



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



WLADYMYR JEFFERSON BACALHAU DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE FILMES HÍBRIDOS DE QUITOSANA/FOSFATO DE
CÁLCIO COM INCORPORAÇÃO DE VITAMINA E

Campina Grande - PB
Novembro 2012

WLADYMYR JEFFERSON BACALHAU DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES HIBRIDOS DE QUITOSANA/FOSFATO DE
CÁLCIO COM INCORPORAÇÃO DE VITAMINA E**



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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Agência Financiadora: CAPES

**Campina Grande-PB
Novembro 2012**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFSCG

S725d Sousa, Wladymyr Jefferson Bacalhau de.
Desenvolvimento de filmes híbridos de quitosana/fosfato de cálcio com
Incorporação de vitamina E / Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa. -
Campina Grande, 2012.
99f.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook.
Referências.

1. Quitosana. 2. Fosfato de Cálcio. 3. Vitamina E. 4. Biomaterial.
I. Título.

CDU 677.473 (043)

DESENVOLVIMENTO DE FILMES HÍBRIDOS DE QUITOSANA/FOSFATO DE
CÁLCIO COM INCORPORAÇÃO DE VITAMINA E.

Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa

Dissertação Aprovada em 23/11/2012 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



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



Dr. Reginaldo Severo de Macedo
(Examinador Interno)
UAEMa/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Externo)
Pesquisador CERTBIO/UFCG

A Deus, pela sua infinita bondade e por
tornar um sonho em realidade, a meus
pais por todo o incentivo, **DEDICO**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por nunca me deixar sozinho nem desamparado, concedendo força, saúde, paz de espírito e possibilitar que esse o sonho de concluir o curso se concretizasse.

A meus pais **Lucimar Bacalhau de Sousa** e **Waldir Ferreira de Sousa** pelo amor, carinho e atenção que sempre me deram, também por todo o esforço possível e compreensão por horas longe de casa.

Ao meu avô **Antônio** que infelizmente foi morar com Deus e não pode estar presente nessa fase da minha vida, mais estará sempre em meu coração.

A meu tio **Edson** por todos os seus conselhos juntamente com minha irmã **Wanessa** e meu cunhado **Victor**.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook**, pela confiança e paciência depositada em mim, pela contribuição na minha vida acadêmica e pessoal.

A **Katilayne Vieira de Almeida** que junto a mim sempre me incentivou e me ajudou ao longo do mestrado e da minha vida, esta tese tem sua participação.

Aos amigos **Maria Vitorino** e **Pedro Henrique** por sua amizade e palavras de incentivo nas horas difíceis.

Aos meus amigos **Danilo, Moisés, Katiuscia, Charlane e Raphael** por estarem ao meu lado nas horas que precisei. Por fim a todos os outros que não aparecem de forma explícita, mas que sempre será lembrado em meu coração, A MINHA ETERNA GRATIDÃO!

A **Márcio José** meu amigo que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto no mestrado, que contribuiu bastante para essa tese.

Aos amigos que conquistei nesse período e também me ajudaram na efetivamente nessa tese **Adriana Holanda, Klaidson, Emanuel e Rosseberg**.

À Professora Dr^a. **Roberta Pinto** pela sua grande colaboração desde minha graduação e neste trabalho, também pela sua amizade.

Ao grupo de Biomateriais **Rita, Magna, Hugo, João Paulo, Mayara Cristine, Carol, Tiago Fideles, Fernanda, Italo, Lúcia Helena, Nathalia, Rodrigo, Emilly, Dra. Sayonna Fook, Izabel, Greyce**, em especial à **Eva, Rosemary, Waldênia, Vieira, Roberta Meire** pelos conselhos e amizade e demais pessoas que por hora possa não ter lembrado de citar.

À Professora Dr^a. **Iracilda Zeppone Carlos e Mariza**, pela ajuda e orientação nos testes de citotoxicidade e pela utilização do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular de Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara – SP.

Aos funcionários da Engenharia de Materiais, em especial: **Sergio, Geanne, Adriana, Márcia, Mila, Geraldo, Mayara Fook.**

Ao **corpo docente** de Engenharia de Materiais.

À **CAPES**, pela bolsa cedida.

*Eu digo sim, eu continuo
"Porque a chuva não cai
Só sobre mim"*

Dinho Ouro Preto

RESUMO

A cada ano pesquisadores vêm buscando, cada vez mais, desenvolver ou aperfeiçoar materiais que minimizem problemas de saúde e promovam ou auxiliem a regeneração óssea. Os biomateriais permitem desenvolver produtos que atendam às necessidades do organismo de forma a auxiliar nos processos reconstrutivos e consequentemente melhorar a qualidade de vida da população. A quitosana, devido as suas características de biodegradabilidade, biofuncionalidade e biocompatibilidade, tem despertado interesse dos pesquisadores no intuito de obter novos materiais e quando aplicada a Biomedicina, se torna um biomaterial que favorece a incorporação de outros materiais como a apatita que está presente nos ossos e a vitamina E que potencializa o compósito pois tem o poder de auxiliar na regeneração de tecidos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver filmes biodegradáveis de quitosana/fosfato de cálcio-apatita com incorporação de Vitamina E para utilização como biomateriais. Nesta pesquisa os compósitos de quitosana/apatita (1, 3 e 5%) com e sem vitamina E (proporção de 15 mg por filme) foram preparados e caracterizados por Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Molhabilidade por Ângulo de Contato, Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Microscopia Óptica (MO), Ensaio de Biodegradação Enzimática, Ensaio de Citotoxicidade e Determinação da Produção de Óxido Nítrico. A técnica de DRX mostrou que a incorporação da vitamina E e da apatita alteraram o perfil semicristalino da membrana de quitosana tornando-a mais cristalina. Com a técnica de FTIR foi constatado que a adição de vitamina E e de apatita nas membranas de quitosana não alteraram os grupos funcionais característicos da quitosana. A análise de Molhabilidade por Ângulo de Contato indica hidrofobicidade dos compósitos. Os elementos químicos presentes na quitosana, vitamina E e apatita assim como nos compósitos foram detectados pela técnica de EDX. Por meio das técnicas de MO e MEV, foi possível observar que ocorreu a incorporação da apatita e da vitamina E na membrana de quitosana e ainda mostrou a presença de partículas granulares de tamanhos e formas variadas. Pôde-se concluir com os resultados de DSC que a apatita não alterou estabilidade térmica da quitosana ao contrario da vitamina E que aumentou a estabilidade do compósito e a mesma, diferente dos outros elementos, apresentou dois picos endotérmicos. Os ensaios de biodegradação apontaram que as membranas são biodegradáveis principalmente na presença da lisozima. O ensaio de MTT e NO confirmaram a biocompatibilidade, pois os compósitos demonstraram pouca ou nenhuma citotoxicidade. Fundamentado pelos dados obtidos neste trabalho é possível concluir que a membrana de quitosana-vitamina E com 1%, 3% e 5% de apatita apresenta viabilidade para ser utilizado como biomaterial na regeneração óssea.

Palavras - chave: Quitosana. Fosfato de Cálcio. Vitamina E. Regeneração. Biomaterial.

ABSTRACT

Each year researchers have sought increasingly to develop or refine materials that minimize health problems and promote or assist bone regeneration. The biomaterials allow developing products that meet the needs of the body in order to aid in reconstructive procedures and consequently improve the quality of life. Chitosan, due to its characteristics of biodegradability, biocompatibility and biofunctionality, has aroused the interest of researchers in order to obtain new materials and when applied to biomedicine, becomes a biomaterial that encourages the incorporation of other materials such as apatite which is present in bones and vitamin E which maximizes the composite because it has the power to assist in tissue regeneration, promoting the regeneration of bone defects. This study aimed to develop biodegradable films of chitosan / calcium phosphate apatite-incorporated with Vitamin E for use as biomaterials. In this study the composites of chitosan / apatite (1, 3 and 5%) with and without vitamin E (15 mg proportion of film) were prepared and characterized by X-ray diffraction (XRD), spectroscopy Transform Infrared Region Fourier spectroscopy (FTIR), Contact Angle Wettability by, Analysis of Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy X-ray (EDS), optical microscopy (OM), Assay Enzymatic Biodegradation , Assay and Cytotoxicity Determination of nitric oxide production. The technique XRD showed that incorporation of vitamin E and semi-crystalline apatite alter the profile of chitosan membrane making it more crystalline. With the FTIR technique was found that addition of vitamin E and apatite membranes of chitosan did not alter the functional groups characteristic of chitosan. The analysis by Contact Angle Wettability indicates hydrophilicity of the composites. The chemicals present in the chitosan and vitamin E as well as the apatite composites were detected by the technique of EDX. Through the techniques of OM and SEM, it was possible to observe that the incorporation of apatite and vitamin E in the chitosan membrane and also showed the presence of granular particles of varying sizes and shapes. We conclude with the results of DSC that apatite did not alter the thermal stability of chitosan unlike that of vitamin E increased the stability of the composite and the same, unlike other elements, presented two endothermic peaks. The biodegradation testing showed that the membrane is biodegradable especially in the presence of lysozyme. The MTT assay and confirmed NO biocompatibility, because the composites showed little or no cytotoxicity. Fundamentado by data obtained from this study it can be concluded that the membrane of chitosan-vitamin E with 1%, 3% and 5% apatite shows viability for use as a biomaterial in bone regeneration.

Keywords: Chitosan. Calcium of Phosphate. Vitamin E. Regeneration. Biomaterials.

PUBLICAÇÕES

SOUSA, W. J. B. ; FOOK, M. V. L. ; CARDOSO, M. J. B. ; ALMEIDA, K. V. ; FIDELES, T. . CYTOTOXICITY EVALUATION OF CHITOSAN/APATITE/VITAMIN E HYBRID FILMS. In: 9th World Biomaterials Congress, 2012, Chengdu. Innovative Biomaterials and Crossing Frontiers in Biomaterials and Regenerative Medicine, 2012., 2012, Chengdu. 9th World Biomaterials Congress, 2012, 2012.

SOUSA, W. J. B. ; ALMEIDA, K. V. ; CARDOSO, M. J. B. ; FARIAS, K. A. S. ; FOOK, M. V. L. ; PINTO, M.R.O. . ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPÓSITOS DE QUITOSANA-VITAMINA E/ HIDROXIAPATITA. In: 7º COLAQB - Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012, Natal -RN. <http://www.colaob.com.br/anais>, 2012. v. 149.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical	23
Figura 2 - Osso cortical e Osso trabecular. Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na forma dos tecidos duros.....	24
Figura 3 - Classificação dos biopolímeros segundo a sua origem	27
Figura 4 - Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana	29
Figura 5 - Estrutura química da quitosana	30
Figura 6 - Estrutura dos Tocoferóis	33
Figura 7 - Estruturas dos Tocotrienóis	34
Figura 8 - Fluxograma da elaboração de membranas.....	46
Figura 9 - Quitosana com ácido acético	51
Figura 10 - Quitosana Protonada com adição de vitamina E e apatita.....	52
Figura 11 - Difratoograma do pó do fosfato de cálcio – apatita.....	53
Figura 12 - Difratoogramas dos filmes de: (a) Quitosana (Quit) + Apatita (AP) 1%; (b) Quit + AP 3%; (c) Quit + Ap 5%; (d) Quit + Ap 1% + Vitamina E (Vit); (e) Quit + Ap 3% + Vit; (f) Quit + Ap 5% Vit (g) Quit + Vit; (h)Quit; (i) Vit pó e (j) AP pó.....	54
Figura 13 - Espectros da Quitosana.....	55
Figura 14 - Espectros do pó da Apatita	56
Figura 15 - Espectros do Pó da Vitamina E	57
Figura 16 - Espectrogramas dos filmes de (a) Quitosana (Quit) + Apatita (AP) 1%; (b) Quit + AP 3%; (c) Quit + Ap 5%; (d) Quit + Vitamina E (Vit); (e) Quit + Ap 1% + Vit; (f) Quit + Ap 3% + Vit; (g) Quit + Ap 5% Vit (h)Quit; (i) Ap pó e (j) Vit pó.	58
Figura 17 - Medida de ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas. ..	60
Figura 18 – Análise de DSC para as membranas: (a) Quitosana (Quit); (b) Apatita (Ap); (c) Vitamina E (Vit) pó; (d) Quit + Vit; (e) Quit + Ap 1%; (f) Quit + Ap 3%; (g) Quit + Ap 5%; (h) Quit + Ap 1% Vit; (i) Quit + Ap 3% + Vit e (j) Quit + Ap 5% + Vit. .	61
Figura 19 - Microscopia ótica as membranas: (a) Quitosana (Quit); (b) Quit + Apatita (Ap) 1%; (c) Quit + Ap 3%; (d) Quit + Ap 5%; (e) Vitamina E (Vit) pó; (f) Quit + Vit; (g) Quit + Ap 1% + Vit; (h) Quit + Ap 3% + Vit e(i) Quit + Ap 5% Vit. Aumento de 1750 X.	67
Figura 20 - Micrografias das Membrana de Quitosana. Imagem com aumento 1000x.	72

Figura 21 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana (Quit)	72
Figura 22 - Micrografias do Pó da Apatita. Imagem com aumento 1000x.....	73
Figura 23 - EDS e Percentual de Massa da Apatita	73
Figura 24 - Micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita. Imagem com aumento de 1000X.....	74
Figura 25 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de Apatita;	75
Figura 26 - Micrografias do pó da vitamina E. Imagem com aumento 1000x.....	77
Figura 27 - EDS e Percentual de Massa do Pó da vitamina E	77
Figura 28 - Micrografias da membrana de quitosana com vitamina E. Imagem com aumento 1000x.....	78
Figura 29 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana - Vitamina E .	78
Figura 30 - Micrografias das membranas de quitosana - vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita. Imagem com aumento 1000x.....	79
Figura 31 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana – Vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita.	80
Figura 32 - Viabilidade celular dos macrófagos de camundongos Swiss na presença dos filmes. A – Quitosana (Quit); B – Quit-Vitamina E (Vit); C – Qui t- Vit/1% Apatita (Ap); D – Quit- Vit /3% Ap; E – Quit – Vit /5% Ap; LPS–controle positivo; CN– controle negativo	83
Figura 33 - Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença dos filmes: A –Quitosana (Quit); B –Quit -Vitamina E (Vit); C –Quit –Vit/ 1% Apatita (Ap); D –Quit –Vit /3% Ap; E– Quit –Vit/5% Ap; LPS– controle positivo; CN– Controle negativo	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações Químicas dos Biomateriais	26
Tabela 2 - Elementos que podem ocupar os sítios atômicos da apatita	36
Tabela 3 - Relação Ca/P das fases de apatita	37
Tabela 4 - Formas das hidroxiapatitas usada na medicina e odontologia.....	39
Tabela 5 - Bandas de absorção no FTIR dos filmes de quitosana com GD de 75% – 85%	56
Tabela 6 - Bandas de absorção no FTIR dos filmes pó de Apatita	57
Tabela 7- Bandas de absorção no FTIR do pó da Vitamina E	58
Tabela 8 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana (Quit), quitosana-vitamina (Vit), quitosana-vitamina E /apatita nas proporções de (1%, 3% e 5%) e quitosana/apatita nas proporções de (1%, 3% e 5%) submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos.....	82
Tabela 9 - de variância – A NOVA Teste de Tukey para as membranas confrontadas com o padrão positivo e negativo e com elas respectivamente	85

SÍMBOLOS

Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH	Amina
OH	Hidroxila
°C	Graus Celcius
Ca	Cálcio
P	Fósforo
Da	Dalton
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Θ	Theta
L	Litro
C=O	Carboxila
Pa	Pascal
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico

ABREVIações

pH	Potencial de hidrogênio iônico
MO	Microscópio Ótico
TS	Tensão Superficial
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
cm	Centímetro
DEM	Departamento de Engenharia de Materiais
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
h	Hora
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS	Solução tampão fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 ENGENHARIA DE TECIDOS	20
3.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA	21
3.3 OSSO	22
3.4 BIOMATERIAIS	24
3.5 BIOPOLÍMEROS	26
3.5.1 - Quitosana	27
3.5.1.1 Origem	27
3.5.1.2 Estrutura da Quitosana	28
3.5.1.3 Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Quitosana	30
3.5.1.4 A Quitosana como Biomaterial	31
3.5.2 Vitamina E	32
3.5.2.1 Origem da Vitamina E	32
3.5.2.2 Obtenção e Estrutura da Vitamina E	33
3.5.2.3 Propriedades da Vitamina E	34
3.6 BIOCERÂMICAS	35
3.6.1 Fosfato de cálcio – Apatitas	36
3.6.1.1 Hidroxiapatita	38
3.6.1.2 ACP – Fosfato de cálcio amorfo	40
3.6.1.3 OCP – Fosfato Octacálcico	40
3.6.1.4 TCP – Fosfato Tricalcico	41
3.7 BIOCOPÓSITOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 LOCAL DA PESQUISA	43
4.2 MATERIAIS	43
4.3 EQUIPAMENTOS	44
4.3.1 Difração de Raios X	44

4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.3.3 Molhabilidade por Ângulo de Contato.....	44
4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	44
4.3.5 Microscopia Ótica (MO)	44
4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	44
4.4 MÉTODOS	45
4.4.1 Preparação das Membranas de Quitosana-Vitamina E e Fosfato de Cálcio	45
4.5 CARACTERIZAÇÃO	46
4.5.1 Difração de Raios X.....	47
4.5.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	47
4.5.3 Molhabilidade por Ângulo de Contato.....	47
4.5.4 Exploratória Diferencial (DSC)	48
4.5.5 Microscopia Ótica (MO)	48
4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	48
4.5.7 Ensaio de Biodegradação Enzimática	49
4.5.8 Avaliação de Viabilidade Celular dos Macrófagos	49
4.5.9 Determinação da Produção de Óxido Nítrico	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 LIGAÇÕES E REAÇÕES QUÍMICAS	51
5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	52
5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	55
5.4 MOLHABILIDADE POR ÂNGULO DE CONTATO	59
5.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	60
5.6 MICROSCOPIA ÓTICA (MO).....	66
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS).....	71
5.8 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA.....	81
5.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR DOS MACRÓFAGOS	83

5.10 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	84
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A medicina busca cada vez mais tratar problemas relacionados à regeneração óssea e de tecidos buscando minimizar traumas cirúrgicos e algumas doenças ósseas. Esses problemas de saúde junto à população têm levado pesquisadores, à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados ou reconstituí-los (KAWACHI, et al.,2000).

O avanço da tecnologia dos biomateriais permitiu desenvolver materiais que atendessem às necessidades do corpo de forma a auxiliar nos processos reconstrutivos de partes desse corpo, incrementar tratamentos e melhorar a qualidade de vida dos seres humanos. Um exemplo são órgãos artificiais utilizados para aumentar o tempo de vida dos pacientes, principalmente quando o transplante de órgão torna-se inviável (DEE, PULEO, BIZIOS, 2002 e HENCH, 2006).

A condição fundamental para que qualquer material sintético ou natural seja utilizado como biomaterial é minimizar os processos inflamatórios e não proporcionar reações indesejáveis no corpo. Esta propriedade elementar é conhecida como biocompatibilidade. Um biomaterial deve resistir/suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração e também, não deve alterar o meio biológico, propriedade esta denominada de biofuncionalidade (PARK, LAKES, 2007).

A partir da necessidade de regeneração, reparo e crescimento de tecido em áreas afetadas por lesões ou doenças surgem os biomateriais. Esses materiais possibilitam a formação de novos tecidos para serem incorporados no sistema biológico e utilizados para reparar, repor e induzir crescimentos de tecidos naturais (RATNER, 2005).

A quitosana é um polissacarídeo natural, obtido através da desacetilação da quitina, predominantemente encontrada em carapaças de crustáceos, composta de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glicosamina (SANTOS et al.,2006; HEJAZI; AMIJI, 2003;). Devido as suas características a quitosana é bastante utilizada na biomedicina, na indústria de cosméticos, na agricultura como fibra têxtil e no tratamento de água. Na Biomedicina ela atua como um biomaterial que favorece a reconstituição fisiológica da pele (BIAGINI, et al., 1992) e auxilia na redução do processo inflamatório (HELOU et al., 2008).

Por sua vez os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos utilizados como Biomateriais em reposição e regeneração óssea, devido a apresentarem biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e também permitem a proliferação de células ósseas, proteínas e colágeno em suas superfícies, possibilitando desta forma a regeneração tecidual (APARECIDA, 2007).

. A vitamina E, possui propriedade anti-inflamatória, cicatrizante e regenerante. Devido a essas características ela vem sendo utilizada para regenerar tecidos lesados do corpo (RINZLER, 2011).

Visando a potencialidade dos biomateriais, esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de filmes híbridos de quitosana/apatita com adição de vitamina E. Dessa maneira utilizar-se-á o compósitos como meio regenerativo para ossos uma vez que a quitosana através de suas características permite ser transformada em filmes biodegradáveis que são absorvidos com maior facilidade pelo organismo, favorecendo a introdução dos fosfatos de cálcio (apatita) para regeneração óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver filmes biodegradáveis de quitosana/fosfato de cálcio (apatita) com incorporação de Vitamina E.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer metodologia para confecção de filmes híbridos de quitosana/apatita incorporando vitamina E;
- Comparar as membranas quanto às suas propriedades químicas, morfológicas e térmicas;
- Realizar e avaliar estudos de biodegradação *in vitro* dos filmes;
- Correlacionar esses estudos com as propriedades morfológicas e químicas dos filmes, investigando a relação destas propriedades com a biodegradabilidade e propriedades biológicas, como citotoxicidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é uma especialidade da engenharia biomédica, que aplica os princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos para restaurar, manter ou melhorar a função tecidual (PALSSON; BHATIA, 2004).

A engenharia de tecidos possui uma característica que é a regeneração de tecidos e órgãos dos próprios pacientes, com boa biocompatibilidade e biofuncionalidade, sem que ocorram problemas com rejeições imunes severas. Para isso, os materiais dos dispositivos de engenharia de tecidos devem prover as necessidades nutricionais e biológicas para a população específica das células envolvidas na formação do tecido. O material utilizado em implantes não pode ser rejeitado e deve causar uma mínima resposta inflamatória, portanto, biocompatível. Além disso, deve promover a cura e a regeneração tecidual; e, quando necessário, desaparecer depois de servir ao seu desígnio, significando que o mesmo deve ser biodegradável (YOON; FISHER, 2007).

A variedade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente o suporte e de se adaptar a ele, e de aderir ou não à sua superfície (ANSELME, 2000). A vantagem da engenharia de tecidos é o número reduzido de operações, resultando num curto período de tempo de recuperação do paciente (LANGER, 1999).

A Engenharia de Tecidos tem surgido com o 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 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. Trata-se de um campo interdisciplinar que combina conhecimentos e tecnologia de células, Engenharia de Materiais e adequados fatores bioquímicos para criar órgãos e tecidos artificiais, ou ainda, para regeneração de tecidos lesados.

O material deve fornecer uma estrutura e suporte inicial para a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de fornecer um meio para carrear células, fatores de crescimento e outras biomoléculas (REIS; ROMÁN, 2005; GOUGH, 2007).

3.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo possui uma alta capacidade de reparação espontânea quando lesionado, repondo logo após um pequeno intervalo de tempo, toda a porção perdida (TAGAR, 1997). No entanto, em alguns casos, onde os mesmos não têm a capacidade de se repararem espontaneamente, há a necessidade de se utilizar diversas técnicas cirúrgicas, na tentativa de reparação da deficiência óssea (RESTREPO, 1998). O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, onde a matriz extracelular é mineralizada, composta por 67% de componentes inorgânicos, que tem como principal componente cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que tem a função de rigidez, porém mantém algum grau de elasticidade, devido aos seus 33% de matriz orgânica, dentre os quais 28% referem-se ao colágeno do tipo I e 5% de proteínas não colagênicas, como a osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanas e proteínas morfogenéticas osseas (BMP's) (TEM CATE, 1998).

Pode-se encontrar basicamente quatro tipos de células no tecido ósseo: osteoprogenitoras; osteoblastos; osteócitos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras estão localizadas no perióstio e no endóstio (GARTNER; HIATT, 2007). As células osteoblastos são células cubóides sobrevinda das células osteoprogenitoras, e estão organizadas em uma camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada (MARX, 1998). Os osteócitos são células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos. Têm como função principal a manutenção do tecido ósseo, pois apresentam prolongamentos citoplasmáticos unidos por junções comunicantes (canalículos) formando um complexo necessário à manutenção e vitalidade da matriz. E por último, as células osteoclastos são células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares (JUNQUEIRA, 2005; GARTNER, 2007; MARX, 1998; TEN CATE, 1998).

