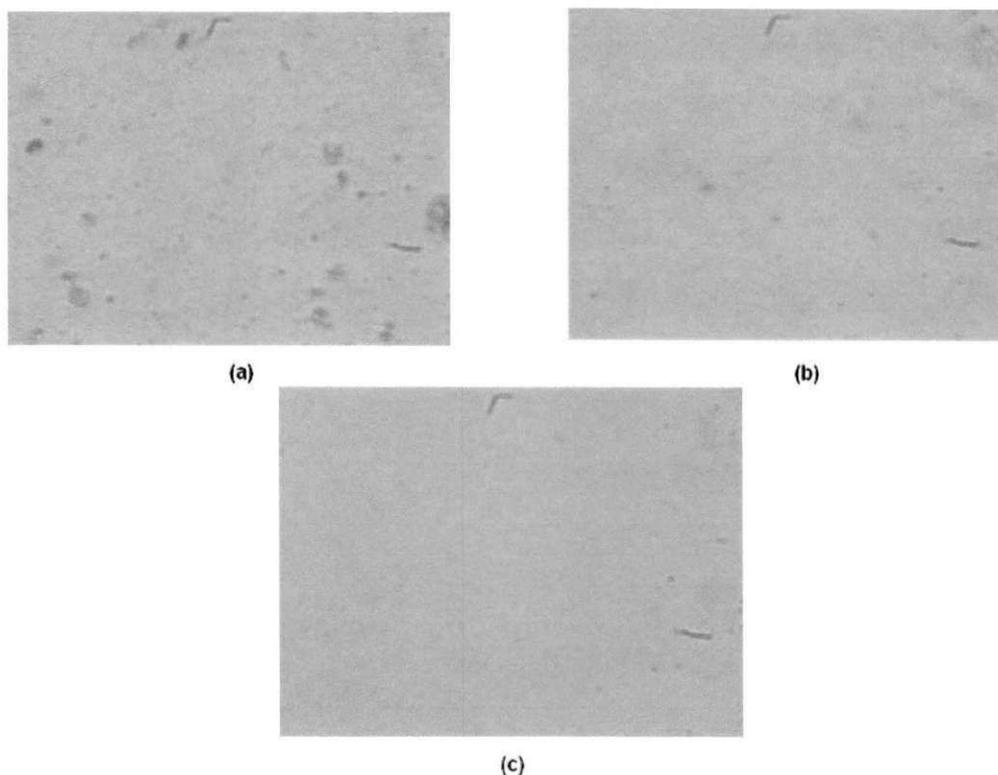


**Figura 4.** Porcentagem de perda de massa das amostras com orientação preferencial na placa pequena à temperatura de 45°C.

