



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido

Autora: Cheisy Daiana Freitas Moreira

Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira

Janeiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Cheisy Daiana Freitas Moreira

Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de Concentração: Ciência e Engenharia dos Materiais

Orientadora: Prof. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2014

*Dedico este trabalho a minha família,
pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, desafios e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, por me proporcionarem segurança, sabedoria e disciplina. Obrigada mamãe e papai, vocês me ensinaram a ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu padrasto, por me tratar como filha e me oferecer condições para investir em meus estudos. Muito obrigada, se não fosse pelo seu incentivo eu não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos, namorado e amigos, pela compreensão nos momentos em que precisei trocar o lazer por horas de estudo.

À professora Marivalda Magalhães, pela orientação e amizade. Obrigada pela confiança depositada em mim e em minha proposta de trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, especialmente Agda Oliveira, Sandhra Carvalho, Taís Macedo, Breno Barrioni e Talita Martins, pelo companheirismo e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Professor Herman Mansur e à Dra. Alexandra Mansur, por disponibilizarem treinamento e a infraestrutura do Laboratório de Materiais Optoeletrônicos.

Ao departamento de Engenharia Química da UFMG, pela disponibilidade de infraestrutura do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros (LCTP). Agradeço especialmente ao Professor Ricardo Sousa e a técnica do laboratório, Cynthia Erbeta, pela atenção e carinho com que me atenderam e ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Professor Gregory Kitten, do Departamento de Ciências Biológicas da UFMG, e sua aluna de doutorado Thalita Valverde, por me fornecerem não só matéria-prima para execução do trabalho, mas também pela atenção e disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas e me orientar na execução dos ensaios.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho e participação de eventos para divulgá-lo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	4
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Engenharia de Tecidos e Biomateriais</i>	5
3.2. <i>Hidrogéis e Sistemas Injetáveis</i>	7
3.3. <i>Vidro Bioativo</i>	11
3.4. <i>Colágeno</i>	16
3.5. <i>Quitosana</i>	20
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. <i>Etapas de desenvolvimento do trabalho</i>	24
4.2. <i>Matéria-Prima</i>	24
4.3. <i>Caracterização da matéria-prima</i>	25
4.3.1. <i>Quitosana</i>	25
Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	25
Determinação do grau de desacetilação.....	25
Difração de Raios X (DRX)	26

Análise Térmica.....	26
4.3.2. Colágeno.....	27
Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	27
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
Difração de Raios X (DRX)	28
Análise Térmica.....	28
4.3.3. Vidro bioativo.....	28
Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	30
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
4.4. <i>Síntese dos hidrogéis termossensíveis</i>	30
4.5. <i>Caracterização dos hidrogéis preparados</i>	31
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
4.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	32
4.5.3. Ensaio Reológico.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. <i>Caracterização das matérias-primas</i>	33
5.1.1. Quitosana.....	33
Espectroscopia na Região do Infravermelho	33
Determinação do grau de desacetilação.....	34
Difração de Raios X (DRX)	35
Análise Térmica.....	36
5.1.2. Colágeno.....	39
Espectroscopia na Região do Infravermelho	39
Difração de Raios X (DRX)	40
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
Análise Térmica.....	42
5.1.3. Vidro bioativo.....	43
Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	43
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
Difração de Raios X (DRX)	44
5.2. <i>Caracterização dos hidrogéis</i>	45
5.2.1. Síntese e Avaliação qualitativa dos hidrogéis	45

5.2.2. Caracterização Morfológica	49
5.2.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	52
5.2.4. Ensaio Reológico.....	55
6. CONCLUSÕES.....	62
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
8. REFERÊNCIAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas envolvidas na técnica de Engenharia de Tecidos.	5
Figura 2. Representação esquemática de (a) hidrogel químico e (b) hidrogel físico.	8
Figura 3. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas LCST e UCST.....	9
Figura 4. Representação esquemática do processo sol-gel.....	13
Figura 5. Representação esquemática da reação sol-gel em pH menor que 2.....	15
Figura 6. Representação esquemática da reação sol-gel em pH entre 2 e 7.....	15
Figura 7. Representação esquemática da reação sol-gel em pH maior que 7.....	16
Figura 8. Estrutura de tríplice hélice do colágeno. (A) Vista ao longo do eixo molecular; (B) Vista lateral, mostrando a formação da tríplice hélice.	18
Figura 9. Representação esquemática do arranjo das moléculas de colágeno em estruturas fibrilares e de fibras.....	19
Figura 10. Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana.....	21
Figura 11. Representação esquemática do comportamento da quitosana em diferentes valores de pH.	21
Figura 12. Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.	24
Figura 13. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo.	29
Figura 14. Espectro FTIR da quitosana comercial em pó.	33
Figura 15. Curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	35
Figura 16. Célula unitária ortorrômbica da quitosana.	35
Figura 17. Difratoograma da quitosana comercial.	36
Figura 18. Curva TGA da quitosana comercial sob atmosfera de N ₂	37

Figura 19. Curva DSC da quitosana comercial sob atmosfera de N ₂	38
Figura 20. Espectro FTIR do colágeno puro.	39
Figura 21. Estrutura dos grupos amida presentes na molécula de colágeno.	40
Figura 22. Difratoograma do gel de colágeno 2mg.mL ⁻¹	41
Figura 23. Micrografias (MEV) do gel de colágeno tipo I.	42
Figura 24. Curva TGA do colágeno em atmosfera de N ₂	42
Figura 25. Espectros FTIR das nanopartículas de vidro bioativo. (A) 4000-600cm ⁻¹ . (B) ampliação do espectro (2000-600cm ⁻¹)	43
Figura 26. Micrografias (MEV) das nanopartículas de vidro bioativo. (A) aumento de 5000x, (B) aumento de 20000x.	44
Figura 27. Difratoograma das nanopartículas de vidro bioativo.	45
Figura 28. Fotos digitais dos hidrogéis produzidos (25 e 37°C). (A) hidrogel de quitosana; (B) colágeno puro; (C) hidrogel quitosana/colágeno (70/30).	46
Figura 29. Representação esquemática das interações entre quitosana e β-GP.	47
Figura 30. Variação de pH das amostras com adição de β-GP e vidro bioativo.	48
Figura 31. Micrografias (MEV) das amostras em diferentes ampliações: 100Q (A e B) e 70Q (C e D).	50
Figura 32. Micrografias (MEV) das amostras contendo 2% de vidro bioativo. (A) 100Q2V; (B) 70Q2V.	51
Figura 33. Espectros EDS das respectivas imagens MEV dos hidrogéis (A) 100Q2V e (B) 70Q2V.	52
Figura 34. Espectros FTIR dos hidrogéis formulados (4000-600cm ⁻¹).	53
Figura 35. Espectros FTIR: (A) Hidrogéis formulados (2000-700cm ⁻¹); (B) Sal β-GP (2000-700cm ⁻¹).	54

Figura 36. Perfil do comportamento reológico dos hidrogéis frente ao aquecimento controlado. (A) amostra 100Q; (B) amostra 70Q.....	56
Figura 37. Comportamento viscoelástico da amostra 100Q frente à varredura de deformação (<i>strain sweep</i>). (A) varredura de 1×10^{-4} - 1,00 (B) 0,01-0,03 (faixa de viscosidade linear).....	59
Figura 38. Resultado do teste <i>Time Sweep</i> (para determinação do tempo de gelificação) da amostra 100Q.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Reações na interface biomaterial-tecido para a formação da camada de HCA	11
Tabela 2. Classes, tipos e características de diferentes tipos de colágenos.	17
Tabela 3. Relação entre estrutura e propriedades da quitosana.	22
Tabela 4. Descrição das amostras estudadas.	31
Tabela 5. Resultados de TGA e DSC para a decomposição térmica da quitosana comercial.	39
Tabela 6. Temperatura de gelificação e valores de G' e G'' das formulações propostas.	57
Tabela 7. Tempo de gelificação das amostras estudadas.	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP	Atividade de fosfatase alcalina
ATR	Reflectância total atenuada (do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BG	Vidro bioativo (do inglês, <i>bioactive glass</i>)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>Differential scanning calorimetry</i>)
FTIR	Espectroscopia por Reflexão Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
G'	Módulo de perda (ou módulo elástico)
G''	Módulo de armazenamento (ou módulo viscoso)
GD	Grau de desacetilação
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxiapatita Carbonatada (do inglês, <i>hydroxyl carbonate apatite</i>)
LCST	Temperatura de solução crítica inferior (do inglês, <i>Lower Critical Solution Temperature</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PEO	Poli(óxido de etileno)
PGA	Poli(ácido glicólico)

PI	Ponto isoelétrico
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PZC	Ponto de carga zero (do inglês, <i>point of zero charge</i>)
SBF	Fluido corporal simulado (do inglês, <i>simulated fluid body</i>)
TCP	Tricálcio fosfato (do inglês, <i>tri-calcium phosphate</i>)
TEOS	Tetraetil ortosilicato (do inglês, <i>tetraethyl orthosilicate</i>)
TEP	Trietil fosfato (do inglês, <i>triethyl phosphate</i>)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, <i>thermogravimetric analysis</i>)
UCST	Temperatura de solução crítica superior (do inglês, <i>Upper Critical Solution Temperature</i>)
β -GP	β -glicerofosfato

RESUMO

Recentemente, os hidrogéis tem ganhado destaque na engenharia de tecido, pois podem ser aplicados como matrizes injetáveis. Esses sistemas, que apresentam gelificação *in situ*, apresentam vantagens sob os *scaffolds* pré-formados, tais como: possibilidade de implantação minimamente invasiva, capacidade de preencher a cavidade danificada e fácil incorporação de agentes terapêuticos. Frente ao potencial desses sistemas, este estudo se propôs a preparar e caracterizar hidrogéis termossensíveis de quitosana e avaliar os efeitos da adição de colágeno e nanopartículas de vidro bioativo, em proporções variadas. Antes do preparo dos hidrogéis, as matérias-primas foram caracterizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR), difração de raios X (DRX) e análise térmica (TGA e DSC), de forma a avaliar suas propriedades e grau de pureza. Após vários ajustes de fórmula, foi possível a obtenção de hidrogéis com temperatura de gelificação próximo aos 37°C. A caracterização das amostras foi realizada por MEV, FTIR e ensaios reológicos. As micrografias de MEV mostraram que os hidrogéis possuem estrutura porosa, sendo que a adição de colágeno provoca um aumento no tamanho dos poros. Pelos espectros FTIR constatou-se a presença das bandas características de cada componente do sistema com a ausência de novas bandas. Por meio dos ensaios reológicos foi possível avaliar o comportamento viscoelástico dos hidrogéis frente ao aumento de temperatura e determinar o tempo de gelificação à 37°C. Os resultados mostraram que a adição de colágeno e vidro bioativo provocam um aumento na rigidez dos hidrogéis após a gelificação e que todas as formulações propostas sofrem gelificação em um intervalo de tempo relativamente curto, cerca de 4 minutos.

Palavras-chave: hidrogéis termossensíveis, matrizes injetáveis, quitosana, colágeno, vidro bioativo.

ABSTRACT

Recently, hydrogels have gained notoriety in tissue engineering because they can be applied as injectable scaffolds. These systems, which present *in situ* gelation, have advantages over preformed scaffolds, such as the possibility of minimally invasive implantation, ability to fill the damaged cavity and easy incorporation of therapeutic agents. Due to the potential of these systems, this study aimed at prepare and characterize thermosensitive hydrogels of chitosan and evaluate the effects of collagen addition and bioactive glass nanoparticles, in different proportions. Before the preparation of hydrogels, the raw materials were characterized by thermal analysis (TGA and DSC), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) to assess its properties and purity. After several adjustments of the formula, it was possible to obtain hydrogels with gelation temperature of approximately 37°C. The samples characterization was performed by SEM, FTIR and rheological tests. SEM micrographs show that the hydrogels have a porous structure and the addition of collagen causes an increase in pore size. FTIR spectra showed characteristic bands of each component of the system with the absence of new bands. Rheological measurements allowed the assessment of the viscoelastic behavior of the hydrogels against temperature increase and determine the gelation time at 37°C. The results showed that the addition of collagen and bioactive glass cause an increase in stiffness after gelation of the hydrogel and that all proposed formulations undergo gelation in a relatively short period of time, approximately 3 minutes.

Keywords: thermosensitive hydrogels, injectable scaffolds, chitosan, collagen, bioactive glass.

1. INTRODUÇÃO

Entre as estratégias ligadas à reconstrução tecidual, os biomateriais se destacam por ser uma alternativa mais versátil e passível de desenvolvimento entre todas as outras. Além da possibilidade de escolha entre uma gama de materiais, ainda é possível fazer manipulações estruturais a fim de melhorar a biocompatibilidade do dispositivo e aumentar as chances de sucesso nos procedimentos reparativos e regenerativos (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

O mercado brasileiro na área de biomateriais está em pleno aquecimento e há estimativas de que irá movimentar cerca de 1,7 bilhões de dólares em 2015. O aumento da expectativa de vida e o aumento da incidência de doenças crônicas, como os problemas cardiovasculares, estão entre os fatores que influenciam o aumento no número de biomateriais produzidos no país (“Brazil Biomaterial Market 2010-2015,” 2011).

Um dos grandes avanços no reparo/regeneração de tecidos danificados ou doentes é a utilização de sistemas injetáveis. Devido a possibilidade de serem administradas via seringa e agulha diretamente no tecido a ser tratado, essas matrizes possuem a habilidade de tomar a forma da cavidade e preencher defeitos irregulares e de tamanhos reduzidos de modo minimamente invasivo, reduzindo o desconforto e complicações para o paciente (KRETLOW; KLOUDA; MIKOS, 2007).

Os hidrogéis de polímeros biodegradáveis são constantemente empregados como matrizes nesses sistemas. Entre os polímeros naturais e seus derivados, a quitosana e o colágeno têm sido bastante utilizados no preparo de hidrogéis por apresentarem propriedades favoráveis como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, atividade microbiana, ausência de toxicidade, entre outras (ARCA; ŞENEL, 2008; GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI S.A., 2007; LEE; SINGLA; LEE, 2001).

A quitosana é obtida por meio da reação de desacetilação alcalina da quitina. Por apresentar baixa solubilidade em água e ser solúvel somente em soluções com pH abaixo de 6,5, é comum fazer modificações químicas nas cadeias da quitosana ou combiná-la a outros compostos a fim de lhe conferir novas propriedades. Para a obtenção de hidrogéis injetáveis é requerido que o sistema seja capaz de mudar do

estado líquido para gel à temperatura corporal. Para essa finalidade, a quitosana é normalmente combinada com sais de β -glicerofosfato, que estendem sua solubilidade a um valor de pH próximo a neutralidade e permite que o sistema apresente ponto de gelificação próximo aos 37°C (COUTO; HONG; MANO, 2009; RIVA et al., 2011).