A formação do tecido ósseo ocorre de duas formas: endocondral e intramembranosa. Na ossificação endocondral ocorre um adensamento de células

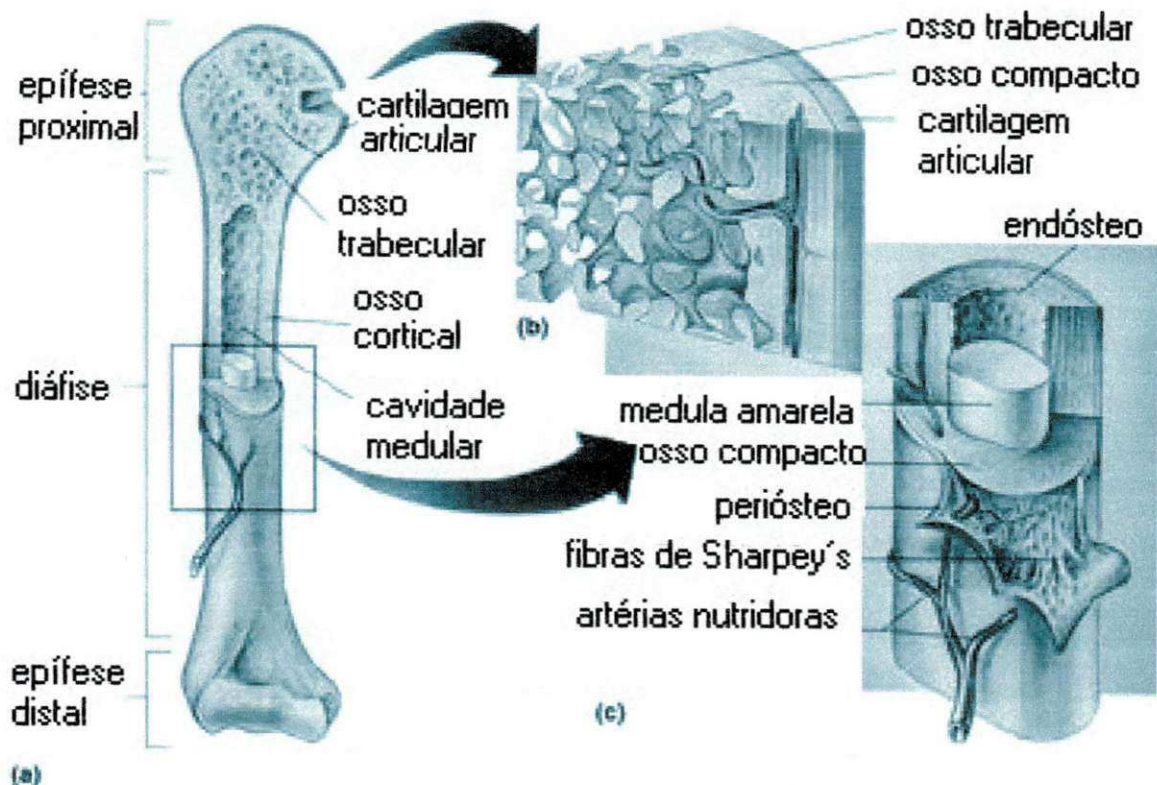
mesenquimais, que diferenciam-se em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Na ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de um tecido mesenquimatoso, ou seja, células progenitoras que diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea formando uma malha de espículas e trabéculas ósseas (JUNQUEIRA, 2005; TEM CATE, 1998). Independente da ossificação pela qual o osso é formado, o tecido resultante é sempre o mesmo, sendo que histologicamente existem dois tipos de tecidos ósseos: primário e secundário, tais tipos possuem a mesma célula apresentando apenas a diferentes orientações das fibrilas do colágeno (BUSER, 1994). Ao microscópio existem duas formas de ossos: esponjoso (medular) e cortical (compacta). O esponjoso apresenta uma matriz organizada em trabéculas, formando assim ângulos retos; enquanto que no cortical, a matriz do colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas geralmente ao redor de um canal vascular central (MARX, 1998).

A regeneração óssea não é somente um processo biológico. Ela também depende de fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos, que são de grande importância na regeneração e na manutenção do osso vivo (PASCHOAL et al. 2003).

3.3 OSSO

O osso desempenha três funções no organismo, designadamente: mecânica, protetora e metabólica (CUMMINGS, 2002). O esqueleto é dividido anatomicamente em dois tipos: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso. O osso cortical equivale à cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Consiste em uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons), na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal nos ossos longos, e é envolvido por um tecido conjuntivo denominado perióstio rico em colágeno e células osteoprogenitoras (LIFE, 2002). A Figura 1 ilustra as partes do osso.

Figura 1 - Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical

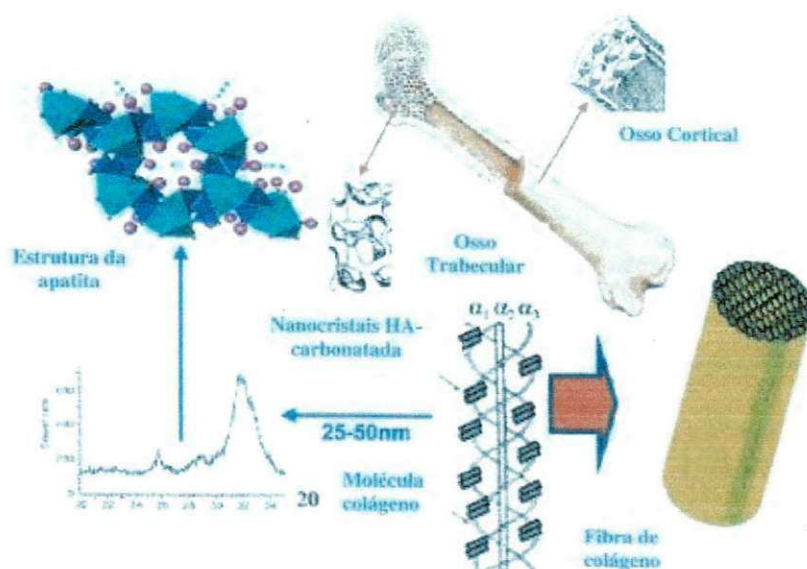


Marieb

Fonte: LIFE, 2002.

O osso trabecular equivale a cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto. É encontrado principalmente nas epífises dos ossos longos (Figura 2) e nos ossos chatos, sendo coberta por uma camada unicelular chamada Endosteio (SIMÕES et al., 1995). A estrutura do osso é formada por hidroxiapatita, colágeno, pequena quantidade de proteoglicanos, proteínas não-colágenas e água. A matriz óssea é constituída de duas partes: a inorgânica: responsável principalmente pela resistência à compressão e rigidez; e a orgânica, que fornece resistência à tração (DOBLARÉ; GARCIA; GOMEZ, 2004).

Figura 2 - Osso cortical e Osso trabecular. Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na forma dos tecidos duros.



Fonte: VALLET-REGI CONZÁLEZ- CALBET, 2004.

3.4 BIOMATERIAIS

Entende-se por Biomateriais qualquer material usado na substituição de partes ou função do corpo humano de forma segura e fisiologicamente aceitável. Um biomaterial é um material sintético ou natural usado para substituir parte de um sistema vivo ou para funcionar em íntimo contato com tecido vivo. Tem como objetivo fundamental melhorar a saúde humana, restaurando a função dos tecidos vivos naturais e órgãos do corpo, para isto é importante a compreensão das relações entre as propriedades, funções e estruturas dos materiais biológicos (PARK; LAKES, 2007).

Novos materiais vêm sendo desenvolvidos a cada dia e as aplicações de materiais já existentes surge como opção viável e importante para as mais diversas áreas do conhecimento. Na Ciência dos Materiais, vem sendo mais evidente a necessidade de se lidar com materiais que possibilitem a obtenção de produtos que atendam as necessidades humanas, com a máxima qualidade e desempenho, ao menor custo possível. É importante mencionar que, durante muito tempo, os biomateriais raramente eram desenvolvidos para substituir ou tratar órgãos ou funções do corpo. Grande parte desses materiais era estudada para aplicações tecnológicas tais como, estruturas, revestimentos e equipamentos, mas a

aplicabilidade na medicina fez com que esses materiais fossem transformados ou melhorados para tais fins (DOBRZÁNSKI, 2006).

A seleção de biomateriais é baseada principalmente na aplicação a que se destina. Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõem a aumentar ou redefinir o tecido, por exemplo: implantes de seios e implantes faciais. Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (próteses de juntas e implantes de raiz de dentes) ou são usados para reparar defeitos ósseos (parafusos, placas e pinos inseridos em osso) (PARK LAKES, 2007).

De forma didática os biomateriais podem se classificados em três categorias de acordo com o comportamento biológico: Bioinertes: São materiais que desenvolvem mínima resposta do tecido biológico; Bioativos: São materiais que estimulam o crescimento de tecidos a partir de sua superfície e Bioabsorvíveis: São materiais que após a degradação são absorvidos pelo organismo e que neste período induzem a formação de tecido (PARK; LAKES, 2007).

Os biomateriais reabsorvíveis tem como característica mimetizar um tecido lesado, e eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do implante. Tal função é conseguida quando a taxa/razão de biodegradação do material ocorre em período suficiente para a formação de um novo tecido. A capacidade de reabsorção de um biomaterial está relacionada com a biocompatibilidade apresentada pelo mesmo (SANTOS; JÚNIOR; WADA, 2007).

Para que o biomaterial execute, de forma devida, a sua função biológica, o mesmo deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica adequada. Que não seja carcinogênico ou pirogênico (SERVICE, 2000; BOSS, 1995).

A biocompatibilidade de um material é a capacidade que ele possui de apresentar resposta apropriada quando aplicado, não causando reações inflamatórias acentuadas, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade. Ela gira em torno da interação celular com o biomaterial. Sendo o material ideal para executar a função desejada, aquele que é absorvido, sendo substituído por tecido natural. Deste modo, polímeros biodegradáveis são de grande interesse para a

comunidade da engenharia biomédica (SANTOS JÚNIOR e WADA, 2007). A Tabela 1 ilustra alguns materiais sintéticos e algumas das suas muitas aplicações.

Tabela 1- Aplicações Químicas dos Biomateriais

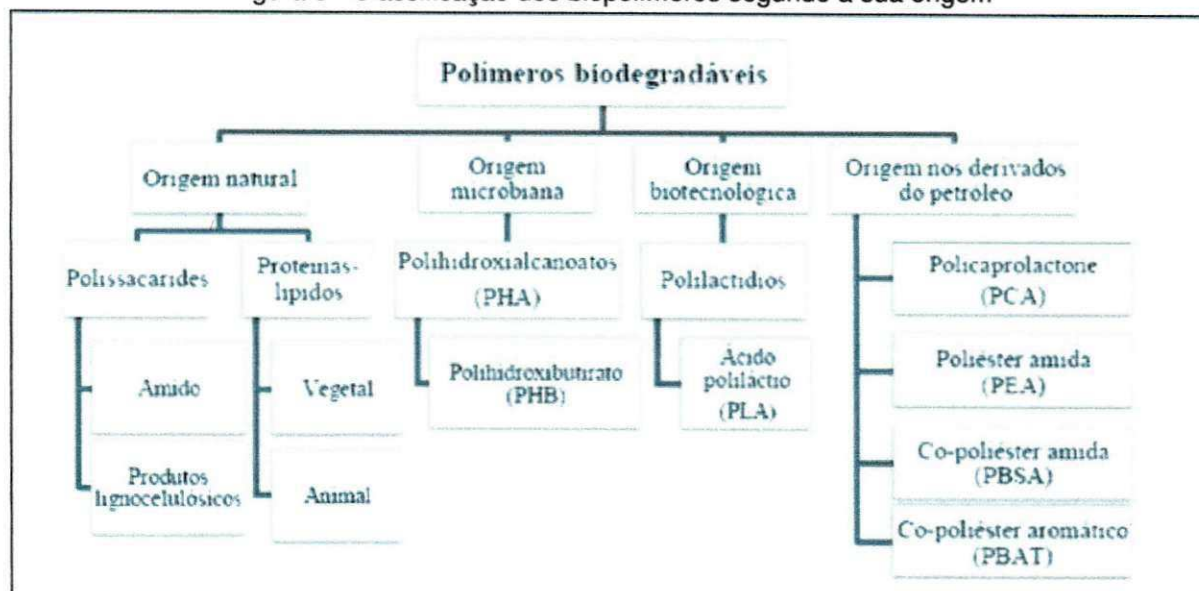
Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros Poliétileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade.	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo.	Suturas, artérias, maxilofacial, cimento, tendão artificial, oftalmologia.
Metais e ligas Aço inoxidável Ligas de titânio Ligas de Co-Cr	Alta força de tensão, alta resistência ao desgaste, energia de deformação alta.	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda de propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade.	Fixação ortopédica, implantes dentários.
Cerâmicas e vidros Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de Cálcio Porcelana Vidros bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia química, alta resistência à compressão.	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade.	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e artérias artificiais.
Compósitos Fibra de carbono Resina termofixa Fibra de carbono termoplástico Fosfato de cálcio-colágeno	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia química, alta força de tensão.	Material de difícil fabricação.	Válvula cardíaca artificial, implantes de junta de joelho.

Fonte: PARK; LAKES 2007.

3.5 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis (PRADELLA, 2006). Os biopolímeros geralmente são classificados tendo em conta a sua estrutura, a origem, o tipo de produção bem como de processo, a sua importância econômica, aplicação, etc. (SMITH, 2005). A Figura 3 ilustra a classificação dos biopolímeros em relação a sua origem.

Figura 3 - Classificação dos biopolímeros segundo a sua origem



Fonte: AZEVEDO, (2010).

Dentre suas principais características apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los a cada aplicação específica, baixo custo de fabricação de dispositivos, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais e a relativa facilidade de obtenção. Além de serem funcionalmente ativos, ou seja, cumprirem com sucesso suas funções dentro do corpo, os polímeros usados como biomateriais devem ser biocompatíveis (RATNER et al., 2005; JALILI et al., 2009). O biomaterial polimérico é desenvolvido de forma a suportar fisicamente e mecanicamente as células, no organismo hospedeiro. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua reabsorção completa (BARBANTI, 2005).

3.5.1 - Quitosana

3.5.1.1 Origem

A quitosana é um biopolímero hidrofílico, natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental, obtido a partir da quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceos, e que representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É originada a

partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino (SPIN et al, 2008).

A quitosana possui os grupos funcionais: N-acetil, amino, hidroxila primária e secundária. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina, mais especificamente do carbono 2 do segundo monômero. Para obter tal material, a quitina deve ser processada em solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v), durante um período médio de três horas, a uma temperatura de 120° C. Dessa maneira, para a obtenção de 1 kg de quitosana desacetilada a 75%, a partir de cascas de camarão, são necessários cerca de 6,3 kg de HCl para desmineralização, 1,8 kg de NaOH para desproteínização e desacetilação, e 1,5 t de água para a ocorrência total das reações. Diferentes graus de desacetilação da quitosana são obtidos com a variação do tempo e da concentração do banho de hidróxido de sódio utilizado, além da temperatura em que a reação ocorre. De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. A percentagem de unidades de glicosamina (monômeros desacetilados) em uma molécula polimérica de quitosana ou quitina é denominada Grau de Desacetilação (GD). O GD varia com a fonte de quitina e com o método de processamento. A desacetilação feita normalmente no estado sólido promove a obtenção de uma estrutura irregular, devido à natureza semicristalina do polímero inicial (CAMPANA FILHO et al., 2007).

Quimicamente o GD da quitosana tem influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, a relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes de entrecruzamento, solubilidade e viscosidade de suas soluções (GONSALVES et al., 2011).

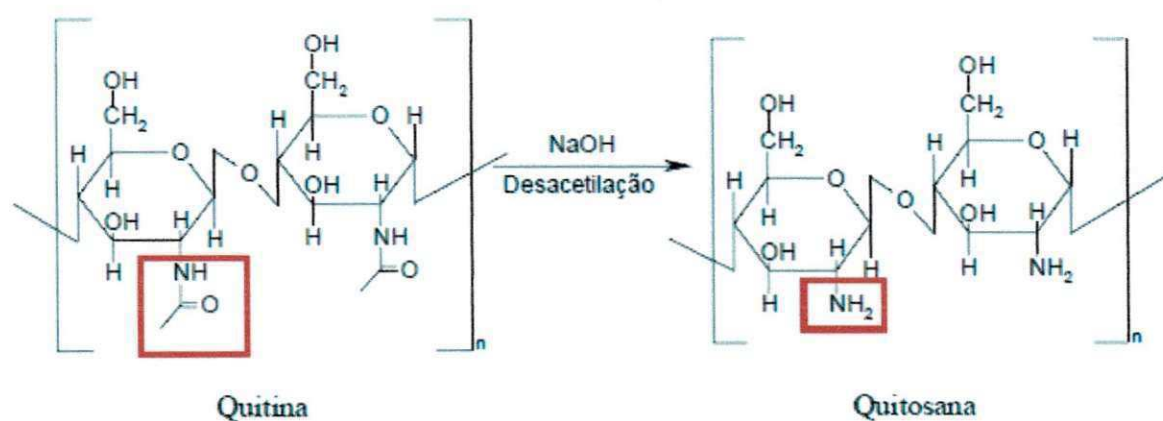
3.5.1.2 Estrutura da Quitosana

A quitosana é composta de β -(1→4)-*D*-glicosamina e β -(1→4)-*N*-acetil-*D*-glicosamina que significa: β corresponde à estrutura cristalina (as cadeias pertencentes a diferentes lamelas dispõem-se paralelamente, o que dificulta o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotado); 1 e 4

são as posições enumeradas assim, devido aos grupos funcionais presentes nessas posições; D significa dextrogeno termo da isomeria óptica em que a luz polarizada é desviada para direita, em um carbono assimétrico (por possuir, quatro elementos distintos conectados e esse carbono) e quando o feixe incide sobre um dos enantiômeros, provoca uma alteração desvio da luz (BRUCE,2006).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido muito investigada, e muitos polimorfismos são mencionados na literatura. Cristais de quitosana são obtidos usando-se a desacetilação completa da quitina de baixo peso molecular (CARTIER, 1990). A Figura 4 ilustra o esquema resumido da desacetilação da quitina, originando a quitosana.

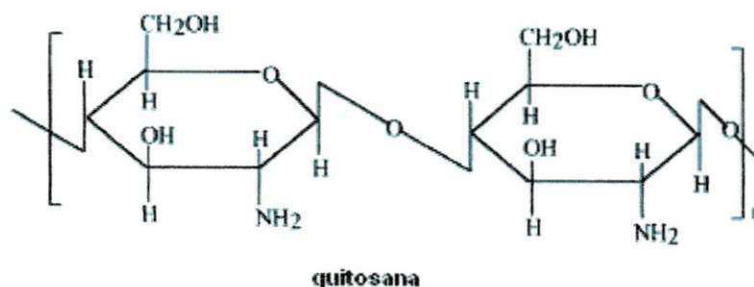
Figura 4 - Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana



Fonte: Adaptado de STAMFORD, 2006.

A célula unitária contém duas cadeias antiparalelas de quitosana e nenhuma molécula de água (OGAWA, 1991; 1992). Este biopolímero possui três grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2, e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (FURUSAKI et al.,1996). A Figura 5 ilustra a estrutura química da quitosana.

Figura 5 - Estrutura química da quitosana



Fonte: MAJETI; KUMAR, 2000.

A aplicação da quitosana está associada a sua massa molar; a partir deste parâmetro pode ser atribuído um uso diferente para a quitosana, ainda podendo ser classificada como baixa massa molecular (<100 kDa), de média massa molecular (100 a 300 kDa), e de alta massa molecular(>300 kDa) (KIM; RAJAPAKSE, 2005). A grande quantidade de pontes de hidrogênio intermolecular e intramolecular nas moléculas de quitosana influenciam na semicristalinidade do polímero (RINAUDO, 2006).

3.5.1.3 Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Quitosana

A quitosana, que é um polímero natural, vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (MUZZARELLI et al., 1997). Também considerada um polissacarídeo com alto teor de nitrogênio sendo insolúvel em água e em solventes orgânicos (ABRAN; HIGUERA, 2004).

As propriedades físicas da quitosana como a cristalinidade, degradação e energia superficial variam de acordo com o grau de desacetilação (MAJETI; KUMAR, 2000). Porém, as propriedades da quitosana não dependem apenas do seu grau de desacetilação, mas, também da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além do seu peso molecular (KUBOTA, 1997; RINAUDO, 2006). A solubilidade é um parâmetro difícil de ser controlado e está relacionada diretamente com a desacetilação, a concentração iônica, pH, natureza do ácido usado para a protonação e a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, bem como, das condições de extração e secagem do polissacarídeo. A solubilidade da quitosana é normalmente investigada dissolvendo-se em solução de ácido acético 1% ou

0,1 Mol/L (RINAUDO, 2006). Em altos valores de pH os grupos amino da quitosana são desprotonados e seu par de elétrons reage com aldeídos, ácidos, anidridos, epóxidos que são reagentes eletrofílicos (CHAO et al., 2004). A quitosana é um biopolímero catiônico com alta densidade de carga (uma carga positiva por resíduo glicosamina). Como agente de floculação interage com moléculas de carga negativas e tem propriedade de adsorção (CRINI; BADOT, 2008). Como a quitosana se trata de um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução quebrando as ligações do complexo polimérico e os componentes da água são incorporados aos fragmentos resultantes (TOMIHATA; IKADA, 1997).

A atividade antimicrobiana está relacionada à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (CLEASEN; WHILHELMS; KULICKE, 2006). O mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Suas propriedades antimicrobianas atuam na separação e recuperação de microrganismos de suspensões celulares (HIROUYUKI et al., 1998).

Dentre as propriedades biológicas encontradas na quitosana estão: biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade, além de ser atóxico e produzido por fontes naturais e renováveis. A biodegradabilidade é devido à metabolização da quitosana por algumas enzimas humanas, como por exemplo, a lisozima. Essa propriedade condiz com um dos requisitos primários de um processo de biodegradação, que é ser susceptível a uma reação de hidrólise enzimática (CAMPANA; SIGNINI, 2001; TRIPLETT et al., 2001; SENEL; MCCLURE, 2004; BETTINI et al., 2008). A quitosana tem facilidade de formar filmes e membranas, permitindo aplicações nas mais diversas áreas (BERGER et al., 2004).

3.5.1.4 A Quitosana como Biomaterial

A quitosana é uma substância que tem a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbicos e aniônicos (BIAGINI et al., 1992). Como biomaterial, é aplicada em lentes de contato, membranas artificiais, cicatrizante, agente hemostático, tratamento de lesões de pele, bactericida e fungicida (DALLAN,

2005). Devido a sua flexibilidade e resistência a tensão, a quitosana é usada em curativos como, por exemplo, de queimaduras. Por ser um componente hipoalergênico auxilia na cicatrização, pois acelera a reposição celular, recuperando com maior rapidez tecidos lesados (HIROUYUKI et al., 1998). A atividade da quitosana sobre as biomoléculas é facilitada pela diferença de cargas elétricas que ocorre na superfície das duas estruturas. A quitosana é um polímero que se comporta como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga (DALLAN, 2005). A quitosana tem apresentado propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, provavelmente atribuído as características de seus produtos de degradação enzimática, os oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, que são totalmente absorvíveis pelo organismo (DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2006). Por não ser hidrolisada pelas enzimas digestivas no homem e a sua estrutura química ser similar a da celulose, a quitosana pode ser usada como um novo tipo de fibra dietética. Entretanto, por conter um par de elétrons livres no nitrogênio tem capacidade de formar complexos com polímeros e metais (JING et al., 1997).

3.5.2 Vitamina E

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos complexos que são essenciais para o funcionamento normal e as reações metabólicas no corpo. As vitaminas não são utilizadas como uma fonte de energia ou tecido estruturais componentes, mas sim como cofatores ou coenzimas em reações bioquímicas. As vitaminas são divididas em duas categorias com base na sua solubilidade, em aquelas solúveis em solventes de gorduras e as solúveis em água (U.S, 2006). As vitaminas solúveis em gordura são as vitaminas A, D, E, e K. As vitaminas solúveis em água incluem vitamina C, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, folato, vitamina B12, ácido pantotênico e biotina), e talvez de colina (OTTEN, 2006).

3.5.2.1 Origem da Vitamina E

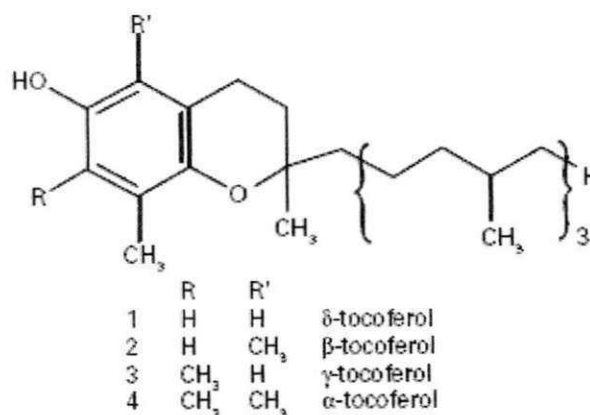
A vitamina E foi descoberta e caracterizada como uma nutricional solúvel em gordura, em estudos reprodutivos em ratos. Evans e Bishop publicaram

essas observações em 1922. A vitamina E ativa foi isolada a partir de óleo de gérmen de trigo em 1936 (KURTZWEIL, 2003). Neste ponto, o grupo de pesquisa de Evans chamou o composto α -tocoferol (α -T) de os tocos palavras gregas (nascimento) e ferein (trazer), relativos à sua essencialidade para ratos e para jovem uso. O sufixo ol indica que o composto é um álcool (FDA/CFSAN, 1994). Mais fatos marcaram a história inicial de vitamina E como: o isolamento de β -, γ -tocoferol (β -, γ -T) a partir de óleo vegetal em 1937 (CARLSON, 2001), a determinação da estrutura do α -T, em 1938 (OFFICIAL METHODS, 2006; DRISKELL, 2004), a síntese de α -T em 1938 (EPLER, 1993), o reconhecimento da atividade antioxidante dos tocoferóis (KANG, 1998), o reconhecimento de que α -T foi o mais eficaz em tocoferol prevenção da deficiência de vitamina E (CARLSON, 2001), o isolamento de δ -tocoferol (δ -T) a partir de óleo de soja em 1947 (KIMURA, 1990).

3.5.2.2 Obtenção e Estrutura da Vitamina E

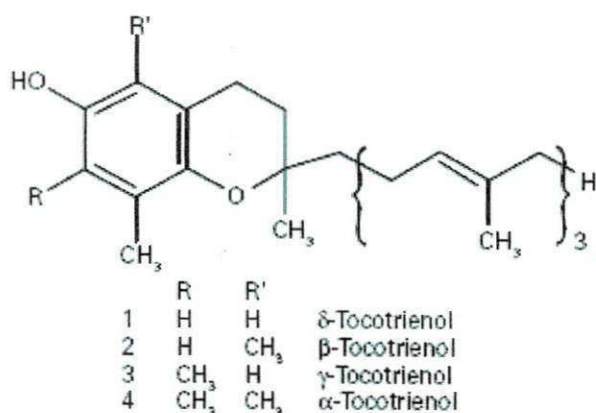
A vitamina E é encontrada em alimentos de origem vegetal e animal (WULF, et al., 1995; ENGESETH, 1993; MONAHAN, 1990). A Vitamina E natural existe em oito formas diferentes, quatro tocoferóis (α -, β -, γ -,e δ -) e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ -, e δ -) (LITWACK, 2003). As Figuras 6 e 7 ilustram as estruturas dos Tocoferóis e Tocotrienóis respectivamente:

Figura 6 - Estrutura dos Tocoferóis



Fonte: FANI, 2010

Figura 7 - Estruturas dos Tocotrienóis



Fonte: FANI, 2010

Alfa-tocoferol é considerada a única forma de vitamina que é biologicamente ativa no corpo humano. Apenas as formas estereoisoméricas 2R-(RRR-, RSR-, RRS-, e RSS) de α - Tocoferol são consideradas formas ativas de vitamina E para o ser humano. A principal função da vitamina E é a sua ação antioxidante. Os radicais livres são produzidos no corpo durante o metabolismo normal e exposição a vários fatores ambientais. A capacidade antioxidante da vitamina E é perdida por oxidação com radicais livres, mas a vitamina E pode ser reduzida por outros antioxidantes tais como a vitamina C, regenerando a antioxidante capacidade de vitamina E. Em carne crua, a maior parte da vitamina E é sob a forma de α -tocoferol. Durante o processamento, a vitamina E é perdida muito rapidamente e essa perda é acelerada por oxigênio, luz, calor, e vários metais, principalmente ferro e cobre, e pela presença de radicais livres na gordura que pode iniciar auto-oxidação (FANI, 2010).