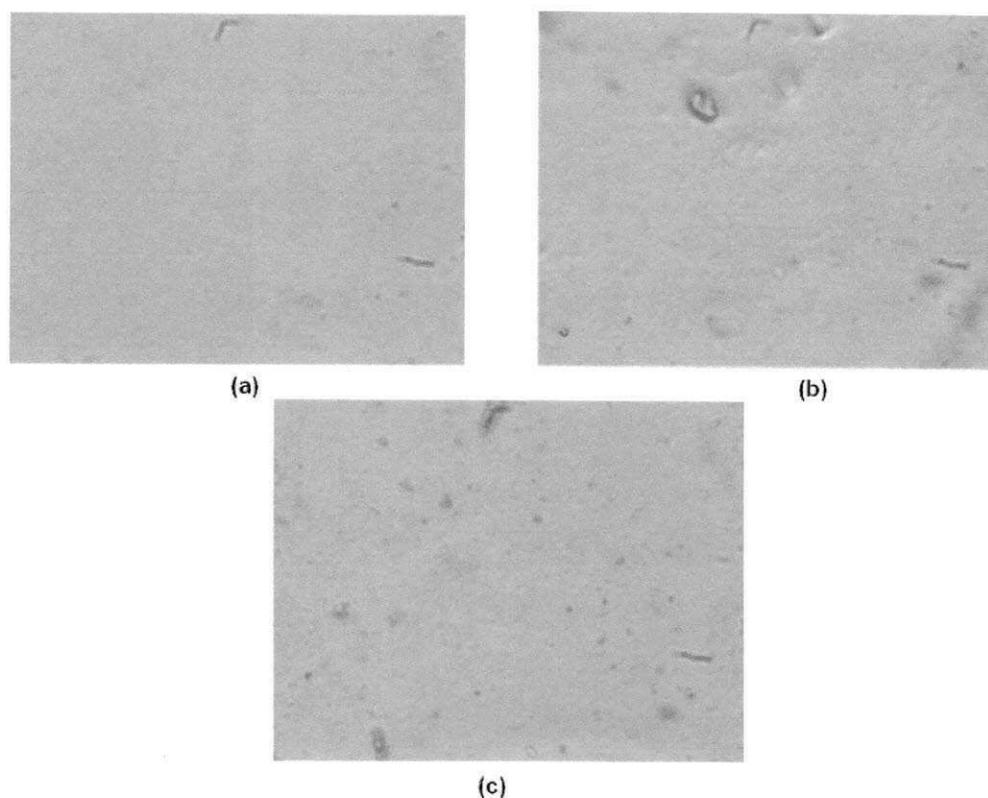
Já para os resultados das membranas de quitosana orientados nas placas pequenas, para 38°C, praticamente não houve diferenças entre os percentuais de perda de massa. Para 45°C, o percentual de perda de massa para as amostras expostas por 45 dias foi praticamente o dobro das amostras com 30 dias.

## 5.5 MICROSCOPIA ÓTICA

Os resultados dos ensaios de microscopia ótica, realizados nas membranas de quitosana, sem orientação preferencial e com orientação preferencial, não degradada e degradadas, estão ilustradas nas Figuras 25 até a 28, respectivamente.

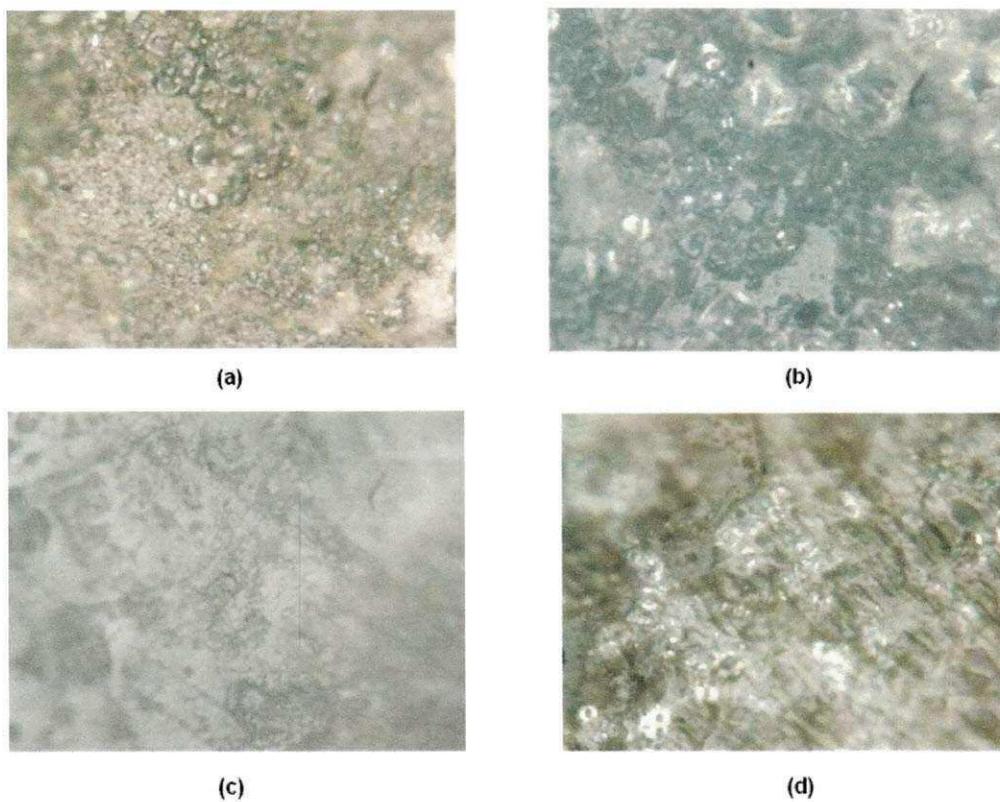


**Figura 25.** Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 1% não degradadas (a) sem orientação, (b) orientação placa pequena e (c) orientação placa grande. 3500 X.