As principais vantagens de se utilizar o colágeno, principalmente o tipo I, de origem natural, incluem sua abundância, baixo índice de reações imunológicas e capacidade de formar fibras a partir de preparações solúveis, cujas propriedades são similares às aquelas encontradas nos tecidos (CHAUDRY et al., 1997). Porém, apesar de sua versatilidade, o uso do colágeno é limitado devido a sua baixa resistência mecânica. Dessa forma, uma das alternativas para aumentar suas propriedades mecânicas é o estabelecimento de ligações cruzadas no material. Atualmente, estudos abordam o uso do colágeno reticulado com quitosana para produzir hidrogéis, que podem ser utilizados como matrizes injetáveis para regeneração tissular. Um desses estudos, conduzido por (DENG et al., 2010), mostrou que a adição da quitosana melhorou as propriedades físicas do hidrogel de colágeno, além de aumentar sua capacidade de recrutar e diferenciar as células endoteliais cultivadas.

Diversos estudos mostram as aplicações do vidro bioativo (*bioactive glass* – BG) na engenharia de tecido. Os vidros bioativos possuem a capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, levando à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (*hydroxyl carbonate apatite* - HCA), responsável pela formação de uma forte ligação entre o material e o tecido mole ou duro (RAHAMAN et al., 2011).

A combinação do gel polimérico a base de colágeno e quitosana com o vidro bioativo resulta na formação de um compósito bioativo com grande potencial para a regeneração tecidual. Couto e colaboradores (2009) desenvolveram um sistema constituído de quitosana e vidro bioativo para ser aplicado em reconstruções e regeneração ortopédica. Seus resultados mostram que foi possível obter uma boa dispersão das nanopartículas de vidro na matriz polimérica de quitosana, além de demonstrarem a indução de aglomerados de apatita após imersão em líquido corporal simulado (*simulated fluid body* - SBF) *in vitro*.

A viabilidade de obtenção de um sistema injetável a partir da combinação da quitosana, do colágeno e vidro bioativo são os pontos que norteiam e justificam o presente estudo. O caráter inovador deste estudo consiste em avaliar, do ponto de vista físico-químico, morfológico e reológico, o comportamento dos hidrogéis de quitosana frente à adição de colágeno e nanopartículas de vidro bioativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento (obtenção e caracterização) de uma matriz injetável formada por uma estrutura polimérica híbrida, à base de colágeno/quitosana e nanopartículas de vidro bioativo para utilização potencial na engenharia de tecidos.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a matéria-prima do ponto de vista físico-químico, a fim de avaliar a pureza e identificar suas propriedades.
- Obter hidrogéis termossensíveis baseados em quitosana e misturas de quitosana, colágeno e nanopartículas de vidro bioativo.
- Avaliar o efeito da adição do colágeno tipo I no hidrogel termossensível de quitosana.
- Avaliar o efeito da adição das nanopartículas de vidro bioativo nos hidrogéis.
- Caracterizar os hidrogéis sintetizados quanto à sua composição química, morfologia e comportamento reológico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Engenharia de tecidos e Biomateriais

A engenharia de tecidos é uma ciência multidisciplinar que visa o estudo e desenvolvimento de materiais e métodos para a reparação de tecidos danificados ou doentes. Atualmente, os estudos nessa área se inclinam para o desenvolvimento de matrizes tridimensionais (*scaffolds*) reabsorvíveis, juntamente com moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento que mimetizarão a matriz extracelular e estimularão a adsorção, multiplicação e diferenciação celular, promovendo a regeneração do tecido lesionado (COELHO, 2003; REIS, 2007).

Essa é uma área nova na medicina regenerativa, que ganhou destaque na década de 90, com estudos conduzidos por LANGER e VACANTI (1993). A Figura 1 ilustra o desenvolvimento da técnica, que consiste no recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes tridimensionais, para então serem reinsertidos no paciente e estimular a regeneração do tecido danificado (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

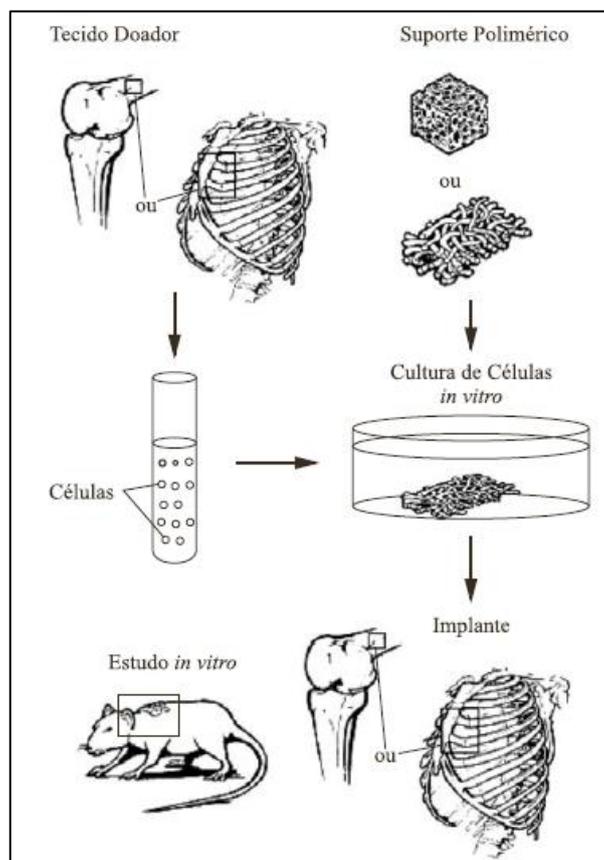


Figura 1. Etapas envolvidas na técnica de Engenharia de Tecidos.

Os eventos que ocorrem durante o processo de reparo celular na engenharia de tecido envolvem: (1) adesão, proliferação e diferenciação celular; (2) produção da matriz extracelular; (3) degradação do *scaffold* e (4) crescimento do novo tecido (HOERSTRUP et al., 2004).

A escolha do biomaterial que irá compor o *scaffold* é de extrema importância, pois ele fornecerá o suporte físico e mecânico para o crescimento celular. Idealmente, para sua aplicação na engenharia de tecidos esses suportes devem apresentar as seguintes propriedades: (1) ser biocompatível, de forma a se integrar ao tecido hospedeiro provocando mínima resposta imunológica; (2) apresentar poros interligados, abertos e com tamanho e geometria adequados para o crescimento celular, bem como o transporte de nutrientes e metabólitos; (3) apresentar propriedades de superfície, do ponto de vista químico e topográfico, adequadas de modo a controlar e permitir a adesão e proliferação celular; (4) apresentar resistência mecânica suficiente para suportar pressão hidrostática e manter os espaços necessários para o desenvolvimento das células e produção da matriz celular; (5) apresentar uma taxa de biodegradação ou bioadsorção compatível com a taxa de crescimento do novo tecido, de modo que o *scaffold* seja totalmente degradado quando o tecido lesionado estiver completamente recuperado (BRAGHIROLI, 2012; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

Os biomateriais utilizados na fabricação de *scaffolds* podem ser de origem natural ou sintética e incluem, principalmente, os materiais poliméricos, pois são prontamente degradados e seus produtos de degradação são metabolizados e eliminados do corpo sem efeitos danosos ao organismo (MONTEIRO, 2008).

Os polímeros de origem natural (animal ou vegetal) mais utilizados incluem as proteínas (colágeno, gelatina, elastina, queratina e actina) e os polissacarídeos (quitina, quitosana, celulose e amilose). As principais vantagens de se utilizar esses materiais incluem suas propriedades bioativas e similaridade com as macromoléculas encontradas na matriz extracelular, o que diminui as chances de uma resposta inflamatória agressiva do corpo. Em contrapartida, há uma dificuldade se obter uma matéria-prima uniforme, já que esses materiais apresentam algumas propriedades específicas do tecido de origem (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; MONTEIRO, 2008; PARK; LAKES, 2007).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados incluem os poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), entre outros. Entre as vantagens destacam-se a facilidade de produção em grande escala, baixo custo e modificações estruturais por meio de modificações no processo de síntese (PARK; LAKES, 2007).

Outra classe de materiais que vem sendo muito utilizada na produção de *scaffolds* é a dos materiais cerâmicos. Os materiais bioabsorvíveis como os fosfatos de cálcio (tricálcio fosfato - TCP) e os bioativos, como os vidros a base de sílica e fosfato (vidros bioativos) e a hidroxiapatita (HA) têm apresentado sucesso em algumas aplicações biomédicas. Entre as propriedades que os tornam atrativos para uso na área biomédica destacam-se, respectivamente, sua degradação gradual no organismo e a capacidade de formar ligações com o tecido hospedeiro (RAMALHO, 2006). No entanto, sua aplicação é limitada, em alguns casos, pela fragilidade desses materiais. Dessa forma, a tendência atual é a fabricação de *scaffolds* híbridos, aliando as propriedades dos polímeros e das cerâmicas de forma a se obter um material com propriedades mecânicas e biológicas superiores, adequadas para aplicação biomédica (PEROGLIO et al., 2007).

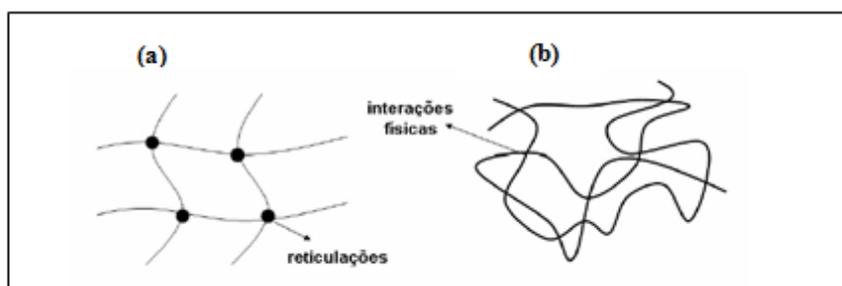
Várias técnicas podem ser aplicadas no processamento dos *scaffolds*, gerando diferentes tipos de estruturas como: (1) *scaffolds* porosas biodegradáveis, que incluem as espumas ou esponjas; (2) *scaffolds* fibrosas, incluem as nanofibras produzidas pelas técnicas de eletrofiação, auto-organização ou separação de fase; (3) *scaffolds* formadas por microesferas, incluem esferas de materiais híbridos, cerâmicos e poliméricos; (4) *scaffolds* injetáveis, que incluem os hidrogéis poliméricos ou híbridos que sofrem transição sol-gel *in situ*. A escolha do biomaterial e a forma de fabricação do *scaffold* dependerá da aplicação a qual se destinará o dispositivo (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; MIKOS et al., 2004).

3.2. Hidrogéis e Sistemas Injetáveis

A estratégia de utilizar implantes formados *in situ* tem se popularizado por permitir a realização de procedimentos minimamente invasivos. Uma variedade de polímeros naturais e sintéticos pode ser usada para formar hidrogel e serem utilizados como *scaffolds* na engenharia de tecido. São alguns exemplos: poli(óxido de etileno) – PEO;

poli(álcool vinílico) – PVA; colágeno, quitosana, gelatina e ácido hialurônico (DRURY; MOONEY, 2003).

Hidrogéis são definidos como redes poliméricas hidrofílicas, com configuração tridimensional e capacidade de absorver uma elevada quantidade de água dentro de sua estrutura, sem se dissolver e preservando seu formato original (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2010; RIVA et al., 2011). As cadeias poliméricas podem ser interligadas por ligações covalentes (reticulação), sendo conhecidos como hidrogéis químicos ou permanentes, ou por interações físicas como ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals ou interações eletrostáticas, chamados de hidrogéis físicos (AOUADA; MATTOSO, 2009; HIN, 2004).



Adaptado de (AOUADA; MATTOSO, 2009).

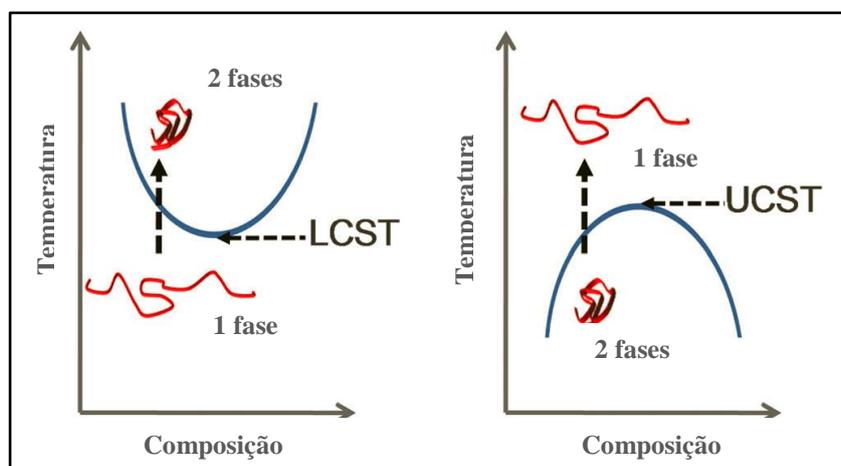
Figura 2. Representação esquemática de (a) hidrogel químico e (b) hidrogel físico.

Os hidrogéis têm sido muito utilizados na engenharia de tecido devido a facilidade de manipulação de suas propriedades físicas, habilidade de incorporar células e outros agentes terapêuticos, como fatores de crescimento, apresentarem transferência de massa eficiente e serem uma alternativa aos processos cirúrgicos (GUTOWSKA; JEONG; JASIONOWSKI, 2001).

Alguns hidrogéis possuem a capacidade de responder a um estímulo do meio em que é inserido, como temperatura, pH, força iônica, estímulo magnético ou elétrico e outros fatores. Esses hidrogéis são chamados de materiais inteligentes e respondem ao estímulo mudando seu grau de inchamento e outras propriedades físicas da rede polimérica. Esse tipo de material tem despertado cada vez mais interesse para aplicações biomédicas, incluindo liberação controlada de fármacos, bioengenharia e engenharia de tecidos (PRABAHARAN; MANO, 2006; RATNER et al., 2004).

Esses hidrogéis responsivos sofrem uma transição sol-gel, na qual são estabelecidas ligações ou interações intermoleculares entre as cadeias do polímero, levando a formação de uma rede tridimensional. Dessa forma, o sistema inicialmente viscoso (sol) adquire caráter elástico (gel). O grande diferencial desse tipo de material é que, ao contrário de uma solidificação clássica, após a transição, a estrutura permanece extremamente aberta e impregnada pela fase líquida (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995).

No caso dos hidrogéis termossensíveis, mudanças de temperatura próximas a uma temperatura crítica provocam expansão ou agregação das cadeias devido às interações das zonas de caráter hidrofóbico e hidrofílico do polímero com as moléculas de água. O hidrogel pode apresentar temperatura de solução crítica inferior (LCST - *Lower Critical Solution Temperature*) ou temperatura de solução crítica superior (UCST - *Upper Critical Solution Temperature*). A Figura 3 mostra o comportamento desses sistemas frente à mudança de temperatura. Sistemas do tipo LCST tornam-se insolúveis (2 fases) e sofrem contração ao serem aquecidos, enquanto os sistemas UCST tornam-se solúveis (1 fase) e sofrem contração ao serem resfriados (SOUSA, 2009).



Adaptado de (GIBSON; O'REILLY, 2013)

Figura 3. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas LCST e UCST.

Alguns hidrogéis do tipo LCST são apropriados para uso como *scaffold* injetável, pois é possível controlar sua estrutura para que possam ser injetados sob a forma líquida (na temperatura ambiente) e gelifiquem na temperatura corpórea, tomando o formato da cavidade a ser tratada. Nesses sistemas, abaixo da temperatura crítica (onde existe

apenas uma fase) as interações entre os segmentos hidrofílicos da rede polimérica e as moléculas de água predominam. No entanto, se a temperatura for elevada acima da temperatura crítica, as interações entre os segmentos hidrofóbicos são favorecidos em detrimento das ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Dessa forma, as interações polímero-polímero são favorecidas, levando a formação do gel (PINTO, 2007).