3.5.2.3 Propriedades da Vitamina E

Além da sua atividade antioxidante, a vitamina E têm efeitos anti-aterogênicos e anti-inflamatória através da modulação de algumas sinalizações moleculares (MASTALLOUDIS, 2006). A vitamina E (tocoferol) é conhecida por ser um antioxidante natural que previne o dano celular ao inibir a peroxidação lipídica, a formação de radicais livres e doenças cardiovasculares. Ela inibe a formação de marcadores inflamatórios e reduz danos inflamatórios (JIANG; AMES, 2003).

Também é parcialmente responsável pela regeneração de todos os tecidos do corpo, incluindo sangue, pele, ossos, músculos e nervos (RINZLER, 2011).

3.6 BIOCERÂMICAS

O uso de biomateriais para substituir a perda óssea tem sido uma prática comum há décadas (CHOW, 2009). As cerâmicas podem ser tanto sintéticas quanto naturais e possuem muitas vantagens como biomateriais, para utilização em substituição ao tecido ósseo, como: são estruturalmente semelhantes ao componente inorgânico do osso, são biocompatíveis, osteocondutivas e, não possuem proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica (ABUKAWA et al., 2006), diminuindo assim o risco de rejeição pelo organismo (BURG; PORTER; KELLAM, 2000), além de possuírem um alto tempo de degradação *in vivo* (ABUKAWA et al., 2006). As cerâmicas empregadas no corpo humano podem ser subdivididas em três tipos de biomateriais: inerte, biodegradável e bioativo. Os materiais inertes (mais estritamente quase inertes) causam resposta de tecidos mínima ou nula. Materiais ativos estimulam a ligação de tecido vizinho como, por exemplo, estímulo de novo crescimento ósseo. Materiais degradáveis, ou reabsorvíveis, são incorporados no tecido vizinho, ou podem até mesmo ser completamente dissolvidos após certo período de tempo. (BAEHR et. al., 1995). As biocerâmicas têm sido utilizadas na forma densa e porosa (DACULSI, 1990). Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas favorecem o crescimento de tecidos através deles, fazendo com que haja um forte entrelaçamento do tecido com o biomaterial (KAWASHI, 2000).

Suas limitações estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, de forma que não podem ser utilizadas em regiões de grande esforço mecânico, e à sua natureza porosa, o que aumenta o risco de fraturas (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006). São amplamente indicadas na ortopedia e odontologia no reparo de defeitos ósseos, manutenção do rebordo alveolar e como implantes ortopédicos e dentários (LEGEROS, 2002).

3.6.1 Fosfato de cálcio – Apatitas

O termo apatita é de origem grega, apato significa “engano” que devido ao fato de primordialmente ter sido confundida com uma pedra preciosa, a turmalina. A apatita é um termo geral para minerais com composição do tipo $M_{10}(Z_2O_4)_6X_2$, onde diferentes elementos podem ocupar os sítios M, Z e X, como ilustra a Tabela 2 (FOOK, 2005)

Tabela 2 - Elementos que podem ocupar os sítios atômicos da apatita

Sítios	Elementos
M	Ca, Mg, Sr, Ba, Cd, Pb
Z	P, V, As, S, Si, Ge, C (como CO_3^{2-})
X	F, Cl, OH, O, Br, C (como CO_3^{2-}), vacâncias

Fonte: Aoki, 1991

Em meio natural às apatitas podem ser encontradas, em meio biológico é encontrado em ossos e dentes de vertebrados na forma de fosfato de cálcio. Ao longo dos anos biocerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente utilizadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo, devido à sua similaridade química e estrutural com a apatita biológica, que propicia a interação direta com este tecido. Uma maneira conveniente para classificar os fosfatos de cálcio é usando a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo, como indicado na Tabela 3 (HATNER, 2004).

Tabela 3 - Relação Ca/P das fases de apatita

Ca/P	Formula	Nome Químico
1.0	CaHPO ₄	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)
1.0	CaHPO ₄ .2H ₂ O	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)
1.33	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	Fosfato de Octacálcico (OCP)
1.00	Ca ₂ P ₂ O ₇	Pirofosfato de cálcio (CPP)
1.5	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato de tricálcio (α , α' , β , γ) – (TCP)
1.67	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroxiapatita
2.0	Ca ₄ P ₂ O ₉	Fosfato de tretracálcio
1.33	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .5H ₂ O	Fosfato octacálcico (OCP)

Fonte: HATNER, 2004

Os fosfatos de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade e são bem recebido e bem integrados pelo corpo humano quando implantados. A taxa de solubilidade dos fosfatos de cálcio é um parâmetro importante para seu comportamento *in vivo*. A composição, tamanho do cristal e cristalinidade afetam a taxa de dissolução do material. Mudanças nos parâmetros de rede estão diretamente relacionadas ao tamanho e quantidade do substituinte na rede da apatita. A diminuição desses parâmetros conduz a uma taxa de dissolução maior uma vez que com a diminuição do tamanho do cristalito a área superficial do material aumenta e com isso um maior contato com os fluídos corpóreos. A cristalinidade esta diretamente relacionada ao tamanho do cristalito, morfologia e a distorção do cristal. Uma baixa cristalinidade aumenta a solubilidade do material devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal (LEGEROS, 2002).

Pode-se dividir os fosfatos de cálcio em duas categorias, os que são obtidos pelo método de precipitação em solução aquosa próximo à temperatura ambiente e

os que são obtidos por síntese térmica ou decomposição (BOHNER, 2000). Logo a seguir estão relacionados alguns tipos de apatitas:

3.6.1.1 Hidroxiapatita

O conhecimento da microestrutura da hidroxiapatita (HA) é importante por vários aspectos. Primeiro porque, é um dos principais componentes do tecido ósseo, sendo assim o estudo da nucleação e crescimento dos cristais sob condições próximas das condições do ambiente biológico (temperatura de aproximadamente 37 °C, pH 7,4 e concentração baixa) dá a possibilidade de modelar os processos de biomineralização e desmineralização, que é a remodelação óssea. Segundo, como a HA é um material de implante biocompatível, a determinação da correlação entre morfologia e estrutura das partículas por um lado e as condições de crescimento por outro, permitem definir quais condições de temperatura, concentração e pH seriam fundamentais para uma síntese direta e racional que gere uma morfologia e tamanho de partícula desejado (SUVOROVA; BUFFAT, 1999).

A hidroxiapatita [HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], que corresponde o principal componente inorgânico dos tecidos duros, possui uma variedade de aplicações em preenchimento e substituição óssea devido a sua excelente bioatividade e osteocondutividade (ZENÓBIL, 1997; LOPES, 1997). A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos dentes e ossos (EANES, 1980). A hidroxiapatita ocorre raramente na natureza, porém sua estrutura é similar a fluorapatita (com o grupo OH⁻ ocupando os sítios do F⁻) (LOGAN, 1995). Esses minerais ocorrem como constituintes de várias rochas ígneas e metamórficas, especialmente em calcários cristalinos (ELLIOT, 1994). A princípio, todas as apatitas terrestres estavam presentes nas rochas ígneas. No decorrer do tempo geológico, a extensa e contínua lixiviação dessas rochas primárias pelas águas tem sido uma fonte para a formação de fosfato de cálcio biológico, na forma de apatita. Os esqueletos de algumas espécies marinhas também são fontes deste mineral. Alguns contêm carbonato de cálcio, porém a maioria contém fosfato de cálcio (MAVROPOULOS, 1999).

São dois os tipos de hidroxiapatitas mais consideradas: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais

grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos (FULMER, 1992). A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos (Ca1) e seis no sítio II, octaédricos (CaII) (EANES, 1980). Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (ALMQVIST, 1999).

São muitas as técnicas para a síntese do pó da hidroxiapatita. Um dos métodos mais utilizado é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. Outro processo para a síntese de hidroxiapatita é o sol-gel, que é um método químico, via úmida que dispensa alto vácuo e temperaturas elevadas. Como material de implante a hidroxiapatita pode ser obtida através da desproteinização do tecido ósseo, por tratamento hidrotérmico de corais ou ainda pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação de soluções aquosas ou reações no estado sólido (PARK, 2007; KAYALI; GOLLER; AKIN, 2011).

A Tabela 4 ilustra as formas das hidroxiapatitas usadas na medicina e na odontologia.

Tabela 4 - Formas das hidroxiapatitas usada na medicina e odontologia

Usos	Formas
Matriz ou suporte para crescimento ósseo	Grãos, porosa
Osso artificial	Grãos, densa, porosa
Cimento ósseo	Pó com PMMA
Articulações artificiais	Metal recoberto com Hap
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Terminais pericutâneos	Densa
Sistema de liberação densa	Densa ou pó

Fonte: E'GUES, 2005

O grande interesse pela hidroxiapatita como biomaterial, está relacionado por ser a principal fase encontrada no tecido ósseo e sua alta biocompatibilidade (OGUCHI, 1995).

3.6.1.2 ACP – Fosfato de cálcio amorfo

Os fosfatos de cálcio amorfo se dão quando são precipitados a partir de soluções aquosas supersaturadas, com pH neutro ou alcalino e uma fase amorfa e metaestável forma-se rapidamente nos estágios iniciais da reação (KIM, 2005; ABBONA, 1996).

As fundamentais propriedades apresentadas pelo ACP são: possibilidade de substituições catiônicas e aniônicas (apresenta característica semelhante à hidroxiapatita, porém com menor número de possibilidades de substituições, apresentando apenas os íons Mg^{2+} como substituintes do Ca^{2+} e CO_3^{2-} e F^- como substituintes do PO_4^{3-}); habilidade de transformação a outros fosfatos de cálcio (reconhece-se que o ACP ocorra como uma fase metaestável nos estágios iniciais da formação de fosfatos de cálcio a partir de soluções aquosas supersaturadas, em pH neutro ou alcalino e, também, durante a mineralização dos tecidos vivos); maior solubilidade do ACP em comparação à HA torna-se uma característica importante para a sua utilização como biomaterial, pois lhe confere maior velocidade de degradação no meio biológico. A velocidade de degradação de um material está fortemente relacionada à osteocondutividade e desempenha papel importante na fixação inicial de implantes com o tecido ósseo (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

3.6.1.3 OCP – Fosfato Octacálcico

Os fosfatos Octacálcico apresentam a fórmula $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$, embora a quantidade de água ser variável. As principais propriedades do OCP são: possibilidade de substituições catiônicas e aniônicas (a estrutura do OCP permite a incorporação de íons Cd^{2+} , Cu^{2+} e F^- . Obs.: a capacidade de adsorção destes íons pelo OCP é maior que a da HA e menor que do composto $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$; O OCP adsorve proteínas em sua superfície tão bem quanto a HA; O OCP é uma fase metaestável e sua transformação em HA é termodinamicamente apropriado, sendo espontânea e irreversível (HATNER, 2004; KAYALI; GOLLER; AKIN, 2011).

A utilização de OCP como biomaterial vem crescendo gradativamente, pois estudos revelam que este composto apresenta as propriedades de proliferação celular e osteocondutividade maiores que da HA, devido à sua maior velocidade de

reabsorção. A reabsorção do OCP estimula a regeneração óssea logo nos estágios iniciais de aposição óssea, sendo seguida pela formação de novo tecido ósseo. Dessa forma, o OCP é considerado um substituto ósseo mais adequado que a HA em aplicações onde se requer rápida formação óssea (DEKKER, 2005; IMAIZUMI, 2006).

3.6.1.4 TCP – Fosfato Tricalcico

O fosfato tricálcico – TCP, que contém fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com razão Ca/P de 1,5, também pode ser denominado de fosfato tricálcico anidro, onde o adjetivo anidro é utilizado para distinguir este composto dos precipitados hidratados que possuem razão Ca/P parecida. Podem ocorrer em 4 formas alotrópicas, são elas α -TCP, β -TCP, γ -TCP e α' -TCP.

As principais propriedades apresentada pelo TCP incluem a possibilidade de substituições catiônicas a forma alotrópica β -TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons Ca^{2+} sejam trocados por Mg^{2+} sem mudanças significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de β -TCP substituído por magnésio; As formas alotrópicas α e β -TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase α -TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} sejam trocados com o meio biológico; A utilização do TCP juntamente com a HA tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da HA. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura HA/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado. Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas α e β tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles (KAWACHI et. all, 2000).

3.7 BIOCAMPÓSITOS

Os compósitos têm surgido como uma valiosa classe de materiais de engenharia, pois oferecem muitas condições não alcançadas por outros materiais ou podem ser usados porque são economicamente mais viáveis do que os materiais

competidores. Muitos compósitos são materiais bifásicos, isto é, são constituídos por apenas duas fases; sendo uma denominada de matriz que é contínua e envolve a outra fase, chamada de fase dispersa ou de reforço (AMICO, 2006). A aplicação desses materiais compósitos tem sido facilitada pela introdução de novos materiais, melhorias nos processos de fabricação e desenvolvimento de novos métodos analíticos de teste (CALLISTER, 2002).

São formados por uma fase contínua, chamada matriz, geralmente formada por um polímero natural e são reforçados por fibras de diversas fontes botânicas ou de fibras de celulose de madeiras duras e coníferas (AVEROUS; BOQUILLON, 2004; MOHANTY et al, 2005; SATYANARAYANA, 2007).

Os biocompósitos, aqueles formados por fibras naturais e polímeros sintetizados por fontes renováveis que possuem potencial para serem os novos materiais do século XXI (MOHANTY *et al.*, 2005). As propriedades dos compósitos dependem de alguns fatores como adesão fibra-matriz, orientação da fibra, volume da fibra, etc. (CORRADINI, 2006; MATTOSO, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais – Certbio, que está localizado no Bloco CJ3, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

A caracterização biológica foi realizada no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP (UNESP).

4.2 MATERIAIS

- A quitosana fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich – de médio peso molecular com grau de desacetilação entre 75- 85%.
- Fosfato de cálcio- apatita fornecida pelo grupo Certbio
- Vitamina E DL. Alfa Tocoferol Acetato (pó) - GALENA
- O ácido acético glacial P.A., fornecido pela Vetec.
- O hidróxido de sódio P.A., fornecido pela Vetec.
- Camudongos machos *Swis*, procedentes do CEMIB (Centros Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), São Paulo. Todos os procedimentos que utilizaram células vivas foram conduzidos conforme normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratórios) e que obtiveram parecer do Comitê de Ética local (parecer nº.08/2009 CEP/FCF/CAR).
- A lisozima fornecida pela Sigma Aldrich.
- Tioglicolato de sódio (Difco Lab.Ltda).
- MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, Across Organics).
- LPS (Lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, Sigma Aldrich).
- Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline System - PBS, Sigma-Aldrich).

4.3 EQUIPAMENTOS

4.3.1 Difração de Raios X

Aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA.

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

Aparelho Spectrum 400 da Perkin Elmer.

4.3.3 Molhabilidade por Ângulo de Contato

Aparelho goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG localizado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais - Certbio.

4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Aparelho DSCQ20 (TA Instruments, EUA). A calibração do equipamento foi feita com metal índio (99,9%) em relação à temperatura e entalpia. As curvas foram analisadas em atmosfera de dinâmica de nitrogênio (50mL min^{-1}).

4.3.5 Microscopia Ótica (MO)

Aparelho Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens.

4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Aparelho Microscópio eletrônico de varredura de bancada Hitachi, modelo TM-1000, aumento máximo de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico,

mesmo em amostras não condutoras.

Aparelho Detector de EDS acoplado ao microscópio eletrônico de bancada HITACHI, modelo TM 1000.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Preparação das Membranas de Quitosana-Vitamina E e Fosfato de Cálcio

A solução de quitosana com concentração 1% m/v foi obtida através da técnica de evaporação do solvente, pela adição de 10g de quitosana em pó em uma solução de 1000 mL de ácido acético glacial 1% v/v, sob agitação constante em agitador mecânico – Nova Ética modelo M 110-VER-4K3 por um período de 20h em temperatura ambiente a uma velocidade de 620 rpm.

Em seguida, a solução polimérica foi filtrada à vácuo para remoção das impurezas e da parte insolúvel do material.

Após obtenção da solução de quitosana, seguiu-se para a etapa de adição da apatita dividindo-se a solução de quitosana em três partes iguais que receberam respectivamente 1%, 3% e 5% de concentração de fosfato de cálcio em relação à massa inicial da quitosana. Posteriormente ocorreu a adição da vitamina E, sendo assim foram adicionados 15 mg, em um volume de 30 mL da solução de quitosana com e sem apatita (1%, 3% e 5%). Estas adições foram realizadas em temperatura ambiente, sob agitação mecânica por 5 minutos para homogeneização.

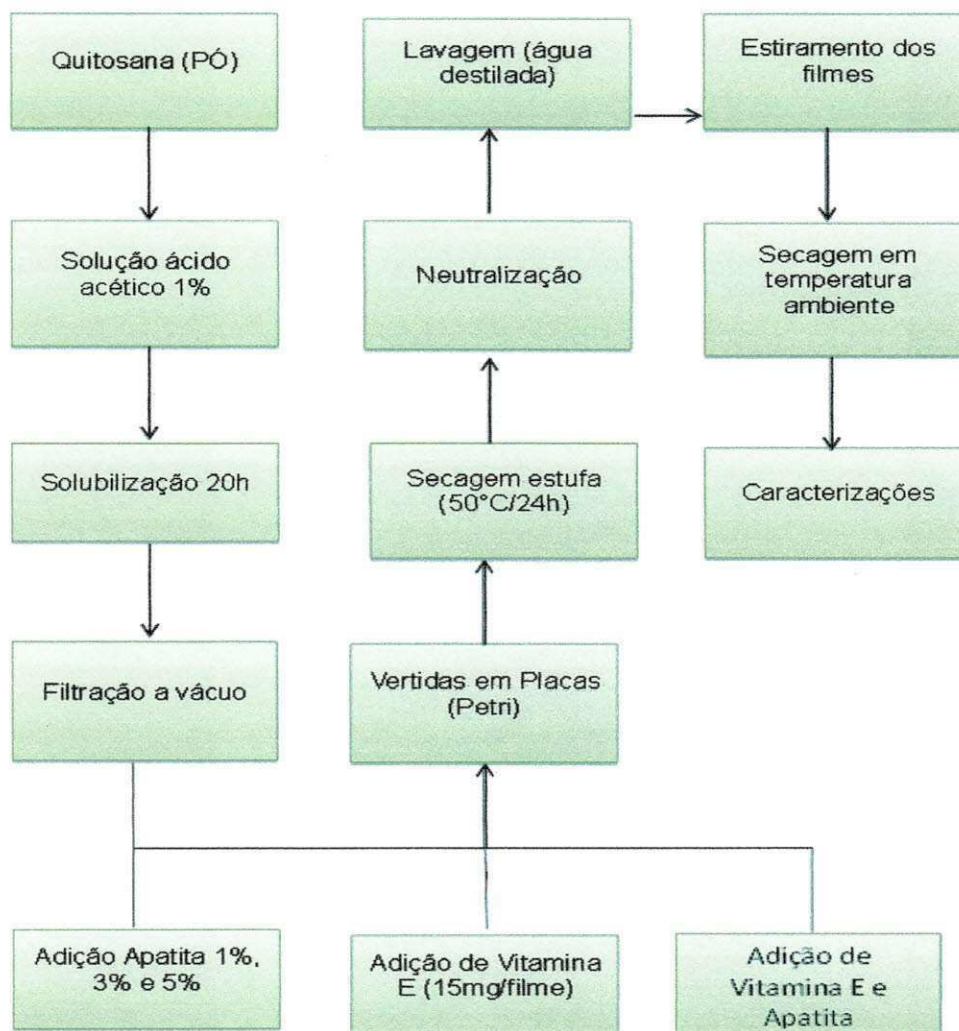
Após todas as adições realizadas foi retirado, um volume equivalente a 30 mL para preenchimento de cada placa do tipo Petri e acondicionadas em estufa até evaporação total do ácido e formação da membrana em temperatura de 50 °C por um período de aproximadamente 42h.

Após o processo de secagem, as membranas foram neutralizadas com solução de hidróxido de sódio 1 Mol/L por um período de 1h. Em seguidas as membranas foram lavadas com água destilada para retirada do resíduo de hidróxido de sódio.

Depois da neutralização, as membranas foram estiradas e secas por 24 h a temperatura ambiente e, posteriormente, caracterizadas. Foram confeccionadas 10 membranas de cada tipo.

A Figura 8 ilustra o fluxograma da elaboração das membranas desde o seu processo inicial até a sua caracterização.

Figura 8 - Fluxograma da elaboração de membranas.



4.5 CARACTERIZAÇÃO

O pó de fosfato de cálcio, vitamina E em pó assim como as membranas de quitosana pura, quitosana com as diferentes proporções de Apatita e Vitamina E foram caracterizados por Difração de Raios-X (DRX); Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Molhabilidade por Ângulo de Contato; Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X

(EDS); Microscopia Óptica (MO); Ensaio de Biodegradação Enzimática; Ensaio de Citotoxicidade e Determinação da Produção de Óxido Nítrico.

4.5.1 Difração de Raios X

A Difração de raios X (DRX) teve o objetivo de determinar o grau de cristalinidade. As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente. Os filmes foram examinados em um intervalo de 2θ entre 10,0 e 70,0 graus a uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

4.5.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Todas as membranas e o pó foram caracterizados por Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais, presentes nas matérias-primas utilizadas nesta pesquisa utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} .

4.5.3 Molhabilidade por Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a gota de água destilada com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Caso o ângulo de contato estático tenha um valor acima de 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é chamada de não-molhante. Com um valor aproximado a 0 o líquido recobre toda a superfície formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90° , a molhabilidade é dita parcial. Logo, quanto menor for o ângulo, maior será a molhabilidade (WISNIEWSKI; ARGUELHO, 2011).

As análises de ângulo de contato foram efetuadas após o gotejamento de água destilada na superfície das membranas. Foi utilizada uma câmara digital para capturar a imagem, estas imagens foram, posteriormente, remetidas a um

computador que possui um programa específico para ser feita a conversão do ângulo da interface líquido-material em unidade de tensão interfacial. A medida do ângulo de contato, assim obtida, foi utilizada para caracterizar a molhabilidade das superfícies.

4.5.4 Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) avalia a diferença da temperatura fornecida a uma substância sob um material de referência. As curvas foram analisadas em atmosfera de dinâmica de nitrogênio (50mL min^{-1}) usando amostras de 2 mg e razão de aquecimento de 10°Cmin^{-1} para análise de transições de fase nos compósitos, quitosana-vitamina E/apatita. Numa variação temperatura de 0°C até 400°C

4.5.5 Microscopia Ótica (MO)

Para materiais que são opacos a luz visível, como é o caso dos metais, da maioria dos cerâmicos e polímeros, somente a superfície pode ser observada e deve ser criteriosamente preparada de maneira que venham a revelar a microestrutura (FOOK, 2005). A microscopia Ótica foi utilizada para avaliação da morfologia das membranas (HOLANDA, 2011). O ensaio foi realizado no aumento de 50x para o pó da vitamina E e 1750x para as demais amostras.

4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

O microscópio eletrônico de varredura é normalmente utilizado para observações de amostras espessas. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, o que resulta em imagens com aparência tridimensional (AIMOLI, 2007; PADILHA; AMBROZIO FILHO, 2004). A microscopia eletrônica foi utilizada para obter informação morfológica e topográfica sobre superfícies dos sólidos. O ensaio foi realizado no aumento de 1000x.

O EDS é um aparelho no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela

amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual. O ensaio foi realizado no aumento de 1000x (o ensaio foi realizado no mesmo local onde foram retiradas as micrografias) (PADILHA; AMBROZIO FILHO, 2004).

4.5.7 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Para este teste utilizou-se como base as normas ASTM F1635-04 *Standard teste Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2010) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007).

O Ensaio de Biodegradação Enzimática teve o objetivo de verificar a degradação de um biomaterial em meios biológicos pois é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente (DALLAN, 2005).

4.5.8 Avaliação de Viabilidade Celular dos Macrófagos

O ensaio tem como objetivo de atender a norma ISO 0993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficarão em contato com a pele, optou-se pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular). O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células que se baseia na capacidade da enzima desidrogenase encontradas nas mitocôndrias de células vivas converterem o substrato amarelo, solúvel em água (MTT) em produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazana, que são insolúveis em água, que poderão ser então detectado através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro . A

quantidade do formazana produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Este ensaio foi realizado segundo as normas descritas por MOSMANN, 1983.

4.5.9 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

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

O óxido nítrico é um derivado do aminoácido L-arginina pela atividade enzimática de três dioxigenases, denominadas óxido nítrico sintetases (ONS). Dois isômeros dessa enzima são expressos na forma constitutiva (cONS) em células endoteliais, nos neurônios e músculos esqueléticos. O terceiro isômero induzido (iONS) é identificado nas células do sistema imune, a exemplo dos macrófagos (FLORA; ZILBERSTEIN, 2000).