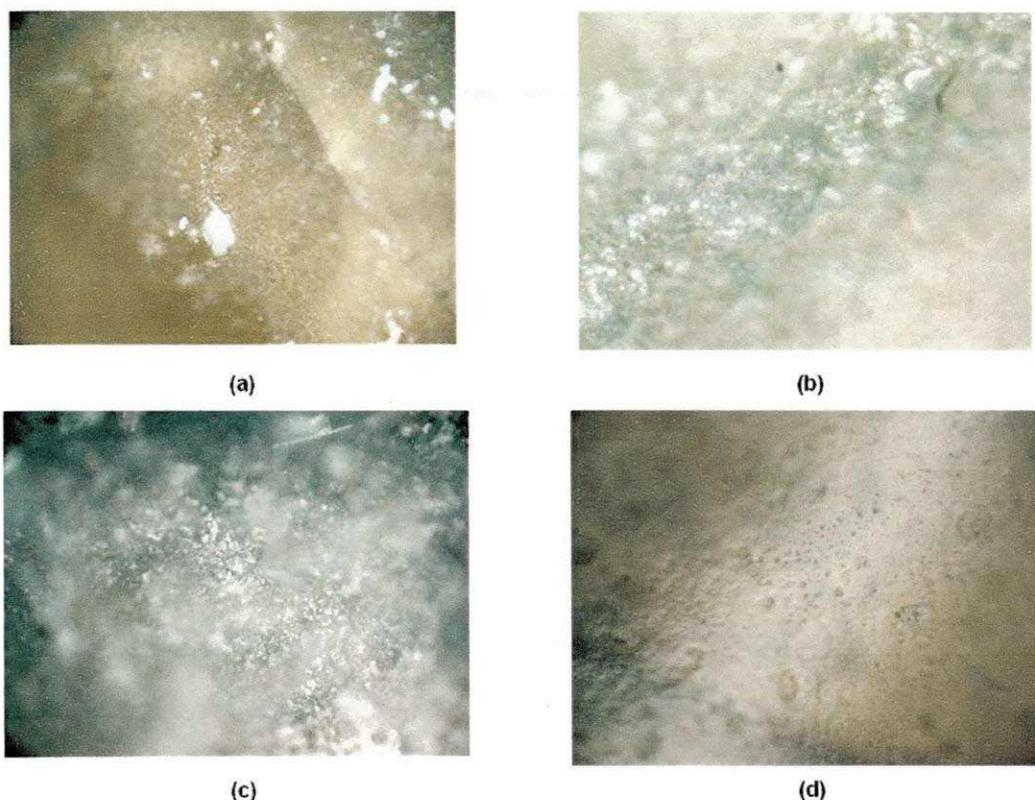


**Figura 26.** Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 2% não degradadas (a) sem orientação, (b) orientação placa pequena e (c) orientação placa grande. 3500 X.

A morfologia das membranas, tanto com concentração de 1% (m/v) como para 2 (m/v), antes do processo de biodegradação apresenta uma superfície lisa, sem a presença aparente de macroporos. Nota-se ainda, a presença de algumas impurezas na superfície, provavelmente resquícios do processo de obtenção das membranas.



**Figura 27.** Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 1% degradadas (a) sem orientação por 30 dias e 38°C, (b) sem orientação por 45 dias e 45°C, (c) com orientação placa pequena, 45 dias e 45°C e (d) com orientação, placa grande, 30 dias e 38°C. 3500 X.



**Figura 58.** Microscopia ótica para as membranas de quitosana a 2% degradadas (a) sem orientação por 30 dias e 45°C, (b) sem orientação por 45 dias e 38°C, (c) com orientação placa pequena, 45 dias e 38°C e (d) com orientação, placa grande, 45 dias e 45°C. 3500 X.