CHENITE e colaboradores (2000) propôs a formulação de um hidrogel a base de quitosana combinada com sais de β -glicerofosfato para originar hidrogéis sensíveis à temperatura. Seus resultados demonstraram que esses hidrogéis apresentam potencial para ser usado na área biomédica, pois são líquidos na temperatura ambiente, o que permite a encapsulação de células, e se tornam gel na temperatura corporal. (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI S.A., 2007) investigou como alguns parâmetros afetam o tempo de gelificação e a taxa de degradação desses sistemas. Seus resultados demonstraram que o aumento da concentração e grau de desacetilação da quitosana promove a formação do gel e diminui o tempo de gelificação. Quanto à degradação, os estudos mostraram que as amostras com menor grau de desacetilação e menor concentração de quitosana se degradaram mais rápido.

(MOLINARO et al., 2002) avaliou a biocompatibilidade de hidrogéis baseados em quitosana/ β -glicerofosfato. Seus resultados mostraram que os hidrogéis com quitosana com maior grau de desacetilação demonstraram maior biocompatibilidade. Uma possível explicação para esses resultados pode estar no fato de que quitosanas menos desacetiladas são degradadas mais rapidamente por células e enzimas devido aos grupos acetil, assim, as respostas inflamatórias podem ser mais pronunciadas devido aos fragmentos gerados nesse processo.

(JI et al., 2010) avaliou os efeitos de hidrogéis baseados em quitosana/sais α , β -glicerofosfato na regeneração de tecido periodontal. Seus estudos mostraram que o hidrogel melhorou significativamente a proliferação e atividade de fosfatase alcalina (ALP) das células derivadas do ligamento periodontal humano testadas.

Além disso, outros estudos mostraram o potencial de sistemas baseados em quitosana/sais de glicerofosfato para uso biomédico e farmacêutico (GIRI et al., 2012; RUEL-GARIÉPY et al., 2002; SONG et al., 2010).

3.3. Vidro Bioativo

Os vidros bioativos são materiais que possuem a capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, levando à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (*hydroxyl carbonate apatite* - HCA), responsável pela formação de uma forte ligação entre o material e o tecido mole ou duro (RAHAMAN et al., 2011). O conceito de material bioativo e capaz de formar ligação com osso foi sugerido inicialmente por Hench e, desde então, esses materiais vem sendo intensamente estudados com variadas composições para aplicações na área biomédica (PEREIRA; HENCH, 2004).

Os componentes básicos dos vidros bioativos são SiO₂, Na₂O, CaO e P₂O₅ em proporções específicas. A composição do sistema é um fator determinante para a interação do biomaterial com o tecido, sendo que a mais comum é formada por SiO₂, CaO e P₂O₅ (RATNER et al., 2004). Estudos *in vitro* mostram que o vidro bioativo com composição, em mol, de 60% SiO₂, 36% CaO and 4% P₂O₅ promove uma rápida formação da camada de HCA, apresentando potencial emprego na engenharia de tecido (HENCH; POLAK; KEMP, 2002).

Os vidros ativos têm sido muito utilizados como matrizes para engenharia de tecido. Quando implantados no corpo, suscitam uma série de reações bioquímicas e biofísicas na interface material-tecido, resultando na formação de uma camada de HCA. As reações que resultam na formação da camada de hidroxiapatita podem ser resumidas em cinco estágios, como esquematizados na Tabela 1 (JUNIOR; ORÉFICE, 2001).

Tabela 1. Reações na interface biomaterial-tecido para a formação da camada de HCA

Estágio	Processos físico-químicos
1	Troca iônica de Na ⁺ pertencentes ao material por H ⁺ e H ₃ O ⁺ da solução. $\text{Si-O-Na}^+ + \text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{SiOH}^+ + \text{Na}^+_{(\text{solução})} + \text{OH}^-$
2	Perda de sílica solúvel do material na forma de Si(OH) ₄ para a solução e formação da camada de Si-OH.
3	Policondensação da camada rica em sílica na superfície do material. $\text{Si-OH} + \text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si}$

-
- 4 Migração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em sílica e posterior crescimento da camada rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação do Ca^{2+} e PO_4^{3-} da solução.
 - 5 Cristalização da camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA)
-

Adaptado de (JUNIOR; ORÉFICE, 2001)

Além dessas reações, ainda podem ser listados outros eventos celulares após a formação da camada de HCA (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006):

- Adsorção de fatores de crescimento na camada de HCA formada;
- Ação de macrófagos;
- Adesão das células-mãe;
- Diferenciação de células-mãe;
- Geração da matriz óssea;
- Cristalização da matriz;
- Proliferação e crescimento do osso.

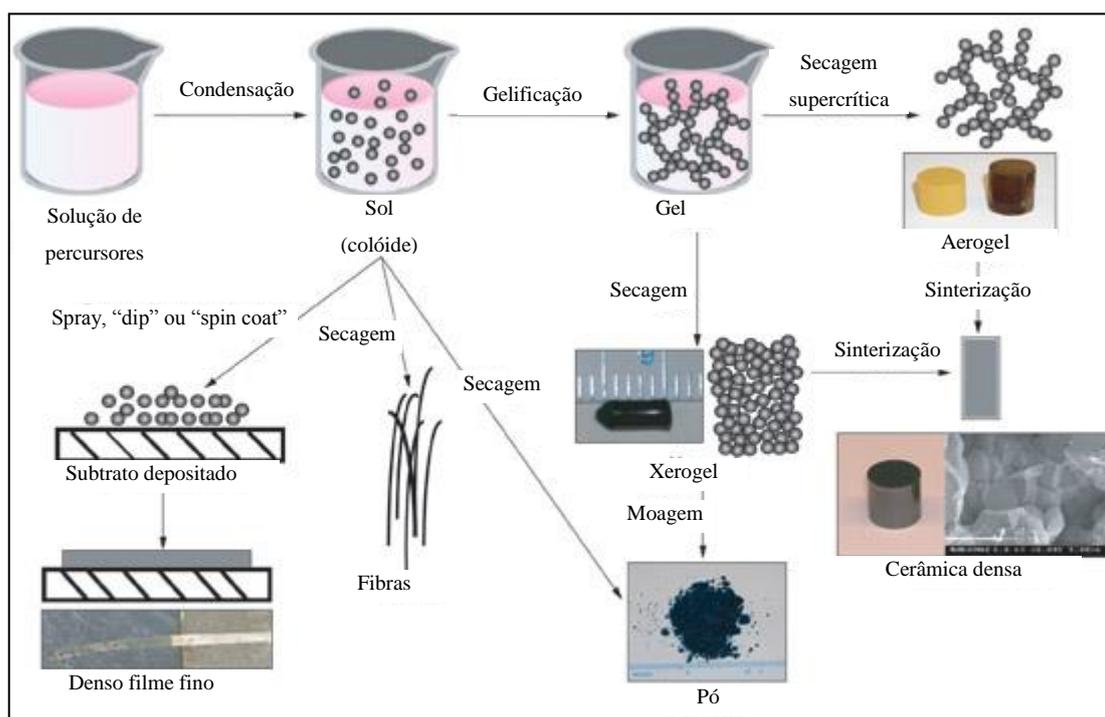
Convencionalmente, as partículas de vidro bioativo podem ser sintetizadas pelo método de fusão. No entanto, a produção por processo sol-gel tem sido amplamente estudada nos últimos anos por possibilitar a obtenção de vidros mais bioativos, devido à facilidade de mudar a composição e características microestruturais do material por meio do controle dos parâmetros de síntese (CACCIOTTI et al., 2012).

Pelo método sol-gel é possível obter vidros com bioatividade para formulações com concentração de sílica de até 90% em mol, enquanto pelo método convencional só se atinge a bioatividade para uma concentração de sílica de até 60%, o que permite a obtenção de materiais mais resistentes. Além disso, o método ainda apresenta outras vantagens como: uso de temperaturas mais baixas (variando da temperatura ambiente até 600-700°C), fácil produção de pós, obtenção de vidros com maior área específica, estrutura com nanoporos interconectados, alta osteocondutividade e degradabilidade significativa (ANDRADE; DOMINGUES, 2006; BALAMURUGAN et al., 2007; RAVARIAN et al., 2010).

O termo sol é geralmente empregado para definir dispersões de partículas coloidais (1-100nm) estáveis em um fluido, enquanto o gel pode ser definido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias

poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida em seus interstícios (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995).

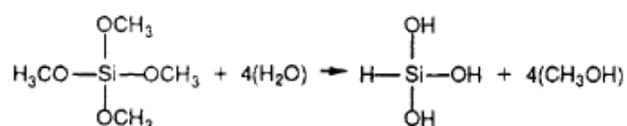
O processo sol-gel consiste, basicamente, nas reações de hidrólise e condensação de precursores alcóxidos dissolvidos em solventes orgânicos. Os precursores formam uma suspensão coloidal e, posteriormente, uma rede tridimensional interconectada, gel. O gel pode, então, ser processado por vários métodos de secagem (Figura 4) para desenvolver materiais com diferentes propriedades (RATH, 2005).

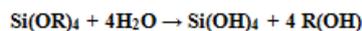


Adaptado de (RATH, 2005)

Figura 4. Representação esquemática do processo sol-gel.

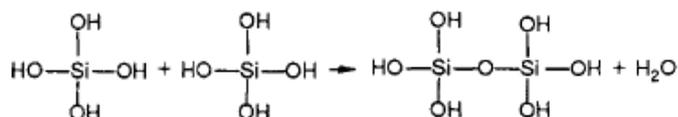
(HENCH; WEST, 1990) descreve o processo de géis silicatos poliméricos a partir do precursor do tipo $\text{Si}(\text{OR})_4$, onde R é CH_3 , C_2H_5 , ou C_3H_7 . A primeira reação que ocorre no processo é a hidrólise do precursor pela adição de água, levando à formação de ligação Si-OH (Eq.1):





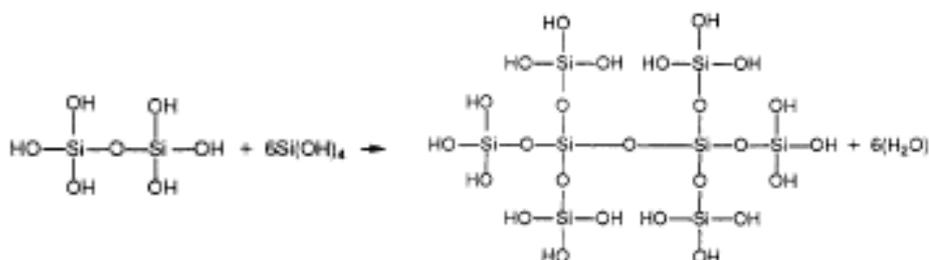
Equação 1

A sílica hidrolisada sofre uma reação de condensação (Eq. 2), formando ligações siloxanas (–Si–O–Si–):



Equação 2

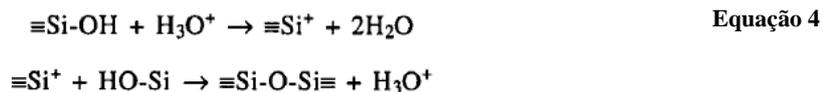
Reações de policondensação também ocorrem entre grupos silanol (Si-OH) resultando na formação de uma rede de SiO₂, formando o gel (Eq. 3). A água e álcool formados como subprodutos dessas reações permanecem nos poros da rede de sílica, sendo removidos posteriormente pelo processo de secagem.



Equação 3

As reações de condensação podem ser catalisadas por bases e ácidos, que influenciarão na cinética e, conseqüentemente, na estrutura final do gel. Para a sílica, esse processo é influenciado pelo ponto de carga zero (PZC), onde a carga superficial é igual a zero, e o ponto isoelétrico (PI), onde a mobilidade das partículas da sílica é zero, ambos na faixa de pH entre 1 e 3 (BRAMBILLA, 2007). Dessa forma, o processo de condensação da sílica pode ser dividido em três domínios de pH: abaixo de 2, entre 2 e 7 e acima de 7.

HIRATSUKA e colaboradores (1995) e OLIVEIRA (2011) esquematizam a dependência do processo de gelificação da sílica da seguinte forma: em valores de pH abaixo de 2, a velocidade da transformação sol-gel é proporcional à concentração de H₃O⁺ (Eq. 4).



Dessa forma, a formação e agregação de partículas primárias ocorre simultaneamente. As partículas carregam pouca carga, o que permite a colisão entre elas, dando origem a cadeias e, posteriormente, a um sólido tridimensional (Figura 5).

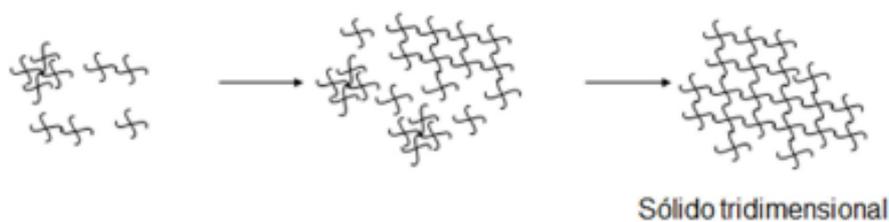


Figura 5. Representação esquemática da reação sol-gel em pH menor que 2.

Em meios com pH entre 2 e 7 a reação de condensação é sensível à catálise básica (Eq. 5):



Nessa faixa de pH, a polimerização ocorre entre espécies condensadas, com a formação de dímeros, trímeros e assim por diante. O crescimento e agregação ocorrem por contínua adição de moléculas pequenas às moléculas mais condensadas, resultando na formação de uma rede tridimensional (Figura 6).

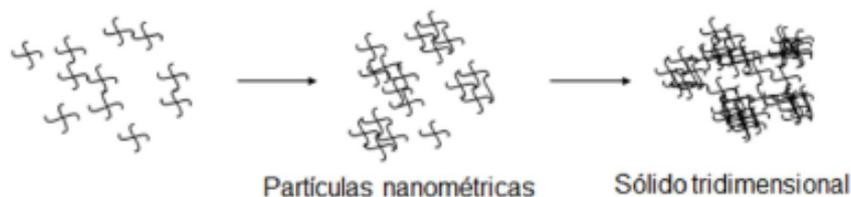


Figura 6. Representação esquemática da reação sol-gel em pH entre 2 e 7.

Acima de pH 7, as espécies de silício são carregadas negativamente e se repelem mutuamente. Dessa forma, não há colisão entre as partículas e ocorre crescimento sem agregação. A taxa de crescimento dependerá da distribuição de tamanho de partículas, sendo que há uma tendência geral de crescimento do tamanho médio das partículas e uma diminuição no seu número total (Figura 7).