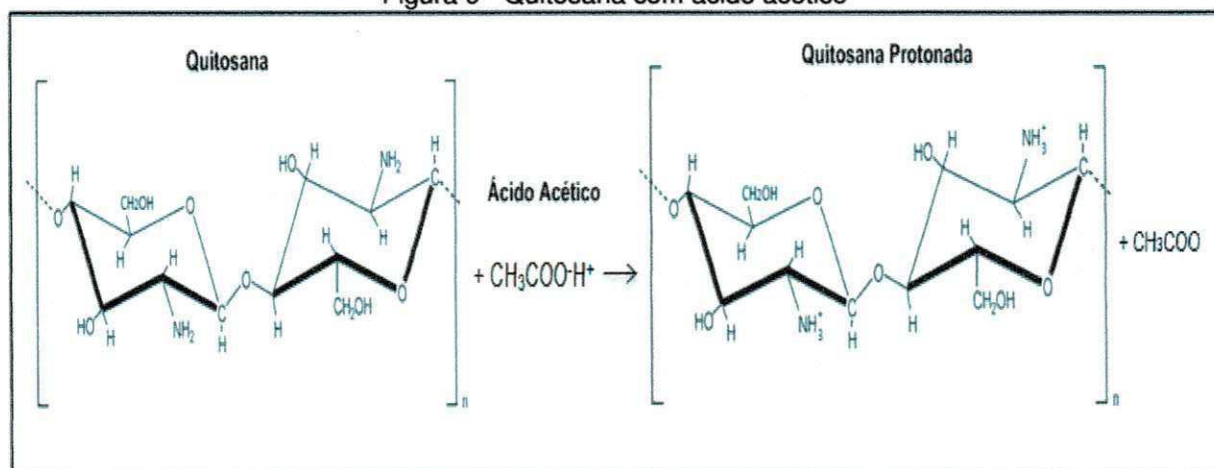
Uma vez que o óxido nítrico mantém significativa associação com a destruição tecidual mediada pelos processos inflamatórios crônicos, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade, mediante a síntese de óxido nítrico em filmes híbridos à base de quitosana/fosfato de cálcio/vitamina E, em cultura de macrófagos. Este ensaio foi realizado segundo as normas descritas por GREEN, 1982.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LIGAÇÕES E REAÇÕES QUÍMICAS

A quitosana é um biopolímero solúvel em meio ácido graças ao grupo amino que se comporta como base de Lewis (elementos que possuem pares de elétrons livres capazes de receberem prótons) recebe H^+ do ácido resultando na protonação da quitosana liberando acetato (CH_3COO^-) no meio (ZILNIK *et al.*, 2007; BRUICE, 2006). As Figuras 9 e 10 descrevem a sequência de uma possível reação do composto.

Figura 9 - Quitosana com ácido acético

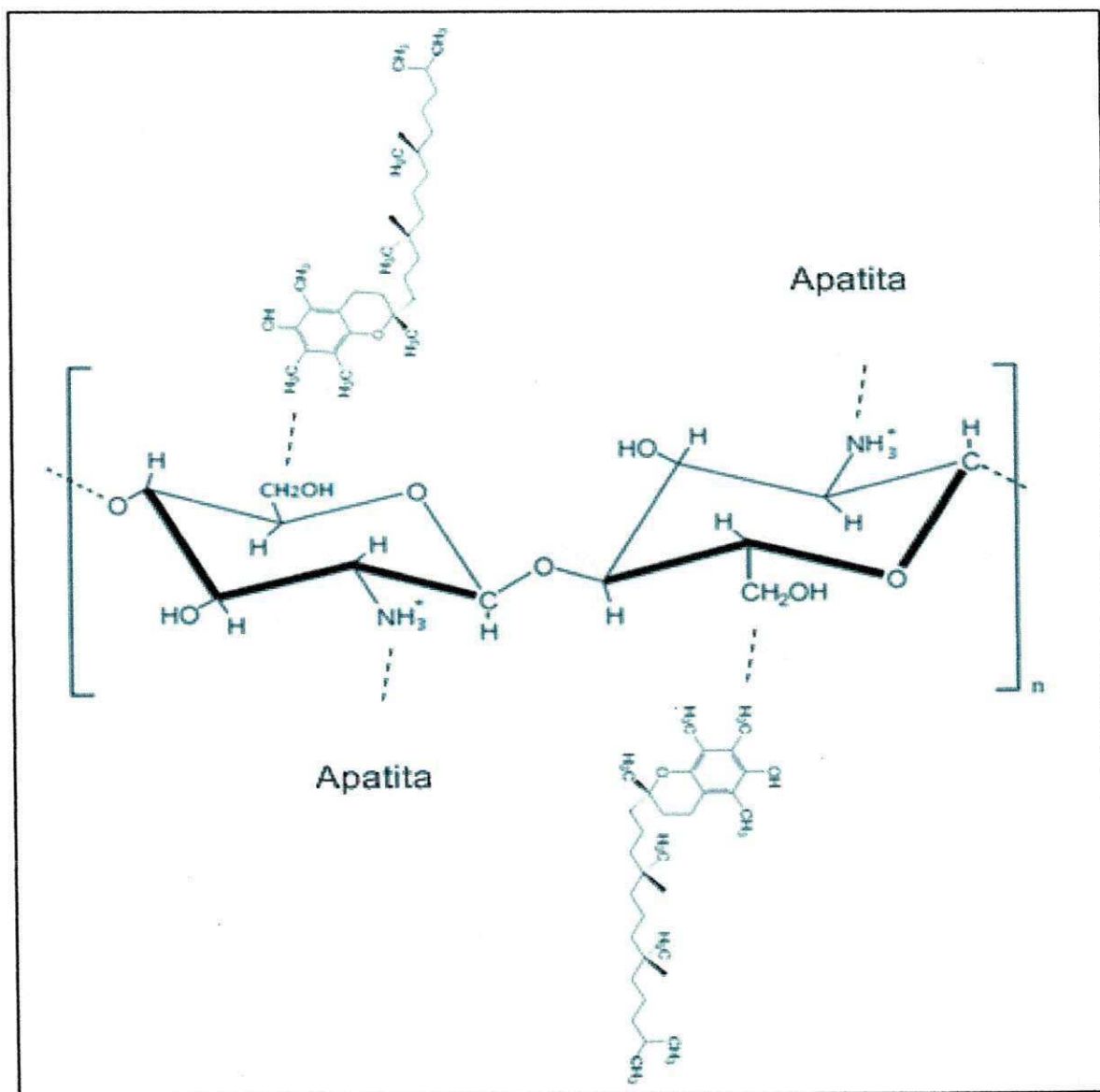


Fonte: Próprio autor

Com a adição do fosfato de cálcio, o grupo amino ($-NH_2$) da quitosana se transforma em NH_3^+ sendo positivamente carregado, formando um complexo com o grupo fosfato (PO_4^{3-}). A dissolução da apatita em meio ácido resulta em uma reação que estará em termos de acetato disperso no meio (ANDRADE, 2007; BRUICE, 2006).

A vitamina E (alfa-acetato de tocoferol) incorporada na solução de quitosana/HA realiza uma ligação intramolecular com a quitosana na sua região de menor impedimento (OLIVEIRA, 2009). A Figura 10 ilustra a reação citada acima.

Figura 10 - Quitosana Protonada com adição de vitamina E e apatita

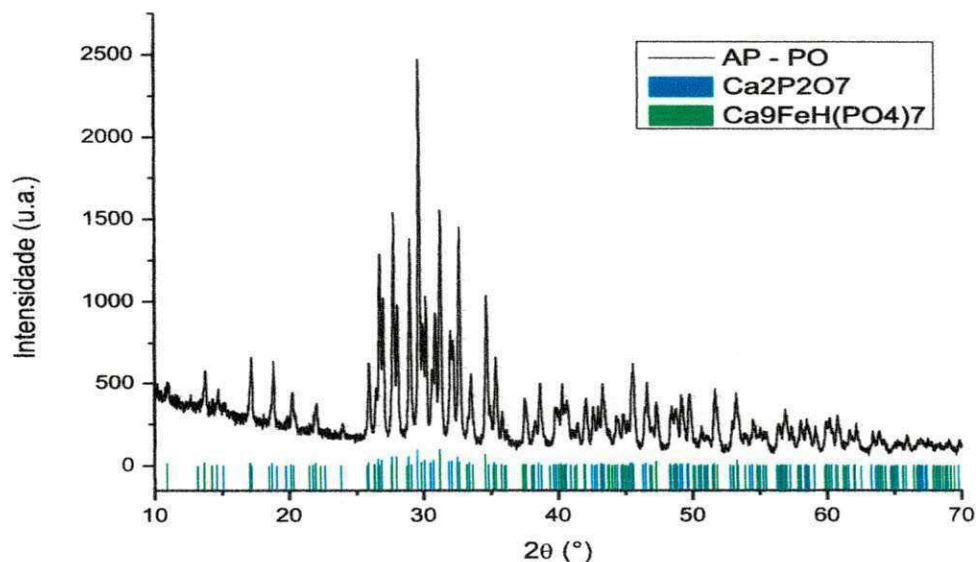


Fonte: Próprio autor

5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

O difratograma de raios X (DRX) obtido do pó da apatita está representado na Figura 11.

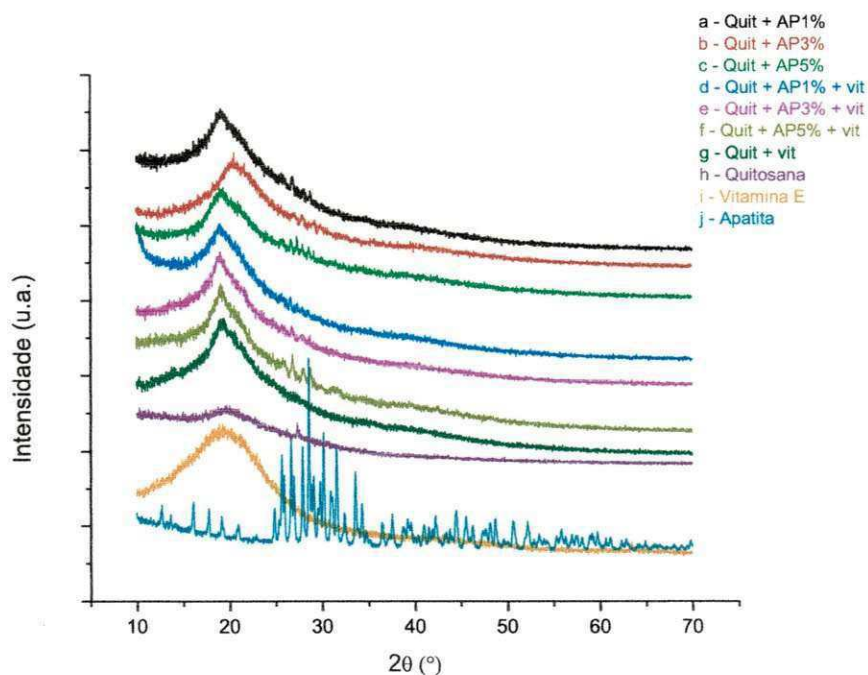
Figura 11 - Difratoograma do pó do fosfato de cálcio – apatita



Através dos padrões de DRX foi possível identificar a presença das fases cristalinas de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) numa quantidade de 56%, com simetria tetragonal e grupo espacial P41 (CALCULATE,1997) e fosfato de cálcio ($\text{Ca}_9\text{FeH}(\text{PO}_4)_7$) numa quantidade de 44%, com simetria romboédrica e grupo espacial R3C (LAZORYAK; KHASANOV, 1994).

Logo abaixo a Figura 12 ilustra os difratogramas dos filme de quitosana, quitosana/apatita nas proporções de (1%, 3% e 5%) com e sem vitamina E, dos pós de vitamina E e novamente o da apatita.

Figura 12 - Difratomogramas dos filmes de: (a) Quitosana (Quit) + Apatita (AP) 1%; (b) Quit + AP 3%; (c) Quit + Ap 5%; (d) Quit + Ap 1% + Vitamina E (Vit); (e) Quit + Ap 3% + Vit; (f) Quit + Ap 5% Vit (g) Quit + Vit; (h)Quit; (i) Vit pó e (j) AP pó.



O difratograma do filme de quitosana apresentou o pico típico de material semicristalinos, com base larga em $2\theta = 20^\circ$ que corrobora com Lima (2010). A quitosana tem um perfil semicristalino proveniente das fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. As fortes interações provem uma certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAM; TOKURA, 2006).

O difratograma do pó de apatita já foi apresentado separadamente na Figura 12, já a vitamina E apresentou uma banda de difração em $2\theta = 20^\circ$ indicando um perfil semicristalino e que seu comportamento cristalino é superior ao da quitosana. Quando observado os compósitos de quitosana-vitamina E/apatita e quitosana/apatita verificou-se que a incorporação tanto da vitamina E, quanto da apatita alteram o perfil semicristalino da membrana de quitosana tornando-a mais cristalina e esse efeito fica mais evidente com o aumento da concentração da apatita e pela adição da vitamina E. Também foi possível visualizar um perfil de difração nos filmes na faixa 2θ entre 25° a 30° que está sobreposta ao background indicando a incorporação da apatita.

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica de FTIR foi proposta como uma maneira possível para avaliar se ocorreu a interação entre os grupos funcionais das moléculas que compõem essas substâncias. Neste caso estudaram-se membranas quitosana e o compósito de quitosana com apatita com 1%, 3% e 5% com e sem vitamina E.

Analisando o espectro de infravermelho obtido do filme de quitosana verificou-se que ele está de acordo com Barbosa, (2011) e Ponciano, (2010), (Tabela 5) pois o espectro apresentou todas as absorções relativas a quitosana podendo ainda afirmar que a mesma não é 100% desacetilada pois possui uma banda característica da amida ($O = C - NHR$), como pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13 - Espectros da Quitosana

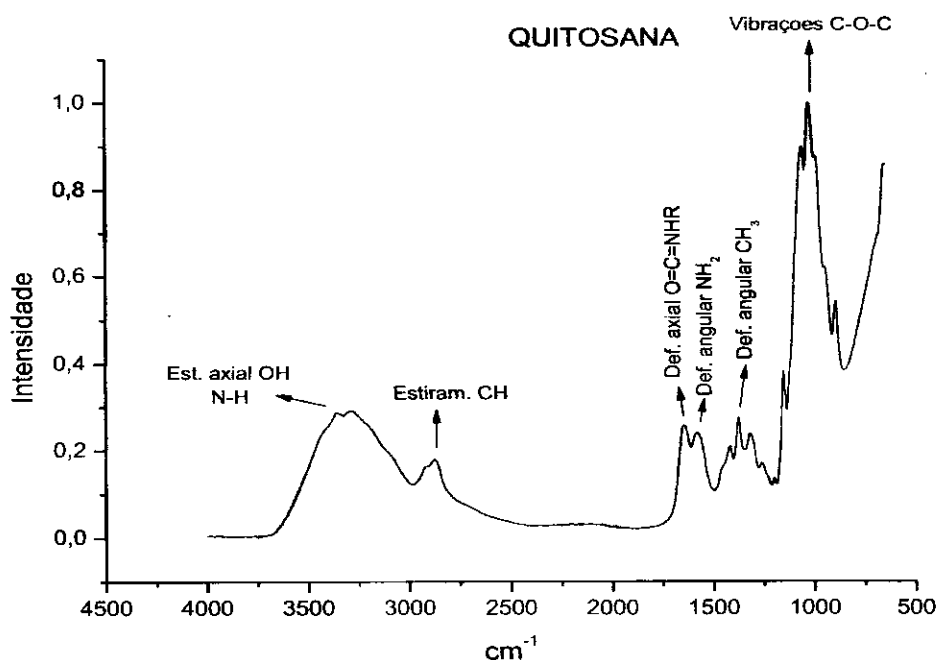


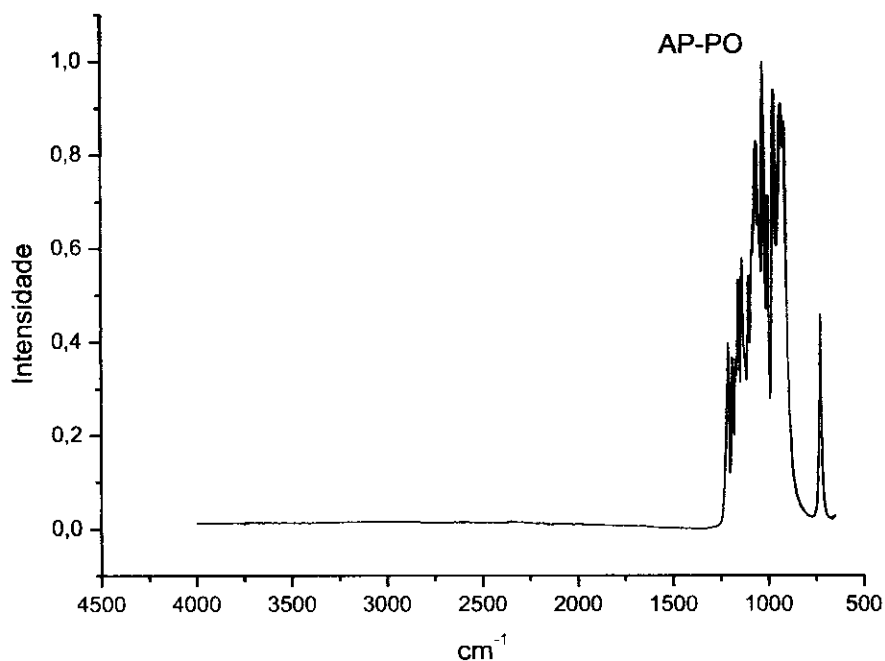
Tabela 5 - Bandas de absorção no FTIR dos filmes de quitosana com GD de 75% – 85%

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3334	Deformação axial de O-H e N-H do grupo NH_2
2928 e 2873	Deformação axial de C-H de grupos CH_2 e CH_3
1652	Deformação axial de RHN-C=O (amida)
1586	Deformação angular N-H do grupo NH_2 (amina)
1423 e 1319	Deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico
1377	Deformação angular do C-H de CH_3
1150, 1062 e 1020	Deformação axial do C-O-C da ligação éter

Fonte: PONCIANO, 2010.

Analisando o espectro de infravermelho obtido do pó da Apatita nota-se que ele apresentou as absorções relativas a apatita, como o grupo característico PO_4 como pode ser observado na Figura 14 e na Tabela 6, corroborando os estudos de Oliveira (2009).

Figura 14 - Espectros do pó da Apatita



Região de Absorção (cm^{-1})	Designação
128	Estiramento PO_4^- em HPO_4^{2-}
1100, 1093, 1047	Estiramento assimétrico de PO_4^{3-} ou Estiramento PO_3 em HPO_4^{2-}
965	Estiramento simétrico PO_4
918	Estiramento P-OH em HPO_4
884	Estiramento antissimétrico de CO_3
650	Vibrações OH de hidroxila
616, 581	Deformação

Fonte: FUKUMURA, 2009.

Avaliando os espectros do pó da vitamina E na Figura 15 verifica-se que ele está de acordo com Fukumura (2009) (Tabela 7) e corrobora com Martin (2011) e Prado (2011), pois o espectro apresentou todas as absorções relativas a vitamina E.

Figura 15 - Espectros do Pó da Vitamina E

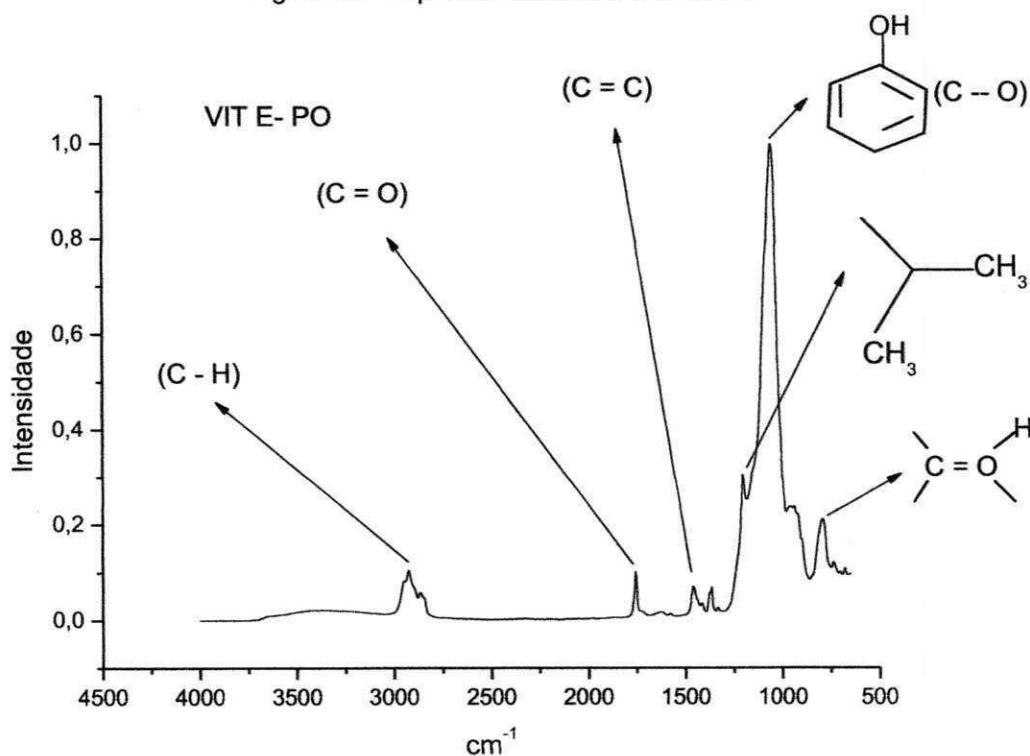


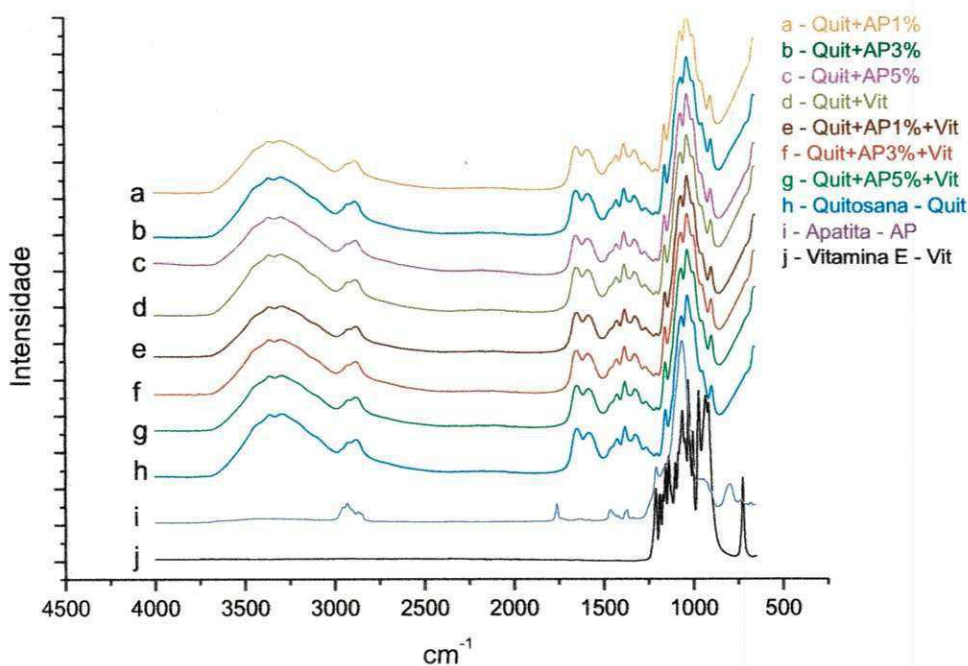
Tabela 7- Bandas de absorção no FTIR do pó da Vitamina E

Numero de onda (cm^{-1})	Atribuição
Isopropil	Simetria de flexão aparece como característica do grupo CH_3 — 1100cm^{-1}
Fenol /(C-O)	Estiramento do grupo 1200cm^{-1} - 1260cm^{-1}
C = C	Corresponde a ligação dupla do anel aromático 1450cm^{-1} - 1500cm^{-1} - 1580cm^{-1} e 1600cm^{-1}
(C - H)	Estiramento do grupo 2890cm^{-1}
(C=O)	Estiramento do grupo 1715cm^{-1} - 1760cm^{-1}
Alceno	Deformação angular 850cm^{-1} - 790cm^{-1}

Fonte: FUKUMURA, 2009.

A Figura 16 ilustra todos os espectros obtidos pelo ensaio de FTIR, são eles: filme de quitosana (quit), quitosana/apatita (AP) nas proporções de (1%, 3% e 5%) com e sem vitamina E (Vit), dos pós de vitamina E e do pó da apatita.

Figura 16 - Espectrogramas dos filmes de (a) Quitosana (Quit) + Apatita (AP) 1%; (b) Quit + AP 3%; (c) Quit + Ap 5%; (d) Quit + Vitamina E (Vit); (e) Quit + Ap 1% + Vit; (f) Quit + Ap 3% + Vit; (g) Quit + Ap 5% Vit (h)Quit; (i) Ap pó e (j) Vit pó.



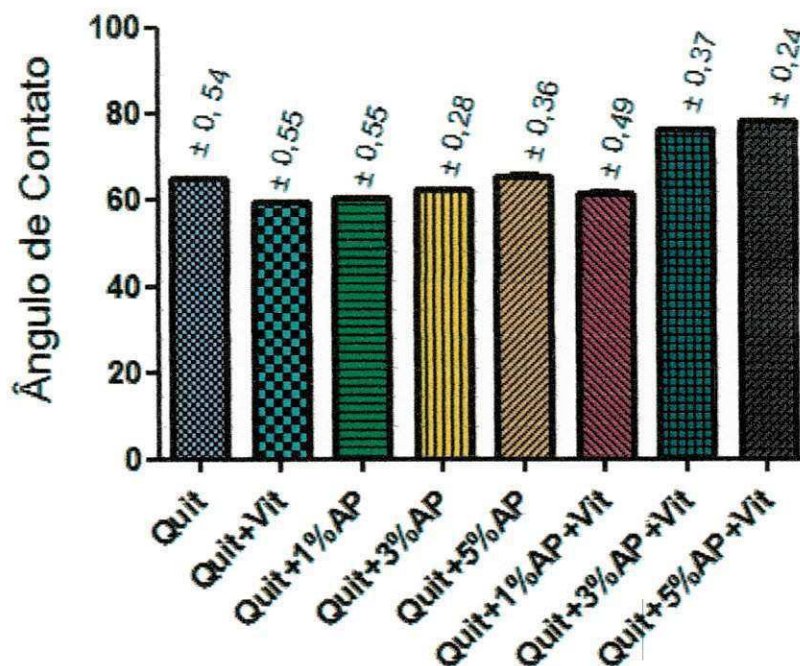
De acordo com a Figura 16, pode-se afirmar que a adição da apatita (1%, 3% e 5%) e a vitamina E nas membranas de quitosana não alteraram os grupos funcionais característicos da quitosana. Porém, não necessariamente, implica que não tenha acontecido uma interação química entre os constituintes dos compósitos, pois a análise de infravermelho é um método de análise de superfície (AIMOLI, 2007) e as partículas de apatita e vitamina E estão recobertas pela matriz quitosana. No entanto, o ensaio de DRX confirmou a interação química ocorrida entre os constituintes desta pesquisa.