Para as membranas de quitosana, sem orientação e com orientação preferencial, submetidas à biodegradação enzimática, a morfologia das membranas se apresentou quase que idênticas para todas as situações estudadas durante a pesquisa. Observa-se presença de erosões nas superfícies poliméricas, comprovando assim as informações encontradas nos ensaios de FTIR, uma efetiva ação da lisozima nos filmes.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos objetivos expostos e com os resultados obtidos ao longo da pesquisa, conclui-se que:

- As membranas produzidas nas concentrações de 1% e 2% (m/v) e, sem e com orientação preferencial, foram sensíveis à ação de lisozima, nos períodos de 30 e 45 dias, independentemente das temperaturas estudadas;
- Na temperatura de 38°C ocorreu um maior nível de biodegradação nas condições de membranas com orientação preferencial obtidas nas placas pequenas;
- Na temperatura de 45°C ocorreu, comparativamente com a temperatura de 38°C, uma menor perda de massa no processo de biodegradação. Este fato, pode estar associado a inativação parcial da enzima;
- No perfil da cristalinidade constatou-se uma redução do caráter amorfo de 1% para 2% e, um aumento na condição cristalina para as membranas com 2% orientadas preferencialmente obtidas na placa pequena;
- O aumento da concentração dos filmes de quitosana diminui a biodegradação;
- Nas membranas de 1% as tensões internas decorrentes do processo de orientação molecular mostraram-se uma variável decisiva na biodegradação. Ao aumentarmos a concentração das membranas de 1% para 2% observamos que um melhor empacotamento das cadeias poliméricas podem antagonizar o efeito da tensão;
- Nos filmes produzidos com 2% de quitosana, uma outra variável, a hidrofiliabilidade, parece determinar a membrana de maior biodegradação. Visto que as membranas mais hidrofílicas são as produzidas com a placa grande (de 1 e 2%);

- Quanto a temperatura dos ensaios: Devido a lisozima ser uma enzima orgânica e sua temperatura ideal estar na variação de temperatura corpórea, observamos uma maior biodegradação a 38°C;
- A exposição da superfície da membrana de quitosana não revestida pela deposição de cristais de PBS aumentou a biodegradação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDRESS, Y.; GIRAUD, L.; GERENTE, C.; LECLOIREC, P. **Environ Technol**, ed. 28, p.1357-1363, 2007.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueleto de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2007.

ASSIS, O.B.G. **Avaliação por análise de imagem, da ação fungistática de coberturas de quitosana em maçãs minimamente processadas**. Monografia de Especialização, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2008.

BAE, K; JUN, E. J; LEE, S. M.; PAIK, D. I.; KIM, J. B. Effect of water-soluble reduced chitosan on streptococcus mutans, plaque regrowth and biofilm vitality. **Clin Oral Investig**. v. 10, p. 102 – 107, 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e tecnologia**. v.15, n.1, p.13-21, 2005.

BARROS, L. A. Obesidade infantil – Uma alternativa natural contra o excesso de peso. **Editorial Benzen**, n. 1, São Paulo, 2003.

BASTIOLI, Cátia. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Rapra Technology Limited, 2005. p. 549.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R.; EURO. J. **Pharm. Biopharm**. v. 35, p. 57, 2004.

BOSSO, C.; DEFAYE, J.; DOMARD, A.; GADELLE, A. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of B-(1-4)-linked 2-acetamido-D-deoxy-D-glucopyranosyl oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 57-68, 1996.

BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, V.; HIRT, H.P.; BERTHOLD, H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla. **INT J Periodont Restorative Dent**, v.13, n.1, p. 29-45, jan-1993.

CAFFESSE, R. G.; DOMINGUEZ, L. E.; NASJELETI, C. E.; CASTELLJ, W. A.; MORRISON, E. C.; SMITH, B. A. Furcation defects in dogs treated by guided regeneration (GTR). **J Periodonto**, v.61,n.1, p45-50, Jan 1990.

CAMPANA FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, Estrutura e Propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$  Quitina. **Química Nova**, v.3, n.3, p.644-650, 2007.