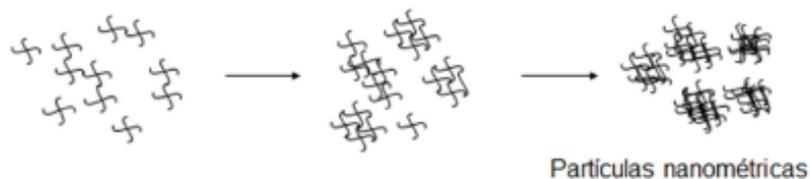


Figura 7. Representação esquemática da reação sol-gel em pH maior que 7.

A síntese de vidro bioativo pelo método sol-gel é reportada na literatura em inúmeros trabalhos. JONES (2009) destaca em seu trabalho que vidros bioativos, assim como seus derivados e compósitos, produzidos por esse método, apresentam propriedades osteogênicas e nanoporosidade adequadas para uso na engenharia de tecido. (BOCCACCINI et al., 2010) ressalta que o uso de nanopartículas e fibras de vidro bioativo juntamente com matrizes poliméricas possibilita a produção de nanocompósitos com potencial para ser usado na medicina regenerativa. Além disso, os autores destacam que os vidros bioativos em nanoescala são mais efetivos para uso biomédico quando comparados aos produzidos em microescala, pois possuem maior área superficial, adsorvem mais proteínas e, conseqüentemente, apresentam maior bioatividade.

3.4. Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos animais, representando cerca de 30% da massa total de proteínas no corpo humano. Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de colágeno foram identificados (HASIRCI; YUCEL, 2008). A Tabela 2 ilustra as principais características de alguns tipos de colágeno.

Tabela 2. Classes, tipos e características de diferentes tipos de colágenos.

Classe	Tipo	Características
Colágenos formadores de fibrilas	I	Encontrado no tecido conjuntivo. Tipo mais abundante encontrado na pele, osso, ligamento e tendão.
	II	Colágeno da cartilagem, encontrado no disco intervertebral e humor vítreo.
	III	Prevalente nos vasos sanguíneos, pele e intestino.
	V	Associado com o colágeno tipo I no osso.
Colágenos associados aos colágenos formadores de fibrilas com interrupções nas triplas hélices	IX	Apresenta três domínios de tripla hélice e três domínios não helicais. Coexiste com o colágeno tipo II na cartilagem e no humor vítreo.
	XII	Associado com o colágeno tipo I nos ligamentos e tendões.
	XIV	Associado com o colágeno tipo I na pele e nos tendões.
Colágenos formadores de redes	IV	Encontrado na membrana basal.
	VIII	Encontrado em muitos tecidos, especialmente no endotélio.
	X	Colágeno com cadeia pequena, encontrado na cartilagem hipertrófica, com estrutura polimérica similar ao colágeno tipo VIII.

Adaptado de (CUNHA, 2006).

O colágeno é uma molécula constituída por três cadeias peptídicas, cada uma contendo uma ou mais regiões caracterizadas pela repetição dos aminoácidos (GLY-X-Y), onde GLY=glicina e X,Y pode ser qualquer aminoácido. Essas cadeias peptídicas se arranjam em forma de tríplice hélice, conforme ilustrado na Figura 8. Dependendo do tipo de colágeno, essa estrutura de hélice tripla pode representar apenas uma parte da molécula, que pode ser constituída por outros domínios (FRATZL, 2008).

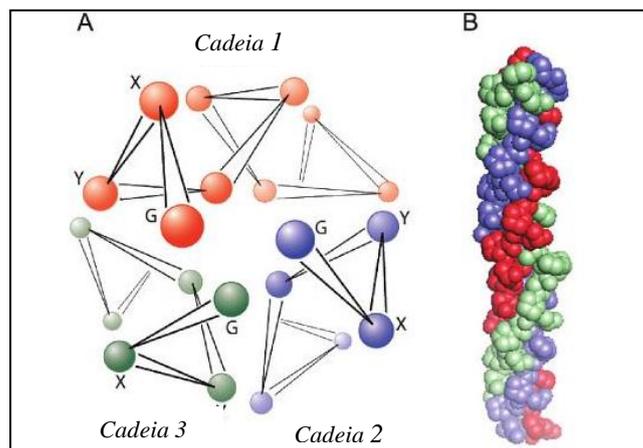


Figura 8. Estrutura de tríplex hélice do colágeno. (A) Vista ao longo do eixo molecular; (B) Vista lateral, mostrando a formação da tríplex hélice.

Do ponto de vista da biomecânica, os colágenos fibrilares (tipos I, II, III e V) são os mais interessantes, pois podem se agregar paralelamente formando fibrilas que são claramente visíveis ao microscópio eletrônico. Essa estrutura lhe confere maior resistência e estabilidade (LEE; SINGLA; LEE, 2001). A Figura 9 ilustra o processo de agregação das cadeias de colágenos, originando as microfibrilas e, posteriormente, as fibrilas e fibras colágenas (CHAUDRY et al., 1997).

O colágeno tem sido muito utilizado como biomaterial por apresentar características favoráveis para uso na área biomédica. Entre elas destacam-se: biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade, capacidade em promover crescimento celular e boa susceptibilidade à modificações químicas, o que permite melhorar suas propriedades mecânicas. O colágeno pode ser utilizado em diversas formas como membranas, filmes, esponjas, géis, partículas, etc. Devido a isso, o colágeno tem sido aplicado em sistemas de liberação controlada de fármacos e como matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

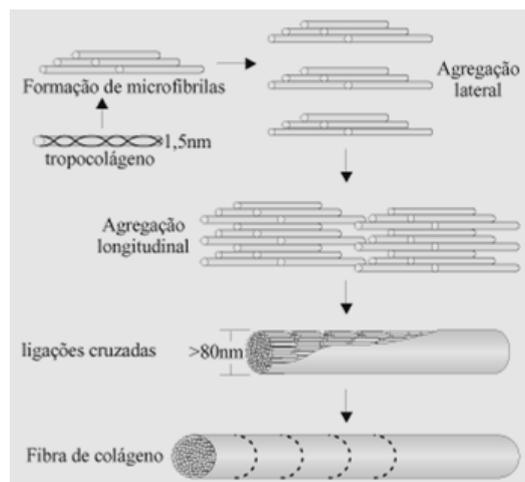


Figura 9. Representação esquemática do arranjo das moléculas de colágeno em estruturas fibrilares e de fibras.

O colágeno tipo I é a proteína fibrilar estrutural mais utilizada como biomaterial devido à alta similaridade da sequência de aminoácidos entre as diversas espécies, sua estabilidade conformacional, abundância na matriz extracelular e sua capacidade de suportar a adesão e proliferação celular (CAMPOS, 2008).

O colágeno tipo I pode ser purificado do tecido conectivo e reconstituído (KEW et al., 2011). Geralmente os colágenos de origem animal, principalmente os bovinos e suínos, são os mais utilizados devido a sua abundância, baixo índice de reações imunológicas e capacidade de formar fibras a partir de preparações solúveis, cujas propriedades são similares às encontradas nos tecidos (CHAUDRY et al., 1997).

Apesar de sua versatilidade, o uso do colágeno é limitado devido a sua baixa resistência mecânica. Dessa forma, é comum o estabelecimento de ligações cruzadas no material, seja por meio do uso de reagentes como o glutaraldeído, carbodiimida e diisocianato ou pela produção de compósitos, como com a quitosana. Nesta alternativa, interações eletrostáticas são estabelecidas entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxila do colágeno, o que estabiliza a estrutura do material e resulta em uma matriz com propriedades mecânicas adequadas para utilização como *scaffold* (PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

Atualmente, alguns estudos abordam o uso do colágeno reticulado com quitosana para produzir hidrogéis, que podem ser utilizados como matrizes injetáveis para regeneração

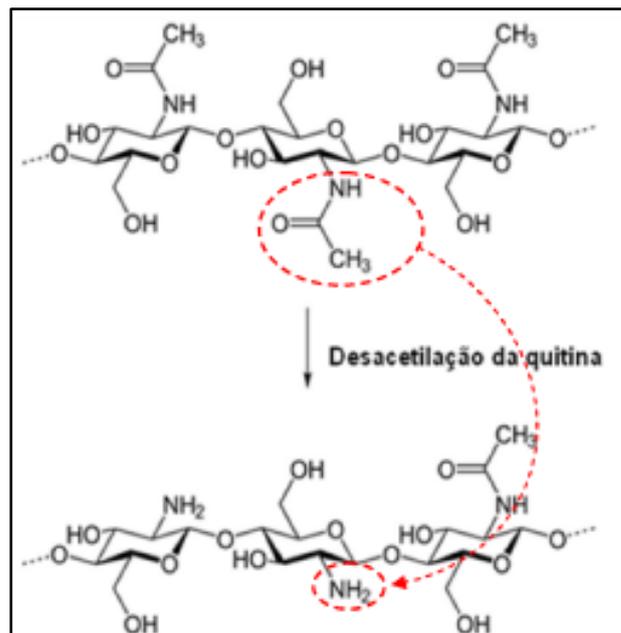
tissular. O estudo de (DENG et al., 2010) avaliou a influência da adição da quitosana nas propriedades físicas do colágeno e na sua capacidade de diferenciação e angiogênese de células epiteliais. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que a adição da quitosana melhorou as propriedades físicas do hidrogel, além de aumentar sua capacidade de recrutar e diferenciar as células endoteliais cultivadas.

Diversos estudos demonstram o sucesso de *scaffolds* baseadas em colágeno na engenharia de tecido ósseo (PALLELA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2003); epitelial (LIU; MA; GAO, 2012; MA et al., 2003); dentário (OHARA et al., 2010) e cartilaginosa (YAN et al., 2010).

Na área odontológica, estudos demonstram a viabilidade do uso do colágeno como matriz tridimensional para regeneração do tecido periodontal. (KOSEN et al., 2012) implantou um *scaffold* à base de colágeno em defeitos periodontais em cães e seus resultados mostraram que a formação de tecidos periodontais (osso alveolar, ligamento periodontal e cemento) foi significativamente maior no grupo experimental do que no controle.

3.5. Quitosana

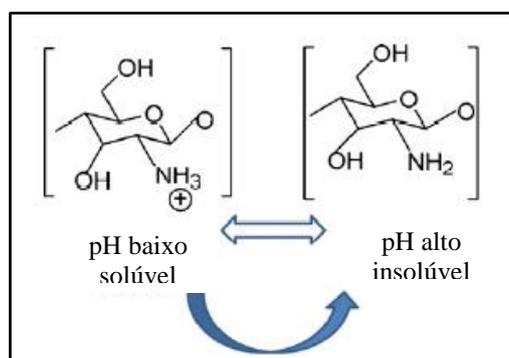
A quitosana é o principal derivado da quitina (copolímero de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina) um polissacarídeo de origem natural que pode ser encontrado nos exoesqueletos de criaturas marinhas, como camarões, caranguejos e lagostas. A transformação da quitina em quitosana se dá por meio da reação de desacetilação alcalina de ligações N-acetil presentes na quitina, resultando na formação de D-glucosamina, que contém um grupo amino livre, conforme ilustrado na Figura 10 (PIRES, 2010). O grau de desacetilação (GD) representa a porcentagem de grupos amino livre e permite distinguir os dois biopolímeros. Quando o GD atinge um valor maior que 50%, a quitina se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado de quitosana (JÚNIOR, 2008).



(JÚNIOR, 2008)

Figura 10. Diagrama ilustrando a obtenção da quitosana.

A presença dos grupos amino ($-NH_2$) e hidroxila ($-OH$) confere reatividade à quitosana, que pode ser submetida a uma série de modificações químicas. Além disso, os grupos amino tornam a quitosana um polieletrólito. A Figura 11 ilustra o comportamento do biopolímero em meios com diferentes valores de pH. Em baixos valores de pH (menor que 6) os grupos aminos se protonam e fazem da quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. A carga positiva dos grupos NH_3^+ é responsável pela interação com diversas moléculas aniônicas, como proteínas, fatores de crescimento, ácidos nucleicos, citocinas, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e polissacarídeos (GRIGOLON, 2001), (YANG, 2011). Por outro lado, em meios com pH maiores (maior que 6), os grupos amino se desprotonam e ela se torna insolúvel e reativa (DASH et al., 2011).



(DASH et al., 2011)

Figura 11. Representação esquemática do comportamento da quitosana em diferentes valores de pH.

A quitosana pode ser usada para o preparo de hidrogéis, filmes, fibras ou esponjas, o que a torna versátil e apropriada para o uso na engenharia de tecido. Além disso, esse biopolímero possui propriedades biológicas favoráveis para o uso na área biomédica. Entre elas pode-se citar: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, afinidade notável a proteínas, atividade antibactericida, cicatrização de feridas, caráter bioadesivo, entre outras (COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011).

A quitosana é um polímero semicristalino e sua cristalinidade e propriedades físico-químicas e biológicas estão diretamente relacionadas ao grau de desacetilação (GD) e sua massa molar (Tabela 3). Comercialmente, encontra-se quitosana com grau de desacetilação variando de cerca de 70 a 95% e massa molar na faixa de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹ (CANELLA; GARCIA, 2001).

Tabela 3. Relação entre estrutura e propriedades da quitosana.

Propriedade	Característica Estrutural *
Solubilidade	↑GD
Cristalinidade	↓GD
Biodegradabilidade	↓GD, ↓Massa molar
Viscosidade	↑GD
Biocompatibilidade	↑GD
Mucoadesão	↑GD, ↑Massa molar
Analgésico	↑GD
Antimicrobiano	↑GD, ↑Massa molar
Permeabilidade	↑GD
Antioxidante	↑GD, ↓Massa molar
Homeostacidade	↑GD

* ↑: diretamente proporcional à propriedade; ↓: inversamente proporcional à propriedade. GD: grau de desacetilação.

Adaptado de (DASH et al., 2011).

Entre as diversas aplicações da quitosana, citam-se as seguintes: engenharia de tecido ósseo (KUCHARSKA et al., 2012); (WANG; STEGEMANN, 2010) engenharia de

tecido cartilaginoso (NEVES et al., 2011); sistema de liberação controlada de fármacos (CHUANG; DON; CHIU, 2009); engenharia de tecido periodontal (JI et al., 2010).

A quitosana pode ser utilizada na área biomédica pura ou na forma de blendas e compósitos. Alguns sistemas propostos na literatura incluem: quitosana/vidro bioativo (COUTO; HONG; MANO, 2009); quitosana/PVA (JUNIOR; MANSUR, 2008); quitosana/PVA/vidro bioativo (MACEDO, 2013); quitosana/hidroxiapatita (TRIPATHI et al., 2012); quitosana/ácido hialurônico (TAN et al., 2009) e quitosana/álcool polivinílico (ALHOSSEINI et al., 2012).

Para utilização em sistemas injetáveis, uma das estratégias empregadas atualmente consiste em combinar a quitosana com sais de β -glicerofosfato (β -GP), que estendem sua solubilidade a um valor de pH próximo a neutralidade e permite que o sistema apresente ponto de gelificação aos 37°C (COUTO; HONG; MANO, 2009; RIVA et al., 2011).