5.4 MOLHABILIDADE POR ÂNGULO DE CONTATO

A Figura 17 ilustra o resultado do teste de molhabilidade das membranas de quitosana (quit), quit com vitamina, quit com apatita nas concentrações de 1%, 3% e 5% com e sem vitamina E. Foram utilizadas três amostras de cada tipo de membrana e realizado cinco medições em cada uma delas. Os resultados expressos na Figura 17 foram obtidos a partir da média dos ângulos de contatos encontrados nas amostras.

De acordo com os resultados, verifica-se que todas as membranas apresentaram as medidas de ângulo de contato menor que 90° o que indica hidrofiliabilidade. Este resultado era desejável devido às membranas serem confeccionadas para um posterior contato com o corpo humano.

Figura 17 - Medida de ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas.

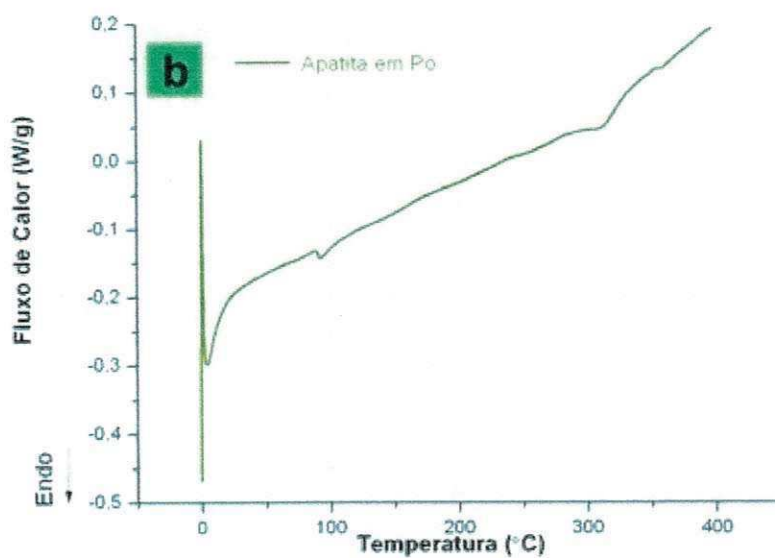
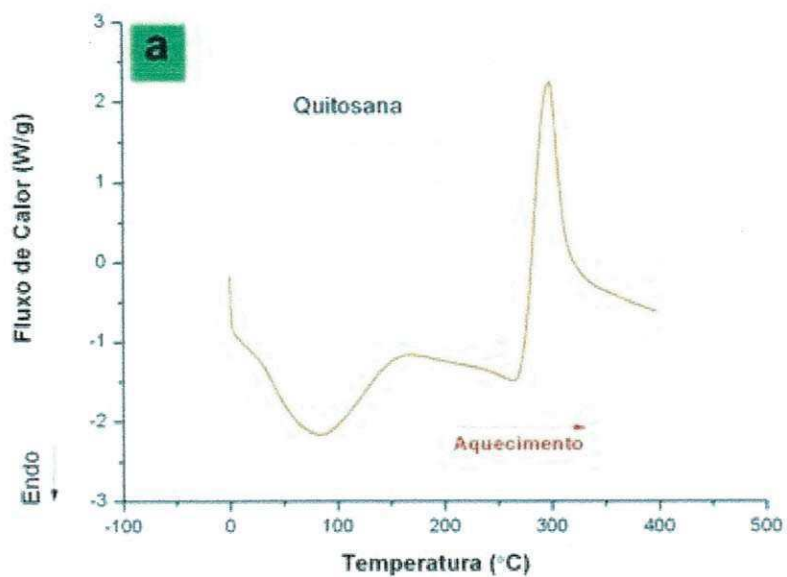


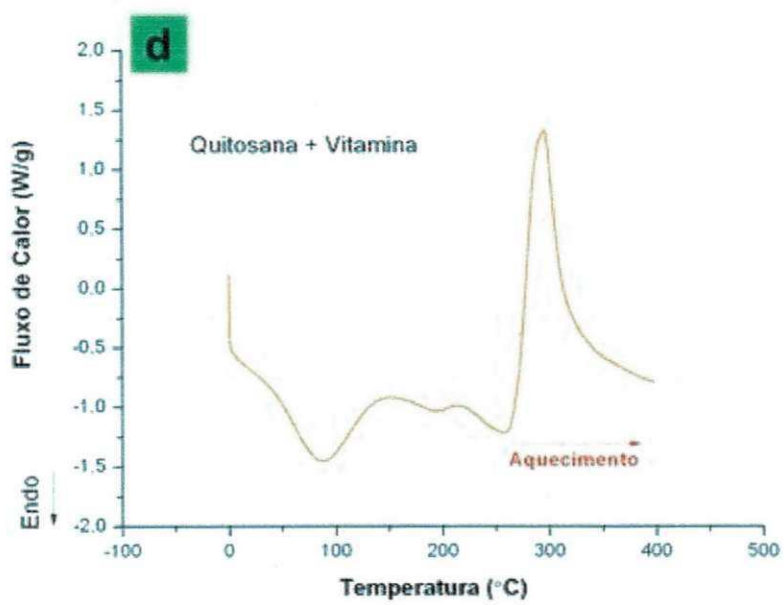
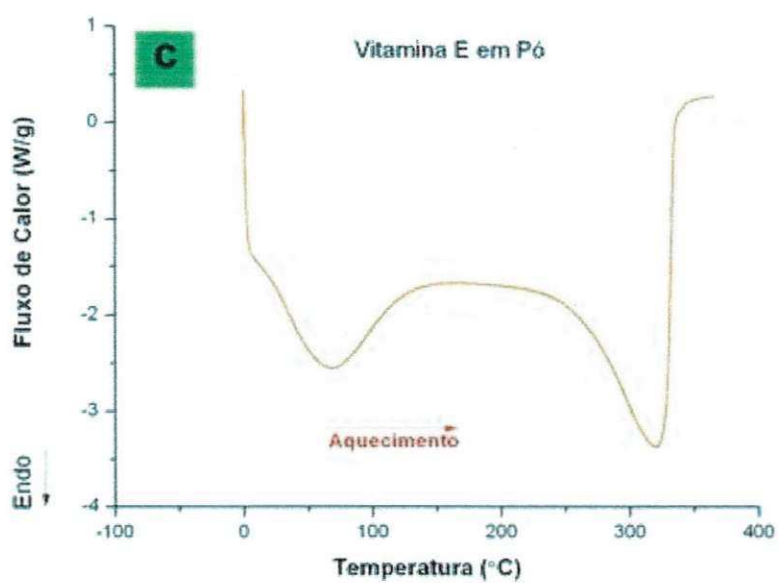
Observa-se na Figura 17 que a presença do fosfato de cálcio nas proporções de 1%, 3% e 5% nas membranas de quitosana e quitosana com vitamina alteraram os valores médios de ângulo, ou seja com o aumento do fosfato diminuiu a molhabilidade, logo verificou-se que na proporção de 5% de fosfato de cálcio, a molhabilidade da membrana foi reduzido. Verifica-se também que a membrana de quitosana com vitamina teve um potencial maior em sua molhabilidade.

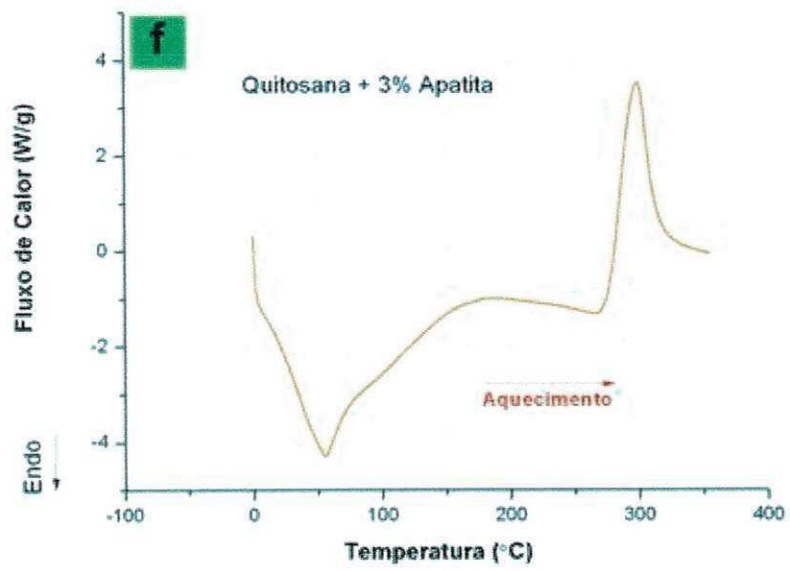
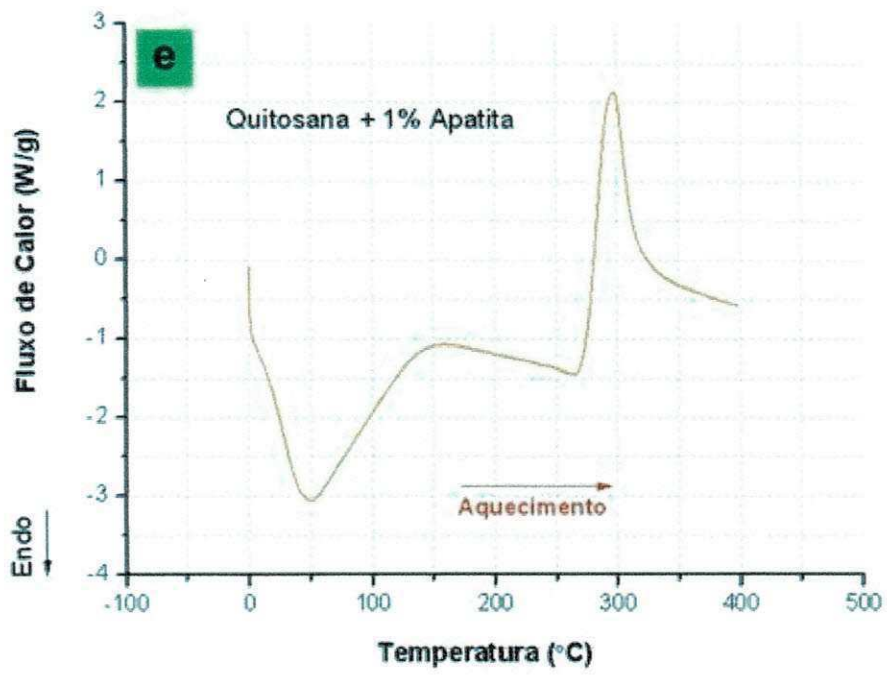
5.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

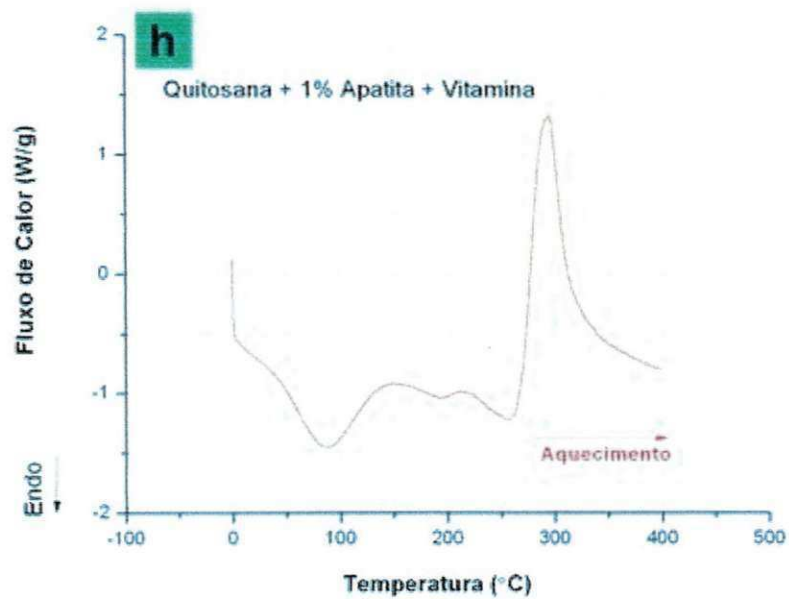
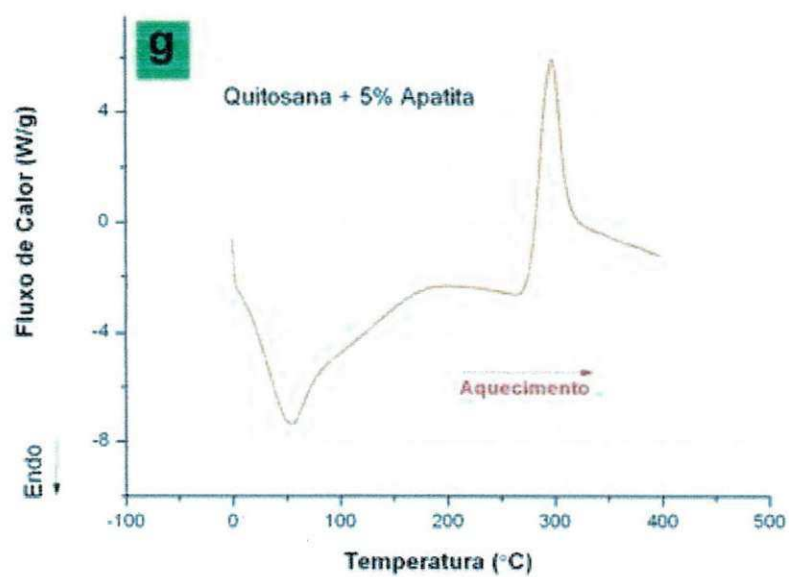
Na Figura 18 pode-se observar as curvas DSC de amostras de quitosana, apatita, vitamina E e de compostos quitosana/apatita (1%, 3% e 5%) com e sem Vitamina E.

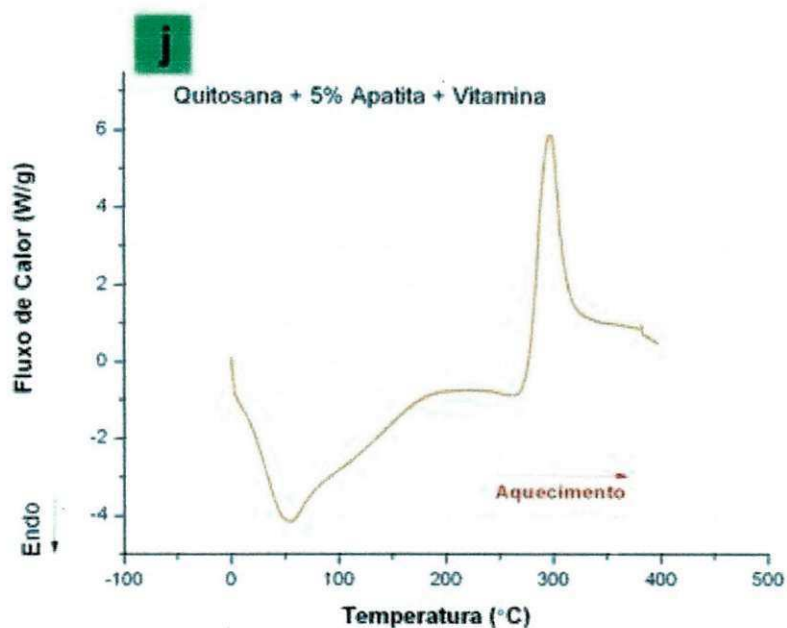
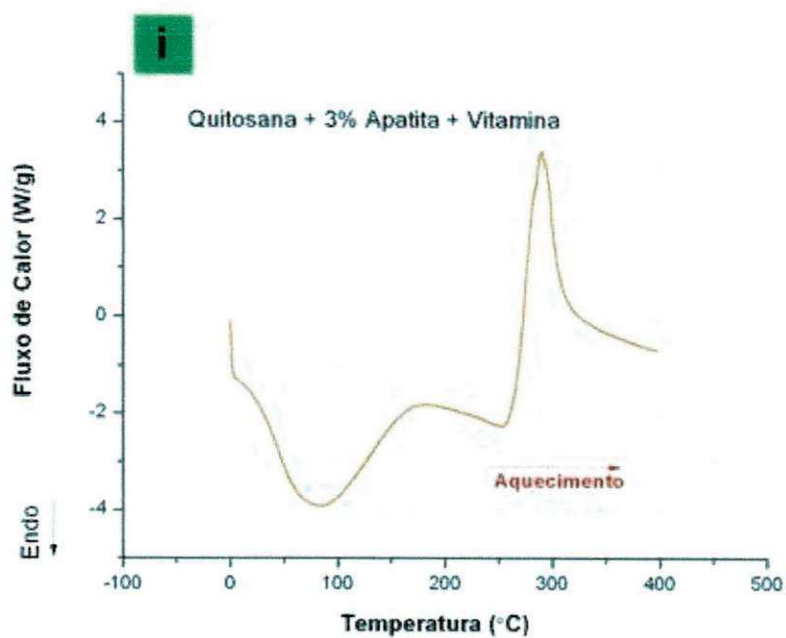
Figura 18 – Análise de DSC para as membranas: (a) Quitosana (Quit); (b) Apatita (Ap); (c) Vitamina E (Vit) pó; (d) Quit + Vit; (e) Quit + Ap 1%; (f) Quit + Ap 3%; (g) Quit + Ap 5%; (h) Quit + Ap 1% Vit; (i) Quit + Ap 3% + Vit e (j) Quit + Ap 5% + Vit.











Na maioria dos casos, observaram-se dois picos, o primeiro, endotérmico, que é correspondente a perda de água residual e o segundo, exotérmico, corresponde a degradação da amostra, que continua além do limite de temperatura do experimento segundo Barbosa (2011).

A curva de DSC Figura 18 (a) correspondentes a membrana de quitosana pura. Ela apresenta dois picos um endotérmico que aconteceu em torno de 80 °C e outro exotérmico em torno 300 °C corroborando com Parize (2006).

O fosfato de cálcio Figura 18 (b) não apresentou picos, nem mesmo referente à perda de água, isto pode ter ocorrido pois a temperatura máxima utilizada neste ensaio foi de 400°C e segundo Kayali, Goller, Akin (2011) o fosfato de cálcio decompõe-se a temperaturas elevadas, bem acima da temperatura que foi realizado o ensaio, podendo também ser comprovado devido a síntese do material ter sido feita a uma temperatura de 900°C.

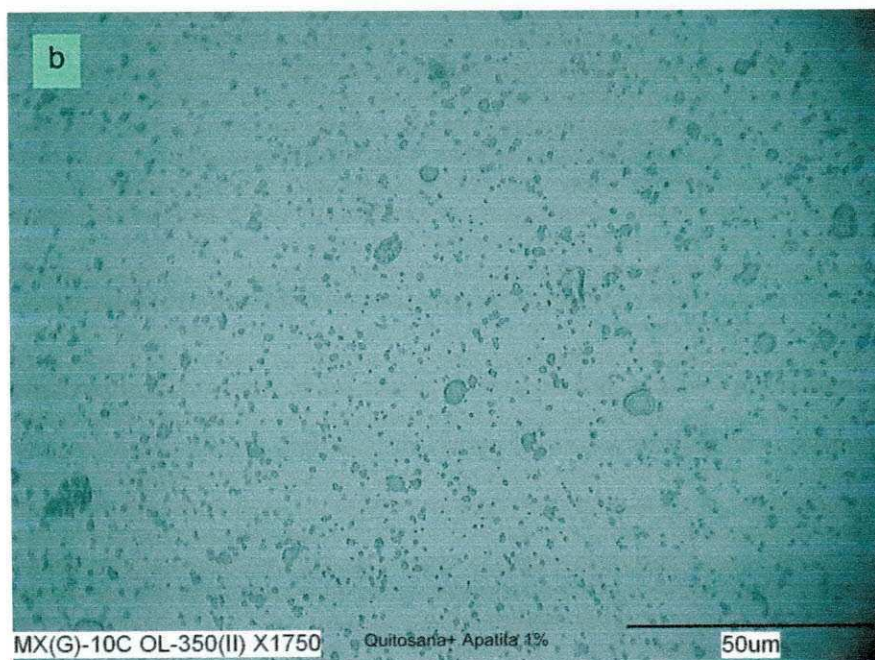
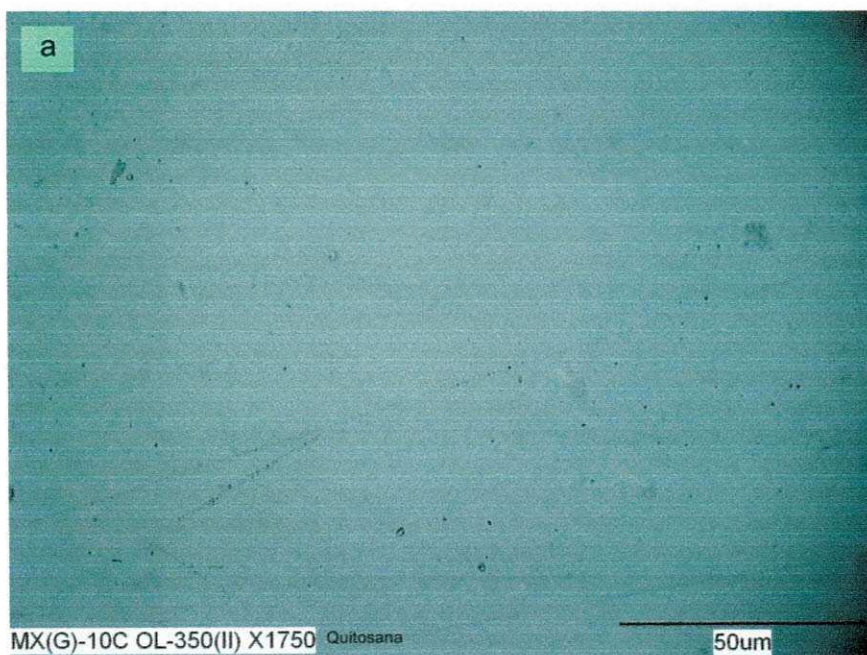
A vitamina E apresentou 2 picos endotérmico Figura 18 (c) o primeiro, corresponde a perda de água residual, cuja área vai depender da secagem da amostra antes de realizar o ensaio e o segundo, corresponde a degradação da amostra, que continua além do limite de temperatura do experimento o que corrobora com Almeida (2008) e Gondim (2009).

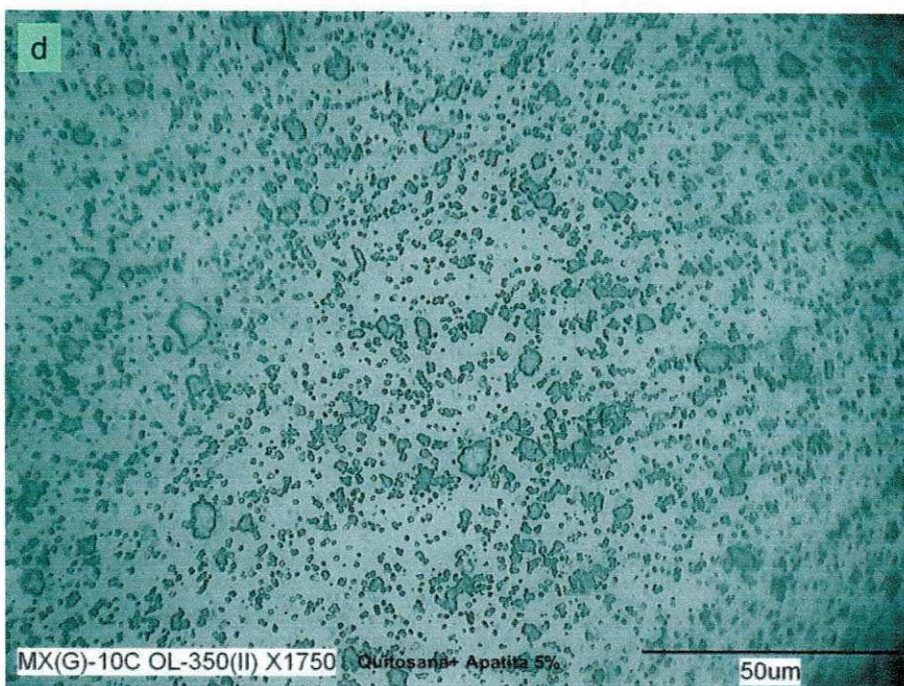
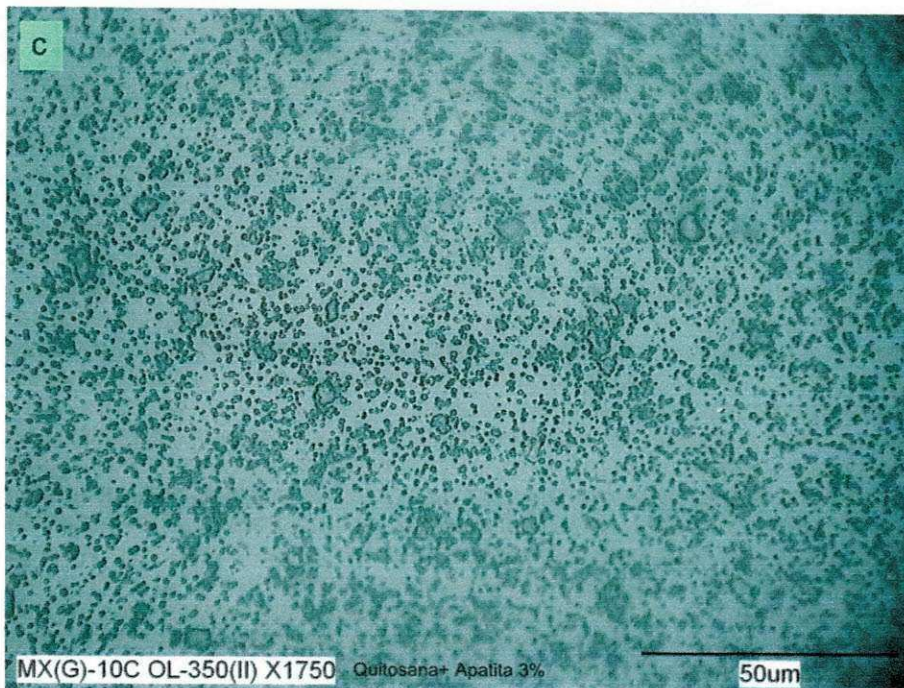
No primeiro estágio, é possível verificar que a membrana de quitosana com apatita perdeu água mais facilmente do que os compósitos quitosana-vitamina E/apatita, caracterizando uma maior resistência térmica dos compósitos quando acrescida da vitamina E com exceção a Quitosana - Vitamina E e 5% de apatita, isto pode ter ocorrido devido a as partículas de apatita estarem dispersas nos filmes de formar heterogênea. Já as temperaturas de degradação de todos os compostos ficaram muito próximas, em torno de 300°C.