CHANDY, T.; SHARMA, C.. **Biomater.artif.cell.artif.organs**. 1990, 18.1.

CHUNG, Y. P.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G. WANG, H.I.; WU, J.C.G & LIN, J. G. Relação entre a atividade antibacteriana da quitosana e características da superfície da parede celular, **Acta Phamacol Sin**, v. 25, p. 932-936, 2004.

CLARINVAL, A-M.; HALLEUX, J. **Biodegradable Polymers for Industrial Application**. Ed.Ray Smith. Woodhead Publishing Limited, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. e QUEIROZ, D. C. **Quitosana – A fibra do futuro**, Padetec, 1999. 124p.

DALLAN, P. R. M. In: **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele**. 2005. 194p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DAHLIN, C.; GOTTLOW, J.; LINDE, A.; NYMAN, S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. A experimental study in monkeys. **Scand. J Plast Reconstructive Hand Surg**. v. 24, n.1, p.13-19, Jan 1990.

DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLOW, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstructive Surg**, v.81, n.5, p.672-676, May 1988.

FEIT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Dev Ind Pharm**; v. 24: p. 979-93, 1998.

FILHO, A. O. F.; ALMEIDA, L. E; PEREIRA, J. A.; LEMOS, A. E. Reconstrução de defeito de continuidade em mandíbula com posterior reconstrução alveolar. **RGO**. v. 55, n.3, p. 305-310, jul/set 2007.

FOOK, Marcus V. **Desenvolvimento De Técnica De Deposição De Hidroxiapatita Pelo Método Biomimético Na Superfície Polietileno De Ultra-Alto Peso Molecular Para Aplicação Como Biomaterial**, 2005. Tese em Química, Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara – SP.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.; GARCIA, J. S.; FRANCO, T. T. Aminoglucanooligossacarídeo (AGO's) Produzidos Enzimaticamente. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 12, p. 111-116, 2009.

GRIGOLON, L. B. **Modificação da quitina e quitosana por via enzimática**, 2001.86p. Dissertação (Mestrado em engenharia química) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2001.

GOY, R.C.; BRITO, D. e ASSIS, O.B.G.A. **Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan**. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. 2009.

HARDWICK, R.; HAYES, B.K.; FLYNN, C. Devices for dentoalveolar regeneration na upto-dat literature review. **J Periodontol**, v.66,n.6,p.495-505, 1995.

HASEGAWA, M.; ISOGAU, A.; ONABE, F. Preparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p. 279 - 283, 1993.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan – Based gastrointestinal delivery systems. **Jornal of Controlled Release**, v. 89, p. 151-165, 2003.

HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. California: Academic Press, 1996.

HONG, H; WEI, J; CHANGSHENG, L. Development of asymmetric gradationalchanged porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. **Composites part b**, v.38, p.311-316, 2007.

HOROWITZ, S.T.; ROSEMAN, S.; BLUMENTHAL, H.J. The Preparation of Glucosamine Oligossacharides. I - Separation. **Journal of American Chemistry Society**, v. 79, p. 5046-5049, 1957.

HSIECH, W. C.; CHANG. C. P.; LIN, S. M.; **Colloid Surf.** v. 57, p. 250, 2007.

HURZELER, M. B.; QUIÑONES, C.R.; HUTMACHER, D.; SCHÜPBACH, P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrie. An experimental study in the monkey. **Clin Oral Implants Res**, v.8, n.4, p.323-331, 1997.

ISSA, J.R; NASCIMENTO, C.; BENTLEY, M.V.; DEL BEL, E.A.; IYOMASA, M.M.; SEBALD W, et al. **Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers.** *Micron*.2007

JE, J. Y.; KIM, S. K. Antimicrobial action of novel chitin derivative. **Biochim Biophys Acta**, v.1760, p. 104 -109, 2006.

JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and chitinases.** Berlin: Birkhauser, 1999. 340 p.

JING, Y. J.; HAO, Y. J.; QU, H.; SHAN, Y.; LI, O. S.; DU, R. Q. **Acta Biologica Hungarica**, 58, p.75-86, 2007.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer degradation and stability**, v. 59, p. 117-120, 1998.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v.26, p. 1921-1971, 2001.