4. METODOLOGIA

4.1. Etapas de desenvolvimento do trabalho

O fluxograma abaixo descreve as etapas que foram desenvolvidas neste trabalho:

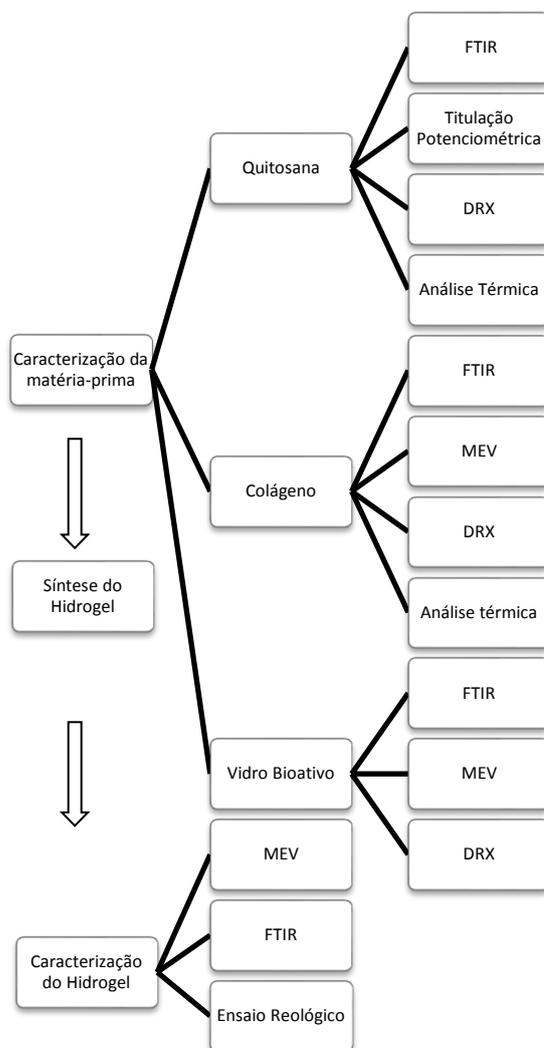


Figura 12. Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.

4.2. Matéria-Prima

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico (P.A.) e incluem: Tetraetil ortosilicato 98% (TEOS), Trietil fosfato 99% (TEP), Nitrato de cálcio tetraidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Metanol (CH_3OH), Ácido nítrico (HNO_3), solução 33% de hidróxido de amônio (NH_4OH), Quitosana em pó de alta massa molar e grau de desacetilação maior que 75% (Sigma-Aldrich, 419-419), Sal β -glicerofosfato dissódico

hidratado (Sigma Aldrich, G-9422), Ácido acético glacial, Colágeno Tipo I e água deionizada.

4.3. Caracterização da matéria-prima

4.3.1. Quitosana

A quitosana foi caracterizada do ponto de vista físico-químico por meio de análise espectroscópica na região do infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), difração de raios X (*X-Ray Diffraction*, XRD), titulação potenciométrica e análise térmica.

Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A avaliação dos grupos químicos presentes na quitosana foi realizada por meio da análise por FTIR. Para isso, o pó da quitosana comercial foi submetido à técnica de reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR). O experimento foi conduzido no equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific, sendo feitas 64 varreduras entre 600 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalos de 2 cm^{-1} . Foi utilizado o acessório Smart Omni Sampler (Thermo Scientific).

Determinação do grau de desacetilação

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada por meio de titulação potenciométrica. Para isso, 0,2000g de quitosana foram dissolvidos em 20 mL de solução padronizada de HCl 0,1 mol.L^{-1} , seguido de diluição em 10 mL de água deionizada. Logo após, foi realizada a titulação potenciométrica, sob agitação magnética constante, com solução padronizada de NaOH 0,1 mol.L^{-1} . Os valores de pH e volume de NaOH adicionado foram registrados, obtendo-se uma curva típica de titulação potenciométrica. Os cálculos para determinação do grau de desacetilação se basearam nas equações propostas por MARTINS (2013). Dessa forma, os valores obtidos foram aplicados nas Equações 6 e 7 e o resultado comparado ao valor fornecido pelo fabricante:

$$MA = n_1 * 161 + n_2 * 204 \quad \text{Equação 6}$$

$$GD (\%) = \frac{n_1}{(n_1 + n_2)} * 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

MA = massa da amostra;

n_1 = número de mols do monômero desacetilado (titulado), cujo mero tem massa molar igual a 161g.mol^{-1} ;

n_2 = número de mols do mero acetilado, que tem massa molar igual a 204g.mol^{-1} .

GD= grau de desacetilação.

Difração de Raios X (DRX)

Para avaliar sua cristalinidade, a quitosana em pó, conforme fornecida pelo fabricante, foi submetida a análise por difração de raios X (DRX) no equipamento PW9710mpd, da Philips, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056\text{Å}$) à 40kV e 30mA. A análise foi conduzida com 2θ variando de $3,00^\circ$ a $90,00^\circ$ com passo de $0,06^\circ$ e tempo de coleta de 1s.

No difratograma obtido, foram identificadas e calculadas as áreas das frações amorfa (FA) e cristalina (FC) da amostra, com o auxílio do software Micronal Origin 8.0[®]. O graude cristalinidade foi estimado a partir da Equação 8 (JÚNIOR, 2008).

$$GC (\%) = \frac{FC}{(FC + FA)} * 100 \quad \text{Equação 8}$$

Análise Térmica

O estudo do comportamento térmico da quitosana foi realizado por meio de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

A análise de TGA foi conduzida no equipamento Shimadzu TGA-50, utilizando uma massa de aproximadamente 5mg de amostra, que foi depositada em um suporte de platina. As amostras foram submetidas a um aquecimento controlado 25 - 900°C em atmosfera de nitrogênio. Foi utilizada uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ e fluxo do gás de arraste de 50mL.min^{-1} .

Para o ensaio de DSC, aproximadamente 10mg das amostras foram colocadas em um porta-amostra de alumínio selado com furo na tampa. A análise foi conduzida no equipamento Shimadzu DSC-60, empregando atmosfera de nitrogênio, com fluxo de

90mL.min⁻¹. As amostras foram submetidas a aquecimento de -20-500°C, com razão de de 10°C.min⁻¹.

4.3.2. Colágeno

O colágeno utilizado neste trabalho, extraído do tendão de calda de ratos, foi gentilmente cedido pelo Professor Gregory Thomas Kitten do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A extração do colágeno tipo I foi realizada conforme protocolo descrito por (KITTEN; MARKWALD; RUNYAN, 1982; KITTEN et al., 1996). Em resumo, os tendões foram separados das caudas, lavados três vezes em água e então cuidadosamente submersos e misturados em ácido acético na concentração 0.5 mol.L⁻¹ por 48 horas à 4°C. À solução resultante, de colágeno solubilizado, foi filtrada através de várias camadas de gaze para remover pequenos vasos sanguíneos e os restos de tecido e, em seguida, centrifugadas (14000 g, 1h). O sobrenadante foi coletado e dializado contra três mudanças de ácido acético (0,02 mol.L⁻¹) a 4°C durante um período de três dias.

A solução estoque de colágeno solúvel utilizado no presente estudo apresentava concentração de 5,6mg.mL⁻¹, contendo mais de 99% de colágeno tipo I. Para o preparo dos hidrogéis, essa solução foi neutralizada (pH≈7,4) com quantidades pré-definidas de água deionizada, meio DMEM 10X e NaOH 1M de forma a se obter um gel com concentração final de 2mg.mL⁻¹. Nessas condições, as moléculas de colágeno solubilizadas se agregam e reconstituem as fibras, formando uma estrutura tridimensional, originando o gel (GELMAN; WILLIAMS; PIEZ, 1979).

Amostras de colágeno foram submetidas à análise espectroscópica na região do infravermelho (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de Raios X (DRX) e Análise Térmica (TGA).

Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A avaliação dos grupos funcionais presentes no colágeno foi realizada por meio da análise por FTIR. As amostras foram submetidas à técnica de reflectância difusa, conduzida no equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific, sendo feitas 64

varreduras entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalos de 2 cm^{-1} . A fim de provocar o mínimo de modificação nas fibras de colágeno e evitar sua desnaturação, as amostras foram misturadas a KBr pré-seco (110°C, 2h) e secas à 40°C durante uma hora.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica do gel de colágeno (2,0mg.mL⁻¹) foi realizada por meio de MEV, utilizando o equipamento FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis.

Difração de Raios X (DRX)

Para avaliar sua cristalinidade, o gel de colágeno (2,0mg.mL⁻¹) foi submetido a análise por difração de raios X (DRX) utilizando o mesmo equipamento e condições de análise descritos anteriormente para a caracterização da quitosana.

Análise Térmica

O estudo do comportamento térmico do colágeno foi realizado por meio de análise termogravimétrica (TGA). Para esse estudo, as amostras do gel de colágeno foram submetidas à liofilização a -80°C, durante 48h., no equipamento da Liotop, modelo K105.

A análise de TGA foi conduzida no equipamento Shimadzu TGA-50, utilizando uma massa de aproximadamente 5mg de amostra, que foi depositada em um suporte de platina. As amostras foram submetidas a um aquecimento controlado 25 - 800°C em atmosfera de nitrogênio. Foi utilizada uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e fluxo do gás de arraste de 50mL.min⁻¹.

4.3.3. Vidro bioativo

A síntese das nanopartículas de vidro bioativo foi realizada de acordo com protocolo desenvolvido anteriormente (OLIVEIRA, 2011); (OLIVEIRA et al., 2013). A síntese, proposta por OLIVEIRA (2011) permite a obtenção de nanopartículas com composição nominal em peso de 60% de SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅. O procedimento para a síntese

é esquematizado na Figura 13 e foi realizado da seguinte forma: (1) 200 mL de metanol foram misturados a 0,12 mL de hidróxido de amônio 33% e 5,4 mL de água e submetidos a agitação por 5 minutos. (2) Em seguida, 5,57 mL de TEOS e 0,56 mL de TEP foram adicionados gota a gota por 10 minutos. O sol foi, então, agitado mecanicamente por 48 horas. (3) O sol formado foi colocado em uma estufa a 50°C até a completa evaporação da amônia, o que foi verificado por meio do pH e ocorre em cerca de 3 horas. (4) Após esse processo, o sol foi filtrado em filtro de 0,22 µm. (5) Em seguida, foram adicionados 3,46g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ no sol e o sistema submetido a agitação por 24 horas. (6) As nanopartículas formadas foram separadas por filtração em filtros de 0,22 e 0,11 µm. (7) O sol filtrado em filtro de 0,11 µm foi submetido ao processo de liofilização para prevenir a agregação secundária das partículas do gel via ligação entre as moléculas de água durante o processo de secagem. (8) O pó obtido foi tratado termicamente em à 200°C por 40 minutos, a uma taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. (9) No fim do processo foram obtidas nanopartículas de vidro bioativo bem dispersas.

Fonte: OLIVEIRA (2011)

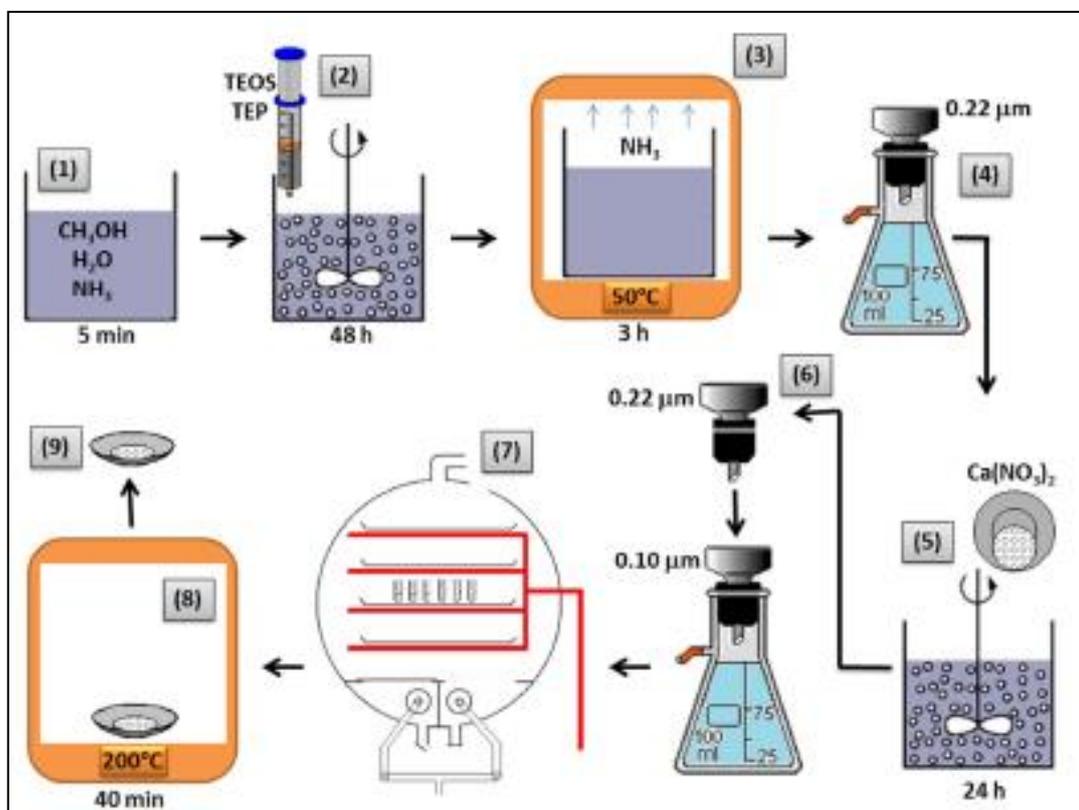


Figura 13. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo.

Como a rota de síntese empregada neste trabalho foi exaustivamente estudada nos trabalhos (OLIVEIRA, 2011); (OLIVEIRA et al., 2013), as nanopartículas foram submetidas apenas à caracterização por FTIR, MEV e DRX para garantir que as amostras não continham contaminantes e não sofreram sinterização durante o tratamento térmico.

Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os grupos funcionais das nanopartículas de vidro bioativo foram analisados por meio de FTIR. Para isso, nanopartículas na forma de pó foram submetidas à análise pela técnica de reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR) utilizando o mesmo aparelho e parâmetros descritos para a análise da quitosana.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada por meio de MEV, utilizando o equipamento FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis.

4.4. Síntese dos hidrogéis termossensíveis

A síntese do hidrogel termossensível de quitosana, usando o sal β glicerofosfato (β -GP) como iniciador do processo de gelificação se baseou nos protocolos propostos por CHENITE et al. (2000), CHO et al. (2005) e ZHOU et al. (2008).

Todas as soluções para preparo dos hidrogéis foram mantidos sob refrigeração à 4°C aproximadamente. As soluções utilizadas foram: solução de quitosana (2% m/v) preparada em solução aquosa de ácido acético (0,1M) e solução aquosa de β -GP (56% m/v).

Para o preparo do hidrogel, foram realizados vários testes, ajustando a quantidade de β -GP para que o sistema gelificasse em temperatura próxima aos 37°C. Após otimização da formulação verificou-se que a solução resfriada de β -GP deveria ser adicionada, gota a gota, à solução de quitosana, sob agitação, de modo que o pH do gel permanecesse entre 7,0 e 7,4. Os hidrogéis foram mantidos sob refrigeração até realização dos ensaios de caracterização.

Para avaliar o efeito da adição do colágeno e vidro bioativo nas propriedades dos hidrogéis de quitosana, foram preparados hidrogéis com diferentes proporções desses materiais.