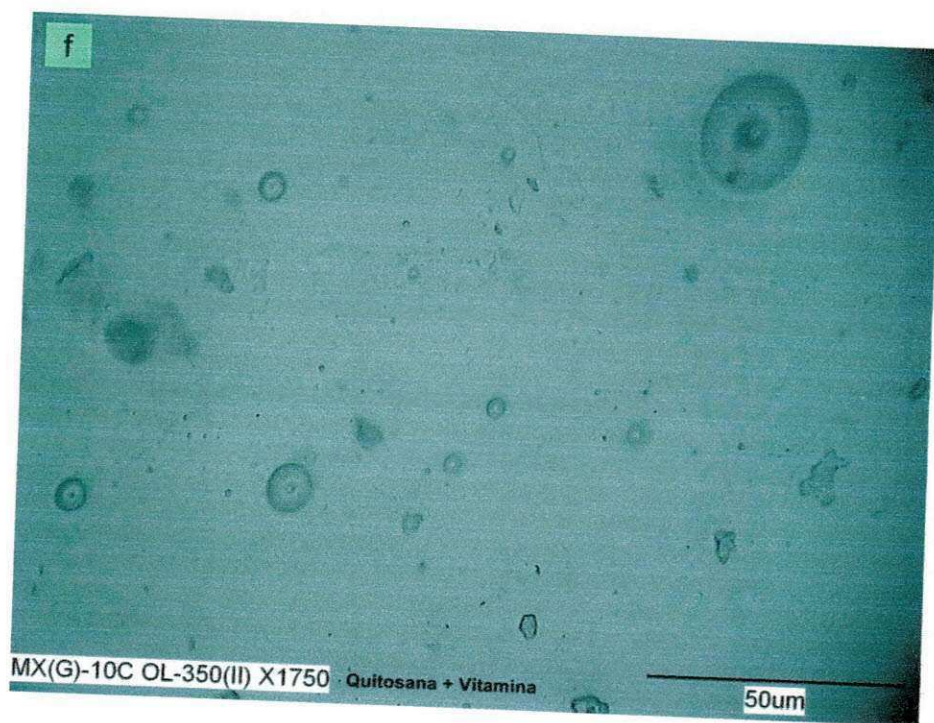
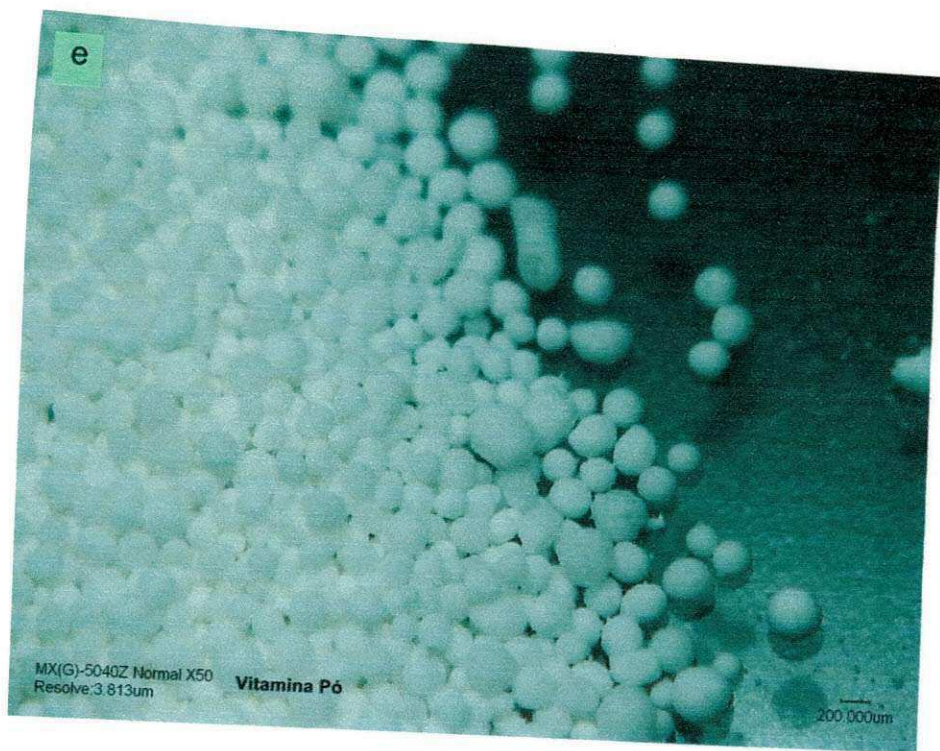
5.6 MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

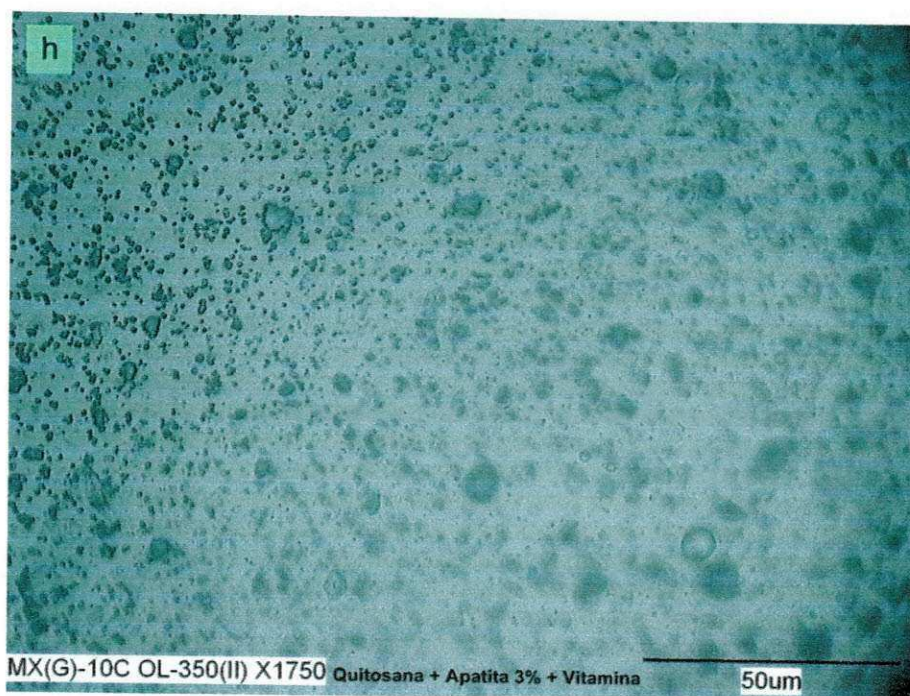
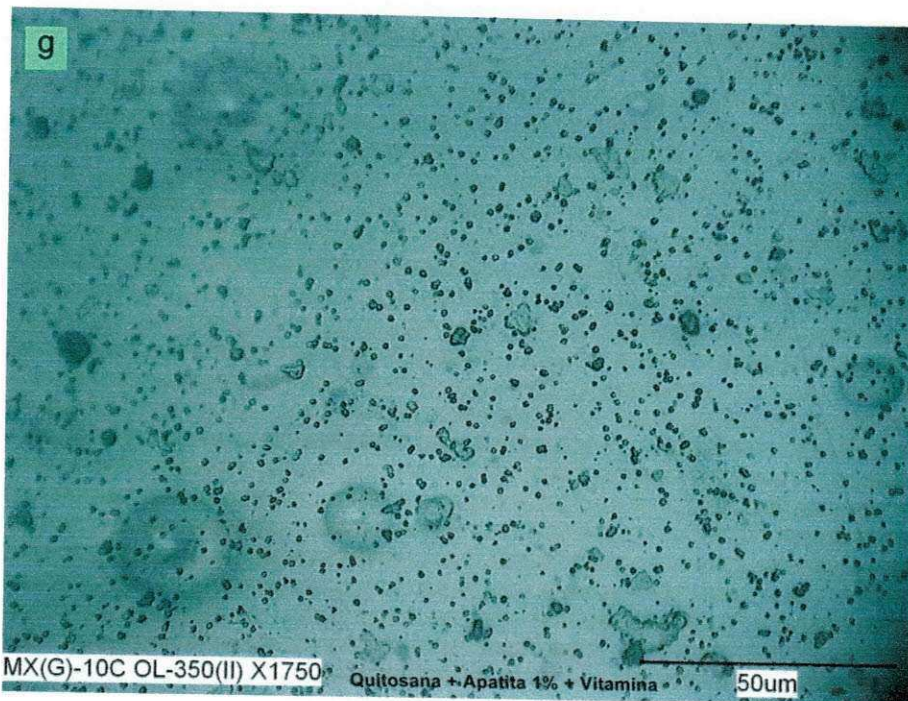
Na Figura 19 é observada a microscopia ótica das membranas de quitosana com (1%, 3% e 5%) de apatita com e sem vitamina E, assim como no MEV verifica-se claramente que houve a incorporação nos filmes de quitosana da apatita e da vitamina E.

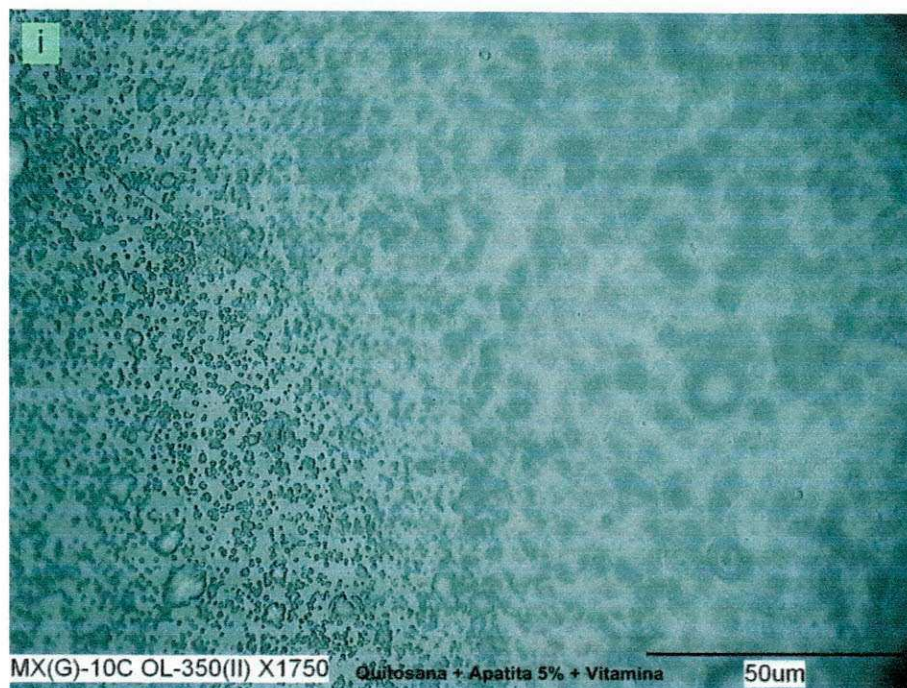
Figura 19 - Microscopia ótica as membranas: (a) Quitosana (Quit); (b) Quit + Apatita (Ap) 1%; (c) Quit + Ap 3%; (d) Quit + Ap 5%; (e) Vitamina E (Vit) pó; (f) Quit + Vit; (g) Quit + Ap 1% + Vit; (h) Quit + Ap 3% + Vit e(i) Quit + Ap 5% Vit. Aumento de 1750 X.











Nas micrografias da Figura 19 foi possível verificar partículas de apatita com tamanhos e forma variados. Nessa mesma Figura 19 (e) foi visto as partículas do pó da vitamina, a partir dela ficou evidente nas demais Figuras (f; g; h e i) que houve a incorporação da vitamina E nos filmes, evidenciado pela formato da vitamina E encontrado nos filmes. Estes resultados corroboram com o ensaio de DRX.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)

A Figura 20 ilustra a micrografia da membrana quitosana e a Figura 21 ilustra o EDS da quitosana.

Figura 20 - Micrografias das Membrana de Quitosana. Imagem com aumento 1000x.

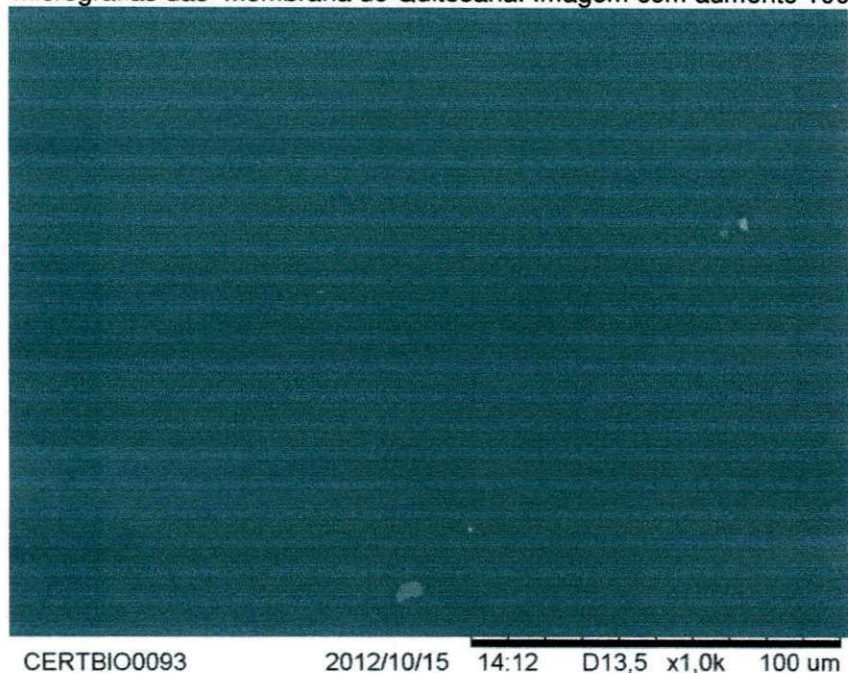
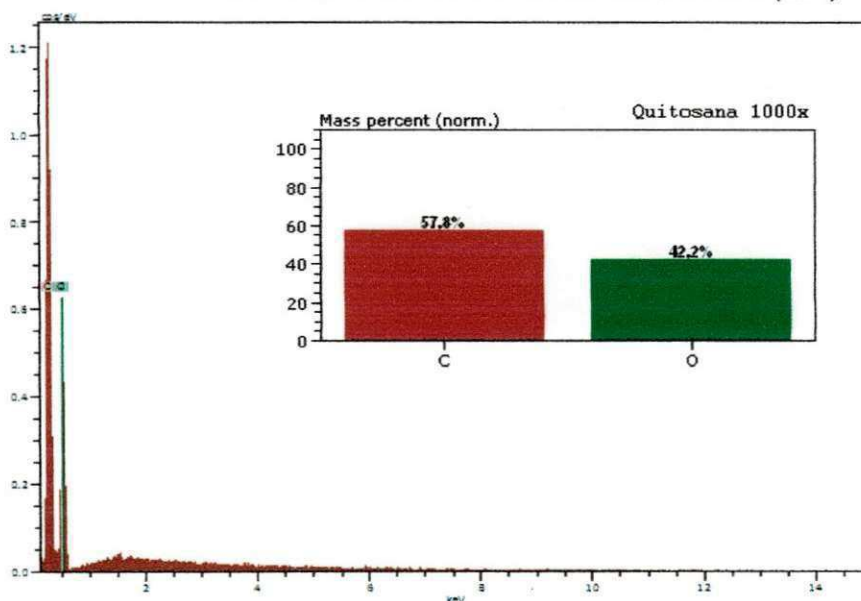


Figura 21 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana (Quit)

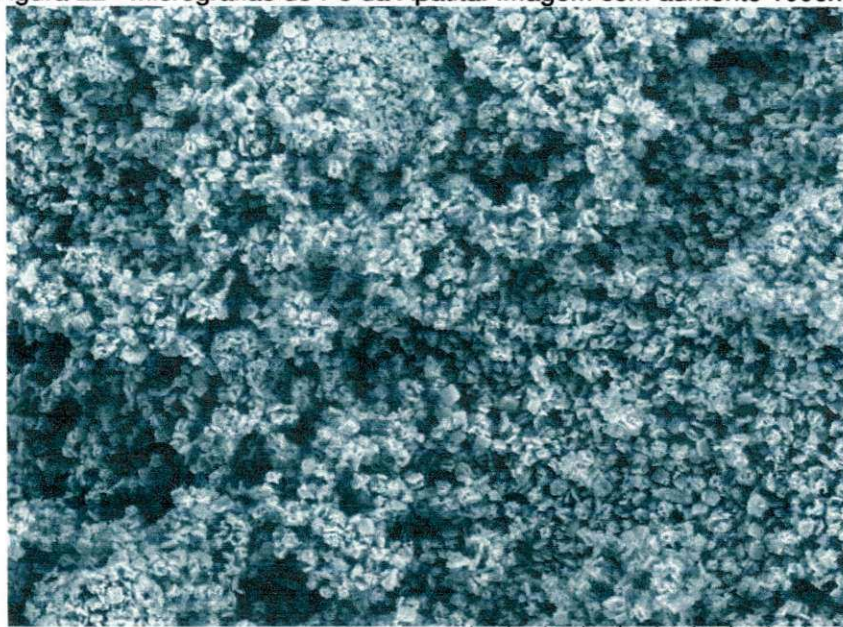


Ao analisar a morfologia da membrana de quitosana Figura 20 observa-se uma superfície plana e lisa, visivelmente não foram detectados poros, caracterizando as membranas como densas. Lima (2010) e Fidèles (2010) analisaram a morfologia de filmes de quitosana e encontraram, também uma superfície plana e densa. Ao analisar o espectro de EDS, Figura 21, constatou-se a

presença dos elementos O e C característicos da quitosana corroborando com Holanda (2011).

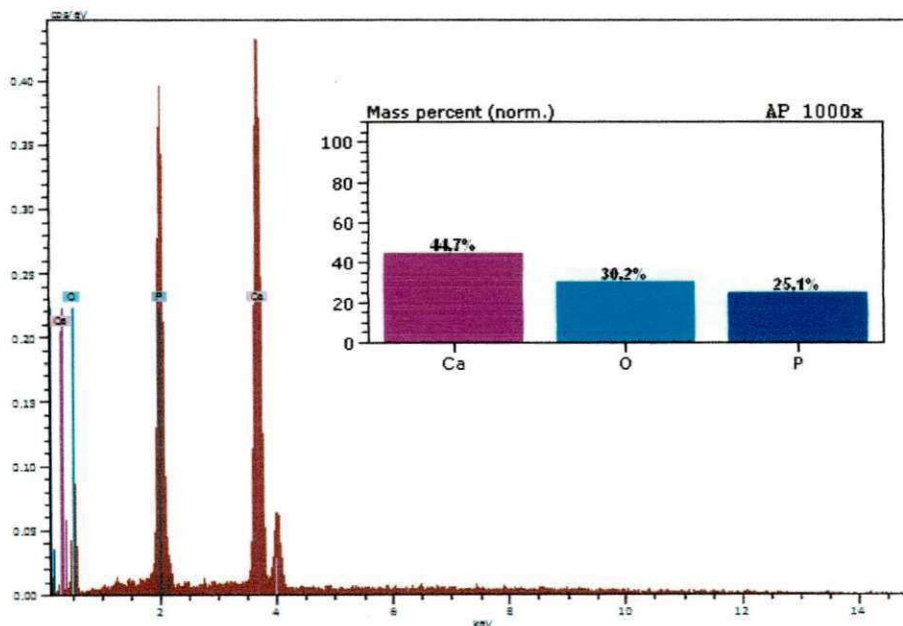
A Figura 22 ilustra a micrografia do pó da apatita e a Figura 23 ilustra o EDS do pó da apatita.

Figura 22 - Micrografias do Pó da Apatita. Imagem com aumento 1000x



CERTBIO_1532 2012/07/17 14:51 D2,7 x1,0k 100 um
AP

Figura 23 - EDS e Percentual de Massa da Apatita



Na Figura 22, observa-se a micrografia referente ao pó da apatita. Com uma ampliação de 1000x foi possível perceber uma heterogeneidade na estrutura do fosfato (morfologicamente há homogeneidade os cristais apresentam formatos irregulares). Por sua vez, os resultados das micrografias mostram que as partículas estão agrupadas na forma de aglomerados estes resultados corroboram os estudos de Oliveira (2009). Ao analisar o espectro de EDS, Figura 23, constatou-se a presença dos elementos O, Ca e P característicos fosfato de calcio corroborando com KAYALI, E. S; GOLLER, G; AKIN, I., (2011).

A Figura 24 ilustra as micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% de apatita e a Figura 25 ilustra o EDS das mesmas amostras.

Figura 24 - Micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita. Imagem com aumento de 1000X.

