



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

Ylka Virginia Ribeiro Gomes

ARCABOUÇOS DE QUITOSANA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

**Campina Grande-PB
Novembro/2012**



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

YLKA VIRGINIA RIBEIRO GOMES

ARCABOUÇOS DE QUITOSANA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande-PB
Novembro/2012





FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

G633a Gomes, Ylka Virginia Ribeiro.
Arcabouços de quitosana para regeneração tecidual / Ylka Virginia
Gomes. – Campina Grande, 2012.

47 f. : il.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.

Referências.

1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Engenharia de Tecidos.
4. Arcabouço. I. Título.


CDU 62:61(043)

Ylka Virginia Ribeiro Gomes


ARCABOUÇOS DE QUITOSANA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Dissertação Aprovada em 16/11/2012 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:


Membros da banca examinadora:



Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook (Orientador - UFCG)



Profa. Dra. Maria Roberta de Oliveira Pinto
(Examinadora Externa)
CCT/UEPB



Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima
(Examinadora Externa)
CCBS/UEPB

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial a minha mãe Jandineide e aos
meus irmãos Allyson e Allynne.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que renova minhas forças e esperanças a cada dia.

A Nossa senhora das graças por iluminar meus caminhos.

A minha mãe, Jandineide, pelo fundamental incentivo e amor dedicados a mim.

Aos meus irmãos Allysson Antônio e Allynne Mary pela amizade e companheirismo de sempre.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook pela oportunidade, orientação incentivadora e amizade.

A associação Médica da Paraíba pela realização do convênio firmado com a Universidade Federal de Campina Grande

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em ciência e engenharia de materiais pelos conhecimentos compartilhados.

A todos do grupo CERTBIO: Rosseberg, Gloria, Thiago, Márcio, Greyce, e em especial Rita pela indispensável colaboração na concretização deste trabalho.

Aos amigos da primeira turma de Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais, fruto do convênio da Associação Médica da Paraíba e a Universidade Federal de Campina Grande, em especial Claudío Orestes, Sandra Carvalho, Otávio Lopes.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu aprendizado e realização deste trabalho.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

A pele do homem do homem, que corresponde a cerca de 15% de seu peso corporal, é um órgão que reveste e delimita o organismo, protegendo-o e interagindo com o meio exterior. Caracteristicamente dinâmica, a pele apresenta alterações constantes, sendo dotada de grande capacidade de reparação. Tem como funções termorregulação, produção e excreção de metabólitos, defesa contra agressões físicas, químicas e biológicas, funções sensoriais. Em muitas situações pode ocorrer perda da arquitetura e ou função desse tecido cutâneo, seja por processos infecciosos, traumáticos, inflamatórios ou neoplásicos, porém em algumas destas situações as terapêuticas convencionais não são suficientes para a resolução do quadro e técnicas mais avançadas precisam ser empregadas, como a engenharia de tecidos, a qual utiliza células associadas ou não a uma matriz extracelular denominada arcabouço. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar arcabouços compostos por quitosana, através da técnica de freeze-drying, para aplicação na engenharia de tecidos. Os arcabouços foram produzidos em três concentrações (1,5%– 2%– 3%) utilizando quitosana de baixo peso molecular e médio peso molecular. Em seguida os arcabouços foram caracterizados por microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia na Região de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raio x (DRX) e ensaio do grau de intumescimento. Os estudos morfológicos por MO e MEV revelaram a formação de um arcabouço com uma arquitetura tridimensional com poros influenciados pela concentração da solução. A FTIR identificou todas as bandas características da quitosana independente da concentração. O DRX demonstrou que o processo de liofilização reduziu a cristalinidade do material e os ensaios de GI demonstraram alta capacidade de intumescimento em todas as amostras de arcabouços testadas.

Palavras chave: Quitosana. Engenharia de Tecidos. Arcabouço.

ABSTRACT

Human skin, which corresponds to about 15% of the body weight, is an organ that covers and delimits the body, protecting it and interacting with the outside environment. Characteristically dynamic, the skin presents constant changes and it is endowed with a great capacity for repair. The skin has got thermoregulation and sensory functions, also, it is responsible for the production and excretion of metabolites and defense against physical, chemical and biological harm. In many situations, there may be loss of architecture and/or function of this tissue by infectious, inflammatory or neoplastic processes, or trauma. However, in some of these situations, conventional therapies are not enough to solve the problem and, thus, more advanced techniques have to be employed, as tissue engineering, which uses cells that may be or not associated with an extracellular matrix known as scaffold. The aim of this study was to develop and characterize scaffolds composed of chitosan, by using the freeze-drying technique, to be applied in tissue engineering. The scaffolds were produced at three concentrations (1.5% - 2% - 3%) using chitosan of low molecular weight and medium molecular weight. Then, the scaffolds were characterized by optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), x-ray diffraction (XRD) and testing of the degree of swelling. The morphological studies by MO and SEM showed the formation of a three-dimensional scaffold architecture with pores influenced by the concentration of the solution. The FTIR identified all characteristic bands of chitosan independent of concentration. The XRD showed that the lyophilization process reduced the crystallinity of the material and GI tests showed a high swelling capacity in all scaffold samples tested.

Key-words: Chitosan. Tissue engineering. Scaffold.

PUBLICAÇÕES

GOMES, Y. V. R.; LEAL, R. C. A.; NASCIMENTO, I.V.S.R.; FURTADO, G.T.F.S.; FOOK, M.V.L. **Arcabouços de Quitosana: Avaliação Morfológica**. In: I Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB, 2012, Campina Grande/PB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da pele.	16
Figura 2 - Representação esquemática das principais estratégias de renovação de um novo tecido	20
Figura 3 - Esquema de reação de desacetilação alcalina da quitina para obtenção da quitosana.	25
Figura 4 - Fluxograma da Metodologia do Trabalho.	29
Figura 5 - Micrografias (MO) da seção superficial dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.	32
Figura 6 - Micrografias (MO) da seção superficial dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.	32
Figura 7 - Micrografias (MEV) da seção interna dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.	33
Figura 8 - Micrografias (MEV) da seção interna dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.	34
Figura 9 - Espectro vibracional de IV dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.	35
Figura 10 - Grau de Intumescimento dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.	36
Figura 11 - Difratoograma de Raios X da Quitosana em pó. (QBPM) Quitosana de Baixo Peso Molecular e (QMPM) Quitosana de Médio Peso Molecular.	37
Figura 12 - DRX dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	TECIDO EPITELIAL	16
3.2	PELE ARTIFICIAL.....	17
3.3	ENGENHARIA DE TECIDOS.....	18
3.4	ARCABOUÇOS.....	20
3.5	BIOMATERIAIS.....	22
3.6	BIOPOLÍMEROS.....	23
3.6.1	Quitina e Quitosana	24
3.7	LIOFILIZAÇÃO.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	LOCAL DA PESQUISA.....	28
4.2	MATERIAIS.....	28
4.3	MÉTODOS	28
4.3.1	Solução de Quitosana e Liofilização	28
4.4	CARACTERIZAÇÕES.....	30
4.4.1	Microscopia Ótica (MO)	30
4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/ EDS)	30
4.4.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	30
4.4.4	Grau de Intumescimento	30
4.4.5	Difração de Raios X	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

5.1	MICROSCOPIA ÓTICA.....	32
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	33
5.3	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	35
5.4	GRAU DE INTUMESCIMENTO	36
5.5	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	37
6	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). É constituída pela epiderme e pela derme, que são unidas entre si por uma estrutura altamente especializada denominada membrana basal ou junção dermoepidérmica. A pele humana desempenha múltiplas funções: proteção, regulação da temperatura, percepção sensorial, excreção e síntese de vitamina D, colesterol e melanina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O desenvolvimento de novos materiais e aprimoramento dos já existentes para a regeneração de pele constitui grande área de pesquisa em biomateriais. Anualmente, várias centenas de pessoas necessitam de enxertos devido a feridas dérmicas. O trauma à pele pode ser causado pelo calor, por agentes químicos, energia elétrica, ultravioleta e nuclear, resultando em vários graus de dano à mesma. Doenças como diabetes e úlceras de pressão também provocam sérias lesões. As lesões menos traumáticas que atingem apenas o epitélio, camada externa da pele, são regeneradas prontamente e não necessitam de enxerto o que não acontece com as lesões mais profundas que atingem a derme. Segundo o Ministério da Saúde estima-se que em 2001 aconteceram 1.000.000 de acidentes por queimadura, sendo 150.000 (15%) causados por álcool líquido e 45.000 (30%) atingiram crianças de até 12 anos (BRASIL, 2005). De acordo com o "National Institute of General Medical Sciences", 1,25 milhões de lesões relacionadas a queimaduras, exigem atendimento médico anualmente só nos Estados Unidos. Destes pacientes, 50.000 exigem hospitalização e 25.000 são atendidos em unidades especiais de queimados. Infecções provocam a morte de aproximadamente 10.000. Felizmente, avanços no cuidado de feridas, tais como enxertos, têm aumentado a taxa de sobreviventes de vítimas de queimaduras e especialmente melhorado as chances de sobrevivência de pessoas com mais de 50% da cobertura corporal queimada (SEAL, OTERO, PANITCH; 2001).

A Engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que integra tecnologia e ciência para manter ou reparar os tecidos do corpo. Arcabouços ou matrizes extracelulares são dispositivos utilizados na engenharia de tecidos como suportes que promovem a proliferação celular e o crescimento, fornecendo um ambiente estável (GREEN, 1977).

Nos últimos anos, a pesquisa de biomateriais funcionais tem sido dirigida para o desenvolvimento de arcabouços. Neste sentido, uma atenção considerável tem sido dada para os biomateriais à base de quitosana (HIRANO; MIDORIKAWA, 1998; QIN; AGBOH, 1998; RATHKE; HUDSON, 1994).

A quitosana é um biopolímero natural, abundante e atóxico e sua utilização tem sido proposta para usos diversos, seja na área de engenharia, biotecnologia, ciências farmacêuticas ou medicina. É obtida a partir da adequação da estrutura química de um polímero natural encontrado em diversas fontes: processo de desacetilação da quitina, que por sua vez é extraída das carapaças de alguns artrópodes, principalmente os crustáceos, através da reação de desacetilação. (ASSIS, SILVA; 2003).

Logo, o estudo a respeito dos arcabouços produzidos com o biopolímero quitosana (morfologia e degradação) utilizados na engenharia de tecidos é de grande valia para a sociedade (médicos, engenheiros, pacientes). Sua utilização desponta como uma possibilidade terapêutica inovadora, podendo trazer benefícios nas mais diversas situações nas quais ocorra perda da arquitetura e ou função de tecidos humanos, seja por processos infecciosos, traumáticos, inflamatórios, neoplásicas, trazendo uma melhora na qualidade de vida dessas pessoas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar arcabouços de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar arcabouços de quitosana;
- Avaliar a influência da concentração da solução de quitosana na morfologia dos arcabouços;
- Avaliar a influencia da massa molar da quitosana na morfologia dos arcabouços confeccionados.

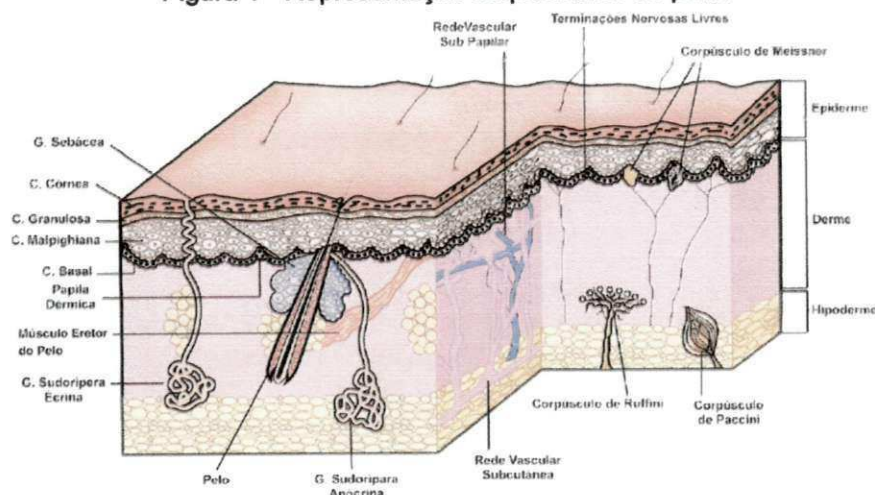
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TECIDO EPITELIAL

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Dependendo da espessura da epiderme, a pele é classificada como fina ou espessa. A pele espessa é encontrada na palma das mãos e na planta dos pés, sendo o restante do corpo protegido por pele fina. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da pele, entretanto a mantém unida a órgãos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As duas principais camadas da pele incluem a epiderme, composta de epitélio escamoso estratificado, e a derme, composta de tecido conjuntivo denso. A epiderme é o local de células epiteliais e a matriz produz queratinócitos, bem como os melanócitos produzem a melanina e sua espessura varia de acordo com a região do corpo, chegando a 1,5mm nas plantas dos pés. A hipoderme, compreendida de um tecido conjuntivo mais leve (menos denso), constitui a camada abaixo da derme (Figura 1). A pele possui receptores, folículos capilares para produção e crescimento do pelo, e dois tipos de glândulas: as glândulas sudoríparas, que primeiramente regulam a temperatura do corpo, e glândulas sebáceas. Como em outros órgãos, a pele é perfurada por capilares e innervada pelo sistema nervoso (DALLAN, 2005; RODAS, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da pele.



Fonte: SAMPAIO; RIVITTI, 2001.

Um pigmento que é produzido e acumulado na epiderme denominado melanina protege o organismo contra a ação da radiação solar (JUVENAL et al., 1992).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica. Além desse epitélio, que constitui sua maior parte, a epiderme apresenta três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico podendo processar e acumular na sua superfície os antígenos cutâneos, apresentando-os aos linfócitos, e as células de Merkel, que são tidas como mecanoreceptores. Essas células caracterizam-se principalmente pela presença de grânulos citoplasmático elétrondensos com 80nm de diâmetro, e em sua base notam-se terminações nervosas, algumas com forma de disco sem vesículas sinápticas, o que sugere que são de natureza sensorial, e que recebem impulso das células de Merkel (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SEAL, OTERO, PANITCH; 2001).

3.2 PELE ARTIFICIAL

O corpo é capaz de regenerar sua própria epiderme desde que a derme permaneça intacta. Entretanto, vítimas severamente queimadas e pacientes com úlceras diabéticas, entre outros, frequentemente não têm uma derme intacta. Atuais soluções envolvem enxertos de pele, porém com a limitação própria da técnica, da área doadora e da área receptora. Cientistas, clínicos e engenheiros, trabalham arduamente para desenvolver terapias que regeneram, ou ajudam o corpo a regenerar a derme, epiderme ou a espessura total da pele (COSTA JR, 2008).

A atual pele artificial procura recriar a derme e a epiderme mas não leva em conta a regeneração da intrincada estrutura e funções de folículo capilar e glândulas sudoríparas e sebáceas, sensores mecânicos e térmicos. Várias abordagens são feitas no projeto de materiais para a regeneração de pele. Estas abordagens variam desde o desenvolvimento de substituição de toda a espessura da pele à substituição dérmica e epidérmica (COSTA JR, 2008).

Para que um substituto de pele possa corresponder ao seu objetivo, algumas características são importantes. No caso da pele, o mesmo deve possuir propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas compatíveis com seu

objetivo, visando a criação de um arcabouço tridimensional que possa agir como o órgão original (YANNAS; BURKE, 1980).

As características essenciais que um substituto de pele deve apresentar são: maleabilidade (possibilitando sua manipulação), composição não tóxica, porosidade (para haver penetração de células e aparecimento de novos capilares), além de oferecer um fluxo adequado de vapor de água evitando o ressecamento da área. (YANNAS; BURKE, 1980; RIVRON et al., 2008; BOYCE, 2001)

O enxerto necessita promover uma regeneração dérmica e epidérmica, para prevenir infecção bacteriana e degradar em uma taxa apropriada, igual porém oposta àquela do tecido em regeneração. Estes parâmetros propõem um enorme desafio a qualquer tipo de material (SEAL, OTERO, PANITCH; 2001).

Apesar da produção de substitutos de pele artificial ser um campo relativamente novo já existem alguns produtos e serviços disponíveis no mercado. A grande maioria destes produtos tem sido desenvolvida por companhias sediadas nos Estados Unidos da América (EUA), geralmente com a colaboração de renomados departamentos acadêmicos (COSTA JR, 2008).

3.3 ENGENHARIA DE TECIDOS

A princípio a Regeneração Tecidual foi descrita na literatura como o emprego de barreiras físicas, ou veículo, com a finalidade de regenerar o tecido ósseo (IAMAGUTI, 2008). Porém, atualmente, ocorre a extrapolação desta técnica para vários tecidos, como tecido nervoso, cartilaginoso e conjuntivo. Vale ressaltar que essas barreiras físicas devem promover a resposta celular seletiva sem produzir reação inflamatória (SENISE, JOLY, LIMA; 1999). A Regeneração tecidual é uma técnica de grande impacto na medicina regenerativa. Tem como objetivo ampliar a capacidade natural de regeneração de tecidos que possuem a capacidade de auto-renovação limitada, que, uma vez estimulados por sinais específicos, orientam a sua diferenciação em diferentes tipos celulares com funções especializadas (ROBEY, 2000).

Williams (2006) sugere que a Engenharia de Tecido é a criação de novo tecido objetivando a reconstrução terapêutica do corpo humano, por deliberada e

controlada estimulação de células alvo através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos.