Para preparo dos hidrogéis híbridos, as soluções de quitosana (2% m/v) e colágeno ($2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram misturadas na proporção mássica de 70/30 (quitosana/colágeno). A essa mistura foi adicionada a solução de β -GP, conforme descrito para os hidrogéis de quitosana. Também foi feita adição de diferentes quantidades de vidro bioativo (nBG) de modo a obter as seguintes concentrações finais: 0% (controle), 1% e 2% ($m_{\text{nBG}}/m_{\text{quit+col}}$). As soluções foram estocadas à 4°C, para evitar gelificação, até a realização dos testes. A descrição das amostras preparadas encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição das amostras estudadas.

Composição		
Amostra	Quitosana/ Colágeno (proporção mássica)	Vidro bioativo (% m/m)
100Q		-
100Q1V	100/0	1
100Q2V		2
70Q		-
70Q1V	70/30	1
70Q2V		2

4.5. Caracterização dos hidrogéis preparados

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica dos hidrogéis foi realizada por meio de MEV. Para esse fim, os hidrogéis foram imersos em banho-maria à 37°C até gelificarem. Em seguida, foram

estocados no congelador por 3 dias e submetidos à liofilização a -80°C , durante 48h., no equipamento da Liotop, modelo K105. As amostras liofilizadas foram recobertas por ouro e analisadas no microscópio FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis.

4.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A análise dos grupos químicos dos hidrogéis foi realizada por meio de FTIR. As amostras foram liofilizadas (conforme preparo para MEV) e submetidas à análise no equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific, por meio da técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance*), utilizando o acessório OMNI-Smart. Foram feitas 64 varreduras entre 600 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalos de 2 cm^{-1} .

4.5.3. Ensaio Reológico

Um estudo reológico das amostras foi realizado a fim de avaliar a formação do gel em função da temperatura. Os ensaios foram conduzidos em um reômetro de tensão controlada, modelo AR-G2 (TA Instruments, New Castle, USA), com geometria placa-cone 20mm, 2° .

Para determinar a temperatura de gelificação das amostras, foram realizados ensaios oscilatórios em uma rampa de aquecimento de 4 a 45°C a uma taxa de aquecimento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e gap de $49\mu\text{m}$. Foram fixados os valores de frequência (1Hz) e uma pequena deformação (*strain*) em 0,01, de modo a não perturbar a formação do gel durante os testes e simular as condições corpóreas (CHO et al., 2005). A evolução dos módulos de perda (G'') e armazenamento (G') foi avaliada durante a rampa de aquecimento.

Para determinar o tempo de gelificação, as amostras foram submetidas aos testes de *Strain Sweep* e *Time Sweep*. Para o teste de *Strain Sweep*, as amostras foram submetidas a um ensaio oscilatório a 37°C , variando a deformação (*strain*) de 0,01 a 100%. Neste ensaio é possível determinar a deformação na faixa de viscosidade linear na temperatura de ensaio. Dessa forma, realiza-se, em seguida, o ensaio de *Time Sweep*, utilizando a deformação determinada no ensaio anterior. Os resultados foram analisados pelo software Rheology Advantage[®].

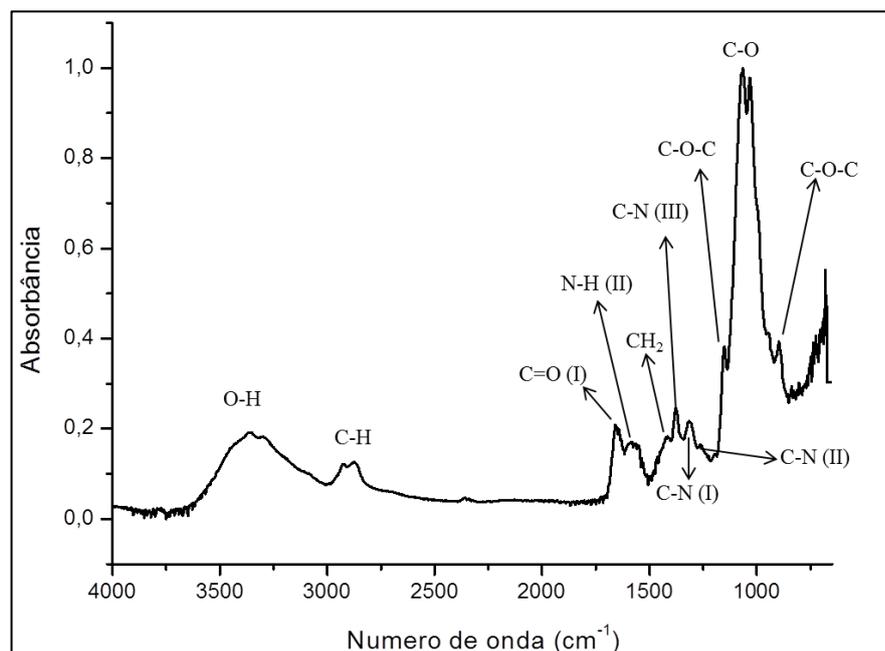
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das matérias-primas

5.1.1. Quitosana

Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 14 apresenta o espectro infravermelho da quitosana em pó pela técnica ATR e exhibe as bandas características do polissacarídeo.



onde: I, II, III correspondem às amidas I, II e III, respectivamente.

Figura 14. Espectro FTIR da quitosana comercial em pó.

A banda intensa e larga com máximo em 3383cm^{-1} está associada à ligação O-H, correspondente aos grupos C-OH e à água fisicamente adsorvida. Nota-se também um ombro, em 3294cm^{-1} , atribuído às ligações N-H, dos grupos NH_2 . Entre $2975\text{-}2832\text{cm}^{-1}$ encontram-se os picos correspondentes às ligações C-H, sendo o pico em 2930cm^{-1} (menor intensidade) atribuído à vibração assimétrica e em 2876cm^{-1} à vibração simétrica. Além disso, banda característica da deformação angular do CH_2 (tesoura) aparece em 1420cm^{-1} (JÚNIOR, 2008). Os grupos amida são caracterizados pelas vibrações das ligações C=O, N-H e C-N e podem ser vistos nos picos: 1658cm^{-1} , característico dos estiramentos C=O (amida I); 1568cm^{-1} , correspondente aos dobramentos NH_2 (amida II); 1380cm^{-1} , referente, principalmente ao estiramento C-N.

A banda larga e intensa entre $1070-1030\text{cm}^{-1}$ está associada aos estiramentos C-O cíclico. Além disso, também se observam os picos em 1158 e 892cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos C-O-C da cadeia da quitosana (JÚNIOR, 2008; PIRES, 2010).

Determinação do grau de desacetilação

O grau de desacetilação é um dos parâmetros mais importantes na caracterização da quitosana porque interfere diretamente em suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Na literatura são descritos vários métodos para a determinação desse parâmetro. Entre eles são citados: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho, análise elementar, espectroscopia UV-VIS e titulação potenciométrica. Em seu estudo, CZECHOWSKA-BISKUP et al. (2012) destaca que o mais preciso e robusto deles é o RMN. Porém, devido a falta de disponibilidade do equipamento em muitos laboratórios se torna necessário recorrer a métodos mais simples, mas com precisão semelhante a essa técnica. Os autores acrescentam que a titulação potenciométrica tem sido muito utilizada devido a sua confiabilidade, rapidez e baixo custo de análise. Desde que sejam empregados os protocolos corretos e soluções padrão na análise, os resultados ficam próximos aos obtidos pelo método de referência ^1H RMN, com pequeno desvio padrão. Diante disso, o método de análise escolhido para determinação do grau de desacetilação da quitosana foi a titulação potenciométrica.

A Figura 15 apresenta a curva de titulação potenciométrica obtida a partir da solução de quitosana (2% m/v). A curva apresenta dois pontos de inflexão, os quais são melhor visualizados na curva da derivada primeira. O primeiro máximo (12,97mL) corresponde à neutralização do excesso de HCl e o segundo (21,42mL) à quantidade de NaOH necessária para reagir com os íons H^+ dos grupos amino.

Por meio do valor de NaOH gasto no segundo ponto de inflexão é possível inferir o número de mols do mero acetilado (n_2 na Equação 7). Dessa forma, obteve-se um valor médio de 75,2% para o grau de desacetilação da quitosana, condizente com as especificações do fabricante (>75%).

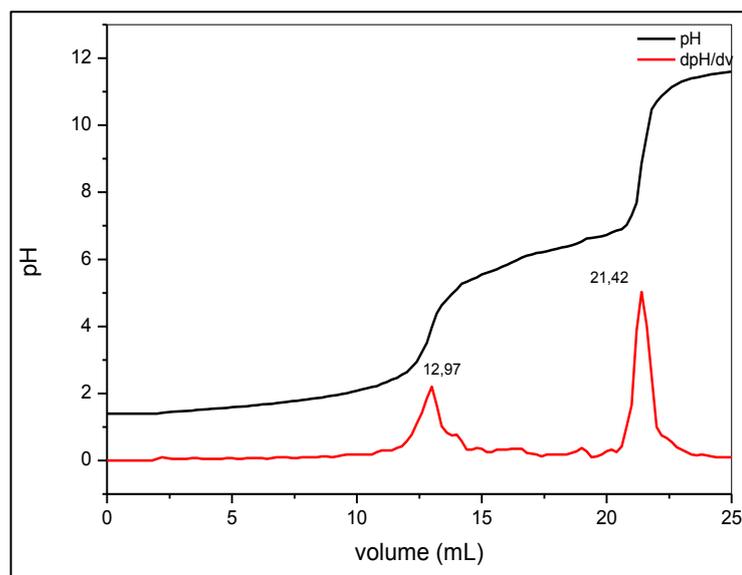


Figura 15. Curva de titulação potenciométrica da quitosana.

Difração de Raios X

As moléculas de quitosana se organizam em regiões cristalinas alternadas com uma fase amorfa. Por meio da difração de raios X é possível observar a célula unitária ortorrômbica dos cristais de quitosana (Figura 16), que possuem parâmetros $a = 0,807\text{nm}$, $b = 0,844\text{nm}$ e $c = 1,034\text{nm}$ (AZEVEDO et al., 2007).

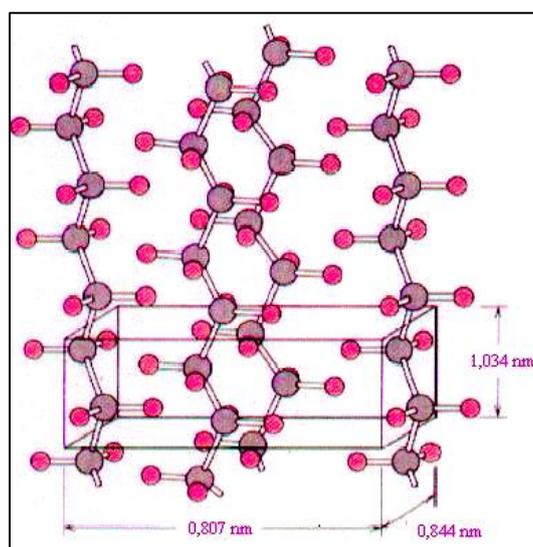


Figura 16. Célula unitária ortorrômbica da quitosana.

A Figura 17 mostra o difratograma obtido por meio da análise do pó da quitosana comercial. São observados dois picos característicos, um de maior intensidade em $19,9^\circ$ e um de menor intensidade em 10° , indicando a presença da fase cristalina. Esse

resultado está em concordância com o padrão de difração descrito por LIU et al. (2013) e WANG et al. (2007).

A partir do difratograma obtido da quitosana foi possível estimar sua cristalinidade em, aproximadamente, 24% (JUNIOR; MANSUR, 2008).

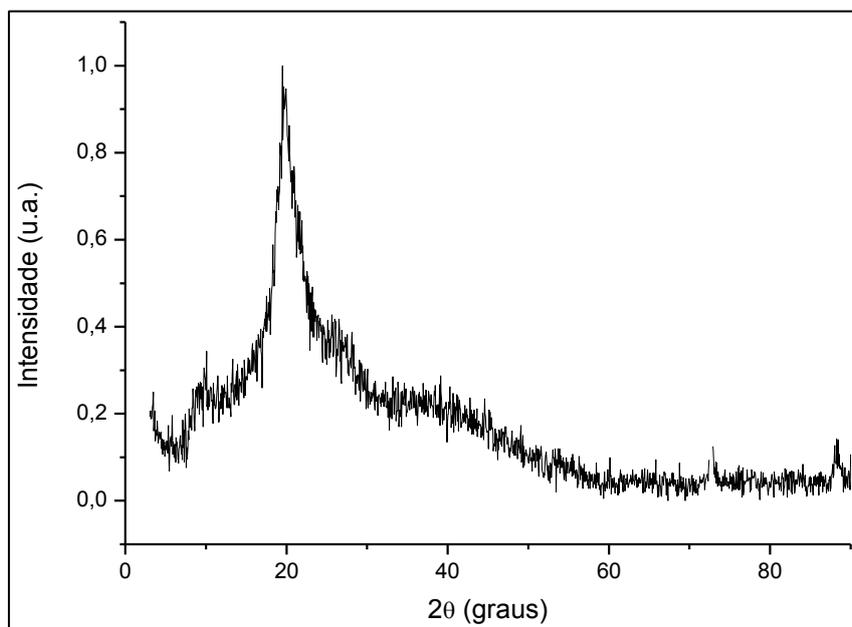


Figura 17. Difratograma da quitosana comercial.

Análise Térmica

Os métodos de análise térmica, tais como a Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são técnicas muito utilizadas para monitorar as alterações físicas e químicas de materiais frente a mudanças de temperatura (NETO et al., 2005).

SANTOS et al., (2003) realizou um estudo de caracterização de diferentes quitosanas comerciais utilizando diversas condições para as análises térmicas das amostras. Seus resultados mostraram que análises com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ geram curvas com perfil mais bem definido e a utilização de atmosfera de N_2 em detrimento de O_2 evita que ocorra a queima do material carbonizado e se observe melhor o processo de degradação do material. Desta forma, as condições de análise utilizadas neste trabalho foram baseadas nessas evidências, resultando em curvas térmicas típicas do polissacarídeo.

A Figura 18 mostra a curva TGA da quitosana comercial utilizada neste trabalho. O perfil da curva está de acordo com SANTOS e colaboradores (2003). Observam-se dois eventos térmicos, com perda de massa, que correspondem à desidratação e decomposição do material.

A curva indica que as amostras de quitosana comercial contém cerca de 8% de água fisicamente adsorvida, a qual é evaporada em temperaturas relativamente baixas, faixa de 25-110°C (Tabela 5).

O segundo evento, decomposição do material, aparece entre 270-318°C (com máximo em 291°C) durante o qual é observado uma perda de aproximadamente 67% da massa inicial da amostra, gerando um resíduo carbonizado no final da análise. Neste processo ocorre a despolimerização das cadeias da quitosana, decomposição dos anéis pirrólicos por meio da desidratação e desaminação e, finalmente, a reação de abertura do anel (ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010) . Pode-se observar ainda que o processo de degradação não se completa mesmo acima dos 900°C.