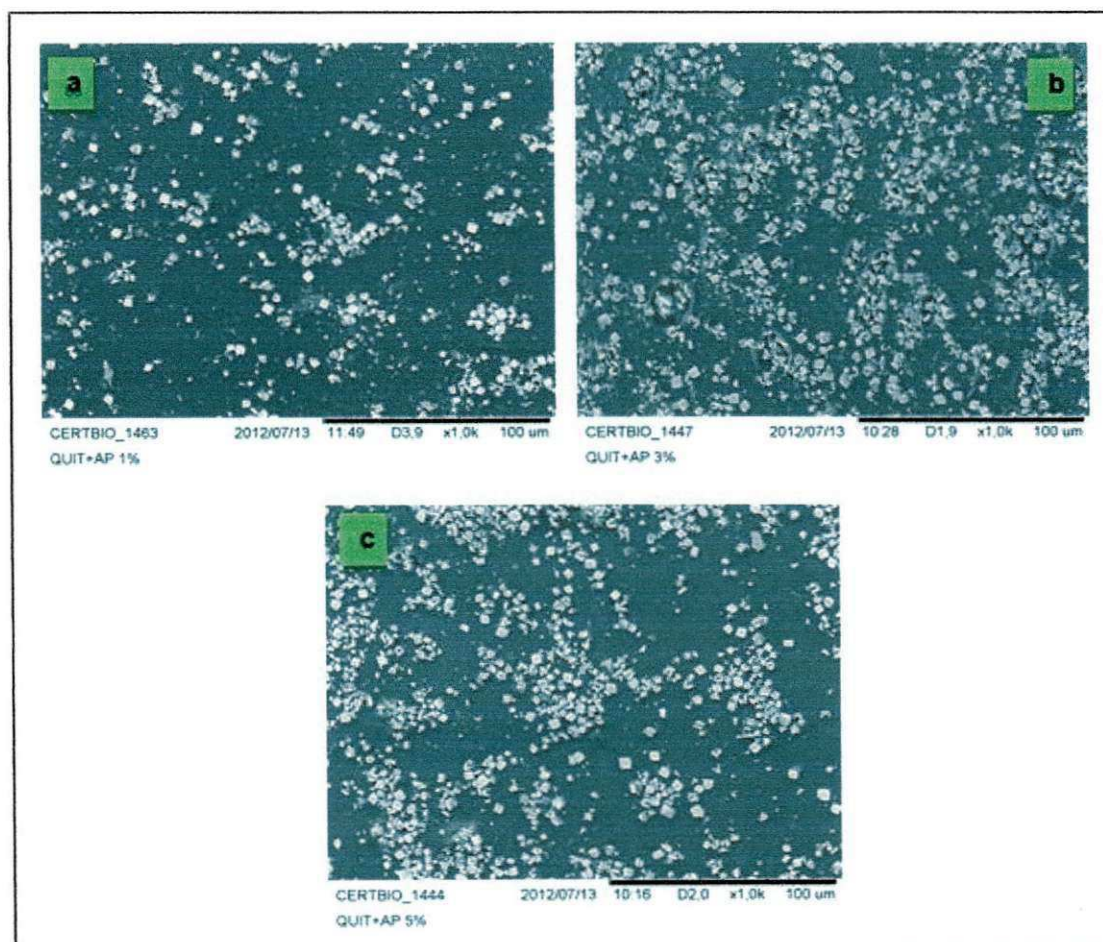
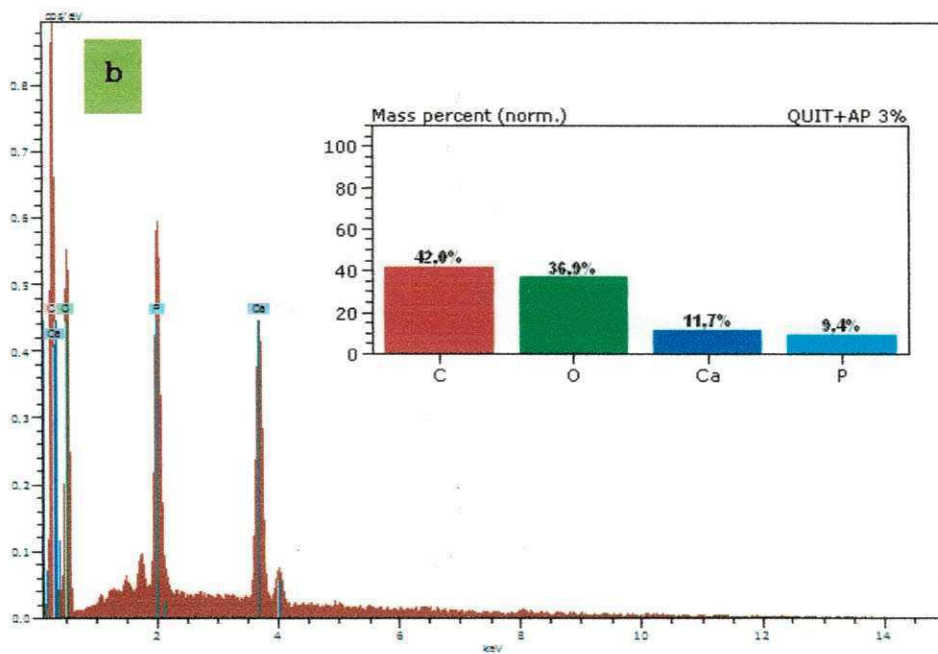
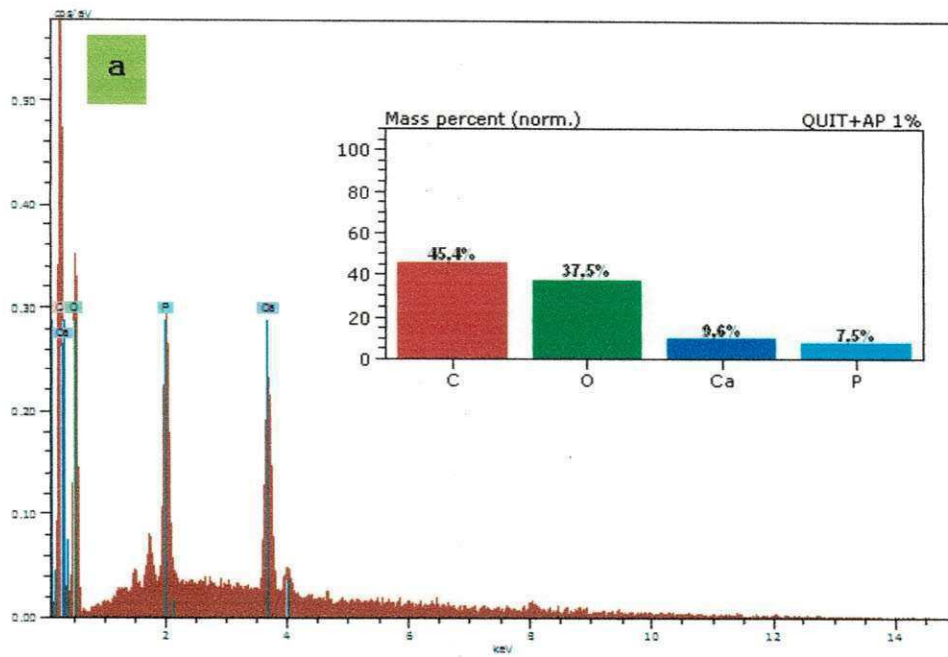
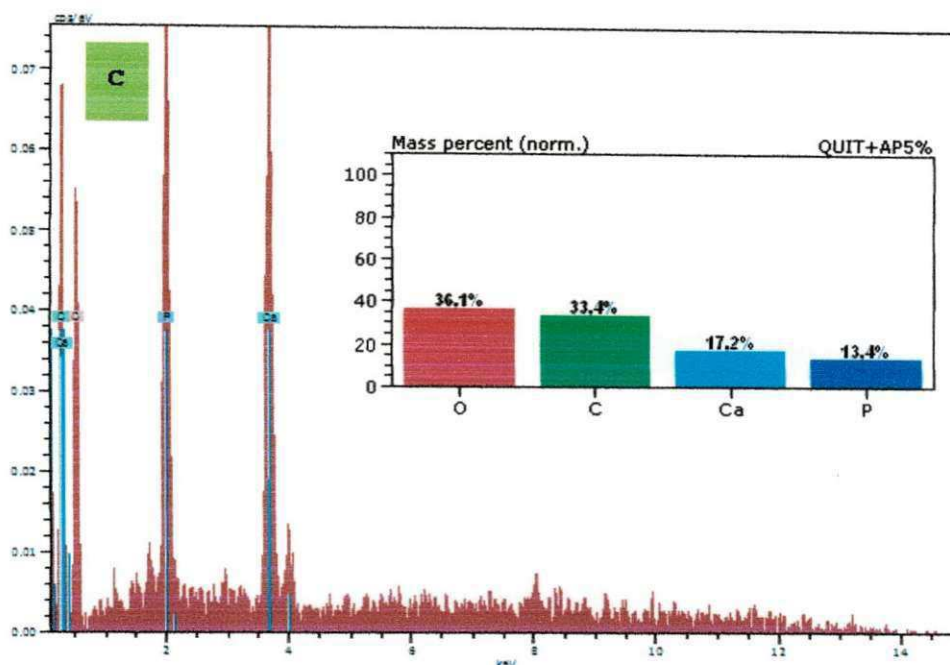


Figura 25 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de Apatita;



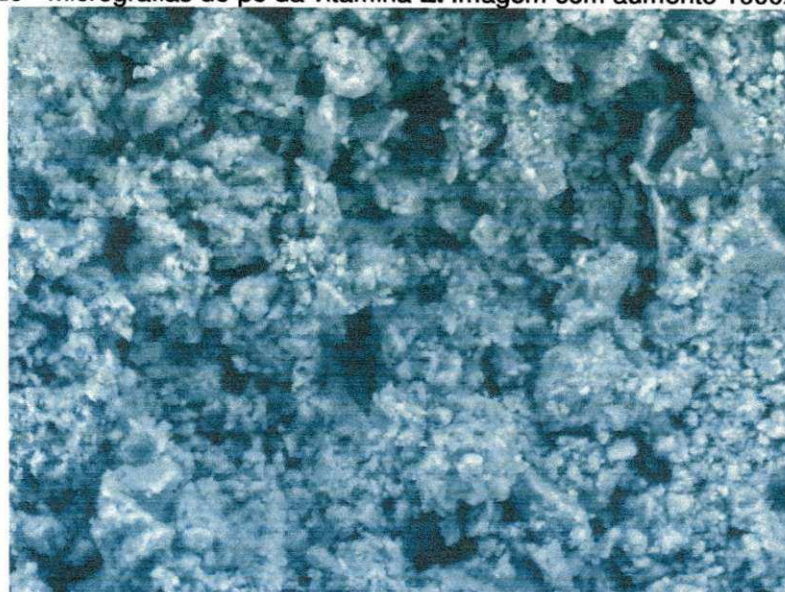


A Figura 24 ilustra as micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 3% (b) e 5% de apatita, foi possível verificar que houve a incorporação da apatita e que a mesma ficou dispersa nos filmes de forma irregular. Também foi observada a presença de partículas de vários tamanhos e formas com grandes quantidades de aglomerados, os resultados das microscopias corroboram com os ensaios de DRX e MO que indicaram a incorporação da apatita.

A partir do ensaio de EDS que está representado na Figura 25 foram encontrados além Carbono e Oxigênio os elementos Cálcio e Fósforo característicos da apatita segundo Hatner (2004), comprovando que houve sua incorporação nos filmes, corroborando com os ensaios de DRX, MEV, MO e também nota-se que houve um aumento do valor de Cálcio e Fósforo, aumento esse esperado pois as membranas continham 1%, 3% e 5% de apatita.

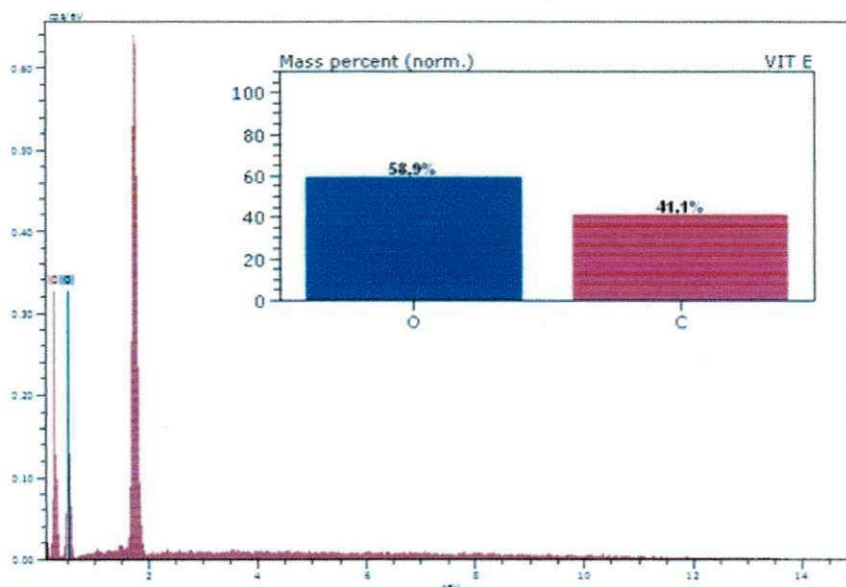
A Figura 26 ilustra as micrografias do pó da vitamina E e a Figura 25 ilustra o EDS da mesma amostra.

Figura 26 - Micrografias do pó da vitamina E. Imagem com aumento 1000x



CERTBIO_1480 2012/07/16 15:59 D2,9 x1,0k 100 um
VIT E

Figura 27 - EDS e Percentual de Massa do Pó da vitamina E



Observa-se a micrografia referente ao pó da vitamina E na Figura 26. Com uma ampliação de 1000x foi possível notar uma heterogeneidade na estrutura da vitamina E (morfologicamente há homogeneidade— os cristais apresentam formatos irregulares, e tamanhos diferentes). Por sua vez, os resultados das micrografias mostram que as partículas estão agrupadas na forma de aglomerados.

Na análise de EDS representada na Figura 27 foram encontrados os elementos carbono e oxigênio esses elementos são característicos da vitamina E

segundo Rinzler (2011) faltando apenas o Hidrogênio. Isso ocorreu devido ao detector de EDS não detectar o Hidrogênio.

A Figura 28 ilustra as micrografias da quitosana-vitamina E e a Figura 29 ilustra o EDS da mesma amostra.

Figura 28 - Micrografias da membrana de quitosana com vitamina E. Imagem com aumento 1000x.

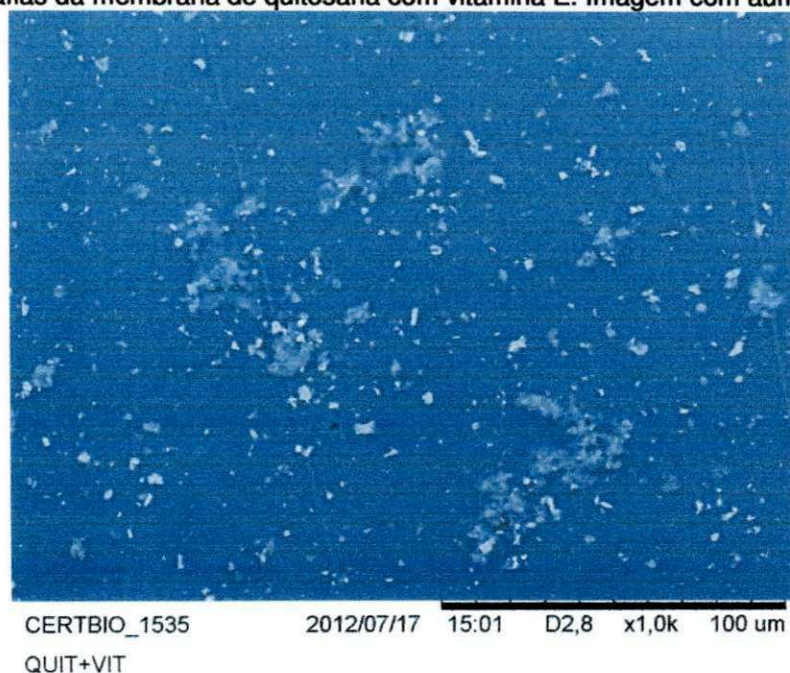
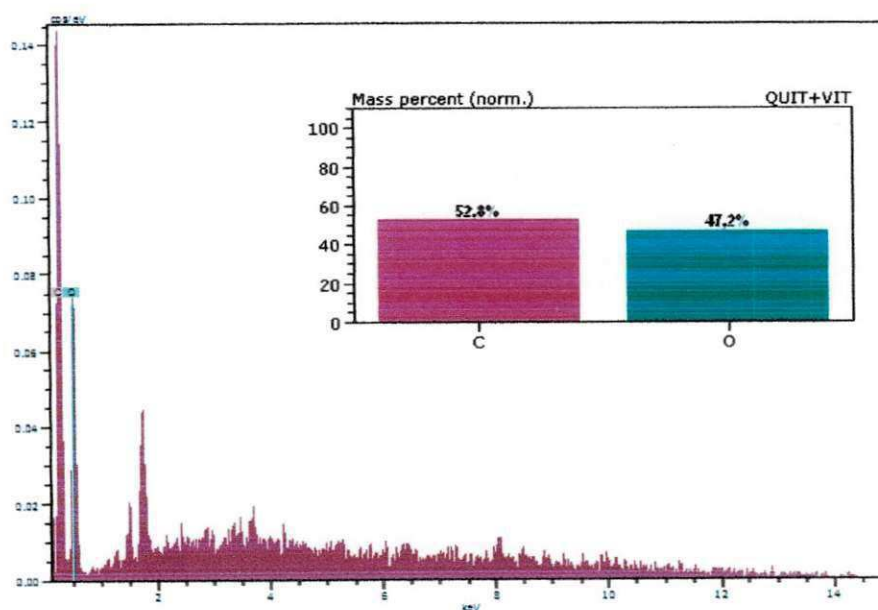


Figura 29 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana - Vitamina E



A Figura 28 ilustra a micrografia da membrana quitosana – vitamina E, ao analisar o compósito verifica-se que houve a incorporação da vitamina na membrana de quitosana e que a mesma está dispersa na membrana corroborando os estudos de Alexandre (2011). Na análise de EDS representada na Figura 29 foram encontrados os elementos carbono e oxigênio esses elementos são característicos da vitamina E segundo Rinzler (2011).

A Figura 30 ilustra as micrografias das membranas de quitosana – vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita e a Figura 31 ilustra o EDS das mesmas amostras.

Figura 30 - Micrografias das membranas de quitosana - vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita. Imagem com aumento 1000x.

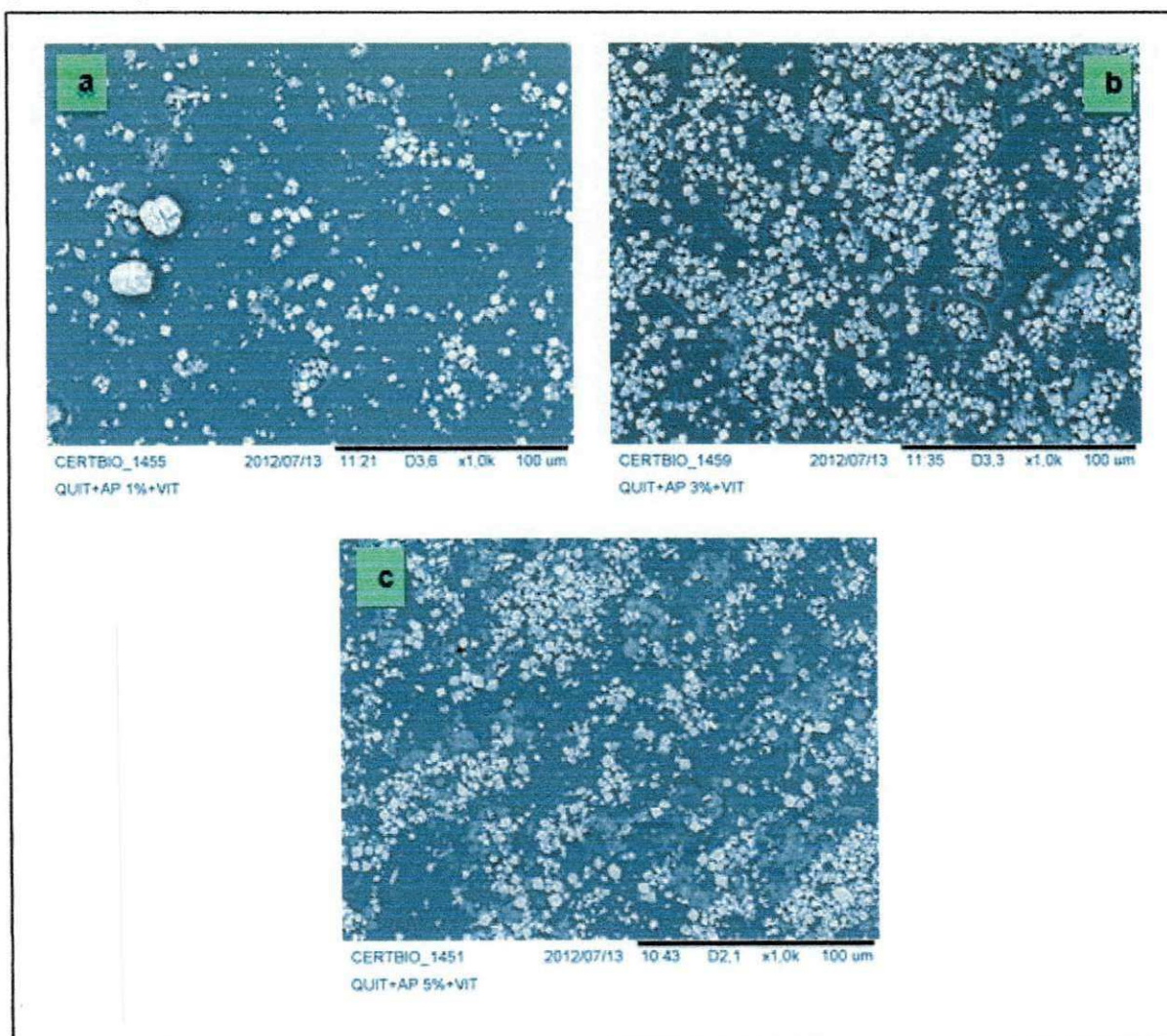
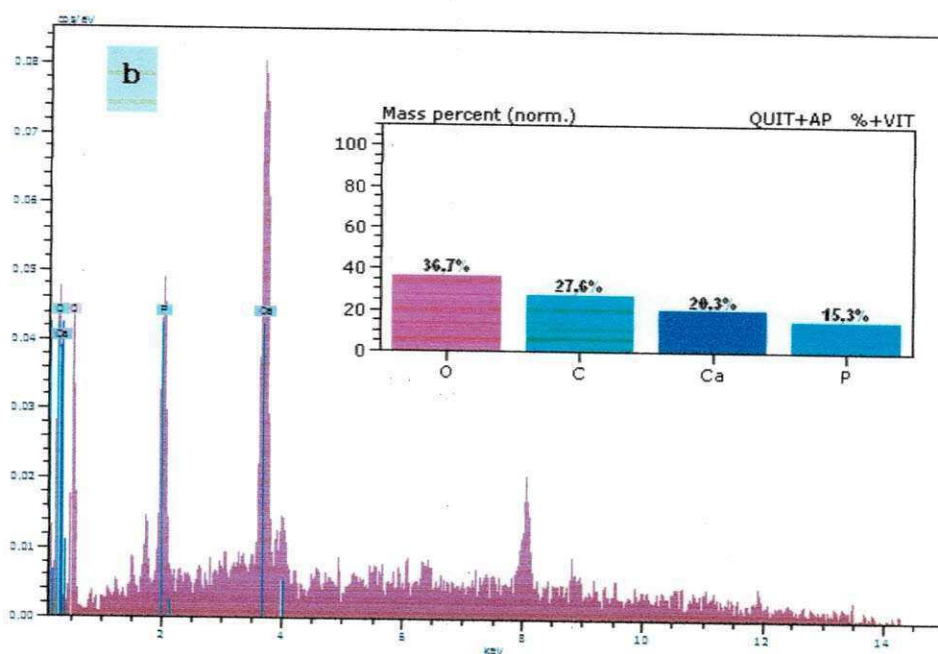
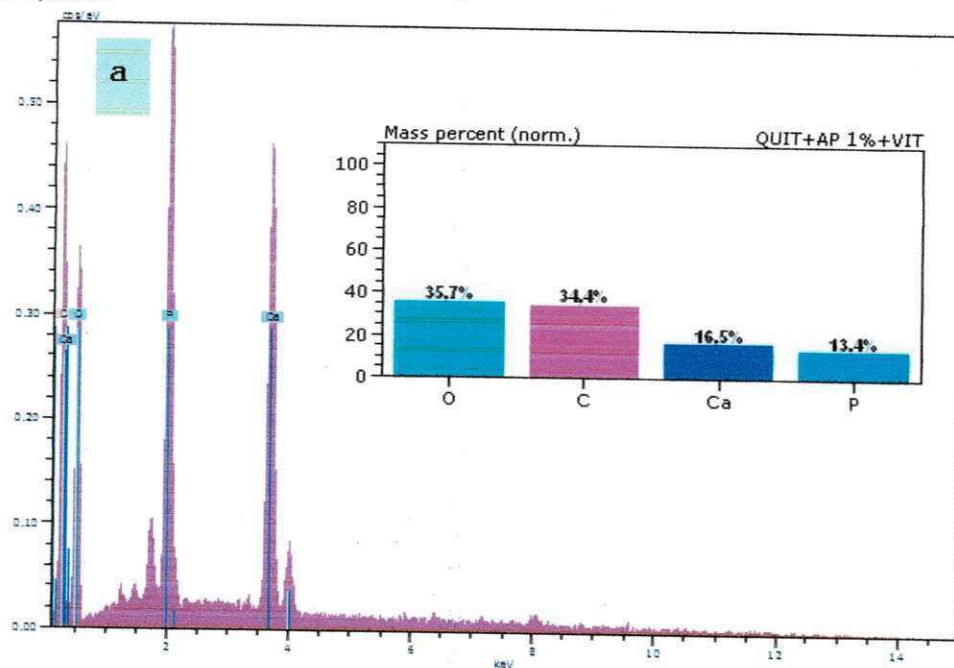
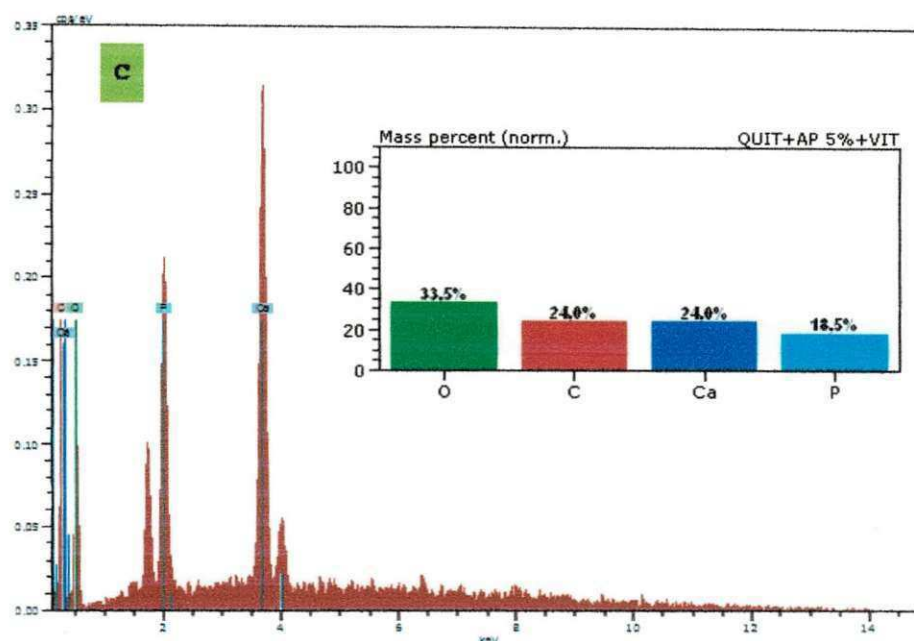


Figura 31 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana – Vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% (c) de apatita.





A Figura 30 ilustra as micrografias das membranas de quitosana-vitamina E com 1% (a), 3% (b) e 5% de apatita. Foi possível verificar que houve a incorporação da vitamina E e da apatita comparando com as Figuras 28 e 24 e que ambas ficaram dispersas nos filmes de forma irregular. Também foi observada a presença de partículas de vários tamanhos e formas, com grandes quantidades de aglomerados, os resultados das microscopias corroboram como os ensaios de DRX e MO pois comprovam a inserção da apatita e da vitamina E na membrana de quitosana formando assim um compósito.

Na Figura 31 que ilustra o resultado do EDS, não foi possível determinar a ocorrência da vitamina E no compósito, porém os ensaios de DRX, MEV, MO comprovam que a vitamina foi incorporada nos filmes de quitosana.

5.8 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

Segundo Dallan (2005) a avaliação da degradação de um biomaterial no meio biológico é de suma importância visto que esta caracterização está diretamente relacionada ao tempo em que o material será absorvido pelo organismo após sua inserção ou utilização no corpo. O ensaio teve como objetivo analisar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação das

membranas, como também, verificar a influência da adição da vitamina E. Os resultados para perda de massa no período de um mês pode ser verificado na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana (Quit), quitosana-vitamina (Vit), quitosana-vitamina E /apatita nas proporções de (1%, 3% e 5%) e quitosana/apatita nas proporções de (1%, 3% e 5%) submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos

Ensaio	Perda de massa das membranas 1 mês de ensaio			
	PBS		Lisozima/PBS	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
Quitosana (Quit)	5,77	0,26	17,14	0,1
Quit+Vitamina (Vit)	7,53	0,44	11,39	1,01
Quit+1% Apatita (Ap)	11,27	0,69	18,69	0,44
Quit+ 3% Ap	10,94	0,15	18,86	0,37
Quit+5% Ap	10,87	0,40	18,49	0,85
Quit+1% Ap + Vit	10,37	0,21	17,75	0,65
Quit+3% Ap + Vit	15,47	1,18	23,25	0,99
Quit+5% Ap + Vit	15,52	1,69	23,27	0,67

Analisando os valores obtidos com a degradação enzimática das membranas expostas em tampão PBS e lisozima/PBS no período de 1 mês (Tabela 8), observou-se que, em todas as amostras, a degradação foi mais acentuada sob a ação da lisozima, o que demonstra a eficiência desta enzima na degradação dos compostos de quitosana e corrobora com Holanda (2011).

