

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

Maria Jucélia Lima Dantas

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS FABRICADAS A PARTIR DE ESFERAS
QUITOSANA/HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Campina Grande - PB

Fevereiro - 2016

Maria Jucélia Lima Dantas

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS FABRICADAS A PARTIR DE ESFERAS
QUITOSANA/HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande como requisito à parcial obtenção do título de **Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Co-Orientador: Prof. Dr. Raul Garcia Carrodegua

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande - PB

Fevereiro- 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

D192e Dantas, Maria Jucélia Lima.
Estruturas tridimensionais fabricadas a partir de esferas quitosana/hidroxiapatita / Maria Jucélia Lima Dantas. – Campina Grande, 2016.
69 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Raul Garcia Carrodegua".
Referências.

1. Quitosana. 2. Hidroxiapatita. 3. Estruturas Tridimensionais. 4. Agregação de Partículas. I. Lia Fook, Marcus Vinicius. II. Carrodegua, Raul Garcia. III. Título.

CDU 620.1:677.473(043)

VITAE DO CANDIDATO

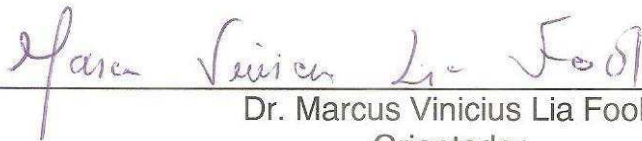
- Engenheira de Materiais pela UFCG (2013).

MARIA JUCÉLIA LIMA DANTAS

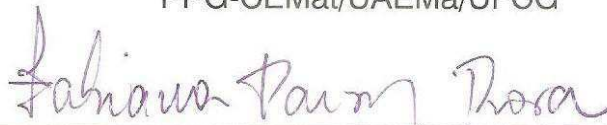
ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS FABRICADAS A PARTIR DE ESFERAS
QUITOSANA/HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

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**.

Aprovado em: 29/02/2016



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.^a Fabiana Paim Rosa
Examinadora Externa
PPG-PIOS/UFBA



Dr. Thiago Bizerra Fidélis
Examinador Externo
UFCG

Dedico este trabalho a minha família, em
especial aos meus pais Jurandi e Socorro.

Se você sonha em ter algo, corra atrás, lute, conquiste, vença!

E se você quer mesmo algo nunca desista!

Felipe de Souza Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por tudo que sou que tenho e que consigo alcançar a cada amanhecer. Por cada dia, cada barreira, cada dificuldade, mas acima de tudo pela força e vitória de poder passar cada momento.

Aos meus pais, Jurandi e Socorro, pelas orientações, conselhos, educação, dedicação e acima de tudo amor, que independentemente da situação me proporcionaram.

A minha irmã, Denise e ao meu cunhado Mikael, pelas inúmeras vezes que me escutaram em momentos de estresse e por todo orgulho que sempre demonstram no meu âmbito acadêmico.

Ao meu namorado, Diego Martins, pela compreensão e apoio, pelos momentos de descontração e incentivo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pelo apoio não somente acadêmico, mas pelo tratamento como um pai, sempre confiando e entendendo cada momento e obstáculo ao longo desta caminhada. Minha imensa gratidão.

Ao meu Co-Orientador Raúl García Carrodegua, por todo ensinamento transpassado, toda paciência e disposição de estar sempre ajudando, mesmo distante, fornecendo sempre conhecimento e sabedoria.

Ao Dr. Thiago Fídeles, meu imensurável agradecimento por todo apoio, acolhimento, contribuição científica e acadêmica, por todas as ideias e soluções de problemas fornecidos durante a pesquisa, meu muito obrigada.

A minha amiga-irmã Marianna Galdino, por todo suporte, apoio emocional e profissional durante toda minha caminhada, desde a graduação, muito obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

As minhas companheiras-amigas, denominadas “xuxinhas”, Dayanna, Flávia, Greyce, Imarally, Isabel, Lívia, Michele, Milena, Rita, Suelem, Valéria e Thaís, por cada dia-dia, cada momento de descontração, por toda ajuda e

incentivo, dúvidas geradas e compartilhadas, cada desespero dissipado, lágrimas e boas risadas no laboratório, vocês fazem parte desta conquista.

Aos meus colegas Claydson, Daniel, Francisco, Ítalo, Hudson, Hugo, Márcio, Sandro, Samuel e Willians, por toda ajuda, seja realizando ensaio ou pelos momentos de descontração.

As duas guerreiras, que tenho como mãe, Paulinha e D. Val, por toda dedicação, entusiasmo, conselhos e todo carinho recebido diariamente.

A todos que fazem parte do NGI, em especial ao meu “chefe” Toninho, Josilene, Tânia, Pedro e Suyanna, por toda prestação de serviços realizada com muito carinho e atenção. Em especial também a Sr. Sérgio, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) pela oportunidade e estrutura concedida, que foram cruciais para execução deste trabalho.

A todos os Docentes do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande.

Aos Funcionários da coordenação de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, a Márcia e André por toda paciência e dedicação para resolver todas as documentações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Estruturas tridimensionais são ferramentas bastante atrativas para a engenharia de tecidos, mimetizado fisicamente a matrix extracelular natural que atuam como suportes para o desenvolvimento celular. O objetivo do trabalho foi produzir estruturas tridimensionais biodegradáveis de quitosana-hidroxiapatita-gelatina (CS/HA/G) com diferentes quantidades de HA e avaliar suas propriedades e comportamento *in vitro*. As estruturas tridimensionais foram produzidas em duas etapas. Numa primeira etapa foram obtidas esferas de CS contendo diferentes quantidades de HA de baixa cristalinidade (20, 50 e 70 % m/m). A HA de baixa cristalinidade foi gerada *in situ* no interior das esferas de CS. Para isso foi precipitado CaHPO_4 em uma dissolução de CS e a suspensão resultante foi conformada na forma de esferas mediante gotejamento em dissolução de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (TPP) com pH 8-9. As esferas precipitadas foram mantidas sob agitação nesta solução para conseguir a reticulação da CS e a transformação do CaHPO_4 em HA, e finalmente liofilizadas. Para a obtenção das estruturas tridimensionais, as esferas de CS-HA foram aglutinadas mediante impregnação com dissolução aquecida (40°C) de 5 % de G, arrefecimento até -18°C e liofilização. As esferas foram caracterizadas mediante microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), análises termogravimétricas (TG) e espectroscopia de infravermelho (IV). E as estruturas tridimensionais por Porosidade, Grau de Intumescimento (GI), propriedade mecânica de resistência à compressão via seco e úmido. O diâmetro médio das esferas segundo os resultados de MO foi de $2,6 \pm 0,22\text{mm}$ e $2,8 \pm 0,28\text{mm}$ para CS-HA 20% e CS-HA50%, respectivamente. Já as partículas de CS-HA70% apresentaram diâmetro médio de $3,9 \pm 0,37\text{mm}$ tendo sua morfologia e porosidade superficial variou com o conteúdo de HA. A presença de HA de baixa cristalinidade no interior das esferas foi confirmada pelos resultados DRX e IV. Nas imagens de MEV foi possível observar que os cristais de HA estão homoganeamente dispersos no interior das esferas. Os resultados de TG revelaram boa concordância entre as quantidades de HA projetadas e as realmente obtidas nas esferas. Os resultados das estruturas tridimensionais indicam influência pelas diferentes concentrações de hidroxiapatita. Com o aumento na fração cerâmica observa-se a densificação da superfície, uma pequena diminuição da porosidade e no grau de intumescimento, como também um aumento no módulo de elasticidade via seca e uma pequena diminuição nas propriedades mecânicas via úmido, causado pelo intumescimento da estrutura. O compósito que apresentou resultados mais satisfatórios foi CS-HA20%, exibindo um melhor perfil à porosidade, grau de intumescimento e propriedades mecânicas. O estudo sugere que as estruturas tridimensionais necessitam de reajustes para serem aplicadas em regeneração óssea, entretanto podem ser indicadas para aplicações em engenharia de tecidos, em situações preferencialmente *ex-vivo*, como suportes temporários de células.

Palavras-Chave: Quitosana. Hidroxiapatita, Estruturas Tridimensionais, agregação de partículas.

ABSTRACT

Three-dimensional structures are very attractive tools for tissue engineering, physically mimicked the natural extracellular matrix, these structures act as supports for cell development. The goal was to produce biodegradable three-dimensional structures of chitosan-hydroxyapatite-gelatin (CS / HA / L) with different HA contents and evaluate their properties and behavior in vitro. The three-dimensional structures were produced in two steps. In a first step CS were obtained spheres containing different amounts of HA low crystallinity (20, 50 and 70% w / w). The poorly crystalline HA was generated in situ within the CS spheres. To this precipitate was dissolved in CS CaHPO_4 and the resulting suspension was shaped in the form of spheres by dripping in dissolution $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (TPP) at pH 8-9. The precipitated spheres were kept in this solution under stirring to obtain the halftone processing and the CS HA CaHPO_4 , and finally lyophilized. To obtain the three-dimensional structures, CS-HA spheres were bonded by impregnation with warm solution (40 ° C) 5% C, cooling to -18 ° C and lyophilization. The spheres were characterized by optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TG) and infrared spectroscopy (IR). And the three-dimensional structures by porosity, Degree of Swelling (GI), mechanical property of resistance compressão via dry and wet. The average diameter of the spheres according to the results of MO was 2.6 ± 0.22 mm and $2.8 \pm 0,28$ mm CS-20% CSHA50% respectively. Already the particles of CS-HA70% had a mean diameter of $3.9 \pm 0,37$ mm having their morphology and surface porosity varied with the HA content. The presence of low crystallinity with in the HA spheres was confirmed by the XRD results and IV. In the SEM images was observed that HA crystals are homogeneously dispersed within the sphere. The TG data showed good agreement between the HA and the amounts actually projected on the spheres obtained. The results indicate influences of three-dimensional structures for various concentrations of hydroxyapatite. With the increase in the ceramic fraction is observed densification of the surface, a slight reduction of the porosity and the degree of swelling, as well as an increase in the modulus of elasticity via a small decrease in the mechanical properties wet route, caused by swelling of the structure. The composite that presented better results was CS-HA20%, showing a better profile to the porosity, degree of swelling and mechanical propriedades. The study suggests that three-dimensional structures require adjustments to be applied in bone regeneration, but can be suitable for applications in tissue engineering, in situations preferably ex vivo, as temporary supports cells.

Keywords: Chitosan. Hydroxyapatite, Three-dimensional structures, aggregation of particles.

PUBLICAÇÕES

Trabalhos publicados em anais de congressos (Resumos)

1. DANTAS, M. L., OLIVEIRA, S.S. L, FIDELES, T. B., SA, M. D., CARRODEGUAS, R. G., FOOK, M. V. L. **Scaffolds de Quitosana-Hidroxiapatita-Gelatina** In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. v.1
2. DANTAS, M. L., MARINHO, T. M. A., FIDELES, T. B., FOOK, M. V. L. **Preparação de esferas de Quitosana/Hidroxiapatita para Produção de Estruturas Tridimensionais** In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia de Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá. Congresso Brasileiro de Engenharia de Ciência dos Materiais. , 2014. v.1.
3. OLIVEIRA, S.S.L, SILVA, M. C., DANTAS, M. L., FIDELES, T. B., FOOK, M. V. L. **Avaliação De Metodologias Baseadas Em Gelificação Ionotrópica Para Desenvolvimento De Esferas De Quitosana/Hidroxiapatita** In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, CUIABA, MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. , 2014. v.1. p.3198.
4. OLIVEIRA, S.S.L, SILVA, M. C., DANTAS, M. L., FIDELES, T. B., FOOK, M. V. L. **Desenvolvimento de Scaffolds De Quitosana/Hidroxiapatita Por Método De Agregação De Partículas** In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, CUIABA, MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. , 2014. v.1. p.3199.
5. OLIVEIRA, S.S.L, DANTAS, M. L., FIDELES, T. B., FOOK, M. V. L. **Chitosan/hidroxyapatite beads produced by ionotropic gelation method** In: 8º Congresso Latinoamericano de Organos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Teidos, 2014, Rosario - Argentina. 8º COLAOB. , 2014. v.1,p.74.
6. SA, M. D., LISBOA, H. M., FIDELES, T. B., SANTOS, F. S. F., DANTAS, M. L., FERREIRA, V. P., FOOK, M. V. L. **Fio de sutura multifilamentado à base de quitosana: uma revisão.** In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. v.1.p.

Premiação:

2014: Mejor Poster del 8 Congreso Latioamericano de Organos Artificiales Biomateriales e Ingeniería de Teidos, SLABO-UNR-CAIC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conceito de Engenharia de Tecidos(Stock e Vacanti, 2001). Adaptado.	24
Figura 2: Estrutura Cristalina da Hidroxiapatita (RIBEIRO, 2009). Adaptado. .	34
Figura 3: Aplicações da hidroxiapatita no corpo humano. (Vaz, 2007).	36
Figura 4: Estrutura química da quitosana. A) N-acetyl-D-glucosamine, D) N-D-glucosamine (PENICHE et al, 2010).	39
Figura 5: Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana(BATTISTI et al, 2008.) Adaptado.	40
Figura 6: Fórmula estrutural da molécula de gelatina(PEÑA et al., 2010.)	42
Figura 7: Fluxograma preparação das Esferas.....	47
Figura 8: Fluxograma Preparação das Estruturas tridimensionais	48
Figura 9: Preparação da Solução de Quitosana.....	49
Figura 10: Etapa para formação de hidrogênio fosfato de cálcio (CaHPO ₄). ..	50
Figura 11: Representação Esquemática da produção das esferas.....	51
Figura 12: Preparação da Solução de Gelatina.....	52
Figura 13: Representação esquemática do processo para obtenção das estruturas tridimensionais.	53
Figura 14: Curva de tensão-deformação de compressão de um sólido celular (Ashby, 2006).....	60
Figura 15:Difratograma de Raio X das Esferas de Quitosana/Hidroxiapatita, CS-HA (20,70%).	62

Figura 16: MO das esferas de (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70%.....	64
Figura 17: MO Esferas de (a) CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70%.....	66
Figura 18: Difratoograma das esferas de (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70% e (e) HA.	67
Figura 19: Curvas TG e DTG para CS, CS-HA 20%, CS-HA 50%, CS-HA 70% e HA.....	70
Figura 20: MEV das esferas CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%. Todos os aumentos foram de 130X.	73
Figura 21: MEV das esferas (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50% e (d) CS-HA70%.....	76
Figura 22: MEV- EDS para CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%.....	78
Figura 23: MEV CS-HA70% (a) 1000x (b) 8000x	79
Figura 24: Espectros de FTIR CS-HA (20, 50, 70%).	81
Figura 25: Porosidade das Estruturas Tridimensionais de Quitosana/Hidroxiapatita CS-HA20% e CS-HA50%.	86
Figura 26: Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos compósitos CS-HA20% e CS-HA50%.	88
Figura 28: Gráfico Tensão x Deformação das estruturas tridimensionais quitosana/hidroxiapatita, deformação a 10%.	90
Figura 28: Curvas tensão x deformação dos compósitos: (a) CS-HA20% e (b) CS-HA50%, deformação a 10%.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações clínicas envolvendo as classes dos materiais utilizados no corpo humano	30
Tabela 2: Volumes empregados das soluções de quitosana (2% m/v), acetato de cálcio (25% m/v), dihidrogênio fosfato de sódio (25% m/v).	49
Tabela 3: Solução do gotejamento para os dois métodos	51
Tabela 4: Diâmetro médio das esferas observadas por MO.....	66
Tabela 5: Eventos térmicos para as esferas de quitosana pura e quisotana/hidroxiapatita (CS-HA20%. CS-HA50%, CS-HA70%).....	71
Tabela 6: Resultados da perda de peso.....	72
Tabela 7: Resultados obtidos a partir dos testes de compressão, amostras a seco.	93
Tabela 8: Resultados obtidos a partir dos testes de compressão, amostras via úmido.	96

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Reação para formação de Hidrogênio Fosfato de Cálcio.	49
Equação 2: Reação de conversão do Hidrogênio Fosfato de Cálcio em Hidroxiapatita.	51
Equação 3: Porosidade (%)	58
Equação 4: Grau de Intumescimento	59
Equação 5: Reação de conversão do Hidrogênio Fosfato de Sódio em Fosfato Octacálcico.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM – American society for Testing and Materials

CS – Quitosana

CS-HA – Compósito de Quitosana e Hidroxiapatita

DCPD – Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado

DRX – Difração de Raios X

EDS – Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

FTIR - Spectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier

GD – Grau de Desacetilação

HAC – Ácido acético

HA – Hidroxiapatita

ISO – International Organization for Standardization

m – Massa

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mm - Milimetro

MO – Microscopia Ótica

MTT – Brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

OCP – Fosfato Octacálcico

OH – Grupo Hidroxila

Ph – Potencial hidrogênio iônico

PSB – Tampão Fosfato Salino

TPP – Tripolifosfato de Sódio

TG – Termogravimetria

v - Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO da literatura.....	24
2.1	Engenharia de Tecidos.....	24
2.2	Estruturas tridimensionais.....	26
2.2.1	Requisitos das estruturas tridimensionais.....	27
2.3	Biomateriais.....	28
2.3.1	Aplicações dos Biomateriais.....	30
2.3.2	Biomateriais para regeneração óssea.....	31
2.3.3	Biomateriais cerâmicos.....	32
2.3.3.1	Hidroxiapatita.....	33
2.3.4	Biomateriais poliméricos.....	37
2.3.4.1	Quitosana.....	38
2.3.5	Gelatina.....	42
2.3.6	Compósitos.....	43
2.3.7	Agregação de Partículas.....	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1	Local da Pesquisa.....	45
3.2	Reagentes.....	45
3.3	Etapas de desenvolvimento da pesquisa.....	45
3.4	Procedimento experimental.....	48

3.4.1	Preparação das soluções de quitosana	48
3.4.2	Etapa I.....	49
3.4.2.1	Obtenção das esferas de quitosana-hidroxiapatita (CS/HA).	49
3.4.3	Etapa II.....	52
3.4.4	Obtenção das estruturas tridimensionais de quitosana-gelatina-hidroxiapatita (CS/GL/HA).	52
3.5	Caracterizações	53
3.5.1	Normas Utilizadas	53
3.5.2	Caracterização das Esferas.....	54
3.5.2.1	Microscopia Ótica (MO).....	54
3.5.2.2	Difração de Raios X (DRX).....	55
3.5.2.3	Análise Termogravimétrica (TG).....	55
3.5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS).	56
3.5.2.5	Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	57
3.5.3	Caracterização dos estruturas tridimensionais	57
3.5.3.1	Porosidade (%).....	58
3.5.3.2	Grau de Intumescimento (%GI)	58
3.5.3.3	Resistência à Compressão.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Etapa I	61
4.1.1	Difração de Raios X (DRX)	61

4.1.2	MICROSCOPIA ÓTICA	63
4.1.3	Difração de Raios X (DRX)	66
4.1.4	Análise Termogravimétrica (TG).....	69
4.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS).....	73
4.1.6	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).	79
4.2	Etapa II	84
4.2.1	Porosidade	85
4.2.2	Grau de Intumescimento	87
4.2.3	Resistência à Compressão	89
4.2.3.1	Resistência à Compressão a seco	89
4.2.3.2	Reistência à compressão via úmida	93
5	CONCLUSÕES.....	97
5.1	Etapa I	97
5.2	Etapa II	97
6	Sugestões para trabalhos futuros	99
7	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A sociedade moderna desde meados do século XX é marcada pela busca do bem estar e longevidade, e é um desafio constante prolongar essa vida com qualidade. Um dos vetores para este desafio é a falência natural dos órgãos e tecidos, necessitando assim de um transplante, que por muitas vezes torna-se um problema, pois prolonga o sofrimento de pacientes que dependem da doação de órgãos, condenando-os a permanecer em uma interminável lista de espera.

Apesar de apresentar crescimento no número de doações, o levantamento realizado pelo Ministério da Saúde de janeiro até agosto de 2014, mostra que os transplantes de ossos tiveram um aumento de 53% em relação ao ano anterior, hoje, o Brasil possui 15 doadores de órgão por milhão de habitantes e dentro deste universo, apenas quatro são doadores de ossos. Além disso, quando ocorre o transplante, existe sempre o risco iminente de rejeições por parte do paciente. A partir disto, técnicas biomédicas de transplante de material orgânico semelhante vêm sendo desenvolvidas, objetivando dar continuidade à vida natural.

Como consequência dos avanços tecnológicos tanto no campo científico como da medicina regenerativa, existe uma progressiva busca pela obtenção de materiais capazes de mimetizar os sistemas biológicos de forma funcional e biológica, a fim de fornecer uma fonte ilimitada de substitutos de tecidos e/ou órgãos. Estes materiais são identificados como biomateriais, e são usados para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009).

A engenharia de tecidos aplicada a biomateriais corresponde a materiais que apresentem propriedades diferenciadas respondendo as demandas biológicas seja de tecido mole ou duro, associando esse desempenho a uma atividade biológica como a regeneração e baseia-se em três elementos importantes: células, fatores de crescimento (moléculas de sinalização) e

estruturas tridimensionais (matriz polimérica 3D). Uma estrutura tridimensional é um dos componentes mais importantes, que interage com as células e os fatores de crescimento para regenerar um tecido específico. (Gautam et al, 2013)

Um desafio diferenciado na atualidade no campo dos biomateriais é desenvolver um material que tenha alto grau de semelhança com o tecido vivo, de modo que este possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como corpo estranho ao seu meio (Leonel et al., 2004). Mediante isto, tem sido investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de estruturas tridimensionais. Por exemplo, a combinação de fosfatos de cálcio com polímeros combina boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade das estruturas tridimensionais. Para a construção de estruturas tridimensionais para a regeneração de tecidos ósseos, destacam-se os compósitos de PCL-HA e PGA-HA e CS-HA. (Pathiraja et al, 2003).

A hidroxiapatita é uma das cerâmicas mais utilizadas como biomaterial, devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. Possui vantagens como a sua composição uniforme, biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável. Por isso, vem sendo estudada como um possível material substituto para osso e implantes dentários. A quitosana é um polímero natural proveniente da reação de desacetilação da quitina (originada principalmente de exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insetos) um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza e possui estrutura química similar à estrutura do ácido hialurônico que reforça a sua indicação como agente cicatrizante e reparador, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções das células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas (Onoet al., 2000; Ueno et al., 2001; Pretorius et al., 2005; Darozet et al., 2008; Fook et al., 2010).

Os compósitos são materiais construídos pela combinação adequada de no mínimo dois componentes, elemento de reforço e matriz, unidos por uma interface, diferindo em forma e/ou composição, resultando em materiais com propriedades superiores às dos componentes individuais. Esses materiais podem apresentar como vantagens: biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão, elevado módulo de elasticidade e boa resistência mecânica. (Mathews, 1994), (Piconi, 1999), (Lee, 2001).

Do ponto de vista biológico a formação de um compósito a partir da combinação entre fração de polímeros e cerâmicas, para fabricação de um estrutura tridimensional na perspectiva de regeneração óssea, é uma estratégia natural e biomimética, já que o osso consiste da combinação de um polímero natural juntamente com uma apatita natural. E, do ponto de vista de ciências dos materiais, a combinação de materiais poliméricos e cerâmicos pode gerar um material compósito que possibilite a otimização de propriedades destes materiais, tornando-se mais adequado a aplicação desejada. (Chen e tal, 2002; Chen et al., 2008; Oliveira, 2015; Sampaio, 2014;).

Com base nesse contexto foram delineados os objetivos dessa pesquisa. Este trabalho propõe o desenvolvimento de estruturas tridimensionais baseadas em compósitos de quitosana-gelatina-hidroxiapatita pelo método da agregação de partículas. Para isso sugere-se primeiro a obtenção de esferas de compósito quitosana-hidroxiapatita obtidas por meio gelificação ionotrópica e geração in situ de hidroxiapatita, posteriormente a otimização do conteúdo de hidroxiapatita nas esferas. E, tem como inovação a geração da fase mineral dentro da quitosana promovendo melhor homogeneização do sistema, como também melhores propriedades mecânicas, tendo em vista que podemos através da combinação destes materiais favorecerem propriedades como: bioatividade, reatividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Utilizando estes componentes, buscou-se mimetizar, o tecido biológico com o intuito de aplicação em regeneração óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Engenharia de Tecidos

A primeira citação científica a respeito da engenharia de tecidos, como um braço das ciências biomédicas, foi realizada por Vacanti e Langer's no ano de 1993. É definida como a “Aplicação dos 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 e Bhatia, 2004).

O conceito de engenharia de tecidos foi ilustrado por Stock e Vacanti (Stock e Vacanti, 2001), e é apresentado na Figura 1.