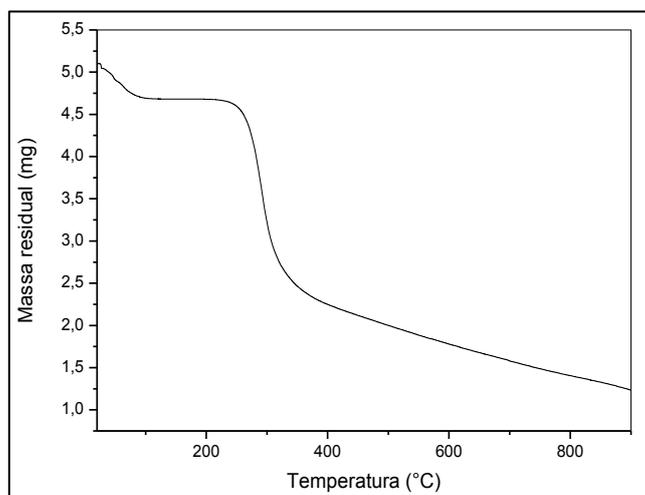


Figura 18. Curva TGA da quitosana comercial sob atmosfera de N₂.

A curva de DSC (Figura 19) mostra a ocorrência de dois eventos térmicos, que concordam com o ensaio de TGA. O primeiro evento, endotérmico, corresponde à desidratação e o segundo, exotérmico, à degradação do material.

Geralmente, a transição vítrea (T_g) do material pode ser vista no ensaio de DSC, porém há controvérsia na determinação desse evento para a quitosana. NETO et al. (2005) ressalta que, por ser um polímero natural, propriedades como cristalinidade, grau de desacetilação, massa molar, teor de água, fonte e método de extração do material podem influenciar sua T_g . Suas observações ainda destacam que são citados casos em que a T_g varia entre -23 e 60°C e outros em que não foi encontrada evidência da T_g , sugerindo que esse evento encontra-se em temperaturas mais altas, onde a degradação impede sua determinação. Nas condições de análise realizadas no presente estudo, as medições de DSC não mostraram evidência da ocorrência de T_g para a quitosana comercial.

Apesar da quitosana apresentar regiões cristalinas, a temperatura de fusão não é identificada no DSC por causa das fortes interações de hidrogênio entre suas cadeias. Dessa forma, o polissacarídeo é degradado antes de sofrer esse processo (LEE; KIM; LEE, 2000).

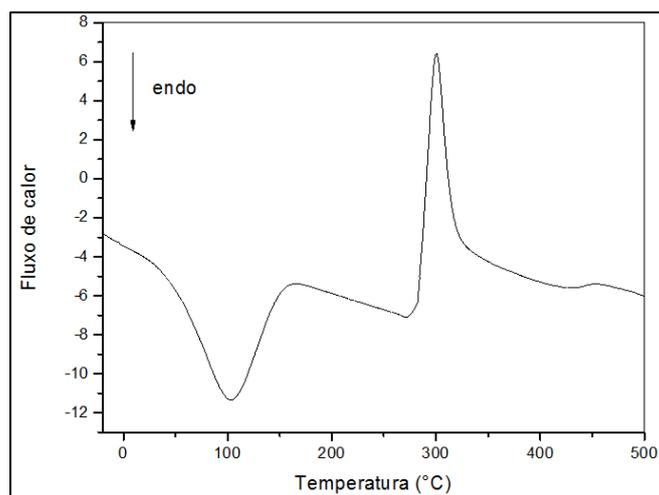


Figura 19. Curva DSC da quitosana comercial sob atmosfera de N_2 .

As perdas de massa, percentagem de resíduos e intervalo de temperatura, observados em cada etapa das curvas de TGA e DSC são resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados de TGA e DSC para a decomposição térmica da quitosana comercial.

Evento Térmico	TGA		DSC
	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Picos (°C)
$QUI.nH_2O \rightarrow QUI + nH_2O$	25-110	8	103,24 (endo) ^a
$QUI \rightarrow RC^b$	270-318	67	300,39 (exo) ^c

a) RC= Resíduo carbonizado; b) exo = exotérmico; c) endo = endotérmico

5.1.2. Colágeno

Espectroscopia na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho (FTIR) do colágeno tipo I (Figura 20) exibe as bandas características da proteína. A presença dos picos associados aos grupos amida podem ser observados em 1658cm^{-1} (amida I), 1540cm^{-1} (amida II) e 1240cm^{-1} (amida III) (SANTOS et al., 2013) e indicam que a composição das cadeias polipeptídicas foram mantidas.

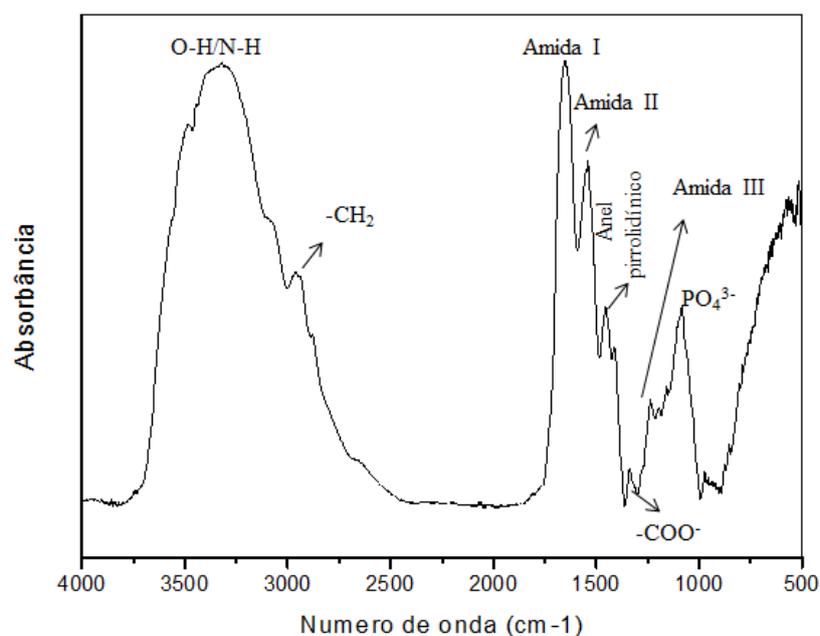
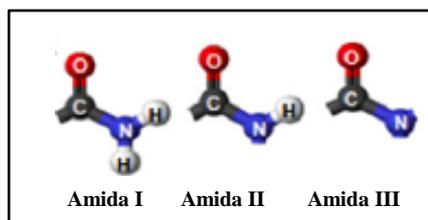


Figura 20. Espectro FTIR do colágeno puro.

A absorção da amida I pode ser observada entre $1700-1600\text{cm}^{-1}$ e é associada ao estiramento da carbonila (C=O), enquanto a amida II aparece entre $1550-1500\text{cm}^{-1}$ e é relacionada à deformação das ligações N-H. Já a banda da amida III ($1350-1250\text{cm}^{-1}$) geralmente apresenta menor intensidade e corresponde às vibrações de estiramento C-N e deformação N-H (CHANG; TANAKA, 2002). A Figura 21 ilustra a estrutura desses grupos:



Adaptado de (SANTOS et al., 2013)

Figura 21. Estrutura dos grupos amida presentes na molécula de colágeno.

A banda intensa e larga, entre $3600-3200\text{cm}^{-1}$ corresponde aos grupos hidroxila (O-H), provenientes das moléculas de água fisicamente adsorvida. Se sobrepondo a essa banda, encontra-se também a banda referente às ligações N-H ($3360-3320\text{cm}^{-1}$) da amida I (SANTOS et al., 2013). Nota-se também a presença dos picos em 2850 e 1450cm^{-1} associados, respectivamente, ao estiramento $-\text{CH}_2$ e aos anéis pirrolidínicos do aminoácido prolina, muito abundante nas fibras colágenas. A presença dos grupos carboxila dissociados ($-\text{COO}^-$) é confirmada com o aparecimento do pico em 1330cm^{-1} , que corresponde ao estiramento assimétrico desses grupos. Por fim, o espectro também mostra uma banda com máximo em 1090cm^{-1} , relacionada às vibrações do grupo fosfato (PO_4^{3-}) (CAMPOS, 2008; HORN, 2008).

Difração de Raios X (DRX)

A fim de provocar menor modificação possível na estrutura do colágeno, as análises de DRX foram realizadas no colágeno na forma de gel. A Figura 22 apresenta o difratograma obtido por meio da análise do gel de colágeno de concentração 2mg.mL^{-1} .

Observa-se que o perfil da curva é típico de um material amorfo, apresentando apenas um halo largo em 2θ variando de $20-50^\circ$ (ALLEGRETTI, 2009).

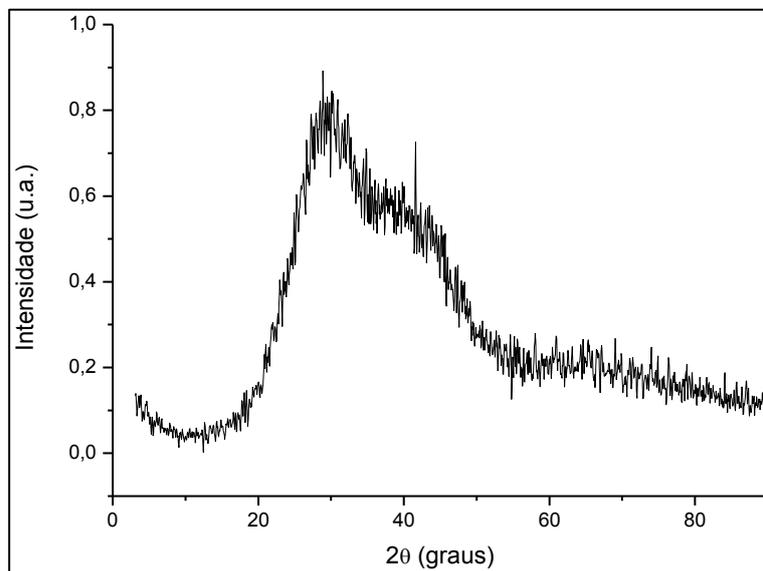


Figura 22. Difratograma do gel de colágeno 2mg.mL^{-1} .

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 23 mostra a micrografia do gel de colágeno tipo I usado para o preparo dos hidrogéis. O colágeno usado como matéria-prima neste trabalho é mantido em solução de ácido acético, onde as fibras se mantêm solúveis. Portanto, para observação da estrutura tridimensional da proteína, as fibras foram reconstituídas pela neutralização da solução, por meio da adição de água, meio DMEM 10X e NaOH (conforme descrito pag. 27). Nessas condições, com a redução das cargas positivas, as moléculas de colágeno se organizam na forma de feixes, formando uma rede tridimensional com características de gel (ALLEGRETTI, 2009).

A imagem da superfície do hidrogel submetido à secagem no ponto crítico mostra a estrutura constituída por um arranjo de fibras finas organizadas randomicamente.

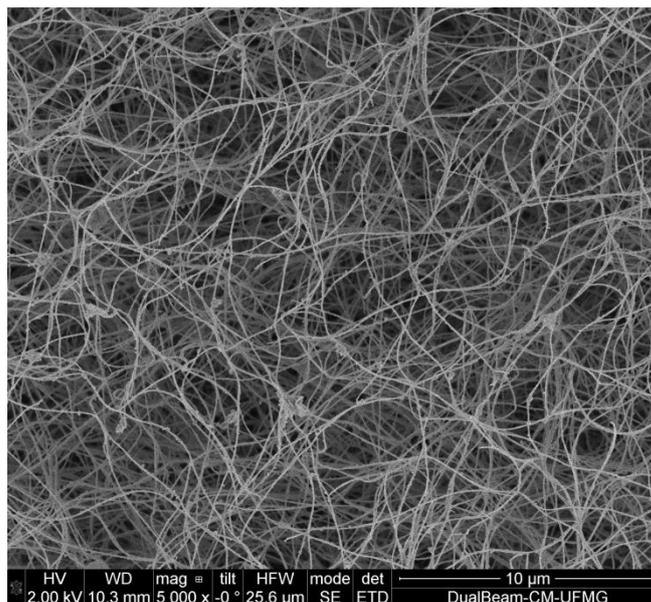


Figura 23. Micrografias (MEV) do gel de colágeno tipo I.

Análise Térmica

A Figura 24 mostra a curva termogravimétrica para o colágeno liofilizado. O perfil da curva está de acordo com os resultados obtidos por FERNANDES et al.(2011). São observados dois eventos térmicos, com perda de massa, que correspondem, à desidratação e decomposição do material, respectivamente.

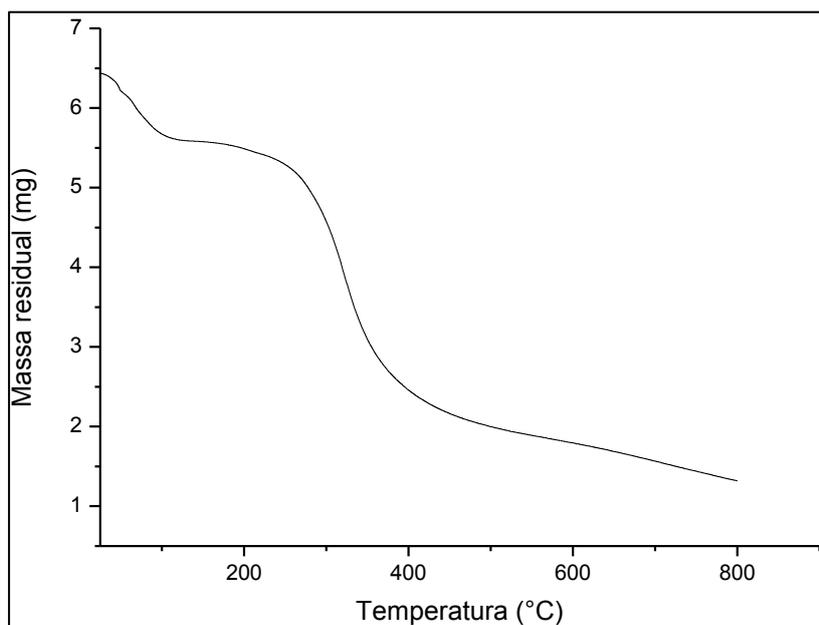


Figura 24. Curva TGA do colágeno em atmosfera de N₂.

A curva TGA indica que as amostras de colágeno possuem cerca de 13% de água fisicamente adsorvida, a qual é evaporada em temperaturas relativamente baixas, faixa de 25-120°C. O segundo evento, decomposição do material, aparece entre 210-440°C durante o qual é observado uma perda de aproximadamente 63% da massa inicial da amostra, gerando um resíduo carbonizado no final da análise.

5.1.3. Vidro bioativo

Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

O espectro de infravermelho das nanopartículas de vidro bioativo (Figura 25) exhibe as bandas características do material cerâmico. Os picos identificados condizem com aqueles encontrados no estudo de (OLIVEIRA, 2011). Os principais picos identificados no espectro correspondem a diferentes vibrações das ligações Si-O-Si e grupos fosfato (Figura 25B).