A quitosana também é degradada pela lisozima que é uma enzima, essa degradabilidade depende, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, uma vez que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (SUH; MATTHEW, 2000). Estes grupamentos são de fundamental importância no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima (KURITA et al, 2000).

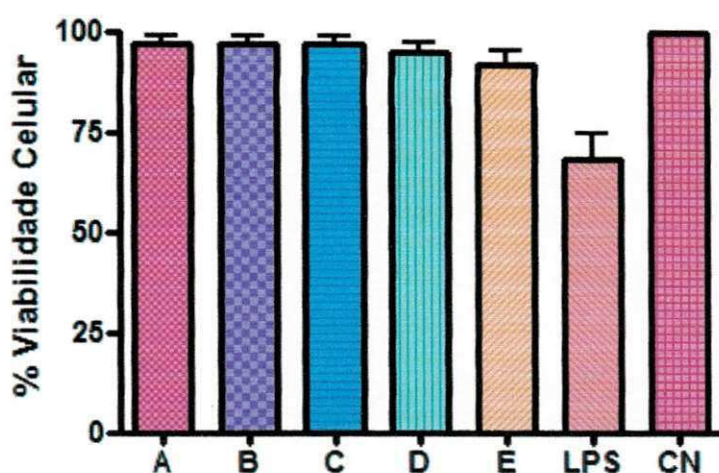
O resultado da quitosana com vitamina E corrobora com o ensaio da molhabilidade, que mostrou que a vitamina E aumentou a molhabilidade da membrana de quitosana e portanto a membrana ficou mais biodegradável porém quando juntos quitosana, apatita e vitamina E não ocorre o mesmo comportamento.

Os resultados deste ensaio demonstraram, também, que seja na presença apenas do PBS ou com a Lisozima, o efeito biodegradante nas membranas, foi potencializado pela vitamina E.

5.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR DOS MACRÓFAGOS

Este ensaio teve por objetivo foi avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos. A Figura 32 ilustra o resultado deste teste.

Figura 32 - Viabilidade celular dos macrófagos de camundongos Swiss na presença dos filmes. A – Quitosana (Quit); B – Quit-Vitamina E (Vit); C – Quit- Vit/1% Apatita (Ap); D – Quit- Vit /3% Ap; E – Quit – Vit /5% Ap; LPS–controle positivo; CN–controle negativo



O controle negativo foi utilizado para comparar as membranas o LPS só foi utilizado na determinação de óxido nítrico. O controle negativo (CN) equivale a 100% de viabilidade com as células sendo mantidas em meio de cultura (RPMI-16400).

O Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi obtido da *Escherichia coli* ativa de forma policlonal os linfócitos B dos camundongos e os macrófagos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e os produtos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (ESTRELA; PÉCORRA, 1997).

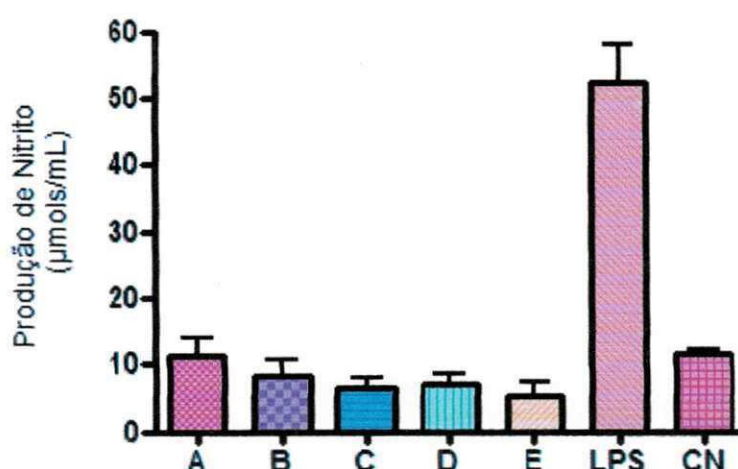
As letras A,B,C,D e E correspondem aos resultados apresentando \pm desvio padrão de 10 animais e 5 membranas de cada composição por animal que ao serem comparados com o valor mínimo requerido para o teste de citotoxicidade de 50% de acordo com Bispo (2009) apresentam-se viáveis para serem adotados como biomaterial uma vez que a viabilidade de todas as 5 composições obtidas encontraram-se acima de 90%.

5.10 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora que é produzida em sua grande maioria por macrófagos ativados, tem importância nos procedimentos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Essa molécula gasosa pode demonstrar alguns benefícios, como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Entretanto, em elevadas concentrações, pode atuar como agente citotóxico desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes (KENDAL, MARSHALL, BARTOLD, 2001).

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição às membranas testadas estão ilustrada na Figura 33 que mostra os valores individuais de cada membrana.

Figura 33 - Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença dos filmes: A – Quitosana (Quit); B – Quit -Vitamina E (Vit); C – Quit –Vit/ 1% Apatita (Ap); D – Quit –Vit /3% Ap; E– Quit –Vit/5% Ap; LPS– controle positivo; CN– Controle negativo



O óxido nítrico sendo o principal mediador citotóxico de células imunes ativas apresenta importantes funções nos processos fisiológico e patológico dos organismos vivos. Na determinação de óxido nítrico, Figura 26 pelos macrófagos em contato com as membranas analisadas a produção foi em torno de 10 µmols/mL. Todas as amostras apresentaram-se abaixo do controle negativo, o que indica uma ação anti-inflamatória (LIMA, 2010) confirmando, portanto, juntamente com o ensaio de viabilidade celular a não toxicidade das membranas.

A Tabela 9 apresenta os valores obtidos pelo teste de Tukey para as membranas testadas e respectivas significâncias.

Tabela 9 - de variância – A NOVA Teste de Tukey para as membranas confrontadas com o padrão positivo e negativo e com elas respectivamente

Comparações	Valores
A vs B	3.058 0.8550 ns P>0.05
A vs C	4.936 1.380 ns P>0.05
A vs D	4.441 1.242 ns P>0.05
A vs E	6.123 1.712 ns P>0.05
A vs LPS	-41.089 11.488 *** P<0.001
A vs CN	-6.119 1.711 ns P>0.05
B vs C	1.878 0.5250 ns P>0.05
B vs D	1.383 0.3866 ns P>0.05
B vs E	3.065 0.8571 ns P>0.05
B vs LPS	-44.147 12.343 *** P<0.001
B vs CN	-9.177 2.566 ns P>0.05
C vs D	-0.4953 0.1385 ns P>0.05
C vs E	1.188 0.3320 ns P>0.05
C vs LPS	-46.025 12.868 *** P<0.001
C vs CN	-11.055 3.091 ns P>0.05
D vs E	1.683 0.4705 ns P>0.05
D vs LPS	-45.530 12.730 *** P<0.001
D vs CN	-10.560 2.953 ns P>0.05
E vs LPS	-47.213 13.201 *** P<0.001
E vs CN	-12.243 3.423 ns P>0.05
LPS vs CN	34.970 9.777 *** P<0.001

É essencial que os biomateriais não incitem a produção exacerbada de óxido nítrico (NO), nem impeçam sua síntese por células estimuladas, pois estes eventos ocasionariam problemas na sua utilização com o passar do tempo (LIMA, 2010). A Tabela 9 confirmou que não ocorreu nenhuma significância dos resultados apresentados na Figura 33 o que confirma a não toxicidade das membranas e corrobora os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular.

Os testes de citotoxicidade apontaram que os compósitos quitosana-vitamina E/apatita, podem ser empregados *in vivo* sem ocasionar reações indesejadas nas células de origem animal, pois, passado o processo de fabricação das membranas

onde foram utilizados reagentes ácidos e básicos, o material não se mostrou citotóxico.

Na presente pesquisa os níveis de produção de NO foram extremamente baixos, classificando o material em estudo como não-citotóxico, permitindo a sua aplicação experimental *in vivo* com segurança.

6 CONCLUSÕES

Após criteriosa análise dos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os objetivos foram alcançados e que o processo descrito na metodologia para a obtenção dos compósitos em forma de filme mostrou-se eficaz.

Os resultados apresentados indicaram que a vitamina E e a apatita foram incorporadas de forma bem distribuída nas membranas de quitosana. A vitamina E por sua vez aumentou a estabilidade térmica do compósito.

Todas as membranas desenvolvidas mostraram-se viáveis para serem utilizadas como biomaterial, pois apresentaram pouca ou nenhuma citotoxicidade o que confirma a biocompatibilidade das mesmas.

Os compósitos apresentaram biodegradabilidade e hidrofiliidade indicando assim que as membranas podem ser confeccionadas para um posterior contato com o corpo humano. Este trabalho abre, dessa forma, uma perspectiva de estudo voltado para produção de curativos compostos de quitosana - vitamina E e apatita.

Por fim, após todas as caracterizações, pode-se ainda, concluir que a membrana composta de quitosana-vitamina E/ apatita 5% é a melhor a ser utilizada em testes in vivo, devido a maior quantidade de apatita, nela contida, o que se espera que funcione melhor no processo de regeneração óssea e também, devido ao fato desse compósito, ter-se revelado o mais biodegradável, espera-se, que com sua degradação, a vitamina E e a apatita possam agir, o mais rapidamente possível, de forma a acelerar os processos de regeneração e cicatrização óssea.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours". *Carbohydrate Polymers*. v.56 N°2. p. 111-122. 2004.

AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. Tokio: JAAS, p.230, 1991.

AZEVEDO, F. *Optimização da Fase Acidogénica Termofílica para Produção de Biopolímeros*. 2010. 164f. (Mestrado em Engenharia do Ambiente)- Universidade de Aveiro. Departamento de Ambiente e Ordenado. Portugal. 2010

BAEHR, G.; DAY, J.; DIESKOW, L.; FAULISE, D.; OVEROCKER, E.; SCHWAN, J. J.; *Ceramics – Windows To The Future; Materials Science and Technology*, 1995
BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C., DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, V.15, n.1, p.13-21, 2005.

BARBOSA, R.C., *Compósitos Quitosana/Carbonato de Cálcio para Utilização em Cânulas de Fístula Ruminal*. 2011. 119f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

BERGER, J.; REISTT, M.; MAYER, J.M.; FELTT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52, 2004.

BETTINI, R.; ROMANI, A.A.; MORGANTI, M.M.; BORGHETTI, A.F. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.68, p.74-81, 2008.

BIAGINI, G.; MUZZERELLI, R. A. A.; GIARDINO, R. E.; CASTALDINI, C. Biological Material for wound healing. In: BRINE, I.; CHARLES, J. *Advanced in chitin and chitosan*. Elsevier Science Publishers, London, p. 16-24, 1992.

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

BOHNER, M., Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements. *Injury International Journal of the Care of the Injury*, Vol. 31, S-D37-47. 2000.

BOSS JH, SHAJRAWI I, AUNULLAH J, MENDES DG. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci.*; V.31, p.203-9, 1995.

BRUCE, P. K. *Química Orgânica*. Volume I e II. Editora Prentice Hall. 4ª EDIÇÃO. 2006.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.21, p.2347-2359, 2000.

BUSER D, DAHLIN C, SCHENK R.K. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Publ.; 1994.

Calculated from ICSD using POWD-12++, 1997.

CALLISTER JR., W.D. Ciência e engenharia de materiais. Uma introdução. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de α - e β -quitina. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

CARLSON, C.W.; GREASER; M.L. JONES, K.W., The Meat We Eat, Interstate Publishers, Inc., Danville, IL, chap. 23. 2001

CARTIER . N, Domard A, Chanzy H. Single crystals of chitosan. Int J Biol Macromol;12:289-94, 1990.

CHAO, A. C.; SHYU, S. S.; LIN, Y. C.; MI, F. L. Enzymatic grafting of carboxyl groups on chitosan to confer the property of a cationic dye absorbent. Bioresource Technology, v. 91, p. 157-162, 2004.

CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. Dent. Mater. J., v.28, n.1, p.1-10, 2009.

CLEASEN, C.; WHILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. Biomacromolecules, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

CORRADINI, E.; MORAIS, L. C.; ROSA, M. F.; MAZZETTO, S. E.; MATTOSO, L. H. C. e AGNELLI, J. A. M. A. - Macromol. Symp., 245-246, p.558 (2006).

CRINI, G.; BADOT, P.M.; Application of Chitosan, a Natural Amino Polysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A Review of Recent Literature. Progress in Polym. Sci. 33: 399, 2008.

CUMMINGS, S.R., MELTON III, L.J. "Epidemiology And Outcomes Of Osteoporotic fractures". *Lancet*, 359: 1761-67. (2002)

DACULSI G, PASSUTI N. Effect of the Macroporosity for Osseous Substitution of Calcium phosphate Ceramics. Biomaterials v.11, p.86-7, 1990.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DEE, K.C.; PULEO, D.A.; BIZIOS, R. Biomaterials. In: An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2002, p1-13.

DEKKER, R. J.; BRUIJN, J. D.; STIGTER, M.; BARRERE, F.; LAYROLLE, P.; BLITTERSWIJK, C. A.; Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials*. PubMed - indexed for MEDLINE. v.26, 5231-9. 2005.

DOBLARÉ, M.; GARCIA, J. M.; GÓMEZ, M. J., 2004. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 71, pp. 1809 – 1840, 2004.

DOBRZÁNSKI, L. A. Significance of materials science for the future development of societies. *Journal of Materials Processing Technology*. v. 175, p. 133-145, 2006.

DRISKELL, J.A.; MARCHELLO, M.J.; GIRAUD, D.W.; SULAEMAN, A. Vitamin and selenium content of ribeye cuts from grass- and grain-finished bison of the same herd, *J. Food Qual.*, 27, 3, 2004.

ELLIOT, J. C. Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. *Studies in inorganic chemistry* v. 18, Elsevier Science B.V. 1994

ENGESETH, N.J.; GRAY, J.I.; BOOREN, A.M.; ASGHAR, A. Improved oxidative stability of veal lipids and cholesterol through dietary vitamin E supplementation, *Meat Sci.*, 35, 1, 1993.

ESTRELA, C.; PÉCORA, J.D. Hidróxido de Cálcio na Endodontia, 1997. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcio/introhc.htm>. Acesso em 13/09/2012.

E´GUES, M. A. M. Compósito de colágeno comsilicato e hidroxiapatita como material para endodontia. Dissertação (Mestrado). Programade Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia; Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, USP. São Carlos, 2005.

FANI, M. A vitamina E: Aditivos e Ingredientes, São Paulo, Editora Insumos LTDA, revista nº 70, artigo 2, p. 42-48, Junho, 2010

FDA/CFSAN, A Food Labeling Guide: Appendix B Relative or Comparative Claims, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1994

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

FLORA, F. R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v. 46, p. 265-271, 2000.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial. 2005. 128f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005.

FRAGA, A. F. et al. , Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, Anais. Foz de Iguaçu : IPEN, 2006, p. 2715-2725.

FUKUMURA, H; et.al. Molecular Nano Dynamics: Volume 1 and 2. Copyrighted Material; 2009.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 3, p. 299-305, 1992.

FURUSAKI, E.; UENO, Y.; SAKAIRI, N.; TOKURA, S. Faciel preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -Cyclodextrin. Carbohydrate Polymers, v. 9, p. 29-34, 1996.

GARTNER L.P.; HIATT J.L. Color textbook of histology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2007.

GODIM, D. M .A. Avaliação de Estabilidade térmica e Oxidativa do biodiesel de algodão e do efeito da adição de antioxidante (α - tocoferol. E BHT). Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. São Paulo, 2009, 249p.

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

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

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126.

GUASTALDI, A.C; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010.

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

HELOU, J. B.; CORRÊA, F. A. F.; REZENDE, P. M.; PACHECO, A. A.; FEISTEL, J. C.; ORLANDO, C. F. P.; MORAES, A. M.; SILVA, O. C.; SILVA, L. A. F. Descorna

plástica em bovinos: uso tópico de um composto a base de quitosana a 5% como auxiliar na cicatrização de feridas contaminadas (RESULTADOS PRELIMINARES), 2008.

HENCH, L.L. Biomateriais: Uma Introdução, 2006. In: Oréfice, R.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p.538, 2006.

HIROUYUKI, H.; KAWABE, A.; SHINKAI, M.; KOBAYASHI, T. Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation. Journal of Fermentation and Bioengineering. v. 86, n. 2, p. 191-196, 1998.

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

IMAIZUMI, H.; SAKURAI, M.; KASHIMOTO, O.; KIKAWA, T.; SUZUKI, O.; Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. Calcif. Tissue Int. PubMed - indexed for MEDLINE. v.78, 45 – 54. 2006

JALILI, K.; ABBASI, F.; OSKOEI, S. S.; ALINEJAD, Z. Relationships between The morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly (acrylic acid) interpenetrating networks. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v.2, n.5, p.534-541, 2009.

JIANG. Q, AMES B.N.; γ -Tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. FASEB J;17:816–22. 2003.

JING, S. B.; LI, L.; Ji, D.; TAKIGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 49, n. 9, p. 721-723, 1997.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. Basic histology : text & atlas. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.

KAYALI, E. S; GOLLER, G; AKIN, I. BIOCERAMICS, 23ed. Istanbul, Turkey: Trans Tech Publications 2011.

KAWASHI E.Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas Tendência e Perspectiva de uma Área Interdisciplinar. Química Nova 2000;v.23, n.4, p.518-522., 2000.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Diseases. v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KIM S. K.; RAJAPAKSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. v. 62, p. 357–368, 2005.

- KIMURA, M.; RODRIGUEZ, A.D.B.; GODOY, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A, *Food Chem.*, 35, 187, 1990.
- KRONCKE, K; FEHSEL, K; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, v.1, n.2, p.107-20, Jan. 1997.
- KUBOTA N, EGUCHI Y. Facile preparation of water-soluble N-cetylated chitosan and molecular weight dependence of its watersolubility. *Polym J*;29:123–7, 1997.
- KURITA ,K.; KAJI, Y.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, v.42, p.19-21, 2000.
- KURTZWEIL, P. 'Daily Values' Encourage Healthy Diet, in Focus on Food Labeling, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1993, updated 2003.
- LANGER, R. "Selected advances in drug delivery and tissue engineering", *Journal of Controlled Release*; 62: 7-11, 1999.
- LAZORYAK, B., KHASANOV, S., Moscow State University., Russia., ICDD Grant-in-Aid, 1994.
- LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.395, p.81-98, 2002..
- LIFE – BONE; <http://www.life.uiuc.edu/csb/213/pdf/14.pdf>; acesso em 10 de dezembro de 2002.
- LIMA, R. S. C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.
- LITWACK, G. Vitamin E, Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications. Academic Press is an imprint of Elsevier. California v. 78. 588. 2007.
- LOGAN T. J. MA Q.Y.; TRAINA S.J. Lead immobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. *Environ. Sci. Technol.*, v. 29, p. 1118-1126, 1995
- MAJETI N.V. KUMAR R. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *Reactive & Functional Polymers* 46, 1–27, 2000.
- MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Elsevier*. v. 27, n. 8, p. 220-227, 2012.

MARX R.E; GARG AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.*; v.7, p. 267-76, 1998

MASTALOUDIS, A.; TRABER, M.G., Vitamin E, in *Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements*, Driskell, J.A., and Wolinsky, I., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, chap 13. 2006.

MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, F. C. & CURVELO, A. A. S. – “Sisal Fiber: Morphology and Applications in Polymer Composites”, *in: “Lignocellulosic-Plastic Composites”*, A. L. Leão; F. X. Carvalho & E. Frollini (Eds.), USP, São Paulo, p.241, 1997..

MAVROPOULOS, E. A hidroxiapatita como removedora de chumbo. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MOHANTY, A. K., MISRA, M., DZRAL, L.T. *Natural fibers, biopolymers and biocomposites*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005.

MONAHAN, F.J.; BUCKLEY, D.J.; GRAY, J.I.;MORRISSEY, P.A. Effect of dietary vitamin E on the stability of raw and cooked pork, *Meat Sci.*, 27, 99, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZZARELLI, R. A. A.; BELMONTE, M. M.; MUZZARELLI, B.; SIMONELLI, L. *Materiali da medicazione a base di chitosani*. In: *Convegno-Scuola Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia Delle Macromolecole “Polimeri in Medicina”*. Gargnano, p. 307-336, 1997.

Norma ABNT NBR 15448-1. *Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia*. (Biopolímeros)

Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., revision 1, AOAC International, Gaithersburg, MD, 2006.

OGUCHI, H.; ISHIKAWA, K.; MIZOUE, K.; SETO, K.; EGUCHI, G. Long term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. *Biomaterial*, v. 16, n. 1, p. 33-38, 1995.

OLIVEIRA, S. V. ; MEDEIROS, K. M.; ARAÚJO, E. P. ; BRAGA; C. R. C.; E. M. ARAÚJO; FOOK, M. V. L. Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4.3 (2009) 11-20, aceito em 30/11/2009

OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. Eds., *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*, National Academy Press, Washington, DC,p. 8. 2006.

PADILHA, A. F. e AMBRÓZIO FILHO, F., Técnicas de Análise Microestrutural, Editora Hermus, 2004.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. Tissue Engineering. New Jersey: Prentice Hall. P.407, 2004.

PARK, J.; LAKES, R.S. Biomaterials: an Introduction. 3th Edition. New York: Springer, 2007. 561p.

PARIZE, A. L; SOUZA, T. C. R; Brighente, I. M. C. Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana contendo o corante de urucum. Simpósio Brasileiro de Urucum. João Pessoa, p.4, 2006.

PASCHOAL, A.L.; VANANCIO, E.C.; CANALE, L. C.; DA SILVA, O.L.; HUERTA, V. D.; MOTHEO A.D.E. Journal Metallic biomaterials TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. Artif Organs. V. 27: p.461-4, 2003;

PONCIANO, J. J. In: Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo, 2006.

PRADO, A. G. S; SANTOS, A. L. F; PEDROSO, C. P; CARVALHO T. O; BRAGA L. R; EVANGELISTA, S. M. Vitamin A and Vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres, J Therm Anal Calorim. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, p.6, 2011.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A .S.; SCHOEN F.J.; LEMONS, J.E.: An introduction to materials in medicine. Academic Press, San Diego, (2005).

REIS, R.L.; ROMÁN, J.S. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boca Raton: CRC PRESS, 2005.

RESTREPO LL, MARZOLA C, CONSOLARO A, COSTA PEREIRA AA, TOLEDO FILHO JL, ANDREO JC. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobondâ" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. Rev Bras Implant n.4, p.8-15, 1998.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science, v. 31, p. 603-632, 2006.

RINZLER, C. A; Nutrição para leigos, 4ed, Rio de Janeiro: Alta Books, 2011

- SANTOS JÚNIOR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. São Paulo – Campinas. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 17, p. 308-317, 2007.
- SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 3277-3285, 2006.
- SATYANARAYANA, K. G.; ARIZAGA, G. G. C. & WYPYCH, F. *Biodegr. Progr. Polym. Sci.*, v.34, p.982. 2009.
- SENEL, S.; MCCLURE, J.; S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1467-1480, 2004.
- SERVICE R. F. Tissue engineers build new bone. *Science*. v.289, p.1498-500. 2000
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SIMÕES, R. D; SJZENFELD, V. L.; ATRA, E.; RODRIGUES, L. G.; BARACAT, E.C., "Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose". In: *Ginecologia Endócrina*, 1ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 272-282, 1995.
- SMITH, R. *Biodegradable polymers for industrial applicatons*. New York, Woodhead publishing limited. 2005.
- SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.37, p. 155-161, 2008.
- STAMFORD, T.C.M. Produção, caracterização e atuação anticariogênica de quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542. 153f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, 2006.
- SUH, J.K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, v.21, p.2589-2598, 2000.
- SUVOROVA, E.I.; BUFFAT, P.A. "Electron Diffraction from Micro- and Nanoparticles of Hydroxyapatite", *Journal of Microscopy*, v.196, p. 46-58. 1999.
- TAGA R, CESTARI TM, SILVA TL, STIIPP CM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev Bras Implant jan/fev* v.3, n.1, p.13-20, 1997.
- TEN CATE AR. *Oral histology : development, structure, and function*. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, v. 18, n. 7, p. 567-575, 1997.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S.R.; FIELDS, R.T. Bone Augmentation With and Without Biodegradable and Non Biodegradable Microporous Membranes. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. Noth Am.*; Vol. 13, no.3, p. 411-22,2001.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) *Material Science of Chitin and Chitosan*, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19, Nutrient Data Laboratory, 2006.

VALLET-REGI, M., GONZALEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphates as substitution of bones tissue. *Progress in Solid State Chemistry*, v.32, p. 1-31, 2004.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. *Dent. Clin. N. Am.*, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WEINBERG, J.B.; MISUKONIS, M.A.; SHAMI, P.J.; MASON, D.L.; SAUIS, W.A.; DITTMAN, E.R.; WOOD, G.K.; SMITH, B.; McDONALD, K.E.; BACHUS, A.F.; HANEY, GRANGER, D.L. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS mRNA, iNOS protein bioprotein, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

WILLIAMS KR, BLAYNEY AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials*. V.8, p.254-8, 1990

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química. Universidade Federal de Sergipe, 2011. Disponível em: http://albertowj.files.wordpress.com/2011/03/106372-apostila-2011_1-t3.pdf. Acesso em 12/09/2011.

WULF, D.M.; MORGAN, J.B.; SANDERS, S.K.; TATUM, J.B.; SMITH, G.C.; WILLIAMS, S. Effect of dietary supplementation of vitamin E on storage and caselife properties of lamb retail cuts, *J. Anim. Sci.*, 73, 399, 1995.

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

ZILNIK, L. F.; JAZBINSEK, A.; HVALA, A.; VRECER F.; KLAMT A. Solubility of sodium diclofenac in different solvents. *Fluid Phase Equilibria*, v.261, n.1-2, p.140-145, jul. 2007.