As barreiras físicas normalmente utilizadas em Regeneração tecidual são os biomateriais, que devem apresentar as seguintes características: (a) Biocompatibilidade e capacidade de sustentar a adesão e o crescimento celular; (b) Propriedades mecânicas condizentes com o tecido a ser reconstruído; (c) Velocidade de degradação compatível com o crescimento do tecido para o qual serve como suporte (no caso dos polímeros biorreabsorvíveis); e (d) Permitir a associação com fatores de crescimento específicos para indução de respostas celulares mais rápidas e mais específicas (LANGER; VACANTI, 1993; MA e ZHANG, 1999; HUTMACHER, 2000).

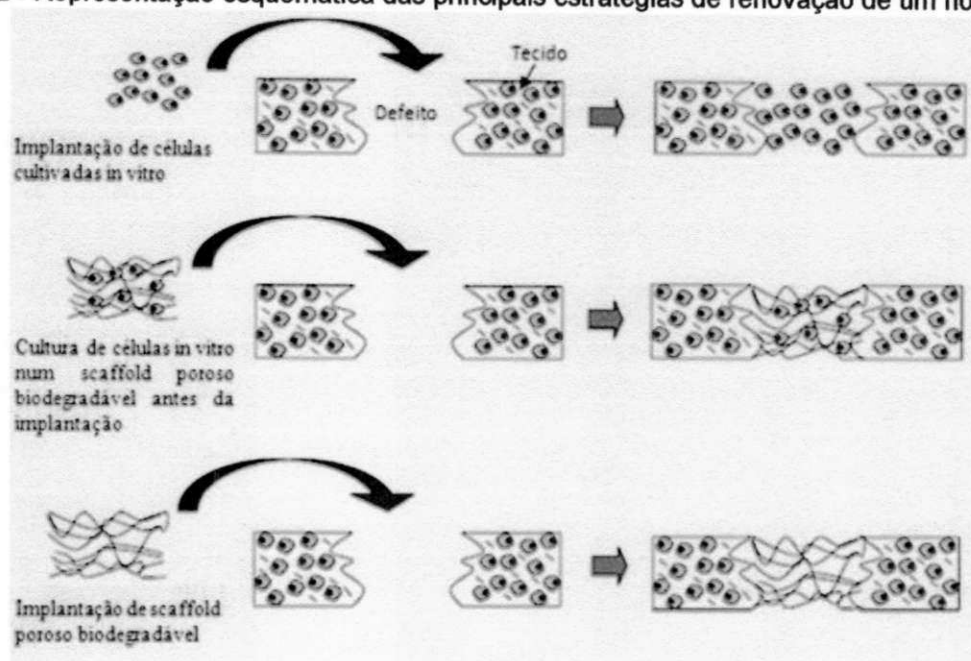
Os Biomateriais utilizados em regeneração tecidual gradual, os arcabouços, podem ser produzidos a partir de diferentes materiais, tais como cerâmicas, metais, silicone, polimetilmetacrilato, polietileno entre outros (SANTOS Jr., WADA; 2007). Os *arcabouços* geralmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico (BLOM, 2007). A regeneração tecidual gradual provoca a recuperação fisiológica e funcional dos tecidos lesionados do órgão, e pode vir a ser realizadas com a aplicação de tecidos artificiais externos, juntamente com células apropriadas, matrizes celularizadas ou combinações de fatores de crescimento, como forma de potencializar o processo regenerativo (ARRUDA, et al., 2007).

A engenharia tecidual pode ser definida como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida visando o entendimento fundamental das correlações envolvendo estrutura e função em tecidos de mamíferos normais ou patologicamente afetados e desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções tissulares” (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

Existem três estratégias principais na engenharia de tecidos. A primeira corresponde à implantação de células cultivadas “*in vitro*” (Terapia Celular). A segunda prende-se a implantação de tecidos funcionais formados em laboratório pela junção de células, provenientes do paciente ou de um doador e uma matriz. A terceira corresponde à regeneração dos tecidos “*in situ*”, utilizando uma matriz que promove a migração e adesão de populações específicas de células, as quais

levarão à reparação ou substituição do tecido danificado (LANGER, 1999). A Figura 2 nos mostra as estratégias adotadas para a criação de um novo tecido.

Figura 2 - Representação esquemática das principais estratégias de renovação de um novo tecido.



Fonte: (LANGER, 1999).

Engenharia de tecidos é uma tecnologia emergente com aplicações clínicas encorajadoras (STOCK; VACANTI, 2001). O propósito das pesquisas nesta área é estabelecer uma nova tecnologia clínica que tornará possível, tratamentos médicos para doenças que têm sido difíceis de curar pelos métodos atualmente existentes (IKADA, 2006).

3.4 ARCABOUÇOS

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

aquisição e purificação e possuir compatibilidade com a substância química e com soluções aquosas em condições fisiológicas (OLSSON, 2008).

Esses arcabouços podem apresentar-se como uma estrutura sólida acelular, sob a forma de preenchimentos absorvíveis que desaparecem com o passar do tempo, ou na forma de biomatriz 3D. A matriz 3D é um tipo de matriz porosa, na qual os poros presentes no interior da matriz devem estar interconectados entre si, com o objetivo de favorecer o crescimento, a proliferação, a diferenciação celular e a angiogênese dentro de sua estrutura (HO et al., 2005; MAUNEY et al., 2005; JIANG et al., 2006). A influência da porosidade e geometria do suporte polimérico é também relatada como um dos fatores determinantes na velocidade de degradação (WU; DING, 2004).

As técnicas de produção poliméricas de suportes tridimensionais dependem quase que inteiramente das propriedades internas e superficiais do material, e da função proposta para o suporte. Porém, o custo e o tempo de fabricação devem ser considerados para a viabilidade do método. A maioria das técnicas envolvem a aplicação de calor e/ou de pressão no polímero ou de dissolução por solventes orgânicos para moldar o material em sua forma desejada. As principais técnicas são: a evaporação de solvente com adição de sal (solvent-casting particule leaching) (MIKOS, et al., 1996), a injeção de gás (gas foaming (HARRIS, et al., 1998), a inversão de fases (phase separation) (PEZZIN, DUEK; 2002), a deposição por fusão (melt moulding) (HUTMACHER, SITTINGER, RISBUD; 2004), a freeze drying (PATIST, et al., 2004).

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

A compreensão do mecanismo de ação do processo de degradação é necessária para explicar as propriedades específicas da biomatriz 3D, pois a ação

da matriz pode ser afetada por alguns fatores e suas propriedades intrínsecas, como também sua morfologia (CHARULATHA; RAJARAM, 2003; REIS et al., 2007).

A degradação *in vitro* mostra-se como uma boa alternativa quando comparados aos estudos *in vivo*, sendo fundamentais e necessários (LUCIANO et al., 2003; LAINE et al., 2004).

A degradação de polímeros parcialmente cristalinos ocorre, fundamentalmente, em duas etapas: Devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, o efeito da cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. O primeiro estágio de degradação consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. O segundo estágio se dá quando parte considerável da região amorfa esta degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos (DUEK; ZAVAGLIA; BELANGERO, 1999).

3.5 BIOMATERIAIS

O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada no corpo por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAM, 2008). Os materiais sintéticos utilizados para este fim incluem metais, polímeros e cerâmicas e também a combinação destes nos chamados compósitos (BOSCHI, 1996).

Biomateriais para engenharia de tecido ou liberação controlada de drogas tiveram inúmeros avanços nos últimos anos pois os pesquisadores continuam a desenvolver e modificar principalmente materiais poliméricos para atender a demanda gerada por estas aplicações biomédicas. Neste sentido, muitos tipos de polímeros naturais e sintéticos têm sido sintetizados e empregados como veículos de liberação controlada de drogas e/ou estruturas matrizes, papel que exige precisa e controlável propriedade do polímero para o sucesso dessas utilizações (DAVIS, ANSETH; 2002; WANG, 2004; HOLLISTER, 2005; LAVIK et al., 2005).

Os biomateriais tem tido diversas aplicações como: biosensores, implantes, liberação controlada de drogas, lente intraoculares, entre outros. A cada ano são

desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer outras opções de tratamento para diversas enfermidades (PAIVA, 2005)

Os biomateriais devem apresentar as funções para as quais foram desenvolvidas, dentre estas serem biocompatível e biofuncional (BOSS et al., 1995). A Biofuncionalidade é o conjunto de propriedades que permite ao material desempenhar uma função desejada, enquanto que a Biocompatibilidade, um aspecto multidisciplinar, se refere à compatibilidade entre o material e o meio biológico no qual ele deve permanecer (BOSCHI, 1996).

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como biomateriais para a fabricação de dispositivos médicos e arcabouços na engenharia de tecidos. Os polímeros utilizados como biomateriais podem ser classificados como aqueles de origem natural (biopolímeros, biodegradáveis) e de origem sintética (biodegradáveis e não-biodegradáveis). Polímeros sintéticos representam a maioria dos biomateriais poliméricos desenvolvidos, utilizados principalmente devido às suas propriedades físico mecânicas, com limitações quanto à compatibilidade e degradabilidade em relação àqueles de origem natural. Polímeros de origem natural, também chamados de biopolímeros consistem em uma classe importante dos biomateriais devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradação e disponibilidade abundante (SHI, 2006).