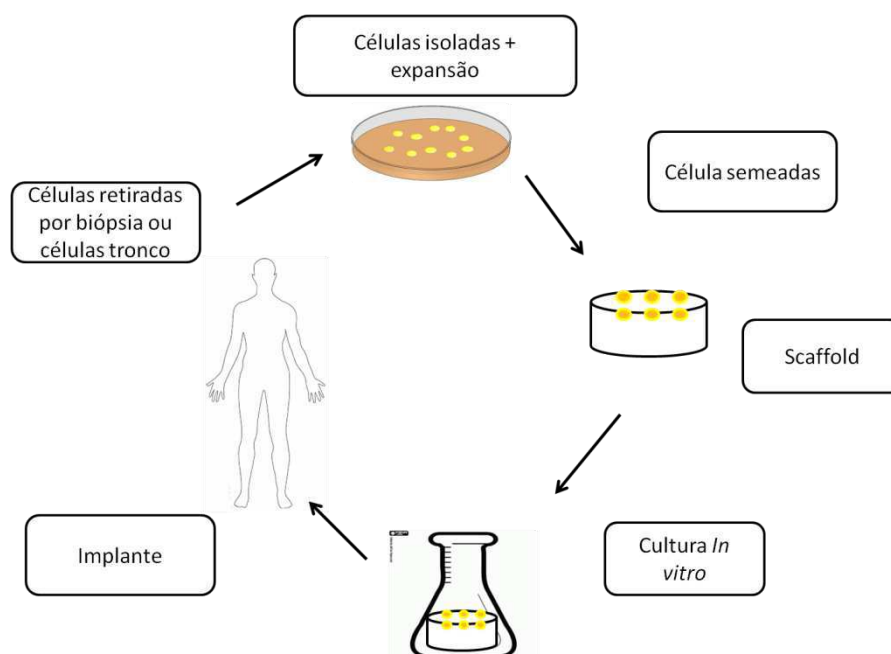


Figura 1: Conceito de Engenharia de Tecidos (Stock e Vacanti, 2001). Adaptado.

Buscando uma padronização tanto na terminologia como na metodologia de pesquisa e aplicação dos produtos preparados pela engenharia de tecidos, a regulamentação vem sendo feita por normas ASTM (entre elas F2312-03, F2027-00e1 e F2150- 02e1) e por órgãos governamentais de países da

Europa, Japão, Canadá e outros(Lloyd, 2004). De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos seguem as seguintes etapas:

- (I) Seleção e processamento do suporte
- (II) Inoculação da população celular sobre o suporte
- (III) Crescimento do tecido prematuro
- (IV) Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico(bioreator)
- (V) Re-Implante cirúrgico
- (VI) Assimilação do produto.

Para regenerar novos tecidos, a engenharia de tecidos utiliza três ferramentas: células, suportes e fatores de crescimento. As células sintetizam a matriz extracelular, que estruturalmente é um material compósito, exercendo a função de uma estrutura tridimensional natural, e que fornece um suporte mecânico que permite as interações célula-célula para a formação de tecidos (Fidèles, 2014),para o novo tecido, o suporte deve prover o ambiente/suporte apropriado para as células crescerem e executarem suas funções, e os fatores de crescimento deve facilitar e promover a regeneração do novo tecido pelas células (Ikada, 2006).

Estes suportes são chamados de estruturas tridimensionais e têm propriedades físicas, mecânicas e químicas apropriadas à adesão, proliferação e diferenciação celular resultando na formação de novo tecido. Esta formação de tecido novo pode ocorrer em dois ambientes, *in situ* e *ex situ*. O primeiro consiste em implantar o arcabouço no local onde se encontra a lesão utilizando a capacidade de auto regeneração do tecido. O segundo ocorre a partir da indução do crescimento celular (biorreatores) em um ambiente controlado e propicio, para que depois haja a implantação e, posteriormente a regeneração. (Spector, 2007)

A Engenharia de Tecidos frequentemente recruta materiais biocompatíveis e biodegradáveis com propriedades mecânicas próximas ao tecido alvo do tratamento. Muito embora os metais e cerâmicas sejam importantes biomateriais, os polímeros são comumente aplicados na engenharia e medicina regenerativa. Adicionalmente, um controle da atividade biológica em nível molecular, que é uma das características primordiais para biomateriais aplicados na Engenharia de Tecidos, pode ser obtido utilizando polímeros naturais (Chionoet al., 2008). Esse novo campo da Engenharia se tornou, de forma literal, a interface entre a indústria tradicional de implantes médicos e a revolução biológica. Ao aproveitar os avanços desta revolução, se permite criar toda uma nova geração de tecidos, órgãos e implantes, assim como estratégias para o reparo e regeneração (Nerem, 2007).

2.2 Estruturas tridimensionais

As estruturas tridimensionais são projetadas para fornecer um espaço tridimensional onde as células transplantadas ou infiltradas permaneçam ligadas, com capacidade de proliferação e diferenciação para produzir o tecido desejado (Putnam, 1996). Podem ser obtidos a partir de material cerâmico, polimérico, metálico ou da associação destes. (Xu Et Al ,2008); (Zhang Et Al, 2008); (Alsberg et al, 2003);(Leong et al ,2006);(Khan et al, 2006);(Duailibi et al 2004).Entre os poliméricos naturais que têm sido largamente utilizados em engenharia de tecidos, podem-se citar os a base de colágeno tipo I, quitosana e ácido hialurônico. Já entre os sintéticos cita-se os poli-anidridos, poli-láctico co-glicólicos (PLGA). (Jiang et al ,2006);(Vogelim, 2005); (Burkoth et al,2005);(Klouda et al, 2008).

A indicação do tipo de material a ser utilizado como suporte para as células depende do objetivo específico da matriz, das propriedades físicas (reológicas, resistência mecânica, porosidade, rugosidade) e químicas (velocidade e modo de degradação) desejadas, assim como da capacidade de devolução de drogas/fatores, entre outros. A inobservância destes e outros requisitos na escolha do material para construção do scaffold pode comprometer o resultado esperado.

2.2.1 Requisitos das estruturas tridimensionais

Os requisitos do material utilizado em aplicações em engenharia de tecidos são complexos e em muitos casos, não há consenso entre a comunidade científica sobre as características específicas que estes devem possuir, para uma aplicação particular. Estes requisitos dependem principalmente do tecido a ser restaurado e sobre a localização e tamanho do defeito a ser tratado. No entanto, existem algumas características gerais principais que o material do arcabouço deve possuir, nomeadamente (Thomson, 1995);(Iakada, 1994):

- Ser biocompatível, ou seja, o material do arcabouço e os seus produtos de degradação, não podem provocar uma resposta do sistema imunitário do corpo ou possuir qualquer substância tóxica;
- Ter propriedades mecânicas adequadas, i.e. o arcabouço deve possuir uma resistência mecânica suficiente para suportar tensões existentes no ambiente onde é implantado;
- Ter uma degradação controlada, porque os tecidos têm diferentes taxas de regeneração, a taxa de degradação do arcabouço tem que ser ajustada ao tecido a reparar, tendo sempre em conta que as propriedades mecânicas deste também diminuem com a degradação;
- Ter tamanho e morfologia dos poros apropriada, i.e. a porosidade, o tamanho e a estrutura dos poros são fatores com grande importância no transporte de nutrientes para células transplantadas e regeneradas. Macroporos de pequeno diâmetro são preferíveis para razões de grande área por volume das estruturas tridimensionais, desde que o tamanho dos macroporos seja maior que o diâmetro de uma célula em suspensão (tipicamente de 10 μm). Há uma falta de consenso sobre o tamanho dos macroporos ideal para o crescimento de tecido máximo e/ou crescimento ótimo das células, mas se aceita que depende do tecido a reparar/ substituir e está ligado ao tamanho das células que serão aplicadas. No caso da regeneração óssea, alguns autores defendem que o crescimento de tecido máximo é atingido com macroporos de tamanhos variando de 200-450 μm (H. SEITZ et al, 2009) para outros,

deve ser de 100-150 μm , ou de 100-350 μm . A Interconectividade entre os macroporos é altamente desejável quando em comparação com os poros isolados, uma vez que uma estrutura de poros com rede interligada aumenta as taxas de difusão de fora para o centro do *scaffold* e facilita vascularização, melhorando assim, o transporte de nutrientes e oxigênio e remoção resíduos. A microporosidade pode possibilitar a inclusão de agentes reguladores e/ou fármacos no material de base dos *estruturas tridimensionais* auxiliando a regeneração de tecido, e tem elevada influencia na sua taxa de degradação.(Thomson, 1995); (Iakada, 1994);

- Ter propriedades químicas da superfície apropriadas para adesão, visto que a adesão é um pré-requisito para futuras funções celulares os diferentes tipos de células, necessitam de diferentes substratos para poderem-se proliferar e promover diferentes tipos de diferenciação, sendo comum que as estruturas tridimensionais recebam tratamentos superficiais para melhorar estas.(Thomson, 1995);(Iakada, 1994); (Thompson, 1995)
- Ser de fácil esterilização, pois antes de poder ser implantado o *scaffold* terá que ser esterilizado, seja por exposição a altas temperaturas, vapor de óxido de etileno, ou radiação gama e devem permanecer inalterados quando sujeitos a uma destas técnicas (Lu, 1996).
- Fácil de processar em variadas geometrias tridimensionais: muitas vezes são utilizados em defeitos com formas únicas, irregulares e complexos, logo as estruturas tridimensionais devem ser de fácil e versátil fabrico (Thomson, 1995);(Iakada, 1994).

2.3 Biomateriais

Uma das áreas de estudo da ciência e engenharia dos materiais é aquela que se dedica à identificação e conhecimento de materiais naturais ou sintéticos, adequados ao uso em meio biológico. A essa categoria de materiais dá-se o nome de biomaterial.

Um biomaterial é uma substância que foi projetada e conformada para que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009).

O desenvolvimento dos biomateriais, especialmente dos substitutos ósseos, é atualmente objeto de intensa pesquisa para utilização em cirurgia ortopédica, traumatológica e buco-maxilo-facial. Desta forma, com intuito de suprir as limitações consequentes ao uso de enxerto autógeno e/ou de bancos de osso, os biomateriais vêm sendo utilizados com perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, seja no reforço de uma estrutura ou preenchimento de um defeito (Gutierrez et al., 2006).

A escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos que devem ser encontrados. Nesse sentido, a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), bem como a velocidade de degradação do material são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial (Pereira; Vasconcelos; Oréfice, 1999; Tabata, 2009).

Os biomateriais utilizados na regeneração óssea, independentemente de serem permanentes ou biodegradáveis naturais ou sintéticos, necessitam ser biocompatíveis e idealmente osteoindutivos, osteocondutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo (El-Ghannam, 2005). Mais recentemente, visando melhorar a qualidade do reparo e a regeneração óssea, tem-se utilizado células cultivadas e fatores de crescimento associados à biomateriais em estruturas tridimensionais (Oliveira et al., 2009). A promessa da engenharia tecidual é a de combinar os avanços no campo dos biomateriais e da biologia celular, de modo que os enxertos ósseos possam abranger a maioria ou todas as características citadas.

Atualmente tem-se observado diversos trabalhos sobre o estudo da reparação óssea, utilizando os mais diversos biomateriais, tais como: polímero de mamona (Jacques et al., 2004), hidroxiapatita sintética (Soccol et al., 2006), β -tricálcio fosfato (Frota, 2006), osso bovino orgânico (Marins et al., 2004; Pinheiro et al., 2003) e inorgânico (Pinheiro et al., 2003; Zambuzzi et al., 2006).

2.3.1 Aplicações dos Biomateriais

Os biomateriais podem dividir-se em materiais sintéticos (metais, cerâmicos ou polímeros), normalmente classificados como biomédicos, ou naturais (animal, vegetal ou humano), classificados como biológicos (Vallet-Regl, 2001). Na Tabela 1, são descritas algumas aplicações clínicas desse grupo de materiais.

Tabela 1: Aplicações clínicas envolvendo as classes dos materiais utilizados no corpo humano

Tipos de Materiais	Aplicações Clínicas
Polímeros (Polietileno, Poliéster, Poliuretano, PMMA, Silicone).	Suturas, vasos sanguíneos; tecidos moles (oftalmologia, tendão artificial, cardiovascular); acetábulo, nariz, orelha.
Metais (Aço inoxidável, Titânio e respectivas ligas, Liga de cobalto- cromo).	Fixação de fraturas ósseas (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); substituição da articulação (quadril, joelho); implantes de raiz dentária; marca- passos.
Cerâmicos (Alumina, Zircônia, Carbono, Fosfatos de cálcio, Porcelana, Vidros bioativos).	Implantes ortopédicos e dentários (ossos, juntas, dentes); substituição, aumento e reconstituição óssea, componentes acetabular e femoral.

Compósitos (Fibra de carbono-resina termofixa; Fibra de carbono-termoplástico; Carbono-carbono, Fosfato de cálcio- quitosana).	Cimento ósseo; resinas dentárias, válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico); implante de joelho.
---	--

Fonte: Adaptado de Park J e Lakes (2007) e Kawachi et al (2000).

2.3.2 Biomateriais para regeneração óssea

Diversas razões clínicas para o desenvolvimento de materiais ósseos na reconstrução de defeitos são encontradas, como por exemplo, traumas, infecções, anomalias de desenvolvimento, patologias, ressecções oncológicas e perda fisiológica de massa óssea podem levar a defeitos ósseos perenes, os quais não tem a capacidade de se regenerar espontaneamente, inclusive a necessidade de implantes ortopédicos que sejam mecanicamente mais adequados ao seu ambiente biológico.

O tecido ósseo, por sua vez, está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (Silva et al., 2007). A consolidação do reparo neste tecido está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, desta forma, há formação de cicatriz fibrosa (Kim et al., 2006).

Por isso, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares. Eles devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos, proporcionando a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento

celular neste sítio (Liu; Ma, 2004; Wan; Nacamuli; Longaker, 2006; Chen et al., 2009). Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (Precheur, 2007). Esses biomateriais ainda devem possuir função imediata após a implantação e ter habilidade de remodelação e integração com o organismo (Vunjaknovakovic; Kaplan, 2006)

Atualmente, para a utilização como substitutos do tecido ósseo, existem diversos biomateriais disponíveis. Eles variam não somente em relação à sua origem e composição química, mas também quanto à sua ação mecânica e configuração espacial (blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e hidrogéis) (Giannoudis; Dinopoulos; Tsiridis, 2005; Abukawa et al., 2006)

Neste trabalho os tipos de biomateriais escolhidos foram: poliméricos e cerâmicos, tendo em vista que a utilização de materiais poliméricos apresentam vantagens quando comparados com materiais metálicos, pois a diferença no módulo de elasticidade entre o implante e o osso é reduzida, diminuindo a tensão de contato que minimiza a reabsorção óssea (Afonso, 1998). Já as cerâmicas possuem diversas vantagens como biomateriais, para utilização em substituição ao tecido ósseo, dentre as quais destacam-se: são estruturalmente semelhantes ao componente inorgânico do osso; são biocompatíveis, osteocondutivas e, principalmente, não possuem proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica (Abukawa et al., 2006), diminuindo o risco de rejeição pelo organismo (Burg; Porter; Kellam, 2000), além de possuírem um alto tempo de degradação in vivo (Abukawa et al., 2006), permitindo a remodelação óssea no sítio do implante.

2.3.3 Biomateriais cerâmicos

Os biomateriais cerâmicos têm sido utilizados em virtude da semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea não induzindo qualquer reação imunológica ou tóxica. Estas não apresentam risco de transmissão de doenças infecciosas nem de degradação protéica. Comercialmente disponíveis estes biomateriais, diferem na origem (natural ou sintética), fase formada

(hidroxiapatita, betatricalcio-fosfato, fosfato de cálcio bifásico), forma física (particulados, blocos, cimentos etc.) e pelas propriedades físico-químicas (Dalapiculaet al 2006). Embora os biomateriais na maioria dos casos, dependendo do hospedeiro, não sofram rejeições imunológicas estes materiais não possuem a capacidade de ósseoindução ou de osteogenia. Okamoto et al (2006) estabeleceram, em modelo experimental em culturas de células da medula óssea de ratos e de humanos, e observaram que a condição de formação do osso mais adequada seria composto de uma cultura primária de medula óssea para expandir o número de células de subcultura e que os poros formados pela inserção de hidroxiapatita (HA) formam excelentes arcabouços para suportar ao estroma celular.

A característica mais importante associada a um arcabouço fabricado em material cerâmico que deverá substituir um tecido ósseo é a porosidade e a capacidade do material implantado à função osteocondutora. A arquitetura porosa controlada, a porosidade elevada, o tamanho adequado do poro e a interconectividade destes arcabouços são necessários para facilitar a distribuição e difusão de células e de nutrientes por toda estrutura (Costa et al 2007).

O tamanho de poros, do volume, da distribuição, da densidade são características que afetam as propriedades físicas e, subsequentemente, seu comportamento biológico. A área de superfície e a porosidade são duas propriedades estruturais importantes que determinam a qualidade e a utilidade dos biomateriais e consequentemente, exercem grandes efeitos em suas características de desempenho. Estas propriedades são especialmente encontradas em um tipo especial na hidroxiapatita (HA).

2.3.3.1 Hidroxiapatita

Simplificadamente pode-se dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita (HA). (Vallet-Regí, 1997). A HA, com a fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, sendo mais tipicamente representada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para indicar que a célula unitária compreende duas moléculas do composto, tem uma razão molar Ca/P 1,67

(BEST et al , 2008). Este composto representa a fase mineral dos ossos, que é responsável por fornecer estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos vitais como pulmões e coração e funcionando como um depósito regulador de íons. Tal fase representa o componente majoritário (aproximadamente 95%) da fase mineral dos ossos, sendo os outros 5% representado por células. (Vallet-Regí, 1997).

A estrutura da hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$ (caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos equivalentes mantendo um triângulo de 120°), com dimensões de célula cristalina de $a = 0,9423 \text{ nm}$ e $c = 0,6875 \text{ nm}$. Esses valores das dimensões de célula unitária valem para hidroxiapatita mineral ou hidroxiapatita pura preparada por reação em estado sólido ou precipitação e sinterização a 1100°C . A célula unitária de hidroxiapatita tem seis grupos PO_4^{-3} , cinco grupos Ca^{+2} e dois grupos OH^- . A estrutura cristalina da hidroxiapatita é mostrada na Figura 2.

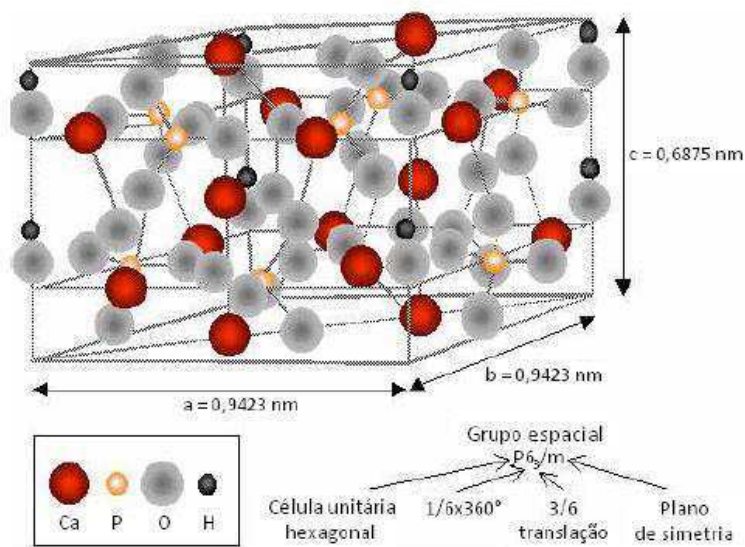


Figura 2: Estrutura Cristalina da Hidroxiapatita (RIBEIRO, 2009). Adaptado.

A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxi e apatita. Hidroxi refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita é um nome mineral.

Devido a sua similaridade com o tecido ósseo, a HA sintética é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos favorecendo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. A sua elevada cristalinidade assegura uma taxa de degradação lenta quando utilizada no fabrico de estruturas tridimensionais, garantindo que este irá manter a sua forma geométrica durante a regeneração do tecido ósseo. Este fato é relevante em aplicações de longo prazo. No entanto a HA sintética só pode ser obtida por tratamentos térmicos onde a sua cristalização acontece com temperaturas acima de 600-700°C, originando cristais de HA sintéticamais e menos solúveis comparados com os obtidos em HA biológica (Bohner, 2000).

A hidroxiapatita pode ser obtida por desproteinização do tecido ósseo (Park, J., 1984) ou por tratamento hidrotérmico de corais (White, R.A. & Shors, E. C., 1986). Pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação a partir de soluções aquosas de PO_4^{-3} , na forma de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ou H_3PO_4 e Ca^{+2} na forma de CaCO_3 , CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. A HA obtida por este método pode conter quantidades diferentes de OH^- e também ocorrer a substituição do íon cálcio por íons estranhos presentes nas soluções aquosas. No método de reação no estado sólido a HA é preparada por um tratamento térmico (900 – 1300°C por 1 a 24 horas) de uma mistura estequiométrica de fosfato tricálcio (β -TCP) ou $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ou DCPD com CaO na presença de pressão de vapor. Métodos convencionais em solução incluem a mistura de soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sob condições alcalinas. A Figura 3 ilustra algumas das possibilidades do uso da hidroxiapatita sintética no corpo humano.

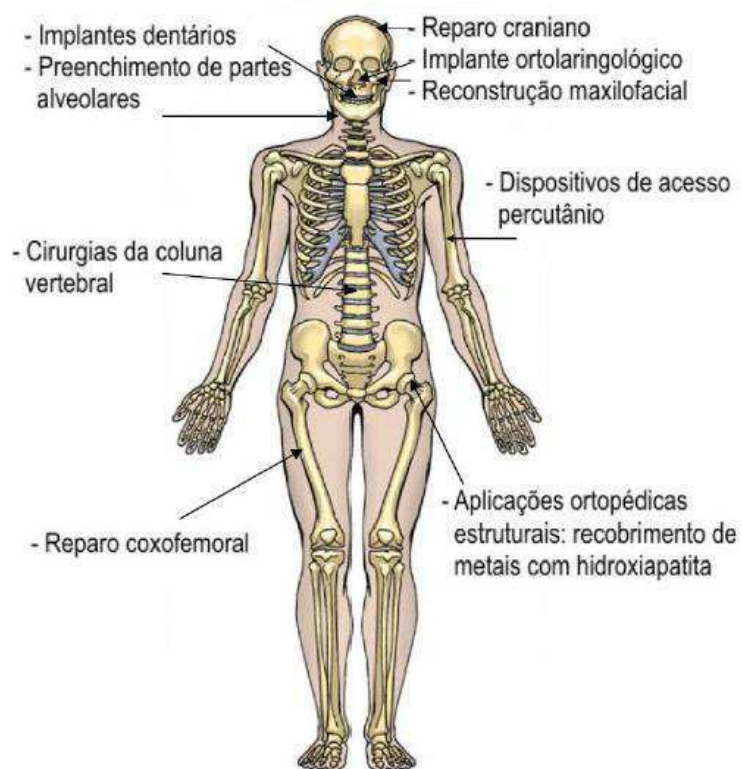


Figura 3: Aplicações da hidroxiapatita no corpo humano. (Vaz, 2007).

A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual (Ribeiro, 2009). Defeitos e doenças do tecido ósseo como, osteoporose, osteoartrite e má formação são apenas alguns de muitos problemas que acometem o tecido e para serem regenerados dependem dos biomateriais. Biomateriais sintéticos para o reparo tecidual apresentam-se em íntimo contato físico e biológico com os tecidos vivos, necessitando dessa forma manter uma ligação efetiva com o tecido hospedeiro. Cerâmicas bioativas como: β - fosfato tricálcico e hidroxiapatita sinterizados, e as vitrocerâmicas, são os únicos materiais que levam a uma integração entre tecido e material *in situ*. (Hench, 1991; Kokubo, T; Kim. H.M.; Kawashita, 2003)

A hidroxiapatita sintética possui propriedades de osteointegração o que a torna substituta do osso humano em implantes dentários. Considerados

materiais osteocondutores servem de meio para reorganização e crescimento ósseo, conduzindo a regeneração tecidual. O termo osteocondução aplica-se ao processo tridimensional observado quando estruturas porosas são implantadas no osso ou adjacências. (Mavropoulos, 1999).

Dentre outras aplicações da HA, algumas são focadas principalmente em situações em que há a necessidade de um aumento ósseo (reconstruções maxilo-faciais ou aplicações dentárias). Nestas situações a HA atua como suporte, promovendo o rápido preenchimento das cavidades com um novo osso fazendo parte da estrutura óssea originada e reduzindo consideravelmente os tempos de recuperação quando comparados a situações nas quais não é usada como preenchimento ósseo. São utilizadas também no preenchimento de defeitos ósseos resultantes da remoção de vastas áreas de osso (remoção de câncer ósseo e defeitos decorrentes de traumas ou acidentes). No tratamento de tumores ósseos, a hidroxiapatita vem sendo utilizada como suporte de ação prolongada associada a fármacos anticancerígenos. Essa união permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual dos fármacos *in situ*. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente. (Andrade, 2013)

2.3.4 Biomateriais poliméricos

Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética, e sua principal característica é a biodegradabilidade. Os polímeros de origem natural utilizados como arcabouços proporcionam uma melhor biocompatibilidade e biodegradabilidade. Por exemplo, a quitosana, alginato e colágeno, apresentam uma estrutura semelhante à matriz extracelular do tecido a se regenerar, evitando inflamação crônica ou reação imunológica e toxicidade, geralmente detectadas em alguns polímeros sintéticos. Alguns dos biomateriais poliméricos utilizados para reparação e regeneração do tecido ósseo são: PMMA, PLA, PGA, PLGA, PE e quitosana, sendo este último utilizado para regeneração e os demais citados aplicados para reparação. (Fontes, 2010; Santos, 2011; Fook, 2012).