KOHAL, R. J.; TREJO, P. M.; WIRSCHING, C.; HURZELER, M. B.; CAFFESSE, R. G. Comparison of a biodegradable and bioinert membranes for guide bone regeneration around non-submerged implants. An experimental study in the mongrel dog. **Clin oral implants Res**, v.10, n.3, p.226-237, May, 1999.

KHOR, E.; LIM, L. Y. **Implantable applications of chitin and chitosan biomaterials**, v.24, p. 2339-2349, 2003.

LANZA, R. P.; LANGER, R.; VACANTI, J. Principle of Tissue engineering. **San Diego Academic Press**. 2 ed. 995p.

LIM, L. Y.; KHOR, E.; KOO, O. Gamma irradiation of chitosan. **J biomed Mater Res**. 1998.

LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z. & YAO, K. D. Ação antibacteriana da quitosana quiosana e carboximetilados. **J. Appl Polym Sci**, v. 79, p. 1324-1335, 2001.

LYU, S.P e UNTEREKER, D. Degradability of polymers for Implantable Biomedical devices. **Internacional Journal of molecular sciences**. v.10, p.4033-4065, 2009.

LUNDGREN, D.; SENNERBY, L.; FALK, H.; FRIBERG, B.; NYMAN, S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. **Case reports. Clin Oral Implants Res**, v.5, n.3, p.177-184, Set. 1994.

LUNDGREN, A.K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A.; GOTTLAW, J.; NYMAN, S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. **Clin Oral Implants Res**, v.8, n.2, p.82-89, Apr. 1997.

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

MAEDA, Y.; KIMURA, Y. Antitumor Effects of various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180 – Bearing Mice. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 945-950, 2004.

MARK, J. E.; CALVERT, P. D. Biomimetic hybrid and in situ composites. **Materials Science and Engineering**. v.1, n.3, p.59-173, 1994.

MARTINI, F. H. (Ed) fundamentals of anatomy and physiology. **New Jersey: A Simon & Schuster Company**, 3.ed. V. 1144, p-28, 1995.

MAYFIELD, L.; NOBRÉUS, N.; ATTSTRÖM, R.; LINDE, A. Guided bone regeneration in dental implants treatment using a bioabsorbable membrane. **Clin Oral Implants Res**, v.8, n.1, p.10-17, 1997.

MCGINNIS, M.; LARSEN, P.; MILORO, M.; BECK, F.M. Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.13, n.1, p.30-35, 1998.

MOFFATT, M. F. e COOKSON, W.O.C. **Gene therapy for peanut allergy Nature Med**. 1999; v. 5, p. 380-381.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. **J Inorg Biochem**. v. 92, p. 89-94, 2002.

OKAMOTO, Y.; SHIBAZAKI, K.; MINAMI, S.; MATSHUHASHI, TANIOKA, S. SHIGEMASA, Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. **J Vet Med Sei**; p.57-85, 1995.

OREFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PARK, J. S.; CHOI, S. H.; MOON, I. S.; CHOK, S.; CHAI, J. K.; KIM, C.K. Eight-week histological analysis of the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. **J Clin Periodontol**.v. 30, p. 443, 2003.

PATEL, S. S.; PATEL, N. R.; PATEL, G. N.; PATEL, R. R. **Pharmaceutical Significance of Chitosan: A review** Pharmainfo.net, vol. 4, 2006.

PIATTELLI, A.; SCARANO, A.; RUSSO, P.; MARATASSO, S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. **Biomaterials**, v.17, n.8, p.791-796, 1996.

PRASITSILP, M.; JENWITHISUK, R.; KONGSUWAN, K.; DAMRONGCHAI, N. Cellular responses to chitosan in vitro: The importance of deacetylation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, p. 773-778, 2000.

QU, X.; WIRSEN, A. e ALBERTSSON, A-C. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. **Polymer**, v.41, p.4841-4847, 2000.