3.6 BIOPOLÍMEROS

Polímeros têm sido empregados em biomateriais (produtos que atuam no sistema biológico) devido às várias características que apresentam. Dentre suas características importantes, apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los a cada aplicação específica, baixo custo de fabricação de dispositivos, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais, a relativa facilidade de obtenção. Estas propriedades os tornam de grande valor em aplicações biomédicas. Existe ainda a possibilidade de alterar um ou outro grupamento químico pertencente à arquitetura macromolecular das cadeias. Além de serem funcionalmente ativos, ou seja, cumprirem com sucesso suas funções dentro do corpo, os polímeros usados como biomateriais devem ser biocompatíveis

(GALLETTI; BRECHER, 1962; AKUTSU, 1972; EDMUNDS, 1985; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; RATNER *et al.*, 2005; JALILI *et al.*, 2009).

Biopolímeros compreendem uma grande variedade de polímeros sintetizados por organismo vivos (STEINBÜCHEL, 2001; STEINBÜCHEL, 2003).

Nessa perspectiva, a quitosana, que é um polímero biógeno, vem sendo foco de atenção, e um grande número de estudos têm relatado o seu potencial e propriedades favoráveis ao seu uso em bioengenharia (SHI *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006; KONG *et al.*, 2007).

3.6.1 Quitina e Quitosana

A quitosana e a quitina são polímeros atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (ROBERTS, 1992; GOOSEN, 1996).

A quitina é encontrada em animais invertebrados, nos quais é um dos componentes do exoesqueleto, e em alguns microorganismos, nos quais é um dos componentes da parede celular. De fato o termo quitina é derivado da palavra grega *khitón*, que significa envoltório ou caixa de revestimento (ROBERTS, 1992).

Quitina é um polímero semicristalino e a acessibilidade aos sítios reativos contidos nos domínios cristalinos é limitada (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007). A cristalinidade das amostras depende de vários fatores, tais como a natureza do organismo do qual a quitina foi extraída e as condições empregadas na extração do polímero (SAITO *et al.*, 2000).

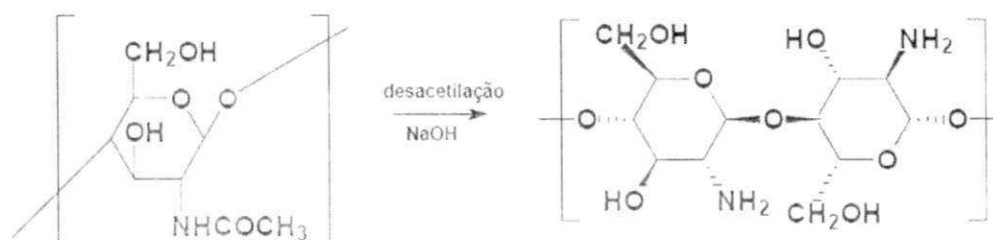
A quitina é um polissacarídeo encontrado abundantemente em animais invertebrados de diversos filos tais como Arthropoda, Annelida, Mollusca, e Coelenterata e também em vários fungos como, por exemplo, Zygomycetes e Deuteromycetes (MUZZARELLI, 1985). De fato a quitina pura foi identificada, até agora, apenas em algas diatomáceas *Thalassiosira fluviatis* e *Cyclotella cryptica*. A quitosana é o principal derivado da quitina e pode ser encontrada em determinados fungos, embora em pequenas quantidades. (ROBERTS, 1992).

A quitina possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (GOOSEN,

1996). A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (GOOSEN, 1996).

A quitosana é um polímero obtido através de uma reação de desacetilação da quitina (Figura 3). Esta reação consiste na remoção controlada dos grupos acetil (C_2H_3O) em meio alcalino de modo a tornar o produto final solúvel em soluções de ácidos diluídos. Este processo é designado por N-desacetilação (CANELLA e GARCIA., 2001; ARGUELLES et al., 2001). Estruturalmente a quitosana é um polímero linear composto de unidades de 2-amino-2-deoxi-(1,4)- β -D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-(1,4)- β -D-glicopiranosose unidos por ligações do tipo β -1,4(D.L. KAPLAN, 1998). Como exibido na Figura 3.

Figura 3 - Esquema de reação de desacetilação alcalina da quitina para obtenção da quitosana.



Fonte: (KRAJEWSKA, 2004).

3.6.1.1 Aplicações da Quitosana

Inicialmente usada para tratamento de feridas pelas propriedades cicatrizantes e antimicrobianas (DAI, 2011), a quitosana tem também sido utilizada na indústria farmacêutica (DUDHANI, 2010). Apresenta propriedades cicatrizantes e antimicrobianas provavelmente devido as características de seus produtos de degradação enzimática, além de ter excelente capacidade de formação de biofilmes. Sua biodegradabilidade é atribuída ao fato de ser metabolizada por enzimas humanas (DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2006).

O uso da quitosana como um biomaterial já foi explorado para a restauração de vários tipos de tecido, como pele, osso, cartilagem, de órgãos como fígado, vasos

sanguíneos e até mesmo de componentes do sistema nervoso (KIM et al., 2008). Dentre estas, a fabricação industrial de curativos para queimaduras à base de quitosana já é uma realidade e esforços vêm sendo feitos para melhorar as propriedades destes produtos.

Outro campo vastamente estudado é a produção de substratos para a engenharia da cartilagem articular, para o uso no tratamento de doenças degenerativas como a osteoartrite.

3.7 LIOFILIZAÇÃO

Uma série de tecnologias para fabricação de arcabouços foram desenvolvidas ou adaptadas de outras áreas para a engenharia de tecidos. (YOON; FISHER, 2007; SHI, 2006; BARBANTI et al., 2005).

Entre as técnicas apontadas, a de liofilização tem atraído bastante atenção. A técnica de liofilização permite a obtenção de estruturas altamente porosas, geralmente com características esponjosas ou de pós, por meio de congelamento da solução de um determinado polímero em temperaturas que podem variar entre -20°C e -196°C , seguido pela remoção do solvente através de sua sublimação em um equipamento denominado liofilizador. Assim, durante a liofilização, o espaço ocupado pelos cristais de gelo formados se torna vazio após a sublimação, originando os poros (SAMPAIO, 2012; CORRELO et al., 2007; FRANKS, 2007).

Apesar do tempo e energia consumidos no processo, quando comparada com outras metodologias mais econômicas, exibe a principal vantagem de conseguir reter a estrutura porosa final do produto obtido, evitando a sua desintegração (SAMPAIO, 2012; CORRELO et al., 2007; FRANKS, 2007).

O processo de liofilização engloba três etapas principais: o congelamento, a secagem primária e a secagem secundária. Após o congelamento a água é removida do material por sublimação (secagem primária). Em seguida a água incongelável é removida por dessorção, sob pressão reduzida (CAMERON, 1997). O congelamento é considerado uma das etapas mais importantes do processo. Após o congelamento a estrutura, o tamanho e a forma do produto são fixadas. O congelamento define o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo no material, caracterizado as fases de secagem primária e secundária (PATAPOFF;

OVERCASHIER, 2002; O'BRIEN et al., 2004). Se a estrutura da matriz é alterada durante a liofilização esta poderá sofrer danos e até perda do produto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

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

4.2 MATERIAIS

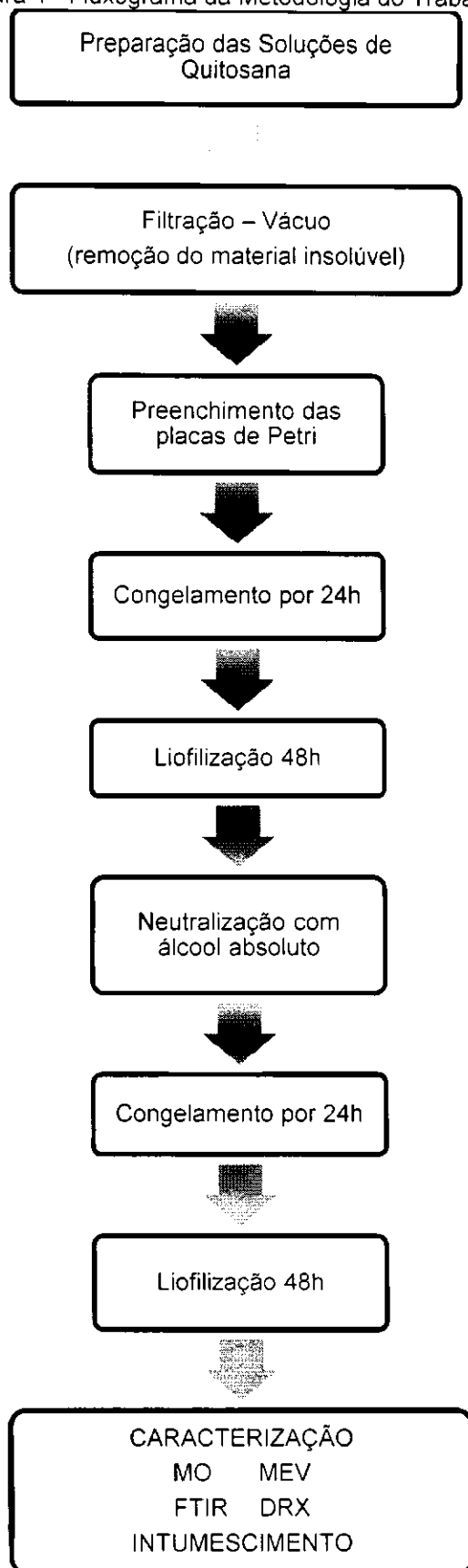
- Quitosana (Sigma-Aldrich, Grau de Desacetilação (GD) = 75 % - 85 %)
- Ácido acético glacial (Vetec)
- Álcool Etilico Absoluto 99,5° GL (Nuclear)
- Álcool Etilico Hidratado 70° INPM (TUPI)
- Tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4, Sigma-Aldrich)