Os polímeros de origem sintética não representam as características e comportamento da matriz extracelular, mas a sua grande vantagem é a possibilidade de serem facilmente fabricados em massa e as suas propriedades, taxa de degradação e comportamento mecânico podem ser adaptados para aplicações específicas (Fontes, 2010).

O principal componente da matriz extracelular das células são biopolímeros, mais precisamente o colágeno, que existe de forma geral na forma de fibras e fibrilas. O principal objetivo no desenvolvimento de arcabouços para a engenharia de tecidos é projetar e fabricar um arcabouço poroso, composto de um polímero biodegradável, que permita reproduzir a matriz extracelular, dando suporte necessário para a organização celular. Polímeros naturais podem simular muitas funções da matriz extracelular e podem influenciar diretamente na migração e organização das células durante a regeneração do tecido (Ma, 2008).

2.3.4.1 Quitosana

Inserido na vasta área dos biopolímeros, a quitosana é um material, com características tecnológicas e econômicas relevantes, possuindo propriedades biológicas adequadas como: 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 foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição (Dallan, 2005). É um polissacarídeo formado por uma cadeia linear, composto por unidades repetitivas do tipo β (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxi-D-glucosamina e β (1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina (Figura 4), sendo encontrada na natureza em pequenas quantidades em muitos tipos de fungos, compõe-se de dois tipos de estruturas unidades distribuídas aleatoriamente (distribuição Bernoulli) ao

longo da cadeia: N-acetil-D-glucosamina (A) e Dglucosamine (D), ligadas entre si por ligações β do tipo glicosídicas ($1 \rightarrow 4$). Na sua forma semicristalina, CS é normalmente insolúvel em soluções aquosas neutras, mas solúvel em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6,0$), onde os íons H^+ livres no sistema se ligam ao grupo amino ($-\text{NH}_2$) deixando os protonados, fazendo com as ligações inter e intramoleculares sejam diminuídas. Este fenômeno que possibilita a solubilização da quitosana. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos ($-\text{NH}_2$) é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações (Netoet al, 2008; ASSIS et al, 2008; Dallan, 2005).

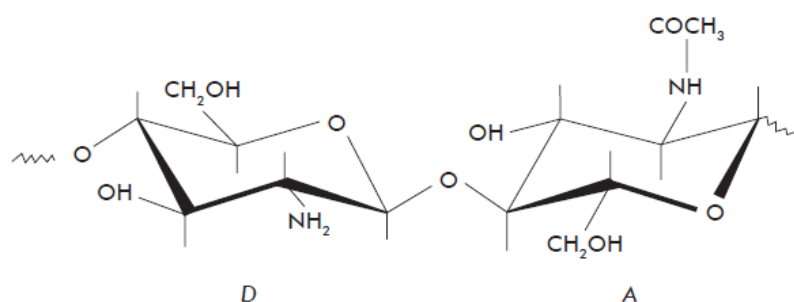


Figura 4: Estrutura química da quitosana. A) N-acetyl-D-glucosamine, D) N-D-glucosamine (PENICHE et al, 2010).

É produzida através da desacetilação alcalina da quitina. Neste processo, ocorre a quebra das ligações N-acetil da quitina, promovendo a formação de D-glicosamina, que contém um grupo amino livre, como ilustrado na Figura 5. O grau de desacetilação (GD) é o parâmetro que indica a quantidade de grupos amina livre ao longo da cadeia de quitosana, se o GD for maior que 50 %, a quitina passa a ser solúvel em meio ácido e o polímero passa a ser denominado quitosana. (Dallan, 2005). A quitosana exibe uma variedade de propriedades físico-químicas e biológicas dependentes da massa molar e GD. A massa molar da quitosana comercial pode variar entre 10,000- 2 milhões Dalton (Da), e o GD usualmente encontra-se numa faixa entre 66-95 %. Esses valores da massa molar e GD podem sofrer alteração através de mudanças nas condições de reação durante a produção da quitosana. (Sonia e Sharma, 2011) Outra opção de produção industrial de quitosana se faz através

da desacetilação microbiológica, utilizando-se enzimas específicas ou microrganismos. (Dallan, 2005)

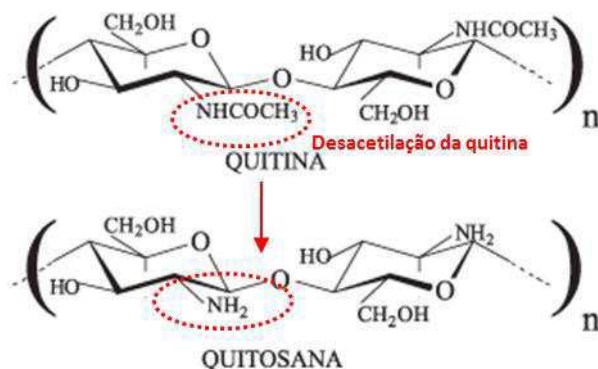


Figura 5: Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana(BATTISTI et al, 2008.) Adaptado.

Estruturalmente, quitina e quitosana são polímeros rígidos fortemente interligados por ligações de hidrogênio que contribuem para o caráter semicristalino do polímero além de fazer com que se decomponha a partir de 300°C e não possuam ponto de fusão. A interação com solventes polares é fortemente induzida pelos dipolos OH e NH permanentes da molécula (Dallan, 2005). Um fator importante na determinação das propriedades físico-químicas das superfícies de um polímero, energia livre, estado químico, rugosidade e molhabilidade é a sua cristalinidade, pois influencia na resposta celular e consequentemente aplicação do material.

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas três décadas, e vão desde o simples uso como excipientes para a indústria farmacêutica até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas. Testes clínicos foram realizados a fim de verificar que biomateriais baseados em quitosana não demonstram qualquer inflamação ou reação alérgica seguida de implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano (Neto et al, 2008; Khor & Lima, 2003).

No que se refere às aplicações biomédicas, a quitosana conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, com propriedades de adsorção, permitindo que seja utilizada até mesmo em terapias genéticas, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da adsorção de partículas de quitosana carreando fragmentos de genes através da parede intestinal, inativando alérgenos de origem alimentar. Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura e para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções (Neto et al, 2008).

Devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, este polímero, na forma de compósito pode atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea. Ao associarmos as características que fazem da quitosana um potencial agente liberador de drogas e aquelas relacionadas às suas propriedades reparadoras teciduais, idealizamos os biomateriais dela obtidos no campo da engenharia tecidual. Materiais capazes de carrear fatores de crescimento, e que sejam biocompatíveis e biodegradáveis como a quitosana, surgem como grande interesse de pesquisas nessa área (Neto et al, 2008; Muzzarelli & Muzzarelli, 2002).

Vários estudos relatam a combinação de quitosana com uma grande variedade de materiais, no nosso grupo de pesquisa CERTBIO, há diversos trabalhos com diferentes aplicações e combinações deste material (Fidéles, 2010); (Fidéles, 2014); (Cardoso, 2012); (Leal, 2012); (Fook, 2010); Almeida, 2013); (Nascimento, 2014); (Oliveira, 2014); (Silva, 2014). Quitina e quitosana apresentam propriedades mecânicas inerentemente reduzidas, dependendo do campo de aplicação. E, por essa razão, a quitina pode ser utilizada como

substituto ósseo para reparo e reconstrução óssea apenas com adição de biomateriais tais como, hidroxiapatita(HA), vitrocerâmica bioativa, etc, com intuito de melhorar sua propriedade mecânica; a quitosana é um polímero que pode oferecer grandes vantagens quando utilizado com fosfatos de cálcio, por suas propriedades granulares, produzindo um arcabouço moldável e endurecido. (Chow, 2009).

2.3.5 Gelatina

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno animal, contido em ossos e peles, principalmente de suínos e bovinos. Gelatinas obtidas por tratamento ácido são designadas do tipo A, enquanto que as do tipo B são as obtidas por tratamento alcalino. O processo produtivo de obtenção da gelatina consiste de três etapas: tratamento da matéria-prima, extração da gelatina e purificação/secagem (SILVA et al., 2011). Sua estrutura química está ilustrada na Figura 6.

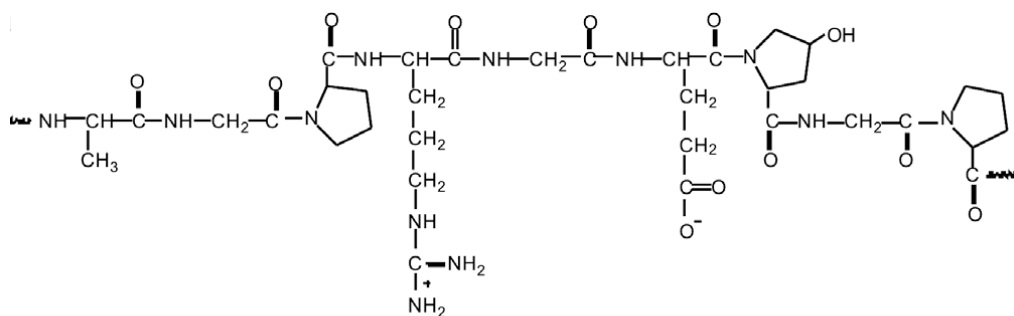


Figura 6: Fórmula estrutural da molécula de gelatina(PENÑA et al., 2010.)

A gelatina é um biopolímero, biocompatível, biodegradável, e solúvel em pH fisiológico à temperatura ambiente, o que a torna ideal para aplicações farmacêuticas. Na construção de biomateriais a gelatina tem sido preferida em relação ao colágeno, pois por ser desnaturada tem mais baixa antigenicidade. Além disso, gelatina é muito mais viável economicamente que o colágeno (Lien, Li e Huang, 2008). Mediante isto, suportes porosos a base de gelatina estão sendo desenvolvido para aplicações em diferentes áreas da engenharia

de tecidos (Liu et al., 2009); (Wu et al., 2010); (Peter et al., 2010); (Wang et al., 2009).

2.3.6 Compósitos

Os materiais do tipo compósitos consistem na combinação de diferentes materiais, com o propósito de aumentar propriedades mecânicas e físico-químicas.

Devidas às limitações próprias de cada um dos biomateriais, tem sido investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de estruturas tridimensionais. Por exemplo, a combinação de fosfatos de cálcio com polímeros combina boas propriedades mecânicas com boa biocompatibilidade das estruturas tridimensionais. Para a construção de estruturas tridimensionais para a regeneração de tecidos ósseos, destacam-se os compósitos de PCL-HA e PGA-HA e CS-HA. (Pathiraja et al., 2003).

A incorporação de fosfato de cálcio numa matriz polimérica tem contribuído para a obtenção de compósitos que combinam a flexibilidade dos polímeros com a resistência, a dureza e a bioatividade da fase inorgânica. Tais características garantem uma maior estabilidade ao material quando em contato com o plasma humano, além de desenvolver uma maior interação com o tecido ósseo (Araújo Júnior, 2005). Polímeros biodegradáveis e cerâmicas bioativas são combinados numa grande variedade de materiais compósitos para serem usados na substituição e regeneração do tecido ósseo (Zioupos, Barbenel, Fisher, 1992; Rezwan, Chen, Blaker et al., 2006).

Pesquisadores como Van & Quoc, 2014; Lijun et al., 2006; Andrade et al., 2012; Munhoz, 2013; Peniche, 2010 E Solís, 2012; destacam o papel significativo em muitas aplicações da engenharia de tecidos a partir da combinação destes materiais, tendo em vista que são passíveis de adaptação e melhoramento de suas propriedades, sejam elas biológicas, físicas, químicas ou mecânicas. Torna-se de relevante importância o desenvolvimento de biocompósitos para reconstrução do tecido ósseo, que possa atender a

crescente demanda desses materiais nas aplicações biológicas das diversificadas áreas da saúde.

No caso do presente trabalho que têm como matéria principal a quitosana é necessário combina-la a outro material, tendo em vista que a quitosana é flexível, mas não possui característica mecânica capaz de suportar as cargas de forma semelhante ao osso natural, sendo assim, a adição de materiais cerâmicos melhora sua capacidade de contribuir no reparo de defeitos ósseos. Neste sentido, os materiais de fosfato de cálcio são osteocondutores, alguns osteoindutores, e mimetizam a porção inorgânica do osso natural, justificando a associação da quitosana e hidroxiapatita no sentido de proporcionar características estruturais e funcionais mais próximas do tecido ósseo.

2.3.7 Agregação de Partículas

Atualmente vários métodos para fabricação de estruturas tridimensionais vêm sendo desenvolvidos, por exemplo: formação de espuma, impressão tridimensional (3D), separação de fases, emulsão, *freeze-drying*, eletrospinning, agregação das partículas, etc. (Miranda et al., 2011; Malafaya et al., 2005).

Dentre os citados, o método de agregação de partículas vem chamando atenção de recentes pesquisas.

Em nosso grupo de pesquisa CERTBIO, o método de agregação de partículas foi pioneiramente utilizado por Fidèles, 2014. Este método consiste geralmente no empacotamento aleatório de esferas seguindo por agregação por meios físicos, químicos ou térmicos para criar uma estrutura porosa tridimensional.

Este tipo de estrutura tridimensional pode exibir propriedades muito promissoras, de acordo com os materiais utilizados, condições de processamento e interconectividade entre os poros. Além disso, as propriedades mecânicas podem ser melhoradas com a incorporação de uma

fase de reforço (cerâmicas), o que os torna atrativos para engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármaco. (Miranda et al., 2011; Malafaya et al., 2005)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste- CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

3.2 Reagentes

- Quitosana em pó;(Sigma Aldrich)[®] (75- 85 % G.D.)
- Ácido acético glacial P.A.; (Vetec)[®]
- Hidróxido de Sódio P.A.; (Sigma Aldrich)[®]
- Tripolifosfato de Sódio - TPP (Sigma Aldrich)[®]
- Tampão Fosfato Salino - PBS P.A.; (Sigma Aldrich)[®]
- Acetato de Cálcio (Sigma Aldrich)[®]
- Fosfato de Sódio (Sigma Aldrich)[®]
- Gelatina (Sigma Aldrich)[®]

Todos os reagentes foram utilizados conforme foram fornecidos, sem que haja nenhuma etapa de purificação ou modificação.

3.3 Etapas de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi realizada em duas etapas:

I - Etapa de obtenção das esferas de quitosana-hidroxiapatita (CS/HA), por dois métodos:

1- Gotejamento em Tripolifosfato de Sódio (TPP).

2- Gotejamento em Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4).

II – Etapa de obtenção das estruturas tridimensionais de quitosana-gelatina-hidroxiapatita (CS/GL/HA)

As Figuras 7 e 8 ilustram os fluxogramas das metodologias utilizadas para obtenção das esferas e das estruturas tridimensionais.

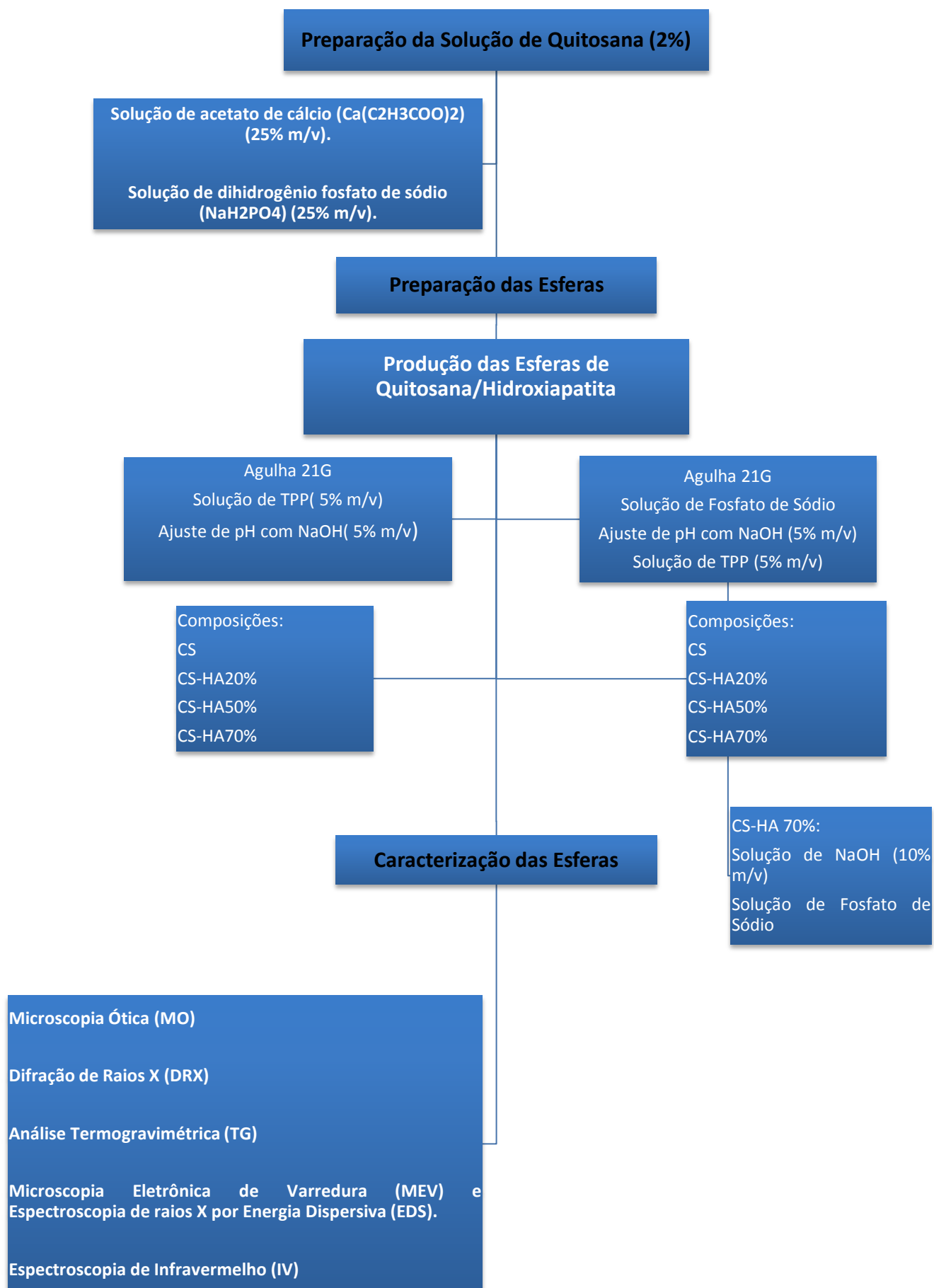


Figura 7: Fluxograma preparação das Esferas

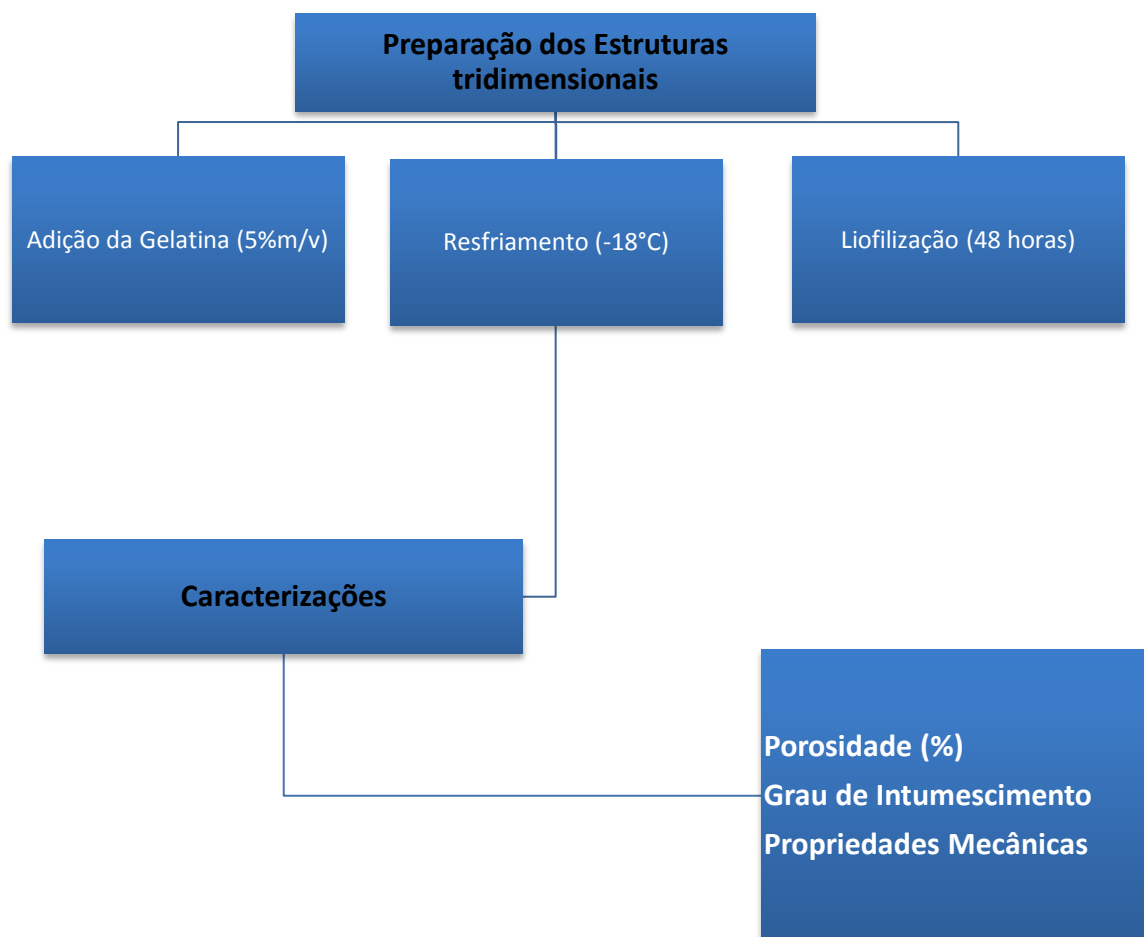


Figura 8: Fluxograma Preparação das Estruturas tridimensionais

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Preparação das soluções de quitosana

O método de preparação das soluções de quitosana foi o mesmo para as duas etapas. A quitosana em pó foi dissolvida em uma solução de ácido acético (1% v/v), empregando uma relação entre a massa de quitosana e o volume de solução a ser utilizado (2% m/v). Na Figura 9 observa-se a etapa de preparação da solução de quitosana.



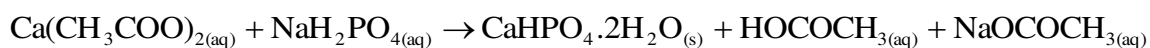
Figura 9: Preparação da Solução de Quitosana

3.4.2 Etapa I

3.4.2.1 Obtenção das esferas de quitosana-hidroxiapatita (CS/HA).

Foram precipitadas diferentes quantidades de hidrogênio fosfato de cálcio (CaHPO_4) na solução de quitosana, segundo a equação 1 (Moré, 2014).

Equação 1: Reação para formação de Hidrogênio Fosfato de Cálcio.



Os volumes empregados das soluções de acetato de cálcio e de dihidrogênio fosfato de sódio são mostrados na Tabela 2, e foram calculados segundo as Eqs. 1 e 2 para a obtenção de 3 conteúdos diferentes de hidroxiapatita no compósito: 20, 50 e 70 % m/v, e os compósitos resultantes foram denominados CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70%, respectivamente.

Tabela 2: Volumes empregados das soluções de quitosana (2% m/v), acetato de cálcio (25% m/v), dihidrogênio fosfato de sódio (25% m/v).

Concentração de HA (% m/m)	Vol. CS (2% m/v)	Vol. Ca ($\text{C}_2\text{H}_3\text{COO}$) ₂ (25% m/v)	Vol. NaH_2PO_4 (25% m/v)
20	100 ml	3,0 ml	2,3 ml
50	100 ml	12,0 ml	9,0 ml
70	100 ml	28,0 ml	21,3 ml

Para isso, a 100 mL de solução de quitosana (2% m/v) foi adicionado um volume de solução de acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{COO})_2$) (25% m/v) e seguidamente, aos poucos, outro de dihidrogênio fosfato de sódio (NaH_2PO_4) (25% m/v), e mantido sob agitação mecânica. (Figura 10).

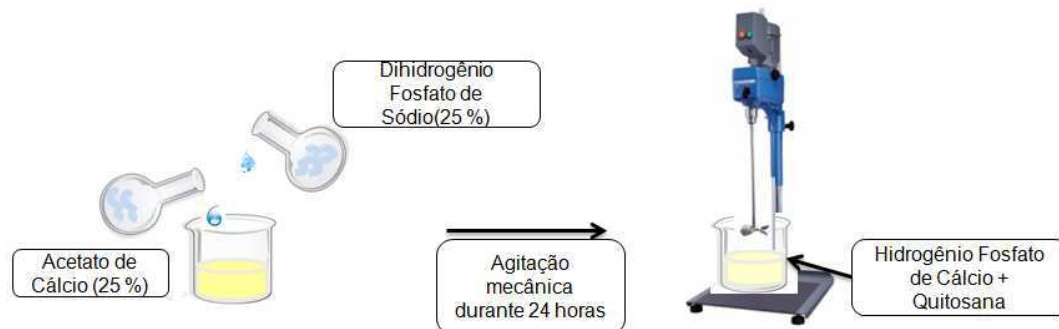


Figura 10: Etapa para formação de hidrogênio fosfato de cálcio (CaHPO_4).