RASMUSSEN, L.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D.; NYMAN, S. Morphological and dimensional changes after barrier removal in bone formed beyond the skeletal borders at titanium implants. A kinetic study in the rabbit tibia. **Clin Oral Implants Res**, v.8, n., p.103-116, 1997.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Academic press, San Diego 1996.

ROBERTS, G.A.F. **Chitin Chemistry**. The Macmillan Press Ltd, London.1992. 350p.

SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **J Oral Maxillofac surg**, v.51, n.10, p.1106-1114, 1993.

SAN ROMÁN J.; REIS R. **Biodegradable systems in medical functions: design, processing, testing and applications**. Editora CRC: Boca Ratón, 2004.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E.T.G. **Polímeros: ciência e tecnologia**; v.13, p. 242, 2003.

SANTOS, L. A. **Cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras**. Blucher Acadêmico, p.31-32, 2008.

SCANTLEBURY, T. V. 1982-1992; A decade of technology development for guided tissue regeneration. **J Periodontol**, v.64, p.1129-1137, 1993.

SCHENK, R. K.; BUSER, D.; HARDWICK, W. R.; DAHLIN, C. HEALLIN. Healing pattern of bone in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. In **J Oral Maxillofacial Implants**, v. 9, n.1p.13-29, 1994.

SNEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Adv Drug Deliv**; v. 56, p.1467-80, 2004.

SIGNINI, R. **Estudos das relações estruturas, propriedades de quitina e quitosana**. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos – USP – São Paulo, 2002.

SILVER, F.; DOAILLON, C. Biocompatibility, interactions and implantable materials. **New York, VCH**, v. 1, p. 1-76, 1989.

SIMON, M.; DAHLIN, C.; BLAIR, K.; SCHENK, R.K. Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. **Clin Oral Implants Res**, v.10,n.2, p.73-84, 1999.

SIMON, M.; SCARANO, A.; GIONSO, L.; PIATTELLI, A. A guided bone regeneration using resorbable and non-resorbable membranes: a comparative histologic study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.11,n.6, p. 735-742, 1996.

TAN, H.; WU, J.; LAO, L.; GAO, C. **Acta biomater**, v.5, p.328, 2009.

TATAKIS, D.N.; PROMSUDTHI, A.; WIKESJÖ, U.M.E. Devices for periodontal regeneration. **Periodontol**, v.19, p.59-76, 2000.

TORRES, M.A.; VIEIRA, R. J.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e tecnologia**. v.15, n.4, p.306-312, 2005.

TSAI, G. J. & SU, W. H. Atividade antibacteriana da quitosana de camarão contra *escherichia coli*. **J. Food Prot**, v.62, p.239-243, 1999.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA M, et al. Accelerating affects of chitosan for healing at erly phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**; v.20, p.1407-14, 1999.

UENO, H.; MURKAMI, M. OKUMURA, M.; KADOSAWA, T. UEDE, T. FUJINAGA, T. Chitosan accelerats the production of osteoponton fram polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**; v.20, p.1407-1414, 1999.

URAGAMI, T. **Chitosan derivative membranes for separations of alcohol/water mixtures In Chition and Chitosan**. (Ed. Muzzarelli, R. A. A. e Peter, M. G.), Via San Mrtino, Italy: Atec Edizioni, p. 783, 1997.

WELING, C.; CHENG, M.; AO, Q.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Physical, mechanical and degradation properties, and schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. **Journal of Biomaterials Science**, v. 16, p. 791-807, 2005.

WILLIANS, D. F. **On the Mechanisms of Biocompatibility**. Biomaterials. Elsevier, p.2941-2553, 2008.

ZHENG, L. Y. e ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydr. Polym.**, v.54, n. 4, p.527-530, 2003.

ZHANG, Y.F.; CHENG, X.R.; CHEN, Y.; SHI, B CHEN, X.H.; XU, D. X.et al. Threedimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. **J Biomater Appl**; v.21, p.333-49, 2007.

ZHANG, Y.; CHENG, X.; WANG, Y.; SHI, B.; HUANG, C, et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta 1 DNA for periodontol tissue engineering. **Biochem Biophys Res Commun**, v.9, p.344-362, 2006.