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Solução de Quitosana e Liofilização

A preparação da solução de quitosana foi conduzida de acordo com a técnica de evaporação de solvente. Três soluções de quitosana foram preparadas pela dissolução de 1,5g, 2g e 3g de quitosana em quantidade suficiente de solução de ácido acético glacial (1%) até obter 100ml de solução e depois mantida sob agitação magnética por 24 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de petri e submetido ao processo de congelamento por Bio Freezer na temperatura de - 20 °C por um período de 24h. Após o processo de congelamento, as amostras foram liofilizadas por 48h para remoção dos cristais de gelo pelo método de sublimação. Terminado o processo de liofilização, os arcabouços foram neutralizados com álcool etílico absoluto por um período de 1h. Lavados com água destilada para retirada do excesso de álcool. Os arcabouços neutralizados foram novamente congelados e liofilizados e em seguida foram submetidos a caracterização. A metodologia do trabalho está descrita na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma da Metodologia do Trabalho.



4.4 CARACTERIZAÇÕES

4.4.1 Microscopia Ótica (MO)

A caracterização por MO foi realizada em um Microscópio Óptico HIROX, com resolução máxima de 3500X, onde o mesmo pode operar com luz transmitida ou refletida, acoplado a uma estação de Captura e Análise *de Imagens com Software*.

4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/ EDS)

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura fabricado pela Hitachi, modelo TM- 1000, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa) acoplado com sistema para micro análise químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS.

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

A caracterização por FTIR foi realizada através da análise de espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier da PERKINELMER SPECTRUM 400, para identificar as bandas características dos grupos funcionais, presentes nas matérias-primas utilizadas nesta pesquisa e nos arcabouços produzidos utilizando a faixa de varredura na região do infravermelho médio de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.4.4 Grau de Intumescimento

O ensaio de avaliação do Grau de Intumescimento é aplicado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em soluções aquosas de concentração iônica similar à do plasma sanguíneo.

Para realização deste ensaio os arcabouços foram imersos em PBS (pH 7.4). As amostras foram cortadas, pesadas e inseridas na referida solução, utilizadas em triplicata. Após o período pré-determinado (24h), os arcabouços foram retirados, a

água adsorvida na superfície foi removida através de papel de filtro e o peso úmido foi registrado. O grau de intumescimento foi determinado pela equação 1.

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_f - M_o}{M_o} \times 100 (\%) \quad (1)$$

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

4.4.5 Difração de Raios X

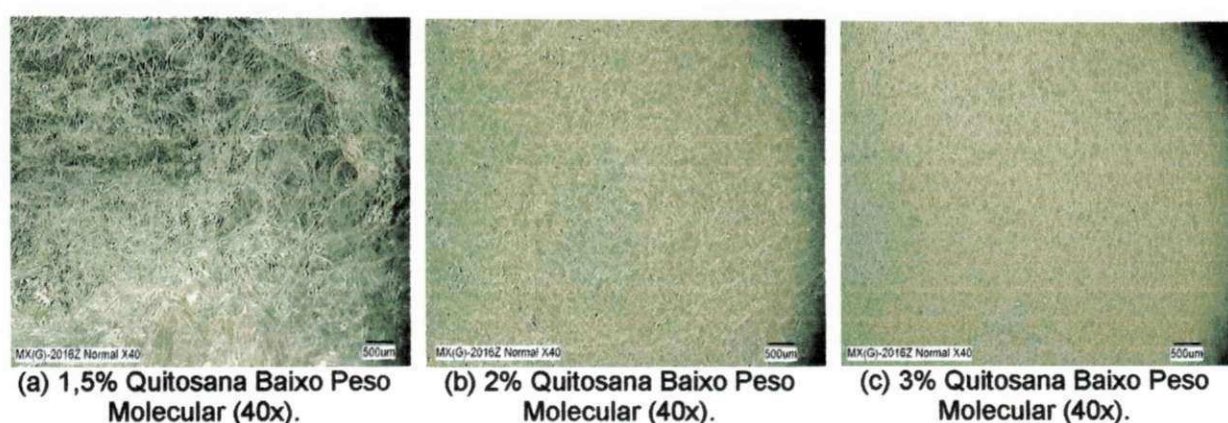
As matérias primas na forma de pó, quitosana de baixo e médio peso molecular, e as amostras dos arcabouços foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular variando de 10° a 50° com passo de $0,06^\circ/\text{min}$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ na tensão de 40kV e corrente 30mA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MICROSCOPIA ÓTICA

A Figura 5 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%, submetidos ao estágio de congelamento por 24 horas.

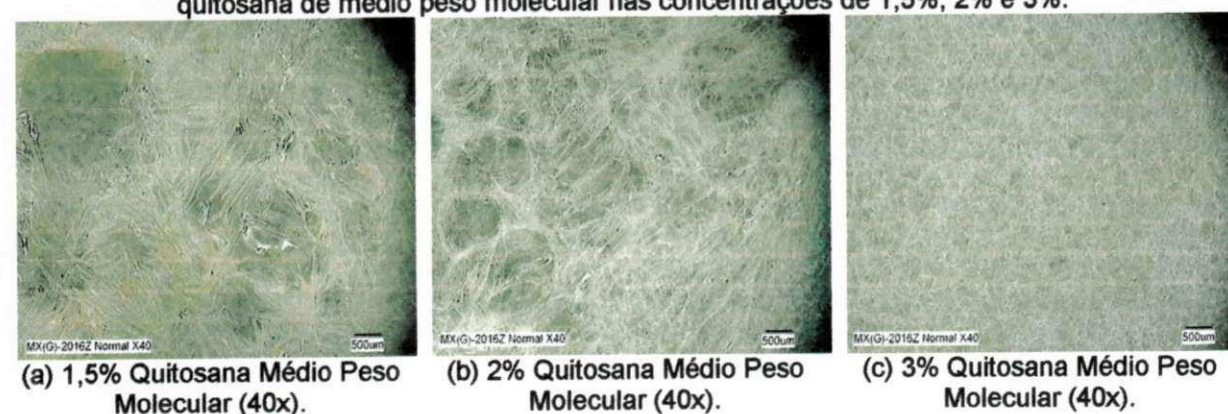
Figura 5 - Micrografias (MO) da seção superficial dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.



Analisando a Figura 5, pode-se observar que, mantendo a massa molar, à medida que se aumenta a concentração de quitosana ocorre uma densificação dos arcabouços. A Figura 5a demonstra uma superfície mais irregular quando comparado com os demais arcabouços.

A Figura 6 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%, submetidos a estágio de congelamento por 24 horas.

Figura 6 - Micrografias (MO) da seção superficial dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.



Analisando a Figura 6, pode-se observar que os arcabouços apresentaram um comportamento diferente dos arcabouços de quitosana de baixo peso molecular, no qual pode-se observar uma maior densificação apenas nos arcabouços de 3% (Figura 6c).

De acordo com as imagens (Figura 6) pode-se observar a formação porosa das estruturas dos arcabouços através da identificação de alguns poros situados no plano de foco. As imagens também revelam a transparência das paredes internas da estrutura (Figuras 6a e 6b), tendo em vista a percepção da arquitetura do arcabouço através do plano de foco. Não foram observadas diferenças significativas quanto à variação da concentração da solução de quitosana de 1,5 % para 2 %.