Em seguida foram formadas as esferas de CS-HA segundo o seguinte procedimento:

A solução de CS resultante contendo o precipitado de CaHPO_4 foi gotejada através de uma agulha hipodérmica (21-G) para dentro de uma solução, como especificado na Tabela 3, com pH 8-9 (ajustado com solução de NaOH 5% m/v), como mostrado na Figura 11. O fluxo do gotejamento foi controlado para 1 mL/min com auxílio da bomba de infusão. Este método de obtenção das esferas, chamado de gelificação ionotrópica, foi baseado e adaptado das pesquisas de Fidéles (2014), Baptista (2008) e Oliveira (2015).



Figura 11: Representação Esquemática da produção das esferas

As esferas formadas foram mantidas na solução (Tabela 3) por mais 72 horas a temperatura ambiente sob agitação constante, para completar a reticulação da quitosana e converter o CaHPO_4 em HA segundo a equação 2 (MORÉ, 2014). No segundo método, após as 72 horas as esferas foram mantidas por mais 24 horas em uma solução de tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), TPP, (5%*m/v*).

Equação 2: Reação de conversão do Hidrogênio Fosfato de Cálcio em Hidroxiapatita.



Tabela 3: Solução do gotejamento para os dois métodos

	Método 1	Método 2
	500 ml	500 ml
Solução do Gotejamento	TPP (5% <i>m/v</i>)	Fosfato de Sódio

No segundo método, não foi possível aplicar a metodologia para o compósito CS-HA70%, pois não houve formação das esferas, deste modo o gotejamento foi realizado em uma solução de metanol (NaOH) a 10% *m/v*, com pH 13, e posteriormente mantidas em agitação magnética na solução de fosfato de sódio por um período de 72 horas.

As esferas obtidas foram separadas por filtração e lavadas com uma solução de PBS (pH 7,4) para ser retirado o excesso de TPP e NaOH. Seguidamente refrigeradas por um período de 24 horas e então liofilizadas.

3.4.3 Etapa II

3.4.4 Obtenção das estruturas tridimensionais de quitosana-gelatina-hidroxiapatita (CS/GL/HA).

Foi preparada uma solução de gelatina 5% (m/v) através da dissolução em água destilada, sob agitação magnética e aquecimento em temperatura de 60°C até dissolução. (Figura 12)

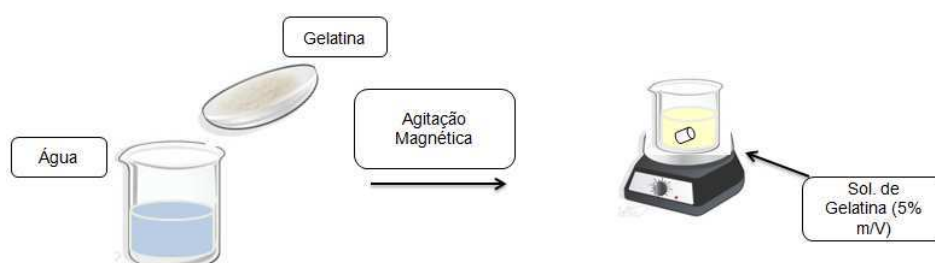


Figura 12: Preparação da Solução de Gelatina

As esferas de CS-HA (15 ml) foram colocadas em um tubo Falcon (50 ml) e a solução de gelatina (2 ml) foi adicionada aos poucos até ocupar o espaço entre as esferas e recobri-las totalmente, com o intuito de promover maior adesão entre as partículas, e assim, formar as estruturas tridimensionais. Após a adição da solução de gelatina, os tubos foram refrigerados (-18°C) por 24 horas e posteriormente liofilizados por 48 horas, ocorrendo assim, a formação das estruturas tridimensionais, através do método da agregação de partículas. A seguir, na Figura 13, ilustra-se a esquematização do processo para obtenção das estruturas tridimensionais.

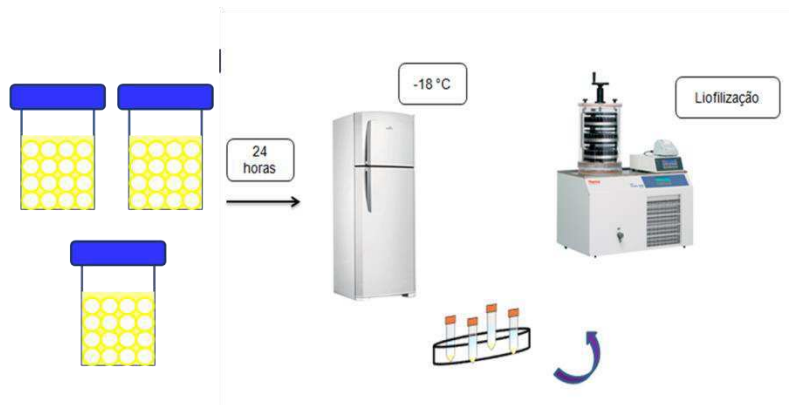


Figura 13: Representação esquemática do processo para obtenção das estruturas tridimensionais.

3.5 Caracterizações

3.5.1 Normas Utilizadas

Para obtenção das estruturas tridimensionais e realização das caracterizações foram utilizadas as seguintes normas:

- **ASTM F2150 – 13:** Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products;
- **ASTM F2450 – 10:** Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products;
- **ASTM D570 – 98(2010)e1 :** Standard Test Method for Water Absorption of Plastics;
- **ASTM D695 – 15 :** Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics;

- **ASTM D1621 - 10** : Standard Test Method for Compressive Properties Of Rigid Cellular Plastics;
- **ISO/TS 10993-19:2006**: Biological evaluation of medical devices -- Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials

3.5.2 Caracterização das Esferas

As esferas de CS-HA foram caracterizadas através das técnicas de Microscopia Ótica (MO), Difração de Raios X (DRX), Análise Termogravimétrica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Infravermelho (IV).

3.5.2.1 Microscopia Ótica (MO)

A microscopia ótica, ou de luz, permite que enxerguemos estruturas de observação impossível a olho nu, através da incidência de luz, e de lentes objetivas que promovem um aumento de até 3500x.

Neste trabalho, a caracterização por Microscopia ótica, para avaliação da morfologia das esferas, foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox- KH 7700 de reflexão e transmissão, pois possui profundidade de campo estendida com medições 2D e 3D, este tipo de microscópio, além de ampliar as estruturas, pode fazê-lo capturando imagens tridimensionais de estrutura interna do material, estando acoplado a uma estação de Análise de Imagens. Para a aplicação desta técnica, foram utilizados aumentos que variaram de 20x até 100x, como também através do software 2D_MEASURE foi realizado a medição do tamanho dos diâmetros das esferas, com uma amostragem de 20 esferas para cada composição.

3.5.2.2 Difração de Raios X (DRX)

O princípio da técnica de difração de raios X- DRX consiste na interação de dois feixes de raios X coerentes, ou seja, procedentes de uma fonte, que incide sobre a amostra. Devido à proximidade do comprimento de onda de raios X e as distâncias interplanares de um cristal, este último atua como grade de difração. Dependendo do ângulo de incidência, diferentes planos refletem os raios iniciais que já tem uma diferença de fase. Estes dois feixes refletidos permitem caracterizar a distância interplanar e, como os planos são numerosos, o quadro total vai caracterizar a estrutura cristalina do composto. Estes dados permitem computar os parâmetros da rede cristalina e identificar o composto através de uma base de dados. Essa técnica é às vezes chamada de difratometria de pó, já que não precisa de monocristais para o refinamento da estrutura, mas apenas o produto triturado (ANDRADE, 2013).

A identificação da fase e cristalinidade dos materiais obtidos em pó foi verificada por um DRX em difratômetro XRD-7000 Shimadzu (CERTBIO/UFCG), utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), com varredura angular de $2^\circ < 2\theta < 60^\circ$, tensão 40 kV e corrente 30mA.

3.5.2.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica é uma técnica de análise instrumental que mede a variação de massa da amostra em relação à temperatura e/ou tempo enquanto é submetido a uma programação controlada (ICTA, 1977). Esta técnica possibilita conhecer a faixa de temperatura em que a amostra adquire uma composição química fixa, a temperatura em que se decompõe e o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição etc.

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas por meio de uma termobalança Perkin Elmer®, modelo Pyris 1 TGA (CERTBIO/UFCG), em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min^{-1} , com uma faixa de temperatura de 25 a 900°C sob a razão de aquecimento de $10^\circ\text{C/min}^{-1}$. Foram

utilizadas amostras com massa de $5,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinho de alumina.

3.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é a técnica de caracterização microestrutural mais versátil disponível hoje, contando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente na engenharia de ciências de materiais. A interação de um fino feixe de elétrons focalizado é capaz de produzir imagens de alta resolução e ampliação, gerando uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar importantes propriedades das amostras, tais como composição, superfície topográfica e cristalografia (RATNER et al., 2004).

No MEV os sinais de maior interesse, usualmente, referem-se às imagens de elétrons secundários (*Secondary Electrons- SE*) e de elétrons retroespalhados (*Backscattering Electrons – BSE*). Neste último os elementos químicos com o maior número atômico (mais pesados) espalham mais elétrons e aparecem mais brilhantes nas imagens e por isso são usados na detecção de contraste entre diferentes composições químicas. Há ainda a utilização de microsondas eletrônicas, conhecidos como espectrômetros de energia dispersiva de raios X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy – EDS*) que complementam a caracterização microscópica dos materiais. Esses detectores de EDS podem ser acoplados na câmara de vácuo dos microscópios para analisar o sinal correspondente aos raios X característicos, resultante do bombardeamento do feixe de elétrons sobre a amostra, permitindo uma análise semi-quantitativa e pontual dos elementos químicos (*EDS-spot*) bem como a distribuição espacial dos elementos sobre um microvolume (*EDS-mapping*) (Goldstein, 2003).

A morfologia das esferas e a análise quantitativa da composição química da amostra foram analisadas a partir do equipamento MEV, PRO X Phenon, com aumento de até 40000 x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, e tensão de 15 kV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa).

As imagens foram realizadas utilizando aumentos de 150x, 250x e 500x, 1000x e 8000x.

3.5.2.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica instrumental rápida e simples que depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética evidenciando a presença de grupos funcionais. A radiação infravermelha causa aumento da amplitude de vibrações das ligações covalentes entre os átomos e grupos funcionais de compostos orgânicos e de insaturações. Nos compostos orgânicos os grupos funcionais possuem átomos ligados por arranjos específicos, então a absorção de energia IV por uma molécula orgânica ocorrerá de modo característico destes grupos funcionais, específicos daquela molécula. Na espectroscopia IV, um feixe de radiação passa através da amostra e a radiação que é transmitida pela amostra é comparada com um feixe de referência. Os compostos absorvem a energia IV em regiões particulares do espectro, as quais são quantificadas. As frequências absorvidas pela amostra serão evidenciadas pela diferença entre os eixos. O espectrômetro registra os resultados na forma de gráfico, mostrando a absorvância versus a frequência ou comprimento de onda. (Cho, No, Meyers, 1998; Muzzarelli, 2002; Rocchetti 1986;)

As análises IV foram realizadas no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, em um espectrofotômetro Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR *Spectrometer* (CERTBIO/UFCG). As amostras foram obtidas em forma de pó, a partir da maceração das esferas. Os espectros foram obtidos no modo absorvância na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

3.5.3 Caracterização dos estruturas tridimensionais

As estruturas tridimensionais foram caracterizadas em aspecto físico-químico a partir dos ensaios de Porosidade (%), Ensaio de Grau de Intumescimento (%GI), como também comportamento mecânico por meio do Ensaio de Compressão.

3.5.3.1 Porosidade (%)

A porosidade das estruturas tridimensionais é importante para avaliar suas propriedades, e vários autores vem ressaltando essa importância bem como diferentes métodos de avaliação. Neste trabalho, tomou-se por base o método realizado por Oliveira (2015), que segue o princípio de Arquimides, em que a porosidade das estruturas tridimensionais é medida pelo deslocamento de líquido. Para a realização do ensaio e obtenção da porosidade, as amostras foram realizadas em quintuplicata e obteve-se uma média ponderada com os resultados obtidos, para isso, primeiramente obteve-se o volume (V_0) e pesagem (W_0) da amostra seca. Em seguida, a amostra foi imersa em etanol ($\rho = 0,789 \text{ g/cm}^3$), por 5 minutos, até ser saturado através da absorção do etanol. Posteriormente, a amostra foi retirada e pesada novamente (W_1). De acordo com a Equação 3:

Equação 3: Porosidade (%)

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{(\rho V_0)} \times 100$$

Onde:

W_0 = Peso das amostras secas

W_1 = Peso das amostras após 5 minutos imersas no etanol

V_0 = Volume das amostras secas

ρ = Densidade do etanol.

3.5.3.2 Grau de Intumescimento (%GI)

A avaliação do Grau de Intumescimento (%GI), também conhecido como Ensaio de absorção, é aplicado com o intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em soluções aquosas de concentração similar ao plasma sanguíneo.

O Grau de Intumescimento foi obtido por meio da imersão das estruturas tridimensionais em solução tampão PBS com pH 7,4. As amostras

foram realizadas em quadruplicata, sendo pesadas em balança analítica e submersas em solução de PBS mantidas à temperatura ambiente durante diferentes períodos de tempo (t) sendo eles: 60, 180, 360, 480 e 540 minutos. Após cada período as amostras intumescidas foram retiradas da solução de PBS e, no intuito de eliminar o excesso da solução, as amostras foram colocadas rapidamente sobre papel filtro e pesadas em balança analítica. A metodologia utilizada para avaliação do GI é descrita por Watrtanunchaiya & Changkowchai 2014, sendo adaptada para períodos de avaliação diferente. O % GI de cada amostra no tempo t , foi calculado, de acordo com a seguinte Equação 4.

Equação 4: Grau de Intumescimento

$$GI (\%) = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100$$

Onde:

W_t : Peso úmido da amostra retirado da solução de PBS no tempo t

W_o : Peso inicial da amostra

3.5.3.3 Resistência à Compressão

Por apresentar estrutura porosa, foi escolhido ensaio mecânico de compressão como forma de verificação de possíveis diferenças entre as diferentes amostras estudadas. Em decorrência da ausência de uma norma específica para o ensaio de compressão em estruturas tridimensionais como os desenvolvidos na pesquisa, optou-se por adaptar da norma ASTM D695 (Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics), utilizada por Fontes (2010), Mendonça et al (2012), Lemos et al (2012), Silva (2015) e Oliveira (2015) e atribuindo valores específicos para diâmetro das amostras e condição do ensaio.

As amostras das estruturas tridimensionais de quitosana-hidroxiapatita (CS-HA20% e CS HA50%) via seca e por via úmida com diferentes tempos de imersão em PBS (1, 3 e 6 horas) foram ensaiadas, obtendo o limite máximo de

resistência e o percentual de deformação máxima. Os testes de compressão pela ação de uma carga axial compressiva foi realizado em uma máquina transversal universal INSTRON 3366, com uma célula de carga de 500N, velocidade de 1,3 mm/min e com as matrizes cilíndricas com dimensões de 20mm de diâmetro e 3 mm de altura. A resistência a compressão foi calculada a partir da divisão entre a tensão máxima e a área original. O ensaio foi realizado em triplicata contendo três amostras de cada composição, e o valor médio do Módulo de Young com seu respectivo desvio foi calculado para 10% de deformação.

De acordo com a Figura 14, é possível observar a região elástica linear, com um módulo (E) até ao seu limite elástico, no ponto em que as arestas do sólido celular deformam plasticamente, ou fraturam. Na região seguinte a estrutura continua a entrar em colapso com uma tensão quase constante (“tensão platô”) até que os lados opostos dos poros colidam. A última região é caracterizada pelo aumento acentuado da tensão (“região de densificação”), onde os poros são completamente colapsados (ASHBY, 2006).

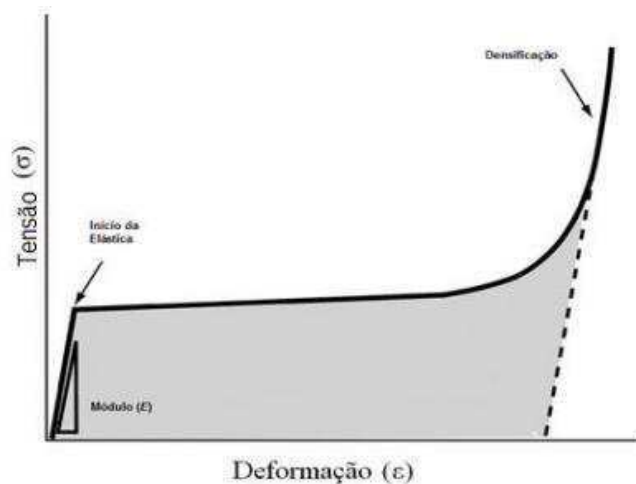


Figura 14: Curva de tensão-deformação de compressão de um sólido celular (Ashby, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa I

Esta etapa de pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a geração da hidroxiapatita *in situ* no processo de fabricação das esferas. Entretanto, com o desenvolver das caracterizações, foi possível observar pela técnica de Difração de Raios X (DRX) que não foi possível obtermos a fase esperada de hidroxiapatita.

4.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Nos difratogramas de raios X das esferas de CS-HA com CS-HA20% e CS-HA50% só foi possível identificar regiões de difração características da quitosana, já na composição CS-HA70% foram observados picos correspondentes a outras fases cristalinas além das bandas correspondentes a CS. Na Figura 15 são mostrados os difratogramas correspondentes as esferas de CS-HA20% e CS-HA70%. O parâmetro principal que determina as propriedades da quitosana, além da massa molecular e grau de desacetilação é a cristalinidade do polímero. (Modrzejewska, 2006). De acordo com Luyen e Huang, 1996 a quitosana pode apresentar três morfismos diferentes: não-cristalina, cristalina hidratada e cristalina anidra, que podem ser identificados por difração de raios X. A forma hidratada de quitosana revela um pico agudo no ângulo $2\theta = 10,4^\circ$ e um pico fraco em $2\theta = 20-22^\circ$. A forma anidro, é caracterizada por um pico principal agudo em $2\theta = 15^\circ$ e um adicional no ângulo $2\theta = 20^\circ$ e, a forma amorfa possui apenas um pico agudo em $2\theta = 20^\circ$. (Modrzejewska, 2006; Ogawa et al, 1992).

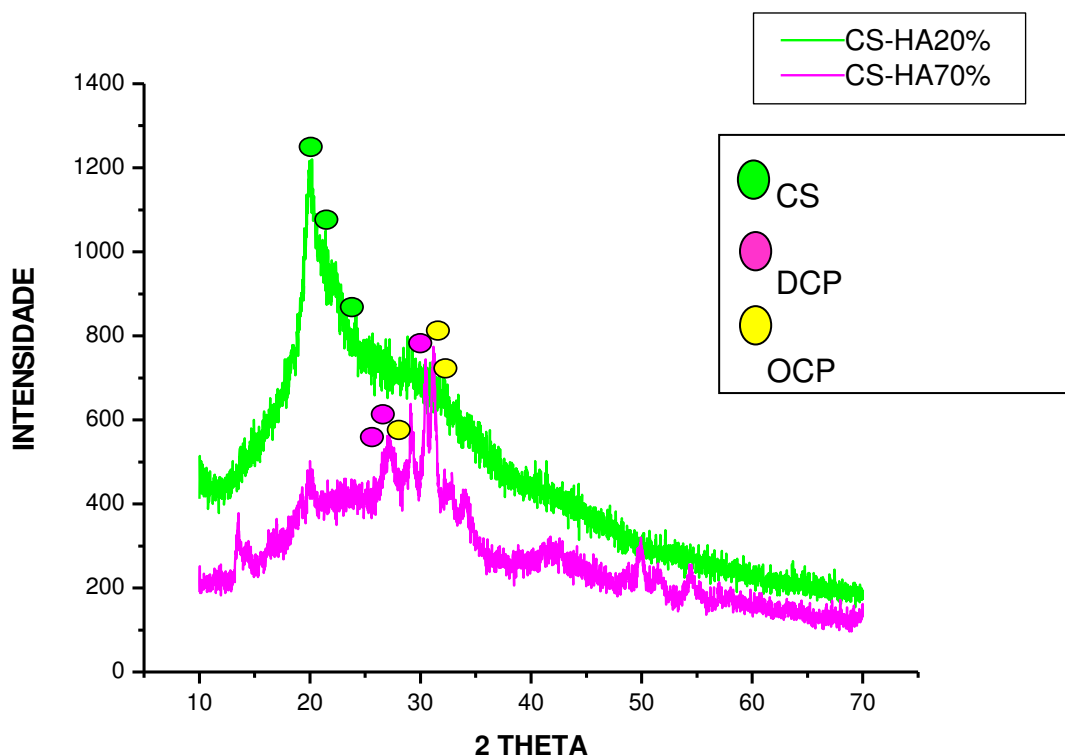


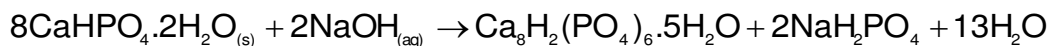
Figura 15:Difratograma de Raio X das Esferas de Quitosana/Hidroxiapatita, CS-HA (20,70%).

No difratograma para a composição CS-HA20%, pode-se observar uma banda larga e assimétrica, com picos sobrepostos em $2\theta = 20.321^\circ, 21.307^\circ$ e 23.920° que corresponde aos principais picos de difração da CS como relatado na JCPDS arquivo N°. 039-1894. A sobreposição dos picos característicos que se fundem em uma banda larga é característica da baixa cristalinidade da CS. Deste modo, a quitosana avaliada no trabalho é predominantemente amorfa.

Para a composição CS-HA70%, observaram-se picos característicos da monetita (DCP) CaHPO_4 em $2\theta = 26.426, 26.586$ e 30.188 (JCPDS 09-0080) entre outros, e do fosfato octacálcico (OCP) $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, conforme JCPDS 026-1056, $2\theta = 26.002, 31.554, 31.703$, entre outros. A ausência dos picos de difração da HA evidenciou que a hidrólise do $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ segundo a Eq. 2 não ocorreu, ao menos em grau apreciável. Por outro lado, a presença

da fase de OCP indica que a transformação que aconteceu foi a indicada pela Eq. 5.

Equação 5: Reação de conversão do Hidrogênio Fosfato de Sódio em Fosfato Octacálcico.



Resultados semelhantes já foram descritos para a hidrólise de monólitos de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carrodegua et al., 2003), quando o pH do meio de hidrólise foi baixo demais para conseguir a transformação em HA segundo a Eq. 2. Além disso, a transformação do DCPD segundo a Eq. 3 não foi total. Parte dele foi desidratado originando CaHPO_4 , que pode ter sido originada devido a um baixo tempo de reticulação tendo em vista que as esferas reticuladas apresentam uma menor quantidade de grupo amina disponível para interagir com as moléculas de água e portanto algumas moléculas de água que seriam vinculadas ao grupo amina vão se ligando aos grupos OH interferindo na formação da fase desejada como também, uma fração menor no conteúdo de fosfato durante a hidrólise.

4.1.2 MICROSCOPIA ÓTICA

As figuras 16 (a), (b), (c) e (d) apresentam as imagens de microscopia ótica das esferas de CS e das esferas de CS-HA, nas respectivas concentrações: CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%, todos os aumentos utilizados foram de 50x.

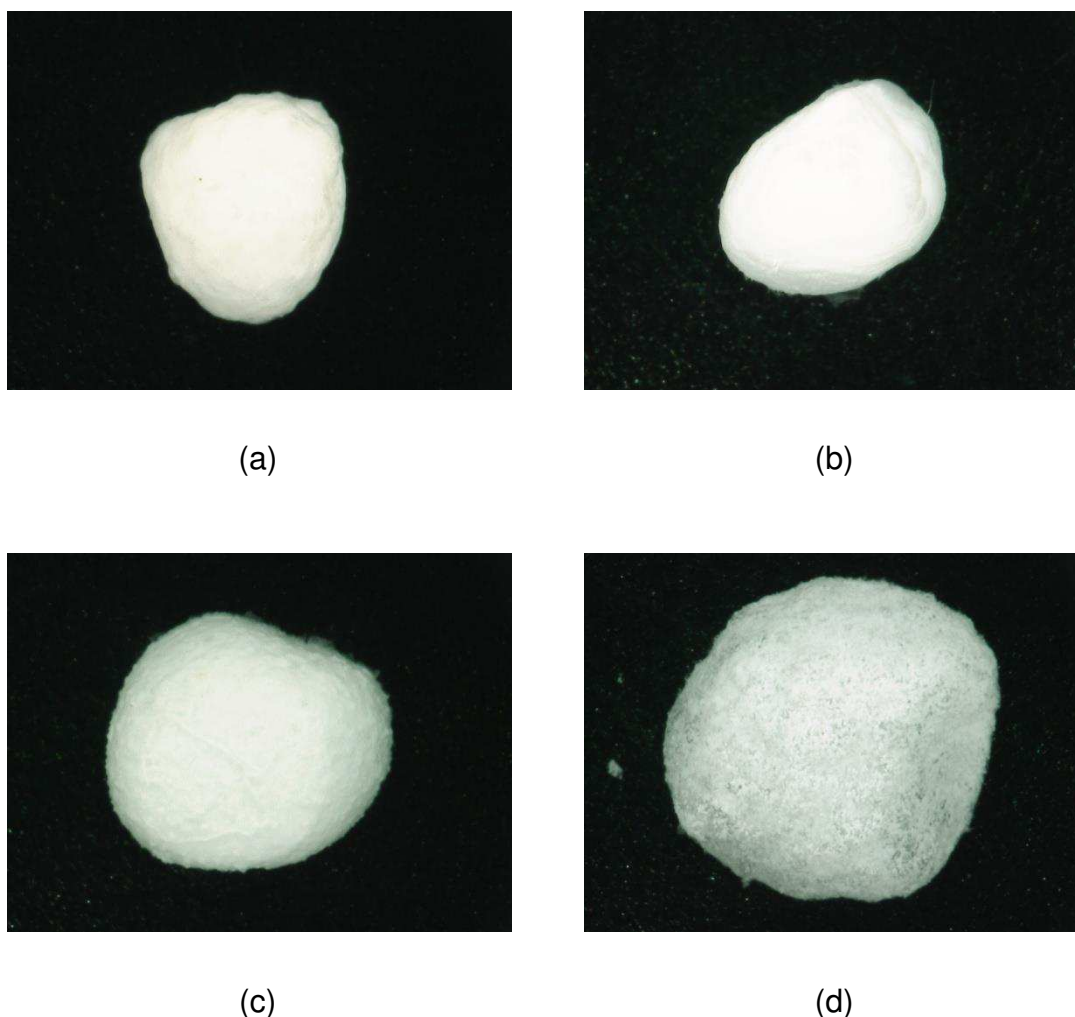


Figura 16: MO das esferas de (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70%.

A morfologia das esferas CS-HA obtidas pelo método de gelificação ionotrópica está apresentada nas Figuras 16 (a), (b), (c) e (d) e foi observada no microscópio ótico, onde a partir desta técnica é possível obter partículas esféricas. A esfericidade depende de alguns fatores como: viscosidade da solução, altura e velocidade do gotejamento e também do diâmetro da agulha, podendo apresentar uma deformidade do tipo cauda, como pode ser observado em algumas esferas da Figura 17 (a) e (b). É possível observar que as esferas com a hidroxiapatita incorporada, apresentam uma menor rugosidade superficial do que as esferas de quitosana e, esta rugosidade diminui conforme ocorre o aumento de percentual de HA.

Verifica-se também que a inclusão da hidroxiapatita ocasionou um leve aumento no diâmetro das partículas. As esferas de CS apresenta partícula com diâmetro médio de $2,4 \pm 0,23$ mm, as composições CS-HA20% e CS-HA50% apresentam partículas com diâmetro médio de $2,6 \pm 0,22$ mm e $2,8 \pm 0,28$ mm, respectivamente. Já as partículas de CS-HA70% apresentaram diâmetro médio de $3,9 \pm 0,37$ mm como pode ser observado na Tabela 4. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes et al. 2008, que produziu esferas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica com diâmetro médio de 2 – 3 mm, utilizando uma agulha hipodérmica ($0,7 \times 25$ mm²), onde as gotículas foram gotejadas em uma solução de NaOH (10%) e em seguida reticuladas com glutaraldeído. A diferença, ou aumento no tamanho médio das esferas para a composição CS-HA70% pode ser atribuída ao tipo de reticulante utilizado nesta pesquisa, que no caso foi o tripolifosfato de sódio. Esse aumento médio de diâmetro entre as esferas de CS e CS-HA se dá devido ao processo de liofilização, onde a água presente na quitosana é evaporada, logo, quanto menor o teor de quitosana na esfera, menos água será liberada, menos contração ocorrerá e maior será o tamanho da partícula. De acordo com Bitencourt 2013, a incorporação de substâncias ativas pode influenciar na estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como, tamanho, peso molecular, interações com a matriz polimérica, dentre outros.



(a)



(b)

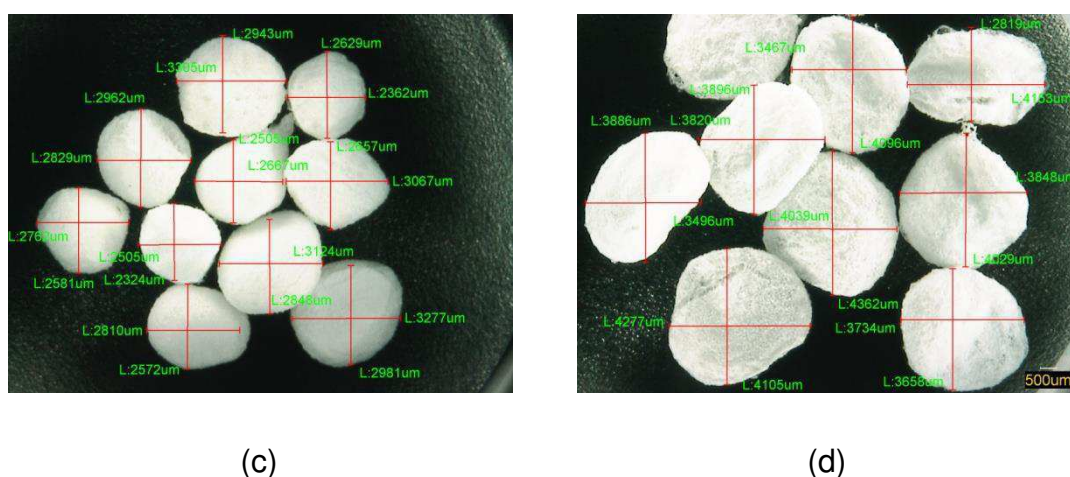


Figura 17: MO Esferas de (a) CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70%.

Tabela 4: Diâmetro médio das esferas observadas por MO.

Composição	Diâmetro médio
CS	2,4 ± 0,23 mm
CS-HA 20%	2,6 ± 0,22mm
CS-HA50%	2,8± 0,28mm
CS-HA70%	3,9± 0,37mm

4.1.3 Difração de Raios X (DRX)

Para esta etapa, foram realizados os estudos de Difração de raios X para as esferas de quitosana (CS) e quitosana-hidroxiapatita em diferentes concentrações (CS-HA20%, CS-HA50% E CS-HA70%) e hidroxiapatita (HA) (Figura 18).

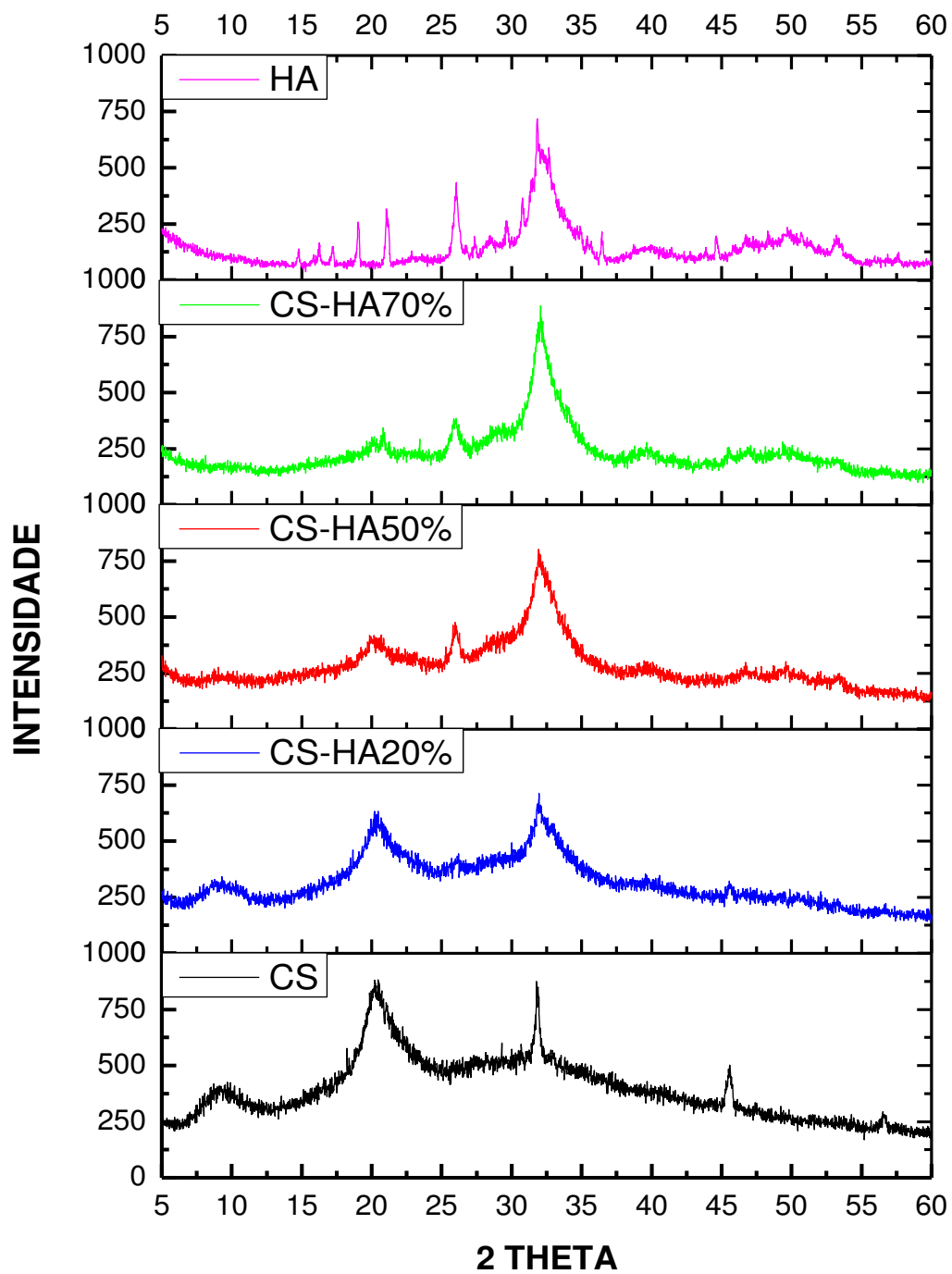


Figura 18: Difratoograma das esferas de (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50%, (d) CS-HA70% e (e) HA.

O difratograma da esfera de quitosana apresenta regiões características de polímeros semicristalinos, sendo uma banda em torno de $2\Theta = 10^\circ$, representando a fase amorfa do material e um pico agudo em $2\Theta = 20^\circ$ que evidencia a parte mais cristalina da quitosana, que pode ser confirmado quando comparado na JCPDS arquivo N°. 039-1894. Segundo Uragami (2006) e Oliveira (2011), a quitosana possui uma região semicristalina devido as fortes interações intra e intermoleculares que decorrem das ligações de pontes de hidrogênio entre os grupos amina, hidroxila, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana, por isso a ausência de picos bem definidos, portanto a quitosana apresentou-se em uma estrutura predominantemente amorfa. Pode-se observar ainda a presença de outros picos em $2\Theta = 31,80^\circ$ e $45,7^\circ$, que podem ser atribuídos a cristalinidade dos sais fosfato de sódio e tripolifosfato de sódio (TPP) que foram utilizados como agente coagulantes e reticulantes, do qual modificaram a organização da estrutura molecular da quitosana. Dados igualmente relatado por Silva (2015) na produção de esferas de quitosana coaguladas com sulfato de sódio, Fidèles (2010) em seu estudo sobre filmes de quitosana reticulados ionicamente com ácido sulfúrico para aplicação como biomaterial, e por Holanda et al (2011), que obteve em sua pesquisa, membranas de quitosana contendo TPP.

A análise de DRX para as esferas CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%, apresentam respectivamente um aumento na cristalinidade, atribuído à inserção da hidroxiapatita que é um mineral cristalino. As composições apresentam os picos correspondentes a fase JCPDS arquivo N°. 9-432, evidenciando em todos os difratogramas o pico $2\Theta = 31,8^\circ$ (211) e para as composições CS-HA50% e CS-HA70% o pico $2\Theta = 26^\circ$ (002). Conforme houve o aumento da concentração de hidroxiapatita, observa-se a permanência das bandas entre $2\Theta = 10^\circ$ a $2\Theta = 20^\circ$, correspondente a fase de quitosana, porém ocorrendo um alargamento típico desta fase, até o desaparecimento destas bandas na composição CS-HA70%. Análogo a isto, os picos referentes a hidroxiapatita vão ficando mais definidos. Pode-se observar ainda, que a amostra CS-HA70% (Figura 18 (d)), apresentou uma maior intensidade dos picos, relacionado provavelmente a maior quantidade de HA presente nas

esferas. Comportamento semelhante foi relatado por Oliveira (2015) na produção de arcabouços de quitosana/hidroxiapatita.

4.1.4 Análise Termogravimétrica (TG)

A Figura 19 ilustra os resultados TG para a quitosana pura CS e as esferas de CS-HA de composições: CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70% e para HA. Para melhor visualização dos eventos térmicos, foi analisada também a curva derivada termogravimétrica DTG.

A partir da análise dos termogramas, observa-se que a primeira etapa de perda de massa que ocorreu entre 30° a 170°C nas amostras é característica à perda de água e também de matéria volátil, pois a quitosana apresenta ao longo de sua cadeia grupos amino (-NH₂) na posição C-2, grupos hidroxila primários (-OH) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico. (Santos, 2004). Subsequente, o segundo intervalo de perda que ocorre entre 210° a 450°C é caracterizado por um processo complexo em que ocorre a desidratação dos anéis sacarídeos, decomposição e despolimerização das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana. Finalmente a terceira etapa, está relacionada à decomposição oxidativa dos resíduos de quitosana. (Moré, 2008; Fídeles, 2014; Nascimento, 2014).

As decomposições térmicas dos compósitos das esferas estão evidenciadas na Tabela 5.

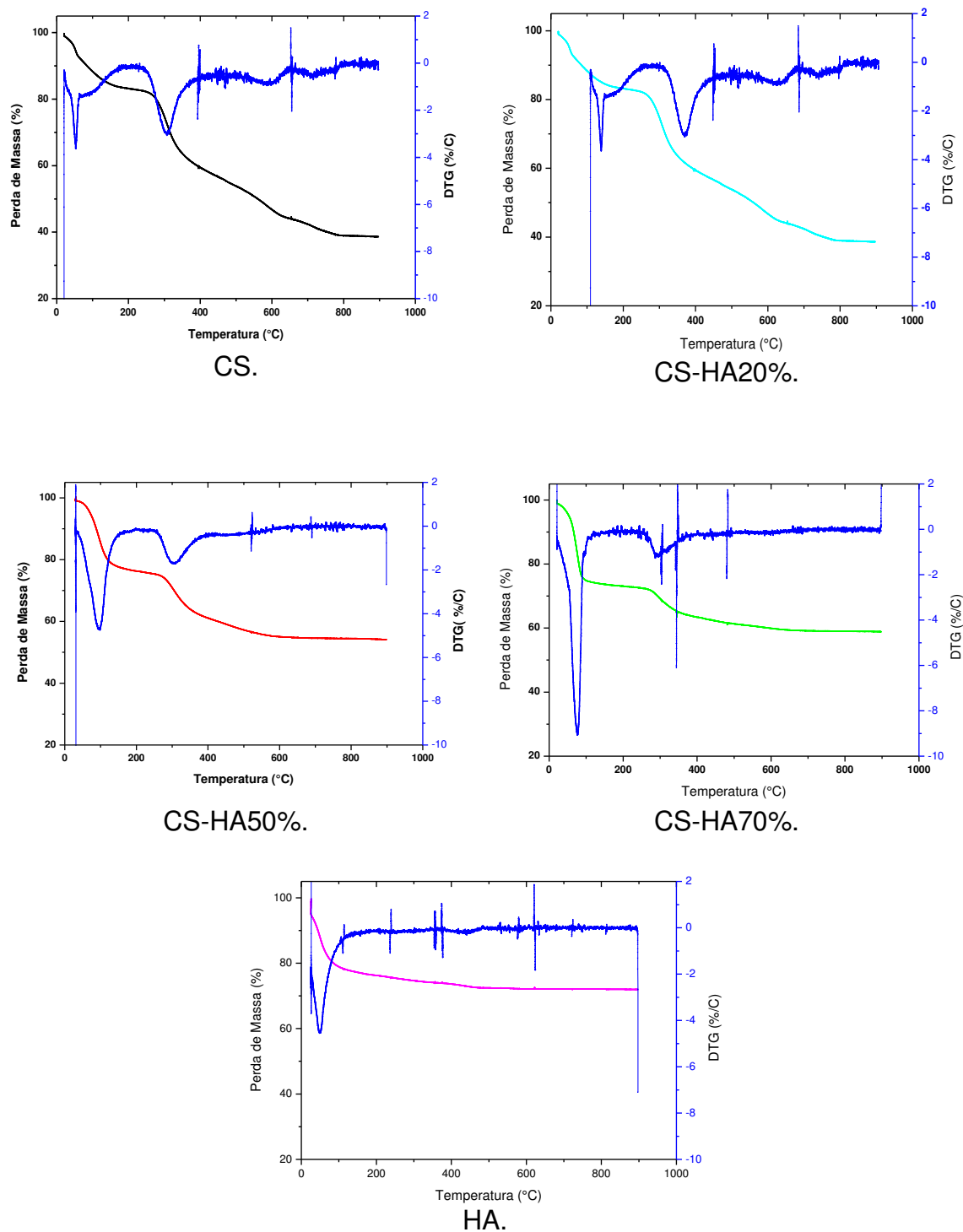


Figura 19: Curvas TG e DTG para CS, CS-HA 20%, CS-HA 50%, CS-HA 70% e HA.

Tabela 5: Eventos térmicos para as esferas de quitosana pura e quitosana/hidroxiapatita (CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70%).

Amostras	Etapas de Decomposição					
	1ª Etapa		2ª Etapa		3ª Etapa	
	T(°C)	ΔT	T(°C)	T(°C)	T(°C)	
CS	75	30 -170	267	210-450	567	500- 750
CS-HA20%	53	31- 208	308	229-462	592	515-768
CS-HA50%	95	39-204	308	258-427	_____	_____
CS-HA70%	75	29-179	293	255-488	_____	_____
HA	50	30-200	_____	_____	_____	_____

A partir dos termogramas obtidos, Figura 19, foi observado que através da variação da composição das amostras, as curvas térmicas diferenciais termogravimétricas, foram deslocadas a diferentes temperaturas, de modo que tanto as curvas de decomposição máxima de temperatura como a DTG mostraram temperaturas diferentes para cada perda (Tabela 6) o que é indicativo da existência de integração entre a quitosana e a fase inorgânica presente do compósito, gerando assim uma ordenação na cadeia polimérica e estabilização do composto devido ao aumento da cristalinidade atribuído a inserção da hidroxiapatita. Podemos observar que para a perda de massa na primeira etapa para o compósito CS-HA50% ocorreu uma diferença na temperatura de perda, quando comparado aos demais, e este comportamento pode ser esperado, pois as esferas com essa concentração de HA tiveram uma menor capacidade de retenção de água do que a CS, isso ocorre devido alguns grupos aminos, que funcionavam como regiões de absorção de água e agora estão protonados, como também as fases cristalinas impede essa absorção de água, além de que as ligações criadas na reticulação aumentam a energia necessária para decompor a macromolécula. As esferas de CS-HA70% apresentam um perfil semelhante a composição HA, tendo em vista uma menor inserção da fase orgânica e um aumento no percentual da fase inorgânica. E outro fator associados a essas mudanças na temperatura está ligado que a reticulação de modo que esta reação de reticulação ocorre de maneira heterogênea e as distribuições de ligações transversais ao longo da cadeia são aleatórias, resultando em diferenças no grau de reticulação e

consequentemente ao longo da temperatura. Estes fatores podem explicar por que à medida que o conteúdo de quitosana diminuiu os compósitos tornaram-se mais estável termicamente e a decomposição de quitosana foi deslocada para temperaturas mais elevadas. Observa-se também que, não houve perda de massa após 620°C, indicando, assim, que todas as macromoléculas orgânicas foram decompostas abaixo desta temperatura. (Murugan et. al, 2004; Moré et. al, 2008 ; Davidenko et. al ,2010).

A partir da soma da perda de peso da segunda e terceira fases correspondentes à decomposição própria de CS, considerando-se o resíduo obtido em 580 ° C de HA e a adição de ambas as fases como 100% de toda a fase orgânica e inorgânica presente, pode ser determinada a fase resultante de cada um dos sistemas finais preparados ou as composições percentuais, e a razão final de compósitos CS-HA. Este resultado demonstra a eficácia do método utilizado neste estudo (Tabela 5).

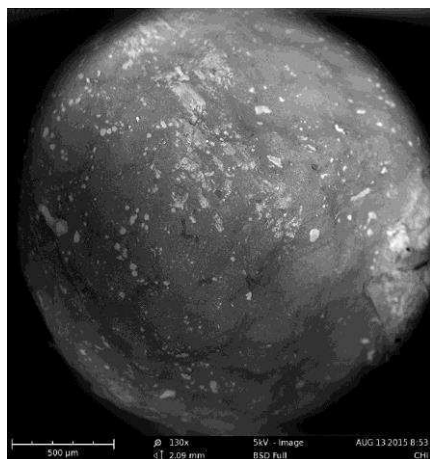
Tabela 6: Resultados da perda de peso

	CS	Resíduo a 580°C	
	(%)		
CS-HA (teórico)		CS-HA (Final)	
80/20	15,12	62,25	19,55/80,45
50/50	40,16	45	47,15/52,85
30/70	25,18	10,89	69,80/30,20

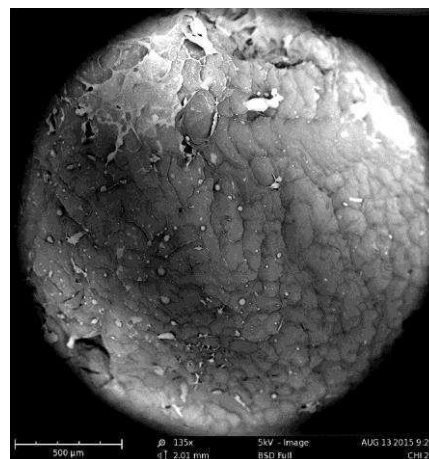
Subsequente, observa-se que houve proporcionalidade dos resíduos (componente inorgânicos do composto) com o aumento do conteúdo de HA (Tabela 6), ou seja, quanto maior a incorporação de HA nas esferas, maior o teor de resíduos. Este comportamento também foi encontrado por Murugan et al. (2004) e Moré et al. (2008), que obtiveram uma perda total de peso proporcional à concentração de CS incorporadas nos compósitos preparados.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS).

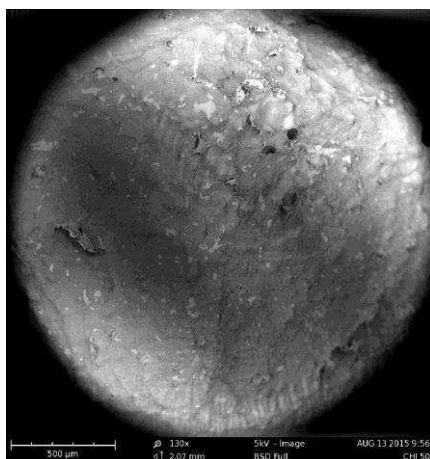
As micrografias MEV das esferas de quitosana CS e dos compósitos CS-HA estão apresentados na Figura 20 para as respectivas concentrações: CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%.



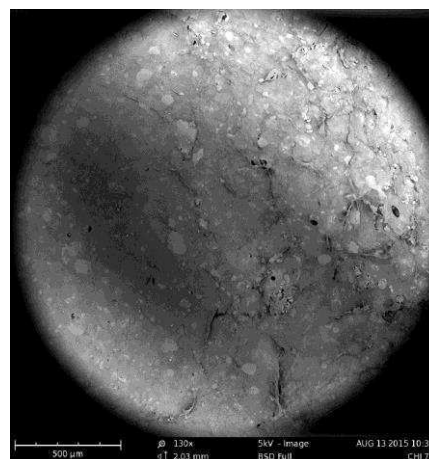
CS



CS-HA20%



CS-HA50%

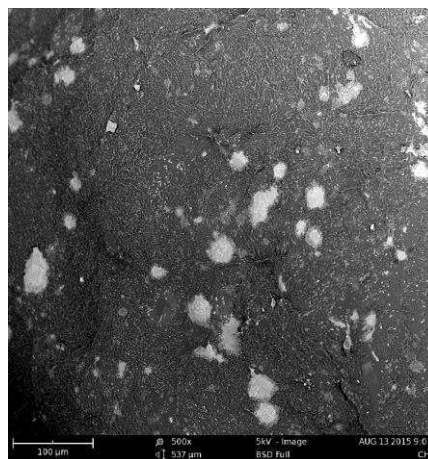


CS-HA70%

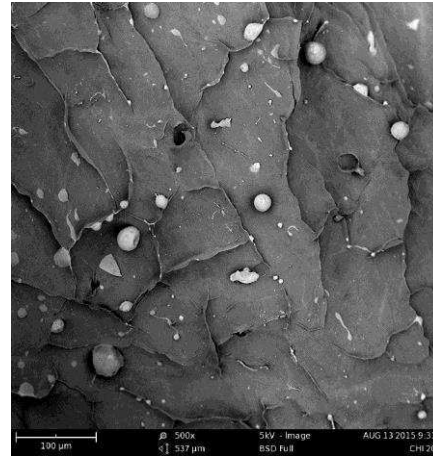
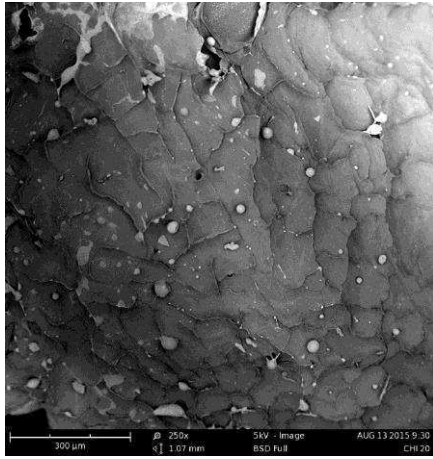
Figura 20: MEV das esferas CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%. Todos os aumentos foram de 130X.