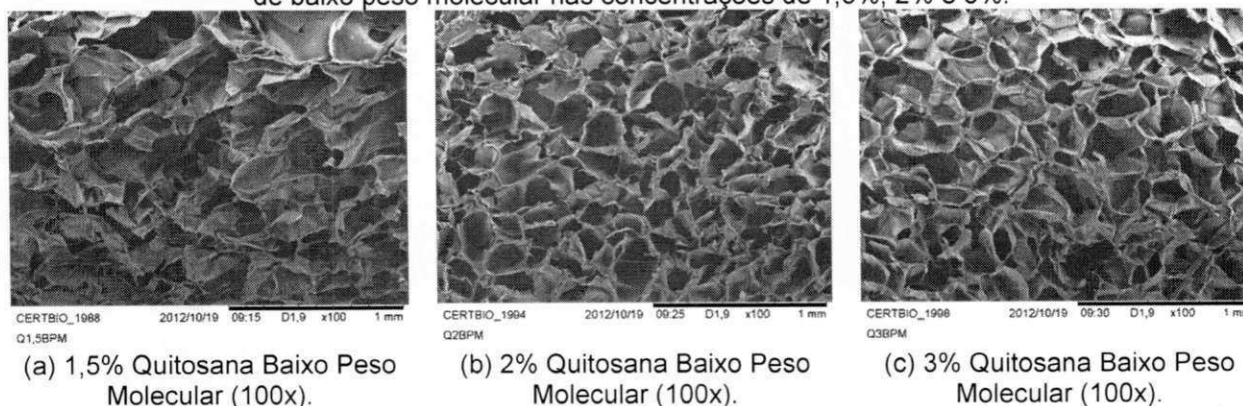
Assim, conclui-se que, nas condições desta pesquisa obteve-se uma maior uniformidade de poros para as concentrações de 3% independentemente da massa molar e, para o caso de aplicações onde for requerida uma distribuição de tamanho de poros mais larga, as concentrações de 1,5% para baixo peso molecular e, 1,5% e 2% para médio peso molecular, seriam as concentrações recomendadas.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Uma alta porosidade e interconectividade entre os poros são essenciais para permitir tanto a difusão de nutrientes e o transporte de oxigênio através do arcabouço, quanto à remoção de produtos metabólicos gerados durante o crescimento celular (LI et al., 2010).

A Figura 7 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%, submetidos ao estágio de congelamento por 24 horas.

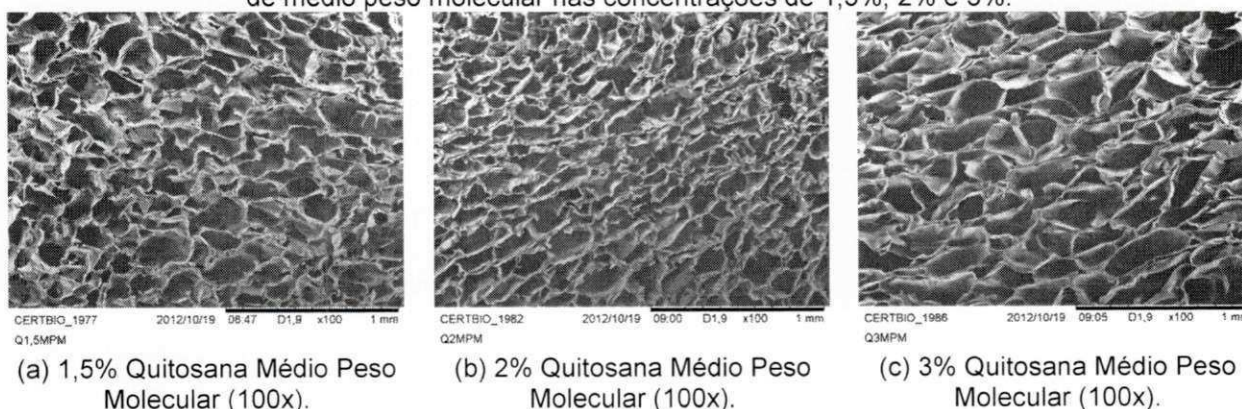
Figura 7 - Micrografias (MEV) da seção interna dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de baixo peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.



Analisando a Figura 7a pode-se perceber que o arcabouço de quitosana com concentração de 1,5%, apresentou em sua secção interna uma estrutura porosa irregular, formado por macroporos com formatos indefinidos. Através das Figuras 7a e 7b, pode-se perceber que os arcabouços preparados com quitosana de baixo peso molecular, apresentaram uma formação porosa extratiforme, uma vez que os cristais de gelo crescem e solidificam na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro da solução. Contudo, pode-se constatar que, com o aumento da concentração ocorre um aumento na quantidade de poros, o formato dos poros é poligonal e mais uniforme, independentemente do seu tamanho e há formação de poros com contornos mais esféricos e definidos.

A Figura 8 apresenta as micrografias dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%, submetidos a estágio de congelamento por 24 horas.

Figura 8 - Micrografias (MEV) da seção interna dos arcabouços liofilizados preparados com quitosana de médio peso molecular nas concentrações de 1,5%, 2% e 3%.

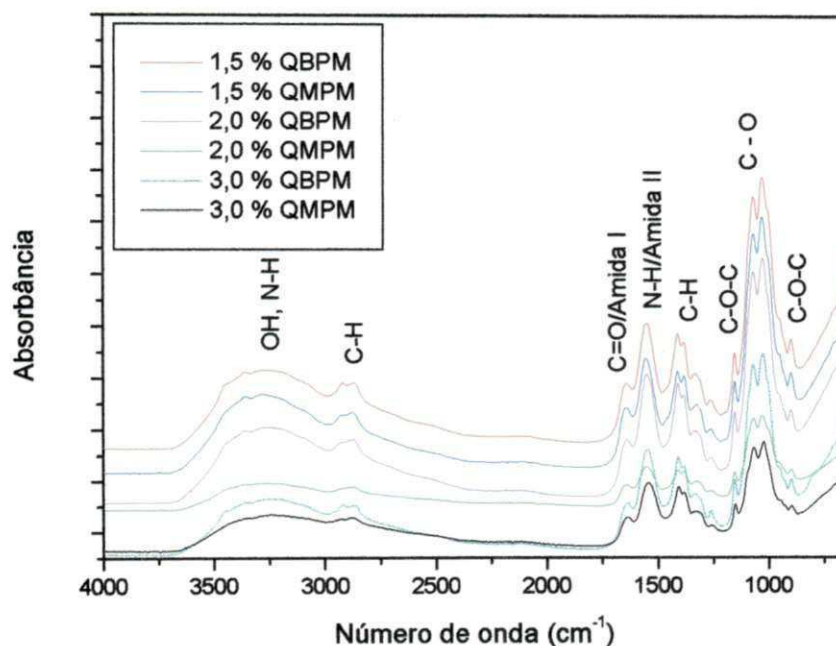


Analisado a Figura 8, constata-se que os arcabouços preparados com quitosana de médio peso molecular apresentaram uma região interna formada por macroporos com tamanhos variando entre 200 μm - 1 mm. A formação dos macroporos nessa faixa de tamanho pode ser atribuída ao processo de congelamento da solução. Madihally e Matthew (1999) mostraram que o tamanho e a morfologia do poro é diretamente influenciada pela temperatura de congelamento, concentração da solução polimérica e distância da parede do molde.

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A Figura 9 apresenta os espectros de FTIR dos arcabouços de quitosana.

Figura 9 - Espectro vibracional de IV dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.



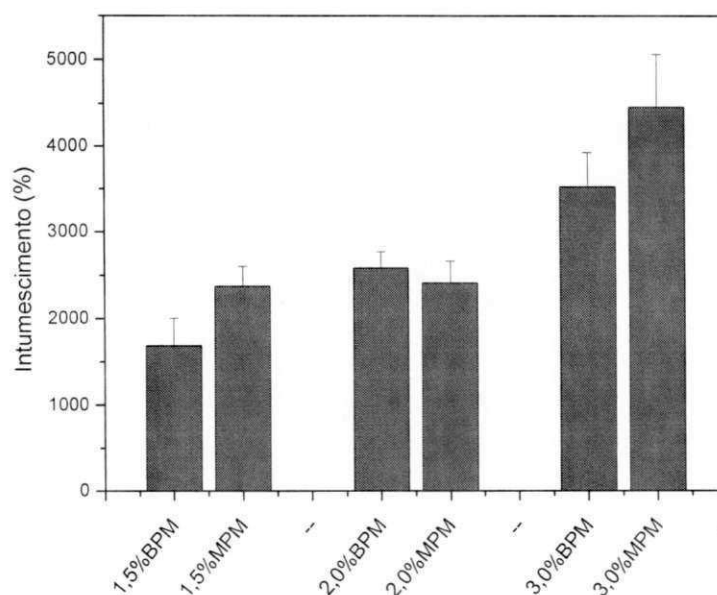
As amostras foram caracterizadas após a etapa de neutralização. Os espectros obtidos para os arcabouços apresentaram todas as bandas características da quitosana, independentemente das concentrações estudadas. O espectro de infravermelho da quitosana em pó apresentou as seguintes bandas características: estiramento axial de -OH entre 2986 e 3689 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C = O de amida por volta de 1646 cm^{-1} ; deformação angular de N-H em aproximadamente 1539 cm^{-1} ; deformação angular simétrica de CH_3 em 1365 cm^{-1} ; bandas de estruturas polissacarídicas na região em 889 e 1142 cm^{-1} . O espectro obtido está de acordo com os espectros característicos da quitosana descritos por Aimoli (2007), Antonino (2007), Fidèles (2010) e Lima (2010).