Analisando os resultados observou-se que o aumento do teor de HA provocou uma alteração na morfologia das esferas, deixando-as menos irregular com formato esférico, mais densificada e com aumento de rugosidade na superfície, corroborando com os resultados obtidos por Microscopia Ótica. Resultados superficiais semelhantes foram obtidos por Fidéles (2014), em esferas de quitosana obtidas pelo processo de gelificação ionotrópica, onde também foi possível observar uma superfície rugosa que provavelmente poderá favorecer uma futura adesão e proliferação celular, pois a arquitetura, composição química e topografia de uma estrutura tridimensional influenciam diretamente o processo adesão e proliferação celular. Nas micrografias dos compósitos CS-HA50% e CS-HA70% pode-se observar que não houve separação de cristais de AP, o que sugere que eles foram incorporados na quitosana.

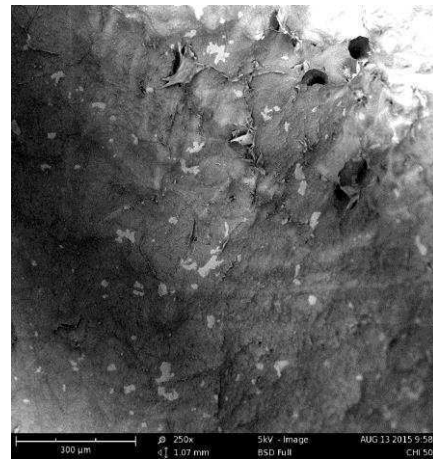
As micrografias MEV dá área central das esferas CS e CS-HA com aumento de 250X e 500X estão apresentados nas Figuras 22 (a), (b), (c) e (d) para as respectivas concentrações: CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%.



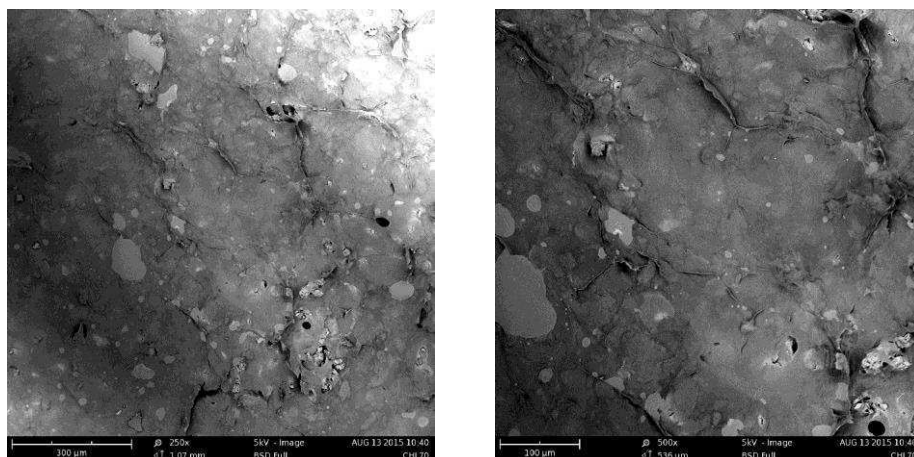
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 21: MEV das esferas (a)CS, (b) CS-HA20%, (c) CS-HA50% e (d) CS-HA70%.

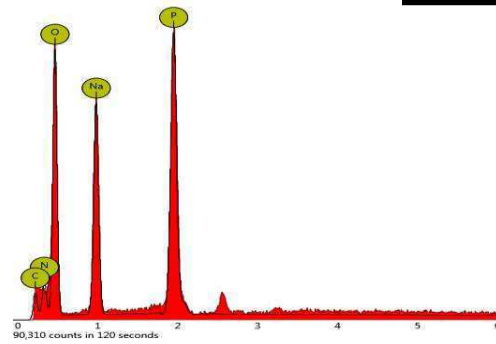
As micrografias revelam uma arquitetura menos rugosa à medida que se tem a inserção da hidroxiapatita, o que é observado entre as Figuras 21 (a) e (b), como também a presença de partículas dispersas no seio da fase polimérica, atribuídas à fase do fosfato de cálcio, que pode ser confirmado pela análise de EDS, apresentada na Figura 23 (b) pela presença dos elementos cálcio e fósforo, confirmando assim a existência da hidroxiapatita dispersa na matriz polimérica. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2015) onde foi observada a presença de pontos brancos em meio fase de quitosana.

Analisando as micrografias representadas pela Figura 21 (c) e (d), verifica-se que com a introdução de uma maior quantidade de fosfato de cálcio, a superfície da esfera se torna mais densa, e com tendência a menor rugosidade como observado na Figura 22 (b), (c) e (d). Este comportamento denso e de superfície irregular é típico de compostos cerâmicos e é consequência da etapa de congelamento, onde os cristais de gelo crescem e solidificam na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro. (Zhang et. al., 2009.)

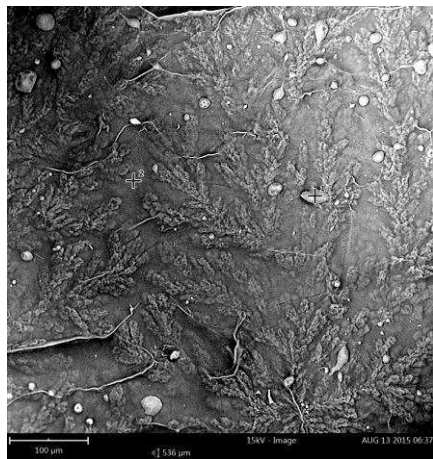
A morfologia da região central e análise química das esferas foram analisadas por MEV acoplado com EDS e estão apresentados na Figura 22 (a) para CS (b) CS-HA20%, (c) para CS-HA50% e (d) para CS-HA70%.



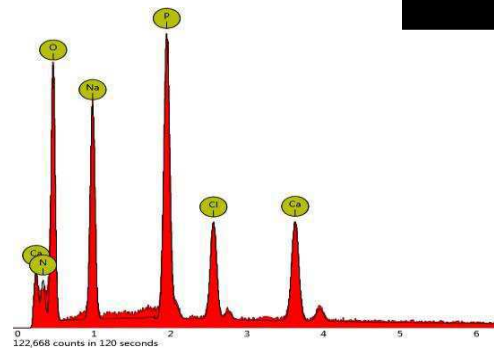
CS



A



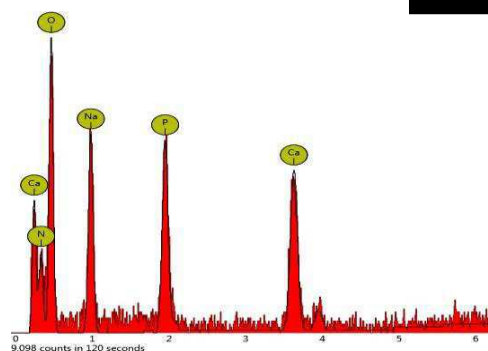
CS-HA20%



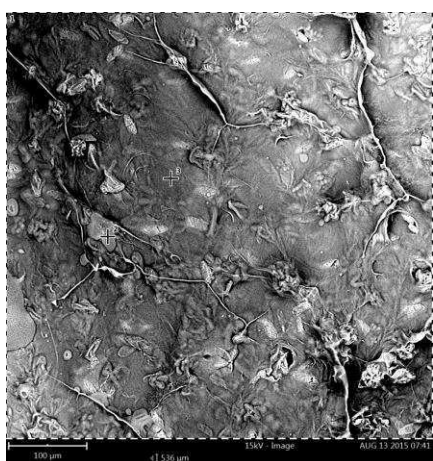
B



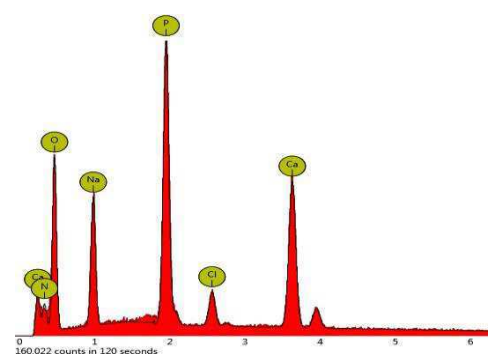
CS-HA50%



C



CS-HA70%



D

Figura 22: MEV- EDS para CS, CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%.

A partir dos resultados da espectroscopia dispersiva de raios X apresentados na Figura 23 (a), (b), (c) e (d) foi observada a presença dos elementos, Cálcio (Ca), Fósforo (P), Nitrogênio (N), próprios dos fosfatos de cálcio, além, do elemento sódio (Na) e também P que são característicos da reticulação com TPP e ajuste de pH com o NaOH. O aparecimento do pico de Cloro (Cl) e Sódio (Na) está provavelmente relacionado aos resíduos da solução de PBS. Fídeles (2014) também encontrou resíduos de Cl e Na, na produção de scaffolds de quitosana/TPP provavelmente advindo de resíduos da solução de PBS, do qual não foi possível constatar alguma influência significativa destes elementos no desenvolvimento da estrutura tridimensional.

Com o aumento da proporção de hidroxiapatita no composto pode-se observar que houve um aumento no teor de cálcio.

A partir da Figura 22 (b) pode se observar uma modificação na superfície da esfera com o surgimento de cristais em forma de “folhas” na matriz do polímero e, com o aumento no teor de HA estes cristais tornam-se opacos. Com um aumento de 1000x e 8000x (Figura 23 (a) e (b)) para a composição CS-HA70% pode-se observar uma típica estrutura típica da fase inorgânica esperada, que se apresenta em forma de agulha, corroborando com os resultados do DRX, evidenciando assim a formação da hidroxiapatita.

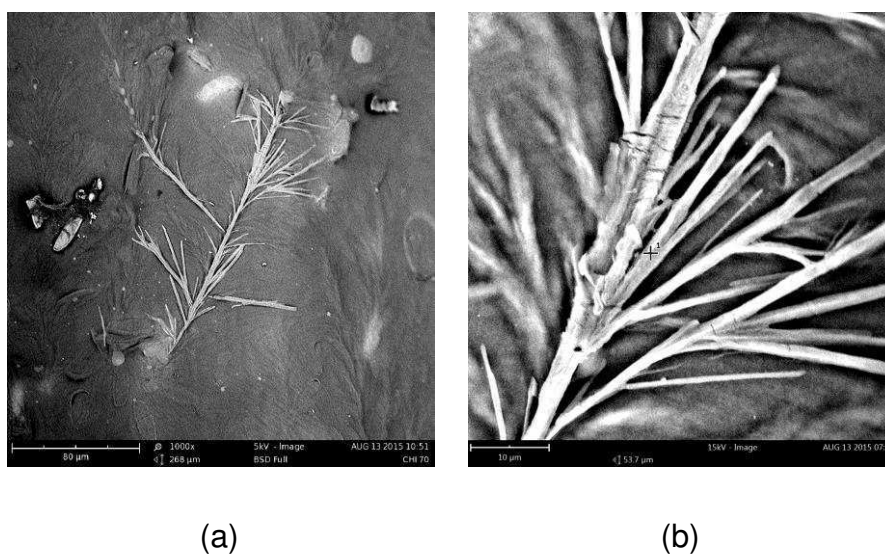


Figura 23: MEV CS-HA70% (a) 1000x (b) 8000x

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

Neste estudo as esferas de quitosana (CS), quitosana/hidroxiapatita (CS-HA) com três tipos de concentrações de hidroxiapatita CS-HA20%, CS-HA50%,CS-HA70%, e apenas hidroxiapatita foram analisadas por FTIR para observar a possível interação entre os grupos funcionais das moléculas que

compõem essas substâncias. A Figura 24 apresenta o espectro de FTIR das composições.

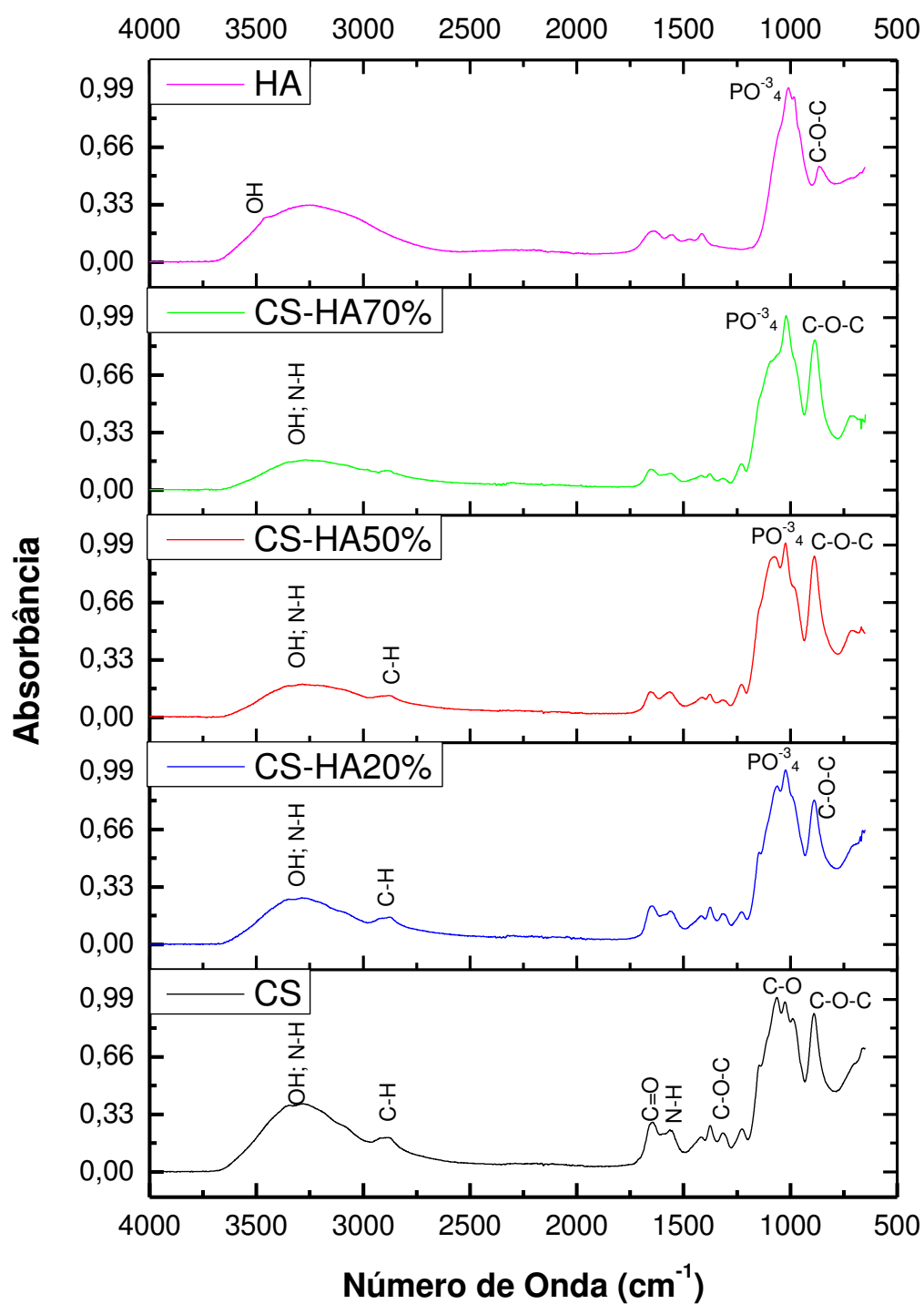


Figura 24: Espectros de FTIR CS-HA (20, 50, 70%).

No espectro de infravermelho obtido das esferas, observam-se absorções típicas da quitosana. A banda de absorção 3340 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação - NH. A banda 3280 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo - OH, provocado pela formação de pontes de hidrogênio, a presença do pico em 1630 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento do grupo amida I (O=C-NHR) mostrando que a quitosana não é 100% desacetilada (Nascimento, 2014). A razão entre essas bandas de absorção é usada por muitos autores para indicar o grau de desacetilação (GD) do biopolímero quitosana (Brugnerotto et al., 2001).

As bandas 2930 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramentos dos grupos C-H assimétrico (CH_2) e simétrico (CH_3), respectivamente. E a banda 1535 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento da ligação - NH da amina protonada (NH_3^+). As bandas em 1400 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} são características da vibração de deformação angular simétrica do grupo - CH_3 pertencente ao grupo acetamido. A banda em 1240 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento do grupo - C-O-H. Bandas de absorção na região de 1150 cm^{-1} correspondem a vibração de estiramento dos grupos -C-O-C- simétrico e assimétrico. (Nascimento, 2014; Redepenning et al, 2003; Joschek et al, 2000).

As bandas em 1047 cm^{-1} e em 1090 cm^{-1} correspondem à vibração de deformação do grupo PO_4^{3-} , enquanto o em 903 cm^{-1} corresponde ao modo de estiramento do grupo PO_4^{3-} (Furtado, Fook, Fook, 2009; Leal, 2012; Ugarte, 2005; Volkmer, 2007). As bandas em torno de 856 e entre $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos à incorporação de grupos CO_3^{2-} na apatita, proveniente do ar, visto que as amostras foram produzidas em atmosfera aberta. (Redepenning et al, 2003; Joschek et al, 2000). A presença de carbonato no composto CS-HA é vantajosa porque aumenta a bioatividade da apatita, como também a dissolução da HA no meio o que pode contribuir para o aumento osteocondução. (MORÉ et al, 2008). As bandas entre $1550\text{ - }1700\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a uma possível sobreposição do grupo OH- da hidroxiapatita e dos grupos da amida I e amida II da quitosana (JIANG, Li, Wang et al., 2008). Volkmer & Santos (2007) em sua pesquisa relatam as bandas características da hidroxiapatita como sendo,

além dos picos citados que se relacionam com as ligações PO_4^{3-} , a presença de outro pico em torno de 3570 cm^{-1} que corresponde às vibrações de estiramento dos íons OH^- da hidroxila, como se pode observar no espectro (Figura 22) estas vibrações estão encobertas pela banda larga 3340 cm^{-1} das moléculas de H_2O que podem estar livres ou adsorvidas, além disso, também existe uma banda de H_2O em 1645 cm^{-1} . (Donadel et al, 2005; Fernandes et al, 2000; Finisie et al, 2001).

Em relação à reticulação dos compósitos com a quitosana, podemos observar que as bandas fracas em 1237 e 1207 cm^{-1} , podem ser atribuídas ao alongamento $\text{P}=\text{O}$, a vibração da banda em 893 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação $\text{P}-\text{O}-\text{P}$. A presença destas bandas indica a presença de grupos de fosfato nas partículas. A banda a 1064 cm^{-1} atribuída ao alongamento de ligações $\text{C}-\text{O}$ de álcoois primários apresentou diferenças significativas na comparação com os espectros de FTIR do quitosana. A banda a 1591 cm^{-1} que aparece no espectro de quitosana pura, atribuída à deformação $\text{N}-\text{H}$ dos grupos amina, vai perdendo a intensidade nos espectros dos compósitos, surgindo uma nova banda localizada em 1549 cm^{-1} , relativo ao grupo amina protonada (NH^{3+}). A partir destes resultados, pode-se afirmar que a reticulação foi eficaz através de interações iônicas entre os grupos fosfatos carregados negativamente ($\text{P}-\text{O}^-$) das cadeias do TPP e os grupos amino protonados (NH^{3+}) das cadeias de quitosana (Shu e Zu, 2002; Martins et al., 2012; Pati et al., 2012).

A marca característica da HA é um pico bem definido em torno de 630 cm^{-1} . Este pico é um triplete que relaciona com as ligações PO_4^{3-} em 601 e 570 cm^{-1} com contribuição da ligação- OH do grupo apatita em 630 cm^{-1} , que é melhor evidenciado no espectro para a composição CS-HA70%. Conforme se tem o aumento no teor de HA, pode-se, ainda, observar que o espectro apresenta estreitamento das bandas, evidenciando a cristalinidade da hidroxiapatita e corroborando com os resultados refletidos no DRX.

Não ocorreu o surgimento de bandas em número de ondas diferentes das bandas observadas nos materiais analisados individualmente, sendo

observado somente o deslocamento de bandas já existentes nos espectros da quitosana e aqueles comuns para fosfatos de cálcio. Tal comportamento ocorre devido a interações de natureza eletrostática entre os íons Ca^{2+} do fosfato de cálcio com os pares de elétrons não ligantes dos grupos N–H e C=O presentes na quitosana. Há também a possibilidade de interações entre os grupos protonados NH_3^+ , presentes na quitosana com os ânions fosfatos PO_4^{3-} e carbonatos CO_3^{2-} . (Martins et al, 2011.)

Comparando os espectros em relação ao teor de quitosana/hidroxiapatita, observa-se certa semelhança entre os espectros, contudo podemos destacar algumas diferenças, que são atribuídas as diferentes concentrações de HA nas esferas. As evidências maiores aparecem entre 3000 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , onde absorção do grupo - OH torna-se mais fraca com o aumento do teor de hidroxiapatita (Fook, 2012). Isso indica a existência de fortes interações entre os grupos fosfatos e a quitosana por pontes de hidrogênio. Os grupos funcionais reativos do biopolímero agem como um sítio ativo para ligação com HA, através de ligação ou quelação com íons de cargas oposta, cálcio e fosfato (Li et. al, 2007). No caso da quitosana, o seu grupo amino ($-\text{NH}_2$) que se transforma em NH_3^+ , sendo positivamente carregado, forma um complexo com o grupo fosfato (PO_4^{3-}) da HA. (Verma et. al., 2008). Como também vai se evidenciando o pico em torno de 1000cm^{-1} característico do estiramento vibracional de C-O da quitosana (Souza et al, 2010), e ocorre o aumento do pico em torno de 800cm^{-1} , que provavelmente pode ser atribuído a hidroxiapatita. Deste modo, pode-se observar que com o aumento no teor de HA nas esferas, as bandas características da quitosana diminuem a intensidade e os picos característicos da hidroxiapatita vão sendo evidenciados e estreitados, o que se pode melhor observar para a composição CS-HA70%.

4.2 Etapa II

Nesta etapa da pesquisa, optou-se por apresentar apenas os compósitos de quitosana-hidroxiapatita, CS-HA20% e CS-HA50%, tendo em vista uma

melhor otimização dos resultados dessas estruturas e similaridade entre os resultados do compósitos CS-HA50% e CS-HA70%.

4.2.1 Porosidade

A Figura 25, apresentam as porosidades obtidas para as estruturas tridimensionais de quitosana/hidroxiapatita para os compósitos de 20 e 50%, pelo método utilizado por Oliveira (2015), Equação 3.

Pode-se observar que a porosidade volumétrica das estruturas foi entre 40 e 55%. Resultados semelhantes foram obtidos por Kucharsha et al 2010 e Silva 2015, que obtiveram estruturas tridimensionais pelo método de agregação de partículas e utilizaram o método de “submersão em líquidos” para medir porosidade que resultou em 40% e Fídeles, 2014 utilizando a mesma metodologia obteve porosidade média de 55%.

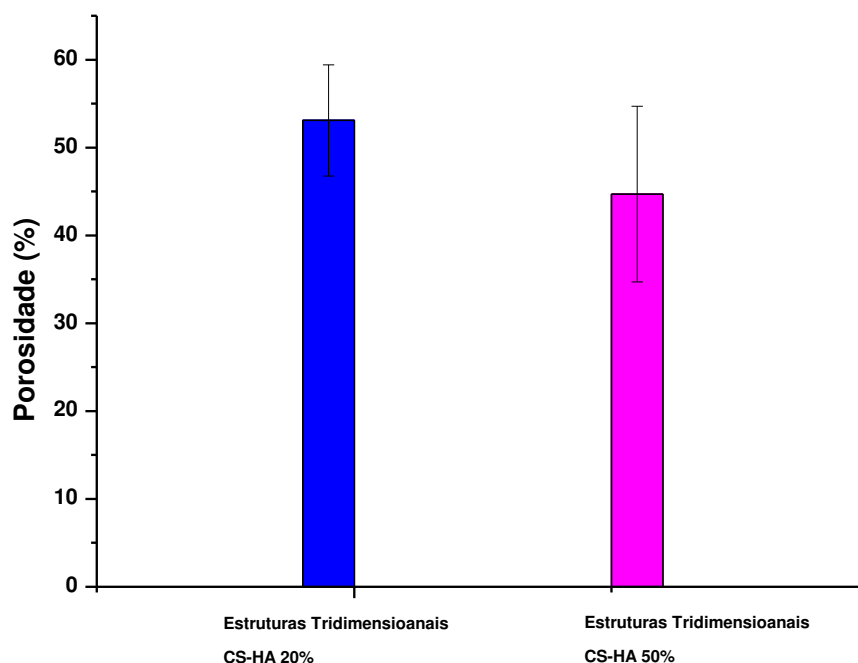


Figura 25: Porosidade das Estruturas Tridimensionais de Quitosana/Hidroxiapatita CS-HA20% e CS-HA50%.