5.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A Figura 10 compara a capacidade de intumescimento dos arcabouços. Nota-se que todas as composições apresentaram alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução, uma vez que absorvem mais água do que seus próprios pesos, ou seja, apresentaram valores de absorção de água acima de 100%.

O grau de intumescimento está relacionado a taxa de absorção ou permeabilidade a solventes e é influenciado pela resistência química da rede polimérica no gel (GEHRKE, 2000).

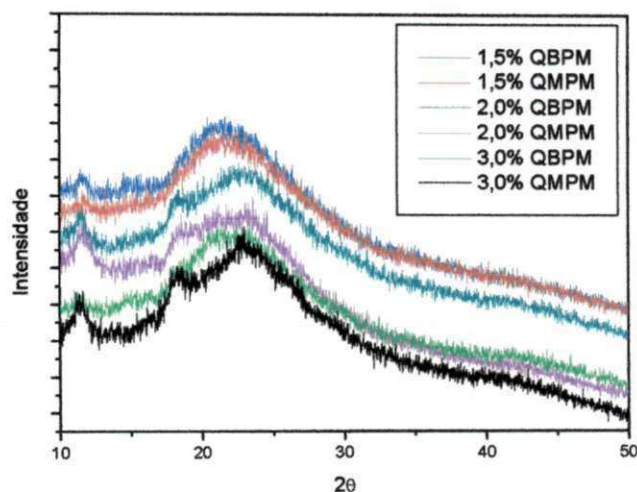
Figura 10 - Grau de Intumescimento dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.



Analisando a Figura 10, pode-se observar que o aumento da concentração de quitosana provocou um aumento significativo no grau de intumescimento. De acordo com Assis e Silva (2003), outro aspecto que contribui para uma maior retenção de água é a estrutura porosa dos arcabouços, pois os poros facilitam a permeação e subsequente retenção de água na matriz polimérica. A hidrofiliçidade da quitosana, em particular, se dá como função de seus grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares (ASSIS, SILVA, 2003).

A Figura 12 apresenta os difratogramas de DRX dos arcabouços liofilizados de quitosana com baixo e médio peso molecular, obtidos com variadas concentrações da solução de quitosana.

Figura 12 - DRX dos arcabouços de quitosana 1,5%, QBPM, 1,5QMPM, 2%QBPM, 2%QMPM, 3%QBPM e 3%QMPM.



Observa-se que quanto maior a concentração da solução de quitosana mais acentuadas as reflexões em 2θ a $11,55^\circ$, $18,28^\circ$ e $22,79^\circ$, indicando uma estrutura melhor organizada/ordenada em longas distâncias.

Analisando os difratogramas (Figuras 12 e 13), pode-se perceber que a etapa de processamento para todas as concentrações e massas molares pesquisadas acarretou uma redução na cristalinidade do material.

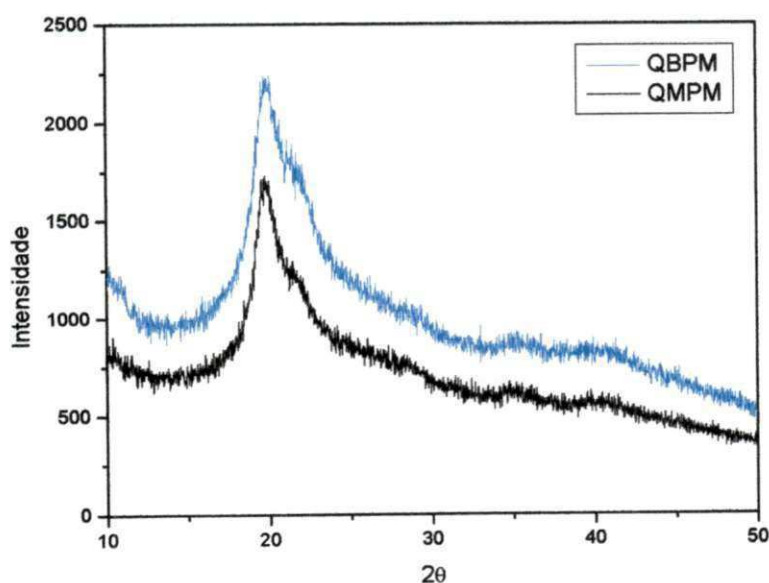
Essa habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de nutrientes e metabólitos (THEIN-HAN e KITIYANANT, 2007).

Constata-se que, com o aumento da massa molar há um aumento gradativo do fenômeno de absorção entre 1,5% e 3%. Contudo, este fenômeno não ocorreu para a concentração de 2% e, isto deve esta associado ao tipo de poro formado nesta concentração de quitosana.

5.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A Figura 11 apresenta os difratogramas de DRX dos pós de quitosana com baixo e médio peso molecular.

Figura 11 - Difratograma de Raios X da Quitosana em pó. (QBPM) Quitosana de Baixo Peso Molecular e (QMPM) Quitosana de Médio Peso Molecular.



Analisando a Figura 11, pode-se observar que o pó de quitosana utilizado apresenta uma estrutura típica de um polímero semicristalino com dois picos de reflexão em 2θ aproximadamente a 20° (Figura 11), características dos difratogramas de quitosana apresentados por autores como Aimoli (2007) e Lima (2010).

6 CONCLUSÕES

- Os arcabouços porosos de quitosana foram desenvolvidos utilizando o método Freeze Drying.
- Os estudos morfológicos dos arcabouços demonstraram a formação de uma arquitetura tridimensional com poros, influenciados pela concentração da solução.
- Pode-se perceber o aumento do número de poros da estrutura com o aumento da concentração da solução, tanto para os arcabouços preparados com solução de quitosana de baixo peso molecular como também para os arcabouços preparados com a solução de quitosana de médio peso molecular.
- A técnica de espectroscopia na região do infravermelho identificou todas as bandas características da quitosana independentemente da concentração da solução de quitosana. Contudo, a partir da concentração de 2% ficou evidenciado a atenuação de algumas absorções específicas.
- Os arcabouços apresentaram alta capacidade de intumescimento em todas as composições. Essa característica foi influenciada tanto pela arquitetura quanto pela concentração de quitosana dos arcabouços.
- As análises por Difração de Raios X demonstraram que o processo de liofilização reduziu a cristalinidade do material.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Pathologic basis veterinary disease. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. p.101-191.
- AIMOLI, C. G. *Investigação da adequação de membranas de quitosana quimicamente modificadas para uso como biomaterial: estudo da calcificação invitro*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2007.
- AKUTSU, T. *Artificial Cardiac Prostheses*. In Norman, Cardiac Surgery. Appleton-Century- Crofts. New York, (1972).
- ANTONINO, N. A. *Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana*. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.
- ARGUELLES, C.P.W.; GALLARDO, A.; ELVIRA, C.; SAN ROMÁN, J. Quitosana: In polissacárido natural biodegradável biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicine. *Revista de Plásticos Modernos* 2001, 585, 81-91.
- ARRUDA, E.R.B., RODRIGUES, N.C., TACIRO, C., PARIZOTTO, N.A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev. Bras. Fisioterapia*, v.11, n. 4, p. 283-288, 2007
- ASSIS, O.B.G., SILVA, V.L., "Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações". *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13(4), p. 223-228, 2003.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C., DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15** (1), 13-21, (2005).
- BEANES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, 2003.
- BLOM, A. Which scaffold for which application?. **Curr. Orthop.**, v.21, p.280-287, 2007.
- BOSCHI, A. O. - "O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial?", in: Congresso Anual da Associação Brasileira de Metalurgia, p.43, São Paulo - SP (1996).

BOSS, J. H.; SHAJRWA, J.; ARENULLAH, J.; MENDES, D. G. The Relativity of Biocompatibility. A Critical of the Concept of Biocompatibility. *Israel J Med Sci* 1995;31(4):203-9.

BRASIL. Ministério da Saúde. Subchefia de Assuntos Parlamentares. **EM n^o 00083/GM/MS**. Brasília, 26-10-2005.

CAMERON, P., ed. Good pharmaceutical freeze-drying practice. Buffalo Grove: Interpharm, 1997. 303p.

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

CANDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Senac, 2001. 268 p.

CANELLA, K., GARCIA, R. Caracterização de Quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do Método de Preparação e do Solvente. *Quim. Nova*. 24, 13 - 17. 2001.

CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatment on the physical. *Biomaterials*. v. 24. p. 759-76. 2003.

CORRELO, V. M.; GOMES, M.E.; TUZLAKOGLU, K.; OLIVEIRA, J.M.; MALAFAYA, P.B.; MANO, J.F.; NEVES, N.M.; REIS, L.R. Tissue engineering using natural polymers. In: *Biomedical polymers*. Ed. Jenkins, M. Woodhead Publishing Ltda.: Cambridge, 2007.

COSTA JÚNIOR, Ezequiel de Souza. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DAI, T.; TANAKA, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(7):857-79.