É evidente que com o aumento da quantidade de cerâmico nas estruturas, a porosidade diminuiu. A explicação para esta diminuição poderá estar associada a fatores que dizem respeito ao congelamento e liofilização, uma vez que os poros são criados pelo congelamento da água presente em cada esfera, ocorrendo difusão de moléculas de água e agregação de cristais que depois de sublimados na liofilização deixam o espaço vazio, corroborando com os resultados obtidos na seção anterior por microscopia ótica, no qual, com o aumento de concentração da hidroxiapatita, o tamanho médio das esferas foi maior, fazendo com que menos espaços vazios fossem formados. Segundo Oliveira (2015) e, com a inclusão de maior quantidade de cerâmico e com a possível interação deste com o polímero é possível que a água tenha menor mobilidade para formar cristais maiores e, assim gerando uma menor porosidade.

Em estruturas tridimensionais a porosidade aumenta a área de superfície, aumenta o espaço para fixação das células e favorece a ligação química entre a estrutura tridimensional e o tecido adjacente. Do ponto de vista estrutural, um alto grau de porosidade é responsável pela regulação da bioatividade, pois influencia diretamente a permeabilidade estrutural, responsável por controlar a velocidade inicial da regeneração tecidual (Dorozhkin, 2010). Zhang & Zhang (2001), consideram que a porosidade mais adequada para essas estruturas deve estar em valores acima de 70%, sendo esta porcentagem ideal para que ocorra a diferenciação celular e que possa ser permitida a proliferação das células. Nesta pesquisa, obtiveram-se resultados inferiores ao que se reporta na literatura, que pode ser atribuído à metodologia de obtenção das estruturas tridimensionais, deste modo é interessante fazer reajustes na metodologia para que se possa alcançar valores semelhantes ou maiores que 70% de porosidade.

4.2.2 Grau de Intumescimento

A hidrofiliabilidade da superfície de uma estrutura tridimensional é um fator importante para a biocompatibilidade do material com a Matriz Extra Celular (MEC) adjacente. A hidrofiliabilidade da estrutura facilita a penetração dos nutrientes para seu interior, influencia a adesão, divisão, proliferação celular (LI et al., 2005). O intumescimento de um polímero é dependente do grau de interação entre as moléculas do polímero e do solvente (Aouada et al., 2009).

A Figura 26 apresenta os resultados do Grau de Intumescimento (%GI) para as estruturas tridimensionais de quitosana/hidroxiapatita (CS-HA20% e CS-HA50%).

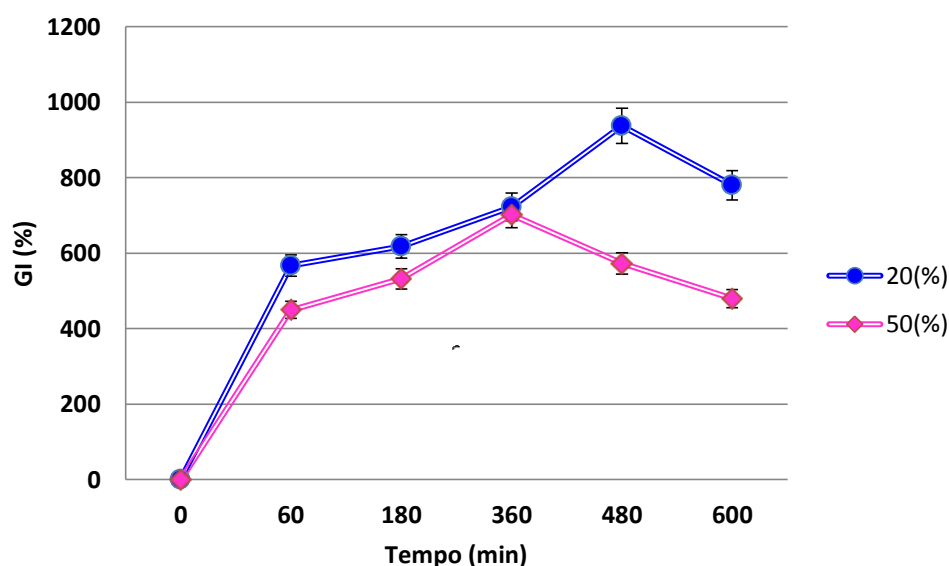


Figura 26: Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos compostos CS-HA20% e CS-HA50%.

Mediante as curvas obtidas, nota-se que todas as composições apresentam alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que, absorvem mais do que seu próprio peso apresentando valores de grau de intumescimento maiores que 100% (Oliveira, 2015). Após 360 minutos para CS-HA20% e 480 minutos para CS-HA50%, ocorreu uma perda gradativa do peso, ocasionada provavelmente pelo início da dissolução. Além disso, este fato pode estar associado à presença de carbonato na fase apatítica. Esta perda de peso está relacionada principalmente, pela dissolução de gelatina, ou seja, a degradação das estruturas inicia-se devido à dissolução da gelatina. Tal comportamento também foi relatado por Silva, 2015 que obteve arcabouços de quitosana/curcumina pelo método de agregação de partículas utilizando a gelatina.

Na quitosana, há predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade, tornando, assim, favorável o rearranjo das moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associadas aos grupos acetamido caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água (Singini & Campana, 2001). Essa habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis, pois ela permite a

absorção de fluídos corpóreos e transferência de nutrientes metabólicos. (Thein-Han & Kitiyanant, 2007).

Em relação ao intumescimento dos compósitos pode-se observar que à medida que se aumenta a quantidade de HA, ocorre uma diminuição no grau de intumescimento, que pode ser explicado a uma menor absorção de água devido à cristalinidade do material cerâmico, que provoca um menor espaçamento entre as cadeias da quitosana, como também pode ser atribuído a morfologia e porosidade das estruturas tridimensionais discutidas na seção anterior, tendo em vista que, quanto menor a porosidade e maior o tamanho das esferas, menor a capacidade de absorção de PBS.

4.2.3 Resistência à Compressão

4.2.3.1 Resistência à Compressão a seco

As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material quando sujeito a esforços mecânicos e correspondem às propriedades que, num determinado material indicam a sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços que lhe são aplicados, sem romper ou sem que se verifiquem deformações incontroláveis. Estas caracterizações mecânicas estão entre os mais importantes testes físicos a serem realizados em materiais que desejam ser implantados, como por exemplo, na aplicação de estruturas tridimensionais para regeneração óssea, tendo em vista a necessidade da estabilidade estrutural para resistir à manipulação, adesão e proliferação celular.

A Figura 28 apresenta o gráfico tensão x deformação das estruturas tridimensionais de quitosana/hidroxiapatita das amostras CS-HA20% e CS-HA50%, ensaios a seco.

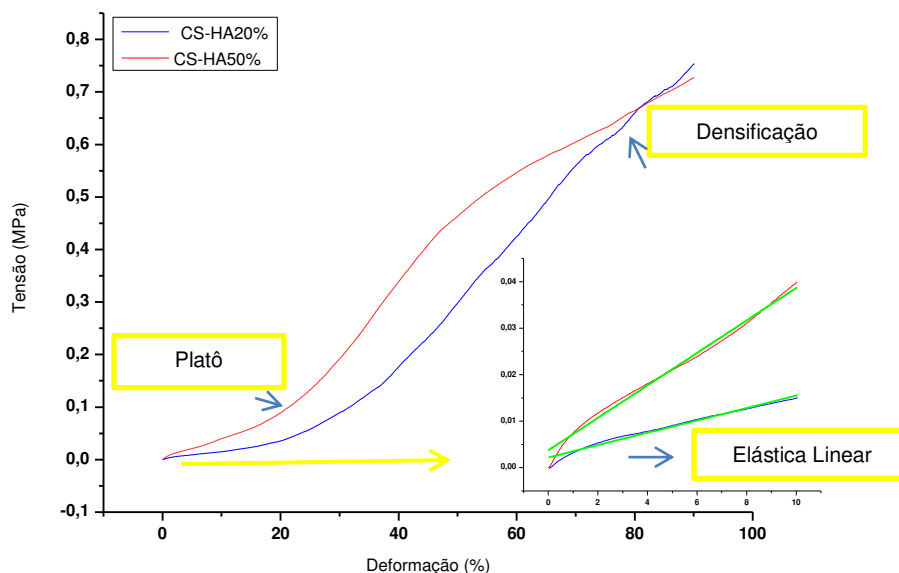


Figura 27: Gráfico Tensão x Deformação das estruturas tridimensionais quitosana/hidroxiapatita, deformação a 10%.

A partir do gráfico de tensão x deformação das amostras de quitosana/hidroxiapatita a seco, pode-se observar que, a quantidade de HA incorporada na matriz polimérica tem influência na deformação do material principalmente na zona elástica, como pode ser observado melhor, na ampliação da deformação até 10%, onde o compósito CS-HA20% suportou um maior nível de carga, quando comparado ao compósito CS-HA50%. Isso pode ser atribuído à fase cerâmica que quando está associada a uma matriz polimérica restringe o movimento da matriz próximo a cada partícula e conseqüentemente também reduz a deformação dos compósitos. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2015) na avaliação das propriedades mecânicas dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita, onde o comportamento da curva mostrou que o caráter elastomérico é mais evidente quando se tem um teor de polímero mais elevado. Na tabela 6 são relacionados os dados mecânicos que caracterizam as amostras CS-HA20% e CS-HA50%, tais como

tensão máxima, taxa de deformação e módulo de elasticidade. Podemos observar que os valores para os dois compósitos para a tensão e deformação máxima são praticamente iguais. Sabe-se que a quitosana é um polímero semicristalino e os valores de módulo e tensão baixos podem ser atribuídos ao baixo grau de cristalinidade. Tendo em vista que diversos fatores influenciam no comportamento mecânico de estruturas tridimensionais, podemos evidenciar o Grau de Desacetilação (GD) da quitosana, que possui influência em diversas propriedades, incluindo a cristalinidade, degradação e resistência mecânica (Fídeles, 2014). Pode-se ainda ressaltar que, o fato de todas as amostras submetidas ao ensaio permanecerem resistentes e não sofrerem quebra durante o ensaio.

Estruturas tridimensionais para engenharia de tecido, apresentam curvas de tensão x deformação caracterizadas por 3 regimes distintos: (1) uma região elástica linear controlada pela flexão das paredes dos poros, (2) um longo platô na curva devido ao colapso dos poros e (3) uma região caracterizada pelo aumento da tensão sem grande incremento de deformação, conhecida como região de densificação, onde os poros são completamente colapsados, o que provoca um aumento rápido da resistência do material, conforme Figura 14 (Gibson & Ashby, 1997; Fook 2012, Fídeles 2014, Oliveira 2015).

No estágio inicial de compressão para os compósitos CS-HA20% e CS-HA50%, as amostras apresentaram baixa resistência à tensão, onde a identificação da região elástica linear é quase imperceptível, devido à associação da fase cerâmica à matriz polimérica restringindo o movimento e conseqüentemente reduzindo a deformação dos compósitos. Após isto, a partir de 20% de deformação pode ser observado um pequeno platô na curva, ou seja, não há uma grande absorção de energia pelo material, e se inicia a compactação dos poros. Em seguida, há um aumento na tensão que pode ser claramente observado a partir de 50%, que é característico da região de densificação.

Sendo o módulo de elasticidade numericamente igual ao valor do coeficiente angular da reta ajustada aos dados do diagrama tensão-

deformação. A partir da região elástica das curvas tensão x deformação, obtiveram-se os módulos de elasticidade dos compósitos a seco e estão apresentados na Tabela 7.

De acordo com a Tabela 7, pode-se observar que houve um aumento na resistência à compressão das estruturas tridimensionais entre os compósitos CS-HA20% e CS-HA50%, este fato pode ser atribuído à presença de uma maior fase do fosfato na composição, fazendo com que o material possua uma maior rigidez, devido a um maior número de ligações entre quitosana e a hidroxiapatita. Adicionalmente, é de se esperar que o cerâmico devido ao fato de ter um maior módulo de elasticidade se comporte como um reforço da estrutura. Maiores valores de módulo podem ser encontrados quando se tem utilização de agente reticulante durante a formação das esferas. Segundo Martins et al, 2012, o TPP interage com a quitosana através de forças eletrostáticas, os grupos amina protonados da quitosana interage com os íons carregados negativamente sobre o TPP através de interações iônicas criando redes iônicas, ocasionando assim, uma maior resistência a compressão. Silva, 2015 em sua pesquisa comparando estruturas tridimensionais de quitosana sem reticulação da gelatina e com reticulação, observou que a gelatina reticulada ocasionou um aumento da tensão máxima de quase três vezes (de 0,4 Mpa para $\approx 1,2$ Mpa) quando comparado com estruturas tridimensionais sem gelatina reticulada. Os agentes reticulantes permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes, além de bloquear os grupos amino como um agente bifuncional.

Segundo Oliveira (2015) para que fosse possível observar um valor maior de tensão e modulo de elasticidade devido à presença de cerâmico, seria necessário proceder à sinterização do mesmo, para que se estabelecessem ligações entre as moléculas de cerâmicas.

As estruturas tridimensionais devem possuir uma resistência mecânica adequada, *in vitro*, para resistir a pressões hidrostáticas, assim como, *in vivo*, pois o osso está sob tensão contínua. (Salgado et al., 2004) Deste modo, esperava-se que os resultados obtidos fossem semelhantes aos do osso

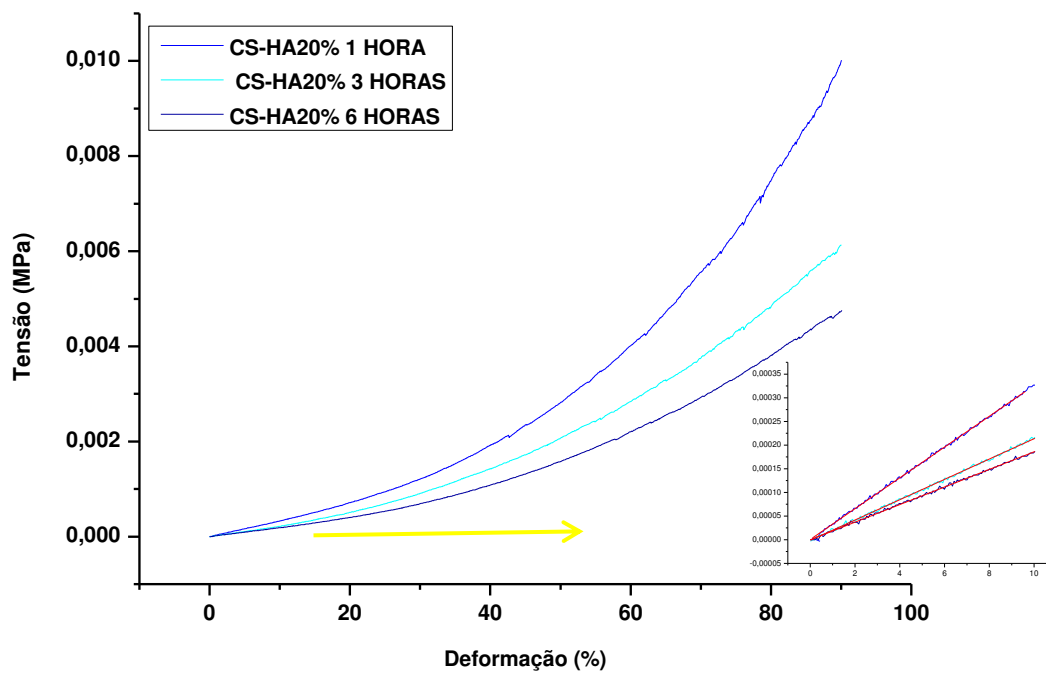
trabecular ou cortical, com sua tensão de compressão variando entre 4 a 12 Mpa e o seu módulo elástico podendo variar entre 0,02 a 0,5 GPa (Fontes, 2010; Gustaldi & Aparecida, 2010). Sendo assim, o comportamento juntamente com as propriedades mecânicas encontradas sugere que as estruturas tridimensionais desenvolvidas serão indicadas para aplicações em engenharia de tecidos, em situações preferencialmente *ex-vivo*, como suportes temporários de células.

Tabela 7: Resultados obtidos a partir dos testes de compressão, amostras a seco.

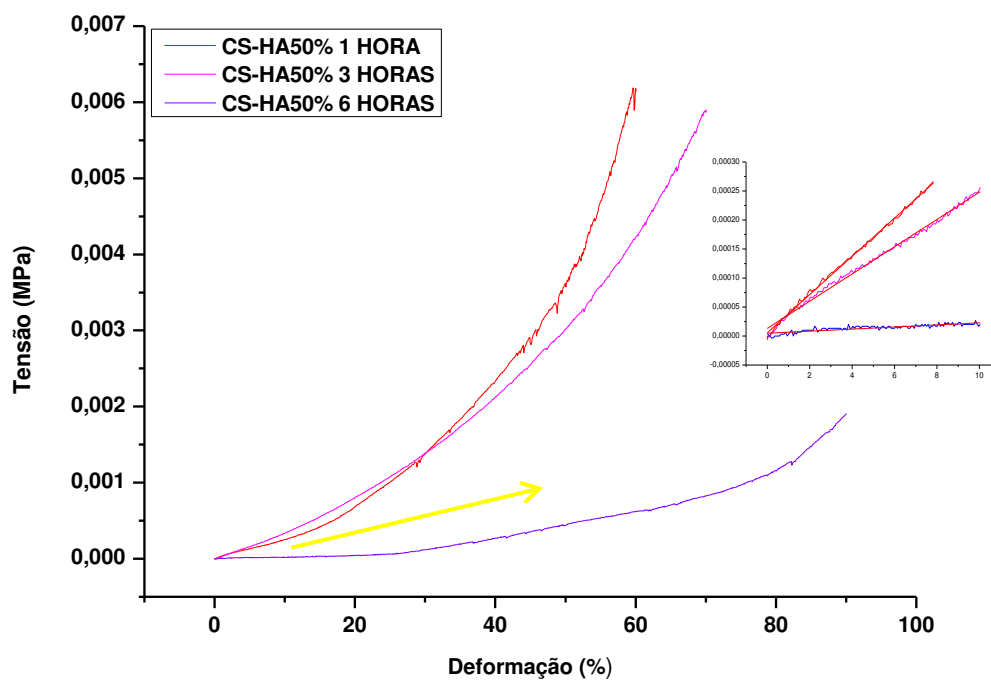
Amostras	Tensão Máxima (Mpa)	Deformação Máxima (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
CS-HA20%	0,75±0,14	90,09±0,09	0,00133
CS-HA50%	0,73±0,11	90,38±0,43	0,00349

4.2.3.2 Resistência à compressão via úmida

As propriedades mecânicas das estruturas tridimensionais dos compósitos CS-HA20% e CS-Ha50%, por via úmida estão representadas na Figura 28, por meio das curvas de tensão x deformação.



(a) Curvas do compósito CS-HA20%



(b) Curvas do compósito CS-HA50%

Figura 28: Curvas tensão x deformação dos compósitos: (a) CS-HA20% e (b) CS-HA50%, deformação a 10%.

A partir da Figura 28, podemos observar que independente da concentração de hidroxiapatita e o tempo imerso no PBS, as análises por compressão geraram uma curva tensão-deformação típicas de um sólido elastomérico celular, tais como, o comportamento de um polímero elastomérico e, a nível biológico, o comportamento de espumas de célula de baixa densidade. Com o aumento da razão de HA presente nas amostras houve uma diminuição da tensão das estruturas tridimensionais, este resultado é provavelmente atribuído às interações entre os grupos protonados NH^{3+} , presentes na quitosana e os ânions dos fosfatos PO_4^{3-} , fazendo com que ocorra um enfraquecimento das ligações intermoleculares e consequentemente diminuição das propriedades mecânicas. Como também a inserção de HA no compósito possibilita um aumento na cristalinidade do material, como foi observado nos resultado obtidos por DRX, ocasionando assim um aumento no E (modulo de elasticidade) e, assim um aumento o Limite de Resistencia à tração (máxima tensão que um material pode suportar ao ser esticado ou puxado antes de falhar ou quebrar) o que torna o material mais frágil.

De acordo com Hoffman et al. 2012, quando um material começa a absorver água, inicialmente as moléculas dos grupos hidrofílicos mais polares hidratam, seguindo dos grupos hidrofóbicos, que também interagem com as moléculas de água. Por consequência ocorre a absorção de água adicional, devido à força motriz osmótica das cadeias da rede. O intumescimento da água adicional que é absorvido pelos grupos iônicos, polares e hidrofóbicos torna-se saturados de água, preenchendo o espaço entre as redes e/ou macroporos. À medida que a rede aumenta de volume, se as redes ou ligações cruzadas são degradáveis, o material começa a dissolver-se e desintegrar-se, a uma taxa em função da sua composição fazendo com que ocorra um decaimento das propriedades mecânicas.

Na tabela 8 são relacionados os dados mecânicos que caracterizam as amostras CS-HA20% e CS-HA50% nos diferentes tempos, tais como tensão máxima, taxa de deformação e módulo de elasticidade.

Tabela 8: Resultados obtidos a partir dos testes de compressão, amostras via úmido.

Amostras	Tensão Máxima (Mpa)	Deformação Máxima (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
CS-HA20% (1 hora)	0,010 ± 0,001	90,01 ± 0,06	3,26x10 ⁻⁵ ± 9,01x10 ⁻⁸
CS-HA20% (3 horas)	0,006 ± 0,004	90,20 ± 0,21	2,15x10 ⁻⁵ ± 7,11x10 ⁻⁸
CS-HA20% (6 horas)	0,005 ± 0,001	90,04 ± 0,24	1,86x10 ⁻⁵ ± 6,73x10 ⁻⁸
CS-HA50% (1 hora)	0,062 ± 0,06	60,83 ± 9,34	3,29x10 ⁻⁵ ± 1,59 x10 ⁻⁷
CS-HA50% (3 horas)	0,057 ± 0,012	70,09 ± 0,10	2,35x10 ⁻⁵ ± 1,44 x10 ⁻⁷
CS-HA50% (6 horas)	0,002 ± 0,001	90,10 ± 0,13	1,79x10 ⁻⁵ ± 8,9x10 ⁻⁸

Em relação ao tempo que os compósitos foram submetidos, podemos observar que a resistência à tensão é inversamente proporcional ao tempo, sendo esperado este tipo de comportamento provavelmente pela dissolução da gelatina e intumescimento do fluído com a quitosana (Tabela 8). Esses resultados corroboram com o Grau de Intumescimento apresentado na sessão anterior, para o mesmo tempo observado. Em relação ao módulo de elasticidade, quanto maior o tempo imerso das estruturas, mais elástico torna-se o material pela influencia da absorção do PBS, que consequentemente provoca um aumento na área superficial dos compósitos, como também as cadeias presas por ligações cruzadas vão aumentando a mobilidade.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de estruturas tridimensionais compósitas de quitosana/hidroxiapatita/gelatina para regeneração óssea, sendo a fase cerâmica gerada *in situ*. Para isto, o trabalho foi dividido em duas etapas, onde a primeira consistiu na produção de esferas de quitosana/hidroxiapatita através da técnica de geleificação ionotrópica e a segunda, no desenvolvimento das estruturas através do método de agregação de partículas. Considerando os resultados obtidos a partir das caracterizações propostas, pode-se concluir que:

5.1 Etapa I

- A metodologia permitiu a produção de esferas quitosana/hidroxiapatita com diferentes proporções de hidroxiapatita gerada *in situ* para o desenvolvimento de estruturas tridimensionais;
- Pode-se otimizar a concentração de hidroxiapatita nas esferas, sendo utilizadas em 20, 50 e 70% de proporção (quitosana/hidroxiapatita);

5.2 Etapa II

- Foi possível o desenvolvimento de estruturas tridimensionais de quitosana/hidroxiapatita/gelatina;
- O compósito que apresentou resultados mais satisfatórios foi CS-HA20%, exibindo um melhor perfil à porosidade, grau de intumescimento e propriedades mecânicas;

De maneira geral, o presente trabalho ofereceu uma metodologia de fabricação de estruturas tridimensionais de quitosana com hidroxiapatita, obtendo a fase inorgânica *in situ*, obtendo estruturas tridimensionais de maneira satisfatória, com uma estratégia simples baseada na agregação de partículas. Com isto, permite-se que os arcabouços produzidos possam ser utilizados em diversas aplicações biomédicas, como por exemplo, carreador

para um sistema de liberação controlada de fármacos e arcabouços para engenharia de tecidos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de estruturas tridimensionais constituídas por quitosana/hidroxiapatita/gelatina com a fase mineral gerada *in situ* a partir da metodologia de agregação de partículas. Utilizando estes componentes, buscou-se mimetizar, em termos de composição, o tecido ósseo, para aplicação na regeneração óssea.

No decorrer da pesquisa surgiram algumas ideias e possíveis avanços não somente referentes à melhoria nas propriedades das estruturas tridimensionais, mas também pensando em expandir o campo de aplicação, como por exemplo na construção de sistemas de liberação controlada de fármaco. Deste modo em termos de estruturas tridimensionais, podemos focar no aperfeiçoamento da metodologia para adequar as propriedades desejadas, tais como, maiores porosidade e módulo de elasticidade. Para isto sugere-se:

- Variar o tamanho das esferas por meio do uso de agulhas com outras dimensões, e avaliar sua influência na porosidade e módulo de elasticidade das estruturas;
- Testar outros materiais para empregar como agente agregador das esferas, ou ainda, reticular a gelatina utilizando algum agente não tóxico, como por exemplo, a genipina;
- Utilizar blendas poliméricas, por exemplo, gelatina/quitosana, com o objetivo de avaliar a agregação das esferas já durante o processamento, não necessitando incorporar a gelatina após a produção das esferas;
- Promover estudos biológicos *in vitro*, como por exemplo, citotoxicidade, adesão celular e ensaio de bioatividade, para observar o comportamento biológico das estruturas;
- Realizar estudos *in vivo*, para avaliar a capacidade de aplicação e as respostas à introdução de fármacos, como por exemplo a dexametasona.

7 REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H. et al. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Estruturas tridimensionais and Implant Coatings. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, p.205-216, 2006

AHSAN, T.; NEREM, R.M. **Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry.** Orthop. Craniofacial Res., v.8, p.134- 140, 2005

ALMEIDA, K. V. “**Arcabouços de Quitosana: Avaliação da Influência da Massa Molar do Processo de Congelamento na Biodegradação**”. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2013.

ALSBERG E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. **Regulating bone formation via controlled scaffold degradation.** J Dent Res. 2003;82 (11): 903-8

ANDRADE, F. A. C. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, 2013.

ANDRADE, F. A. C. S.; RIGO, E.C.S.; VERCIK, L.C.O.; MELO, M. P.; CUNHA, L. T.; MIRANDA, E. T.; FONTANA, C. R. “**Inserção de nanopartículas de prata em hidroxiapatita: efeito antibacteriano sobre Staphylococcus aureus**”. In: 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2012, Natal - RN. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012. p. 01-353.

AOUADA, F. A. et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis e poli(acrilamida e metilcelulose). Quimica Nova, v. 32, n. 6, p. 1482-1490, 2009.

ARAÚJO JÚNIOR, J. V. **Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de

Materiais) – Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro. Universidade de Aveiro, Portugal, 2005.

ASHBY, M.F. The properties of foams and lattices. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. v. 364, n. 1838, p.15-30, 2006.

ASSIS, A.S et al. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v. 09, n. 05, p.480-491, 2008.

BATICH, C.; LEAMY, P. Biopolymers. In: Standard **Handbook of Biomedical Engineering and Design.**, ed. Kutz M, Mc Graw Hill; p. 4-6, 2003. (BATICH & LEAMY, 2003).

BATTISTI, Marcos Valério; CAMPANA-FILHO, Sergio P.. **Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*.** *Quím. Nova*, São Paulo , v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

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.

BITENCOURT, C.M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes á base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.).** 2013(Dissertação Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Ciência da Engenharia de Alimentos. Pirassununga.

BRAGHIOLLI D. I. “ Produção de *Estruturas tridimensionais* contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bio-electrospraying” Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2012.

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

BURKOTH AK, Burdick J, Anseth KS. Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior. *J. Biomed Mater Res*. 2005; 51(3): 352-9.

CAMPANA, S.P.; SIGNINI, R. **Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p.169-173, 2001.

CARDOSO, M. J. B. **“Desenvolvimento de Compósitos de Superfície Peuapm/Quitosana: Potenciais Aplicações Biomédicas”**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

CARRODEGUAS R. G., et al, **“Hydrothermal Method for Preparing Calcium Phosphate Monoliths”** *Materials Research*, 3Vol. 6, No. 3, 395-401, 2003.

CHEN, K-Y. et al. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.

CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. **Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, p. 889-898, 2008.

CHO, I. Y. ; NO, H. K. ; MEYERS, S. P . J. **“Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products.”** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p. 3839-3843, 1998.

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

COSTA V. C. Costa H. S.; Vasconcelos W. L.; Pereira M. M.; Oréfice R.L.; Mansur H.S.; **Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering** Mat. Res, 2007, 10 (1): 21-26.

DALAPICULA SS, Vidigal Junior GM, Conz MB, Cardoso E.S; **Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas**. Uma revisão crítica. Implantnews; 2006; 3(5): 487 -491.

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

DAROZ, L.R.D. et al. **Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan**. Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, v.23, n.4, p.480-487, 2008.

DONADEL, K. **Síntese e Caracterização de Biocerâmicas de Hidroxiapatita e Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado**. 2003. Monografia(Graduação em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates as bioceramics: State of the Art. Journal of Functional Biomaterials, v. 1, p. 22-107, 2010.

DUAILIBI MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. **Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells**. J Dent Res. 2004; 83(7):523-8.

EL-GHANNAM, A. **Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering**. Expert Rev. Med. Devices, v.2, n.1, p.87-101, 2005.

FERNADES, G.F. & LARANJEIRA, M.C.M. Calcium Phosphate Biomaterials from Marine Algae. Hydrothermal Synthesis and Characterisation. Química Nova, v.23, n.4, p.441-445, 2000.

FIDÉLES, T. B. **“Desenvolvimento de Estruturas tridimensionais de Quitosana para Aplicação na Engenharia de Tecidos”**. Tese (Doutorado em

Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

FIDÉLES, T. B. “**Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial.**” Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

FINISIE, M.R., et al. Synthesis of Calcium-Phosphate and Chitosan Bioceramics for Bone Regeneration. Na. Acad. Bras. Cienc., v.73, n.4, p.525-532, 2001.

FONTES, R. A. M.; **Fabrico e Caracterização de Estruturas tridimensionais à Base de Fosfatos de Cálcio.** 2010. [dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica)]. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

FOOK, A. C. B. M.; **Desenvolvimento de Arcabouços Compósitos Hidroxiapatita-biopolímero para engenharia de tecidos.** 2012. [tese (Doutorado em Engenharia de Materiais)]. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

FOOK, A.C.B.M. et al. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como *estruturas tridimensionais* para regeneração óssea. Revista Matéria, v. 15, n. 3, p.392–399, 2010.

FOOK. A. C. B. M. “**Produção e Caracterização de Arcabouços Compósitos HA/Biopolímero para Engenharia de Tecidos**”. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

FROTA, R. Estudo da radiopacidade e avaliação morfológica da reparação óssea utilizando-se β -tricálcio fosfato e polímero de mamona como implantes. 2006. 113 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) – Universidade de Pernambuco, Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Camaragibe.

GRIFFITH, L. G. & NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities - Science, 295, p.1009, (2002).

FURTADO, G. T. F. S. ; FOOK, A. C. B. M.; FOOK, M. V., “**Desenvolvimento de Biocerâmicas Porosas para Regeneração Óssea.**” VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2009.

GAUTAMA S., DINDAB A. K., MISHRA N. C., Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 1228–1235, 2013.

GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, v.36, supl.3, p.S20-27, 2005

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

GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis.**3 ed. Springer, 2003. 690 p.ISBN 978-1-4615-0215-9.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v.33, n6,p.1352-1358, 2010.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S. et al. **Substitutos Ósseos – conceitos gerais e estado atual.**ARQUIVOS DE MEDICINA, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

H. Seitz et al./Different **Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing advanced** engineering materials 2009, 11, No. 5.

HENCH, L. Bioceramics. *81*, 1705 - 1728. 1998.

HENCH, L.L. **Bioceramics: from concept to clinic.** Journal of the American Ceramic Society, v.74, n. 7,p. 1487-1510,1991.

IAKADA, Y. Surface Modification of Polymers for Medical Applications. *Biomaterials*, (1994)15:725-36.

ICTA. **For better Thermal Analysis**. Gianni Lombardi Secretary, ICTA. Instituto de Mineralogia e Petrografia Dell'Università Di Roma, Città Universitaria, 00100, Rome, Italy, 1977. 36 pag. Distribuição gratuita.

IGNJATOVIC, N., USKOKOVIC, D. **Synthesis and application of hydroxyapatite/poly lactide composite biomaterial**. *Applied Surface Science*. 238, 314 - 319. 2004

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, v.3, n.10, p.589-601. 2006.

ISO 23.317, “Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials” **2007**.

JACQUES, J. W.; FAGUNDES, D. J.; FIGUEIREDO, A. S. et al. **O papel da poliuretana de mamona como substituto do enxerto ósseo autógeno em coelhos**. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 31, n. 4, p. 236-241, jul. / ago., 2004.

JIANG T, Abdel-Fattach WI, Laurencin CT. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere *estruturas tridimensionais* for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27(28): 4894-903.

JIANG, L., LI, Y., WANG, X., ZHANG, L., WEN, J., GONG, M. **Preparation and Properties of Nano-hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose composite scaffold**. *Carbohydrate Polymers*. 74, 680 - 684. 2008.

JOSCHEK S., NIES B., KROTZ R. A; GOPFERICH, A. “Chemical and Physicochemical Characterization of Porous Hydroxyapatite Ceramics made of Natural Bone.” *Biomaterials*, 21, 1645, 2000.

KHAN Y, EL-Amin SF, Laurencin CT. In vitro and in vivo evaluation of a novel polymer-ceramic composite scaffold for bone tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;; 529-30.

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

KIM, I.Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26, p.1-21, 2008.

KIM, S-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite estruturas tridimensionais for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, n.8, p.1399-1409, 2006

KLOUDA L, Vaz CM, Mol A, Baaijens FP, Bouten CV. Effect of biomimetic conditions on mechanical and structural integrity of pga/p4hb and electrospun pcl estruturas tridimensionais. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19(3): 1137-44

KOKUBO T, KIM HM, KAWASHITA M. **Novel bioactive materials with different mechanical properties**. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2161-75.

KOKUBO T. **Surface chemistry of bioactive glass-ceramics**. *J. Non-Cryst Solids* 1990;120:138-151.

KUCHARSKA, M.; WALENKO, K; BUTRUCK, B.; BRYNK, T.; HELJAK, M. CIACH, T. Fabrication and characterization of chitosan microspheres agglomerated scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Letters**. v.64, n. 9, p. 1059-1062, 2010.

LANGER, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* 260, 920, (1993).

LAUREANO FILHO, J. R.; BRANCO, B. L. C.; ANDRADE, E. S. S. et al. **Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea**. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 73, n. 2, p. 186-192, 2007.

LEAL, R. C. A. **“Desenvolvimento de Biocompósitos Rígidos para Aplicação como Biomaterial”**. . Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. **Biomedical application of Collagen**, *International Journal of Pharmaceutics*, 221,1-22, 2001.

LEMOS, E. M. F.; MAGALHÃES, M. M.; OLIVEIRA, J. S. **Liofilização de Matrizes 3D Compósita de Quitosana, Vidro Bioativo e PVA: Avaliação da Morfologia e das Propriedades Mecânicas**. 2012. Anais VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB. Natal.

LEONG NL, Jiang J, Lu HH. **Polymer-ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2006;1: 2651-4.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3919-3918, 2005.

LIEN, S.-M., LI, W.-T., HUANG, T.-J., (2008) *Materials Science e Engineering C*, 28, 36.

LIJUN KONG, YUAN GAO, GUANGYUAN LU, YANDAO GONG, NANMING ZHAO, XIUFANG ZHANG. **"A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite estruturas tridimensionais for bone tissue engineering"** *European Polymer Journal* 42 (2006) 3171–3179.

LIU, X., SMITH, L. A., HU, J., MA, P. X. (2009) *Biomaterials*, 30, 2252.

LLOYD-EVANS, M. – *Mater. Today*, May, p.48 (2004).

Lu, L and Mikos, AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering. *MRS Bull*, (1996) 21:28-32.

M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*, vol. 31, pp. 37-47, 2000.

Ma, P. X.; **"Estruturas tridimensionais for tissue fabrication"**. *Materials today*, 7(5), 30-40 (2004). (MA, 2004) *Tissue Engineering* Edited by Daniel Eberli MD. PhD. (EBERLI, 2010)

MALAFAYA PB, PEDRO A, PETERBAUER A, GABRIEL C, REDL H, REIS RL. "Chitosan particles agglomerated estruturas tridimensionais for cartilage and

osteocondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells." J Mater Sci Mater Med 2005;16(12):1077.

MARTINS V. C. A.; SILVA, G. M.; PLEPIS A. M. G; **Mineralização In Vitro De Esponjas De Quitosana:Colágeno**. Anais do 11º Congresso Brasileiro de Polímeros – Campos do Jordão, SP – 16 a 20 de outubro de 2011. p.3246 - 3251.

MARTINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. J Appl Oral Sci, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.

MARTINS, A.; OLIVEIRA, D.M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.K.; MUNIZ, E.C. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 51, n.5, p. 1127-1133, 2012.

MATHEWS, F.L; RAWLING,R.D.; **Composite Materials: Engineering and Science**; Chapman & Hall: London 1994.

MAVROPOULOS, E. A **Hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública-(FIOCRUZ)- Rio de Janeiro, 199, 126p.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de LC. **Aplicação de quitosana como suporte de para uma imobilização de enzimas de interesse industrial**. Química Nova. v.34, n.5, p. 831-840. 2011.

MENDONÇA, R. H.; COSTA, M. F. D.; THIRÉ, R. M. S. M. **Produção de Arcabouços Tridimensionais Bioativos para Bioengenharia Óssea**. 2012. Anais VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB. Natal.

MIRANDA E, SILVA T, REIS R, MANO J **"Nanostructured Natural-Based Polyelectrolyte Multilayers to Agglomerate Chitosan Particles into**

Estruturas tridimensionais for Tissue” Engineering. Tissue Engineering Part A 17: 2663–2674, 2011.

MODRZEJEWSKA, Z. MANIUKIEWICZ, W. WOJTASZ-PAJAK, A. **“Determination of Hydrogel Chitosan Membrane Structure.”** Polish Chitin Society, Monografy XI, 2006.

MORAIS, W.A.; ALMEIDA, A.L.P.; PEREIRA, M.R.; FONSECA, J.L.C. **Equilibrium and kinetic analysis of methyl orange sorption on chitosan spheres.** Carbohydrate Research. v. 343, n. 14, p. 2489–2493, 2008.

MORÉ, Y.S. **“Desarrollo De Composites Basados Em Quitosana/Apatita Y Quitosana/Apatita-Silicato Como Material Soporte Para Regeneración Ósea”.** Tese, Doutorado em ciências químicas, Universidad de La Habana, Centro de Biomateriales Facultad de Química, La Habana, 2014.

MORÉ, Y.S., CARRODEGUAS R. G. , DAVIDENKO N. , COVAS C. P.. CAMERÓN R. **“Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana”** Revista CENIC Ciencias Químicas, Vol. 39, No. 1, 2008.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays.** Journal Of Immunological Methods 65 (1- 2): 55-63, 1983.

MUNHOZ, M. A. S. **“Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos”.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia- São Carlos- 2013.

MURUGAN R. and RAMAKRISHNA S. **“Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite”.** Biomaterials, 25, 3829-3835, 2004

MUZZARELLI R.A.A.; ROCCHETTI. R. **The determination of the degree of acetylation of chitosans by spectrophotometry.** In Chitin In Nature And

Technology R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Gooday, eds., Pag. 385-388. Plenum Press, New York, 1986.

MUZZARELLI, C; MUZZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic, 2002.

NASCIMENTO, I. V. S. R. **“Desenvolvimento de Sistemas Quitosana/Piperina para Liberação Controlada de Fármacos.”** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

NEREM, R.N. **The challenge of imitating nature.** In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. Principles of Tissue Engineering. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

NETO, R.S. 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.

NGUYEN, V. C. N.; PHO, Q. H. “Preparation of Chitosan Coated Magnetic Hydroxyapatite Nanoparticles and Application for Adsorption of Reactive Blue 19 and Ni²⁺ Ions”Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal.V.2014, Article ID 273082.<http://dx.doi.org/10.1155/2014/273082>.

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

OKAMOTO m, et al.Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. J Mater Sci Mater Med. 2006 17 (4):327 -36.

OLIVEIRA, R. A. **“Síntese e caracterização de compósito quitosana com carbonato de cálcio extraído de casca de ovo para possíveis aplicações como curativo.”** 2011. Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

OLIVEIRA, S.M. et al. **Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies.** Tissue Eng. Part A, v.15, n.3, p.635-643, 2009.

OLIVEIRA, S.S.L. **“Desenvolvimento de Arcabouços de Quitosana/Hidroxiapatita/Dexametasona para Liberação Controlada de Fármaco.”** Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2015.

OLIVEIRA, S.S.L. **“Produção de Arcabouços de Quitosana/Hidroxiapatita/Dexametasona para Liberação Controlada de Fármaco.”**Seminário de Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

ONO, I. et al. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, v.21, p.143-151, 2000.

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

PATHIRAJA A. GRENATLAKE, RAJU A. K.; **Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering;** *European Cells and Material*, Vol. 5, pages 1-16, (2003).

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

PENICHE C., SOLÍS Y., DAVIDENKO N., GARCÍA R. **“Chitosan/hydroxyapatite-based composites”** *Biotechnología Aplicada* 2010;27:202-210.

PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. **Novos biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p.104-109, 1999.

PICONI, C.; MACCAURO, G. **Zirconia as a ceramic biomaterial,** *Biomaterials*, 20, 1-25 1999.

PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v. 21, n. 6, p. 383-388, 2003.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. *Dent. Clin. N. Am.*, v.51, p.729-746, 2007.

PRETORIUS, J.A. et al. Histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bone defects surrounding implants. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*, v.20, p.387-98, 2005.

PUTNAM AJ, Mooney DJ. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat Med*. 1996; 2(7): 824-6.

RATNER, B.D. et al. **Biomaterials science – Introduction to Materials in Medicine**. 2nd Ed. London : Elsevier, 2004. 913 p. ISBN 978-0-12-582463-7.

REDEPENNING J.; VENKATARAMAN G.; CHEN J.; N. “Stafford Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrates”. *J. Biomed. Mat. Res.*, 66A, 411-416, 2003

REZWAN, Z., CHEN, Q., BLAKER, J., BOCCACCINI, A. **Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Estruturas tridimensionais for Bone Tissue Engineering**. *Biomaterials*. 27, 3413 - 3431. 2006.

RIBEIRO, G. B. M. **Obtenção de Biomateriais Porosos Utilizando Sílica Coloidal como Aglutinante**, Trabalho de diplomação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SALGADO, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. 2004. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* 4: 743–765.

SAMPAIO, G. Y. H. **Desenvolvimento de Esferas Biodegradáveis para Regeneração de Tecidos Cartilagosos**. 2012. (Dissertação Mestrado).

Universidade Federal de Campina Grande. Ciências e Engenharia de Materiais. Campina Grande.

SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Química analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SANTOS, k. S.; **Biomateriais na Regeneração Óssea. Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, 2011.

SENEL, S.; MCCLURE, S.J. **Potential application of chitosan in veterinary medicine.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SHIN, H.; JO, S. & MIKOS, A. G. **Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering-** *Biomaterials*, 24, p.4353, (2003).

SHU, X.Z.; ZHU, K.J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 235-243, 2002.

SIGNINI, R. & CAMPANA-FILHO, S. P. – *Polímeros: Ciên. e Tec.*, 11, p.58 (2001).

SILVA, A.R.S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Odonto Cienc.**, v.22, n.55, p.77-81, 2007.

SILVA, M. C. **“Arcabouços de Quitosana/Curcumina como Sistema de Liberação Controlada para Tratamento de Câncer de Mama”**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2015.

SILVA, M. C. **“Desenvolvimento de Arcabouços de Quitosana/Curcumina como Sistema de Liberação Controlada de Fármaco”**. Seminário de

Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

SILVA, M.R. “Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito” Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – Universidade de São Paulo- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. – Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PETRY, F. C.; PINTO, L. A. A. “**Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum**”. *Ciênc. Rural.*, vol. 41, n. 5, p. 904-909, mai. 2011.

SOLÍ’S YAIMARA; DAVIDENKONATALIA ; CARRODEGUASRAU´ L G.; CRUZJENY ; HERNA´NDEZ ANDY; TOMA´S MIRIELA; CAMERON RUTH E.; PENICHECARLOS . “**Preparation, characterization, and in vitro evaluation of nanostructured chitosan/apatite and chitosan/Si-doped apatite composites**” *J Mater Sci* (2013) 48:841–849.

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

SPECTOR M.; **Principles and practice Tissue Engineering**: I. A. Introduction/background; Massachusetts Institute of Technology (2007)

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

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications.*J. R. Soc. Interface*, v.6, p.S311-324, 2009

TAMAI, N. et. al. Novel hydroxyapatite ceramics with na interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.59, p.110-117, 2002.

THEIN-HAN, W.W.; KITIYANANT, Y. Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied Biomaterials**, v.80. p.92-101, 2007.

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

THOMPSON, R., WAKE, M.C., YASZEMSKI, M., AND MIKOS, AG. **Biodegradable polymer *estruturas tridimensionais* to regenerate organs**. *Adv Polym Sci*, (1995) 122:247-74.

THOMSON, RC, YASZEMSKI, MJ, POWERS, JM, AND MIKOS, AG. **Fabrication of biodegradable polymer *estruturas tridimensionais* to engineer trabecular bone**. *J Biomater Sci Polym Ed*, (1995) 7:23.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S.R.; FIELDS, R.T. **Bone augmentation with and without biodegradable and nonbiodegradable microporous membranes**. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*; Vol. 13, no.3, p. 411-22, 2001.

UENO, H.; NAKAMURA, F.; MURAKAMI, M. et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*, v. 22, p. 2125-2130, 2001.

UGARTE, J. F. O. et al . “Influence of processing parameters on structural characteristics of porous calcium phosphate samples: a study using an experimental design method”. *Mat. Res.*, São Carlos , v. 8, n. 1, p. 71-76, Mar. 2005 .

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

VALLET-REGÍ, M.; *Anales de Química* 1997, 93, 6.

VAN CUONG NGUYEN AND QUOC HUE PHO, "Preparation of Chitosan Coated Magnetic Hydroxyapatite Nanoparticles and Application for Adsorption of Reactive Blue 19 and Ni²⁺ Ions," *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 273082, 9 pages, 2014. doi:10.1155/2014/273082.

VAZ, G. J.O. Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfatos de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética. Tese de Doutorado. REDEMAT, Novembro, 2007.

VENUGOPAL J.R., PRABHAKARAN M.P., MUKHERJEE S., RAVICHANDRAN R., DAN K., RAMAKRISHNA S., **Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction.** *J R Soc Interface*. 2012: 9:1-19.

VOGELIM E, JONES NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical- sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87(6): 1323-31

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

VOLKMER, T. M.; SANTOS, L. A. dos. Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. *Cerâmica*, São Paulo, v. 53, n. 328, p. 429-435, Dec. 2007.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Tissue Engineering: The Next Generation. **Tissue Eng.**, v.12, n.12, p.3261-3263, 2006.

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.

WANG, S., LIU, W., HAN, B., YANG, L. (2009). Study on a hydroxypropyl chitosan-gelatin based scaffold for corneal stroma tissue engineering. *Applied Surface Science*, 255, 8701-8705.

WATTANUTCHARIYA, W. E CHANGKOWCHAI, W. Characterization of Porous Scaffold from Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite for Bone Grafting. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists, v.2, p.12-14, 2014.

WILLIAMS, D.F. **On the nature of biomaterials.** *Biomaterials* 30 (2009) 5897–5909.

WU, X., LIU, X., WEN, P., ZHANG Y., LONG, Y., WANG, X., GUO, Y., XING, F., GAO, J. **Preparation of aligned porous gelatin estruturas tridimensionais by unidirectional freeze-drying method.** *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 3, p. 1167-1177, 2008.

XU HH, Weir MD, Simon CG. Injectable and strong nano-apatite *estructuras tridimensionais* for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dent Mater*, v. 24, n. 9, p. 1212-22, 2008.

ZAMBUZZI, W.F.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, F.L.; et al. **Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft.** *Braz Dent J*, v.17, n. 4, p. 274-278, 2006.

ZHANG W, Walboomers XF, VAN OSCH GJ, VAN DEN DOLDER J, JASEN JÁ. Hard tissue formation in a porous ha/tcp ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(2):285 -94.

ZHANG Y & ZHANG , M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.55, p.304-312, 2001.

ZHANG Y., ZUO K, ZENG Y. Effects of Gelatin Addition on the Microstructure of Freeze-Cast Porous Hydroxyapatite Ceramics. *Ceramics International* v.35 (2009) 2151–2154.

ZIOUPOS, P., BARBENEL, J., FISHER, J. **Mechanical and Optical Anisotropy of Bovine Pericardium.***Medical e Biological Engineering e Computing, 1, 76 - 82. 1992.*