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

DAVIS, K. A., ANSETH, K.S. Controlled Release from Crosslinked Degradable Networks. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, n.4-5, p.385-423, 2002.

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

DUDHANI, A. R. K. S. Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. *Carbohydr Polym.* 2010;81:243–51.

DUEK, E. A. R., ZAVAGLIA, C. A. C. & BELANGERO, W. D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer.* v40, p. 6465-6473, 1999.

EDMUNDS, H. L. *The Sangreal. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **90**, 1- 6, (1985).

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

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

FRANKS, F. *Freeze-drying of pharmaceutical and biopharmaceuticals: principles and practice.* RSC Publishing: Cambridge, 2007.

GALLETTI, P.M.; BRECHER, G.A. *Heart-Lung Bypass.* Principles and Techniques of Extracorporeal Circulation. Grune & Stratton, New York, (1962).

GEHRKE, S. H. Synthesis and Properties of Hydrogels used for Drug Delivery. *Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics.* Marcel Dekker, New York, (2000).

GOOSEN, M. E. A – “Applications of chitin and chitosan”, *Technomic Publishing Company*, Lancaster (1996).

GREEN, W. T. Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1977, **124**, 237.

HARRIS, L.D, KIM, B. e MOONEY, D.J. 1998. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1998, Vol. **42**, pp. 396-402.

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

HIRANO, S.; MIDORIKAWA, T. Novel method dor the preparation of N-acylchitosan fiber and N-acylchitosan-cellulose fiber. *Biomaterials* 19:293-7, 1998.

HO, M. H. et al. Preparation and chacacterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomateriais.* v.26. p. 3179-3206. 2005.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v.4, p.518-590, 2005.

HUTMACHER, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, vol. 21, p. 2529-2543, 2000.

HUTMACHER, D.W., SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. 2004. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnology*. 2004, Vol. 22, pp. 354-362.

IAMAGUTI, L.S.; BRANDÃO, C.S.V.; PELLIZZON, C.H.; RANZANI, J.J.T; MINTO, B.W. Análises histológica e morfométrica do uso de membrana biossintética de celulose em trocleeoplastia experimental de cães. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 28, n. 4, p. 195-200, 2008.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v.3, n.10, p.589-601. 2006.
In: *Tissue Engineering*. (Bronzino, ed.) CRC Press, Boca Raton, 2007.

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

JIANG, T. et al. I vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. v. 27, p. 4894-4903, 2006.

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

KAPLAN, DL. *Introduction to Biopolymers from renewable resources*. In: **Biopolymers from renewable resources**, Springer-Verlag (1998) 1-29.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 1-21, 2008.

KONG, L.; AO, Q.; WANG, A.; GONG, K.; WANG, X.; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. **J Biomaterials Applications**. v. 22. p. 223-239. 2007.

KRAJEWSKA, B, Synthesis, Characterization controlled drug release of thermosensitive IPN-PNIPAAm hydrogels. **Biomaterials**, v. 25, p. 3793-805, 2004.

LAINE, P.; KONTIO, R.; LINDQVIST, C.; SUURONEN, R. Are there any complications with bioabsorbable fixation devices? A 10 year review in orthognathic surgery. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** 2004; 33: 240-244.

LANGER, R. Selected advances in drug delivery and tissue engineering. **J. Controlled Release** 62: 7-11. 1999.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. *Science*, vol. 260, p. 920-926, 1993.

- LAVIK, E. B.; KLASSEN, H.; WARFVINGE, K.; LANGER, R.; YOUNG, M. J. Fabrication of Degradable Polymer Scaffold to Direct the Integration and Differentiation of Retinal Progenitors. **Biomaterials**, v.26, p.3187-3196, 2005.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. In: GOOSEN, M. F. A. (Ed.) **Applications of chitin and chitosan**. Basel: Technomic, p. 3 – 29, 1997.
- LI, Y.; WANG, Y.; WU, D.; ZHANG, K.; HU, Q. A facile approach to construct threedimensional oriented chitosan scaffolds with in-situ precipitation method. *Carbohydrate Polymers*. v. 80, p. 408-412, 2010.
- LIMA, R. S. C. *Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina*. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.
- LUCIANO, R. M.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R.; Alberto-Rincon, M. C. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: Studies in vivo and in vitro. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2003. 14(1): p. 87.
- LUO, Y. *et al.* Three-Dimensional Scaffolds. *Principles of Tissue Engineering*, 3 ed., 2007.
- MA, P.X.; ZHANG, R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.46, p. 60-72, 1999.
- MADIHALLY, S. V; MATTHEW, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133- 1142, 1999.
- MAUNEY, J. R. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*. v. 26. p. 3175-3185. 2005.
- MIKOS, A.G, *et al.* 1996. Polymer Membranes and Methods of Preparation of Three Dimensional Membrane Structures. **US Patent**, 5514378 7 de Maio de 1996.
- MURPHY, M.B. e MIKOS, A.G. Polymer scaffold fabrication. [A. do livro] Lanza, Langer e Vacanti. **Principles of tissue engineering**. pp. 309-321.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitin. In: MARK, H. F.; BIKALES, N. M.; OVERBERGER, C. G.; MENGES, G. (Eds.). *Encyclopedia of polymer science and engineering*. 2 ed. New York: John Wiley, 1985. v. 3, p. 430-441.
- O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, v.25, n.6, p.1077-1086, 2004.
- OLSSON, D.C. —Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. *Ciência Rural*, v.38, n.8, 2008.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Editora Cultura Médica, 2006.

PAIVA, A. O. Obtenção, caracterização e estudo in vitro do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxibutirato. Dissertação (Mestrado). Univeridade Federal de Itajubá. 2005.

PATAPOFF, T. W.; OVEERCASHIER, D. E. The importance of freezing on lyophilization cycle development. *BioPharm*, v. 15, n 3, p. 16-21, 2002.

PATIST, C.M., et al. 2004. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophoc factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, pp. 1569-1582.

PEZZIN, A.P.T. e DUEK, E.A.R. 2002. Hydrolytic degradation of poly(para-dioxanone) prepared by casting or phase separation. **Polymer Degradation and Stability**. 2002, Vol. 78, pp. 405-411.

QIN, Y.; AGBOH, O. C. Chitin and chitosan fibres. **Med Dev Technol**. 1998 ; 9(10):24}8

RATHKE TD, HUDSON SM. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *Rev Macromol Chem Phys* 1994;C34:375}437.

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

REGE, J. P.; BLOCK, L. H. Chitosan Processing: Influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research* 321: 235-245, 1999.

REIS, C. C. R. et al. Influence of porosity and fibre diameter on the degradation of chitosan fibre-mesh scaffolds and cell adhesion. *J. Mater Sci: Mater Med*. v. 18. p. 195-200. 2007.

ROBERTS, G. Chitin Chemistry. London, The Macmillan Press LTD, 1992, 349p.

ROBEY, P.G. Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest.*, vol. 105, p. 1489-1491, 2000

RODAS, A. C. D. **Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos**, São Paulo: Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2004. 149p. (Tese, Doutorado em Ciências, Tecnologia Nuclear-Aplicações).

SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 81-88, 2000.

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

SAMPAIO, Greyce Yane Honorato. **Desenvolvimento de Arcabouços Biodegradáveis para Regeneração de Tecidos Cartilagosos.** 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Pele normal: anatomia e fisiologia. In: SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia.** 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 3-35.

SANTOS Jr., A.R; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como arcabouços para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros – Ciência e Tecnologia*, vol. 17, n. 4, p. 308-317, 2007

SEAL, B.L., OTERO, T.C., PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Material Science and Engineering**, v. 34, p.147-230, 2001.

SENISE, R.S.; JOLY, J.C.; LIMA, A.F.M. Utilização de barreiras biodegradáveis de colágeno no tratamento de lesões de bifurcação grau II – Relato de casos clínicos *Revista Periodontia*, Maio/Dezembro, p.1-12, 1999.

SHERIDAN, R. L., TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v.25, p.97-103, 1999.

SHI, C.; ZHU, Y.; RAN, X.; WANG, M.; SU, Y.; CHENG, T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J. Surg. Res.* v. 133. p. 185-192. 2006.

STEINBÜCHEL, Alexander. EVERSLOH, Tina L Metabolic engineering pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, n.16, p. 81-96. 2003

STEINBÜCHEL, Alexander. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example: *Macromolecular Bioscience*, v.1, n.1, p 1-13. 2001.

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

THEIN-HAN, W. W.; KITIYANANT, Y., 2007, "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, n. 1, pp. 92-101.

WAN, Y et al. Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering II. In vitro and in vivo degradation. *J. Mater Sci: Mater Med.* v. 16. p. 1017-1028. **2005.**

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

WILLIAM, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials*. Elsevier, 2008 p. 2941-2953.

WU, L. B.; DING, J. D. 2004 In vitro degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25, 5821–5830.

WU, Y. C. et al. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cell cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*. v. 27. p. 896-904. 2006.

YOON, D.M.; FISHER, J.P. *Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications*.