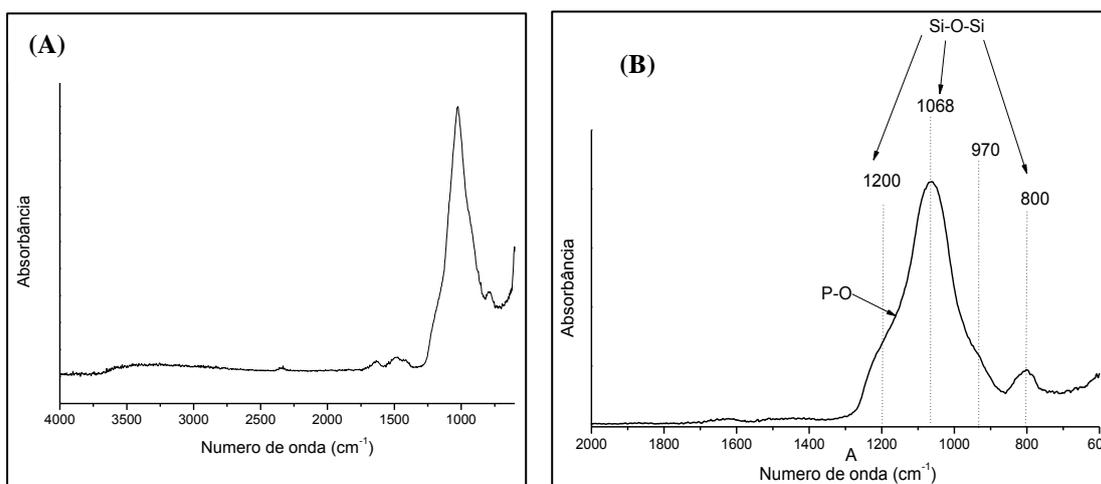


Figura 25. Espectros FTIR das nanopartículas de vidro bioativo. (A) 4000-600cm⁻¹. (B) ampliação do espectro (2000-600cm⁻¹).

A banda associada ao estiramento P-O é encontrado em 1160cm⁻¹, se sobrepondo ao pico do modo de vibração transversal dos átomos de Si nas espécies cíclicas do material (1200cm⁻¹). O pico em 1068cm⁻¹ corresponde às vibrações longitudinais dos átomos de Si nas espécies cíclicas. Também se sobrepondo a essa ampla banda, encontra-se a vibração referente ao estiramento Si-O na espécie SiO⁻Ca²⁺, em 970cm⁻¹. A banda com máximo em 800cm⁻¹ é associada ao dobramento da ligação e o estiramento do grupo Si-OH (OLIVEIRA, 2011).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As nanopartículas, na forma de pó finamente triturado foram submetidas à análise por MEV para verificar sua morfologia. As imagens mostram que foi possível obter partículas esféricas pela rota de síntese empregada (Figura 26).

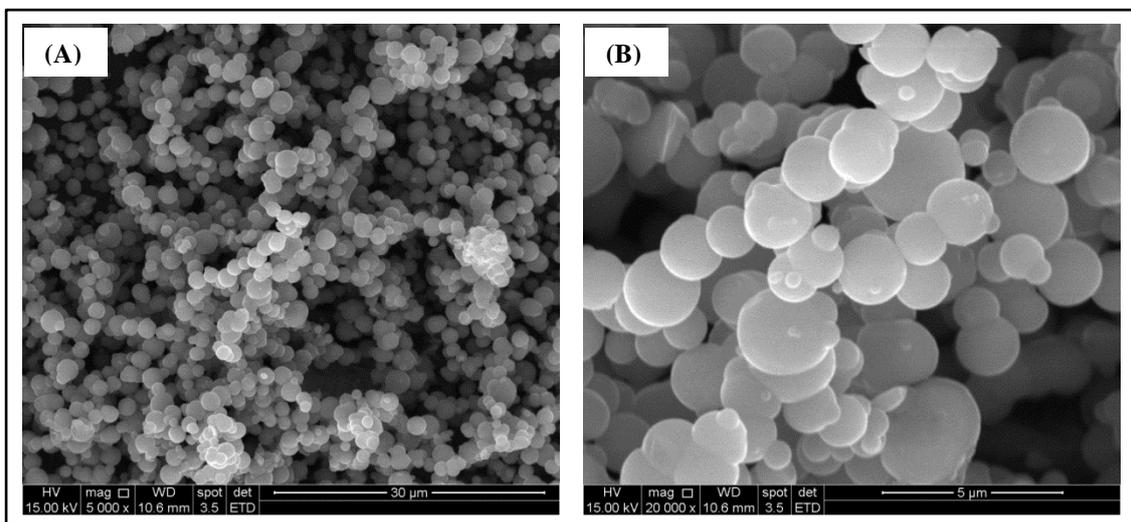


Figura 26. Micrografias (MEV) das nanopartículas de vidro bioativo. (A) aumento de 5000x, (B) aumento de 20000x.

As nanopartículas de vidro se organizam em pequenos aglomerados com tamanho na faixa de 0,8 a 2,7 μm . O fato de se manterem sob a forma esférica confirma que o tratamento térmico não provocou sinterização do material.

Análises adicionais sobre as partículas de vidro bioativo obtidas por meio do método de Stöber modificado podem ser vistas nos trabalhos de OLIVEIRA (2011); (OLIVEIRA et al. (2013). Os resultados têm mostrado que essa rota de síntese permite a obtenção de partículas de tamanho reduzido (cerca de 87nm) com grande volume de poros e alta área superficial, características que aumentam sua bioatividade e, portanto, sua viabilidade para uso na engenharia de tecido.

Difração de Raios X (DRX)

A Figura 27 mostra o difratograma para as nanopartículas sintetizadas. Nota-se que o perfil do difratograma é típico de um material amorfo. Não são observados picos de

difração, mas somente um halo entre 18 e 35°, correspondente ao vidro silicato amorfo (CARVALHO; OLIVEIRA; PEREIRA, 2012).

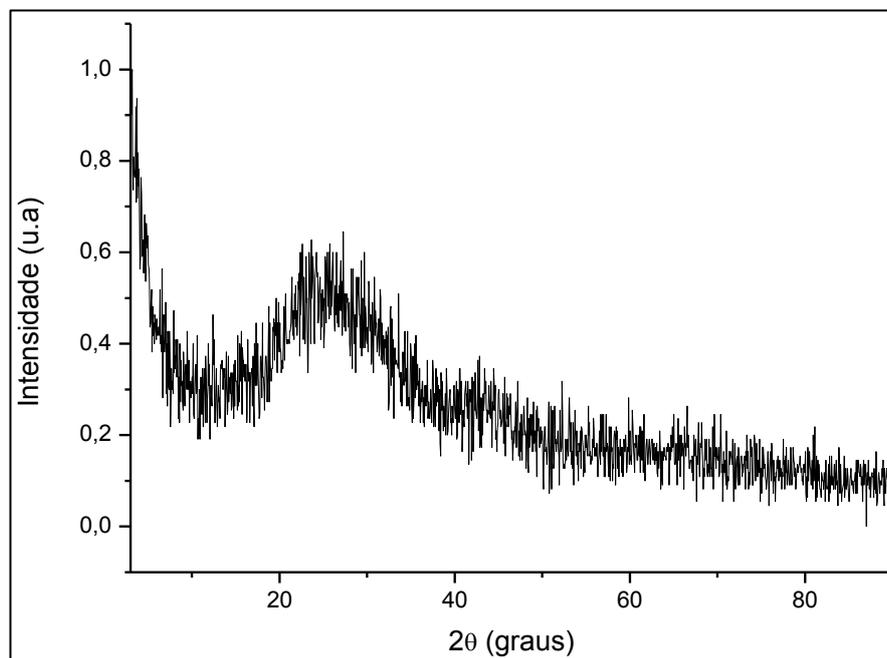


Figura 27. Difratograma das nanopartículas de vidro bioativo.

5.2. Caracterização dos hidrogéis

5.2.1. Síntese e Avaliação qualitativa dos hidrogéis

Foram preparados hidrogéis termossensíveis de quitosana e híbridos de quitosana/colágeno, com diferentes quantidades de nanopartículas de vidro bioativo.

Os hidrogéis apresentaram comportamento termossensível, permanecendo líquidos na temperatura ambiente e se tornaram géis após incubação à 37°C (Figura 28).

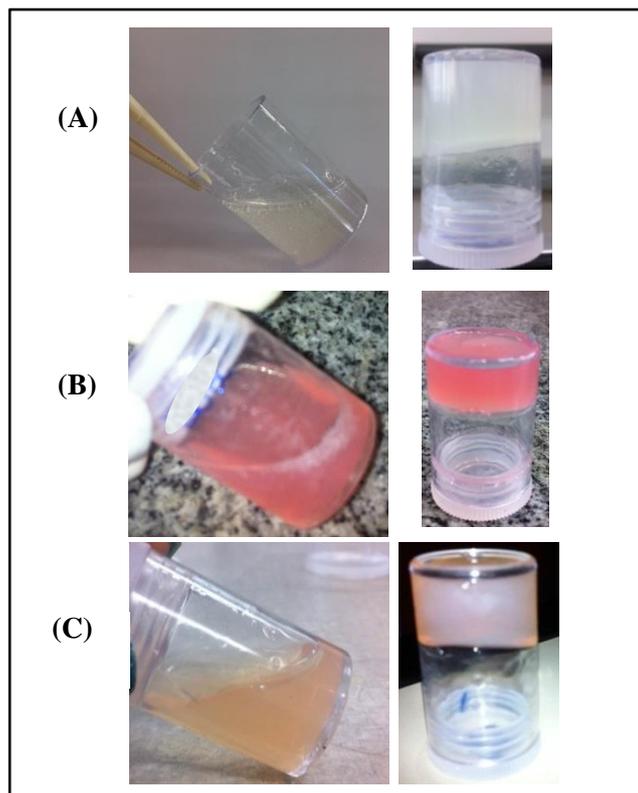


Figura 28. Fotos digitais dos hidrogéis produzidos (25 e 37°C). (A) hidrogel de quitosana; (B) colágeno puro; (C) hidrogel quitosana/colágeno (70/30).

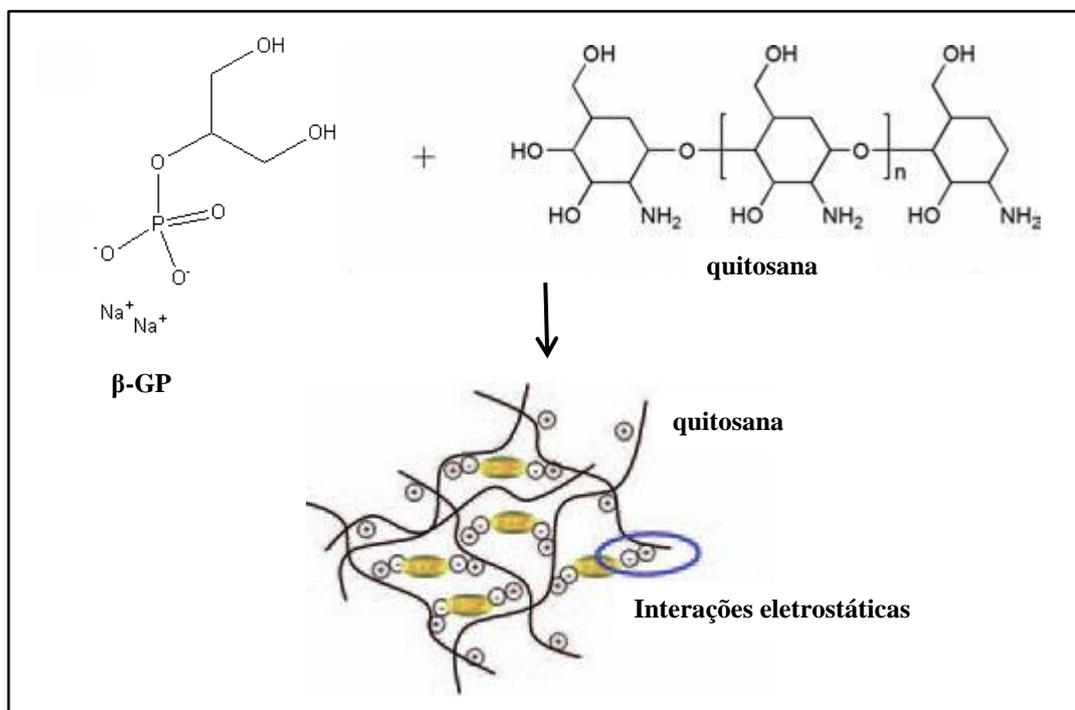
O agente responsável pela transição sol-gel na temperatura corporal é o sal β -glicerofosfato. O mecanismo exato do processo de gelação do sistema quitosana/ β -GP ainda não foi elucidado, porém acredita-se que este envolve várias interações como repulsão e atração eletrostática, ligações de hidrogênio e efeito hidrofóbico (CHO et al., 2005).

CHENITE et al. (2000) e (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI S.A., 2007) enumeram os principais eventos responsáveis pela transição sol-gel desses hidrogéis com a adição do β -GP:

1. Como o sal apresenta caráter fracamente alcalino, há um aumento do pH do hidrogel até as condições fisiológicas (7,0-7,4);
2. A adição do sal evita que ocorra a precipitação imediata das cadeias de quitosana nessa faixa de pH;

3. O β -GP permite a formação controlada do hidrogel quando é imposto um aumento na temperatura.

A manutenção da solubilidade da quitosana na faixa de pH fisiológico pode ser explicado pela atração eletrostática entre os grupos fosfato do β -GP e os grupos amino (NH_3^+) da quitosana (Figura 29). Além de agir protegendo a carga positiva nos grupos amino, a exposição do grupo glicerol do β -GP contribui para a separação das cadeias de quitosana em solução e mantém sua solubilidade em baixas temperaturas. Além disso, em baixas temperaturas, fortes interações quitosana/água protegem as cadeias do biopolímero contra a agregação. Porém, ao aumentar a temperatura do sistema, as moléculas de água ao redor das cadeias de quitosana são removidas e as interações hidrofóbicas quitosana/quitosana e ligações de hidrogênio passam a preponderar sob a repulsão e ocorre a formação do hidrogel pela junção das cadeias de quitosana. A transição sol-gel desses hidrogéis é dependente do pH, concentração de β -GP e temperatura do sistema.



Adaptado de CHO et al. (2008).

Figura 29. Representação esquemática das interações entre quitosana e β -GP.

Recentemente, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos para a obtenção de sistemas termossensíveis híbridos quitosana/colágeno iniciados com β -GP. Autores como WANG & STEGEMANN (2010) e SONG et al. (2010) afirmam que o β -GP também age neutralizando soluções de colágeno tipo I e, desse modo, permite a reconstituição das fibrilas colágenas.

Um dos pontos críticos no controle da temperatura de gelificação dos hidrogéis formulados foi a quantidade de β -GP adicionada. No início do desenvolvimento do trabalho foi feita uma série de testes para verificar a concentração adequada do sal. Na literatura, a concentração de β -GP encontrada nesses hidrogéis termossensíveis encontra-se na faixa de 12 a 20% em massa (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI S.A., 2007; SONG et al., 2010; WANG; STEGEMANN, 2010). Foram formulados hidrogéis nessa faixa de concentração e as amostras foram submetidas a ensaio reológico para investigar a temperatura na qual sofriam transição sol-gel. Após realização desses testes, verificou-se que os hidrogéis apresentavam ponto de gelificação próximo aos 37°C quando o pH do meio se encontrava na faixa de 7,0-7,4. Dessa forma, a quantidade de β -GP foi ajustada de modo que os hidrogéis apresentassem um pH final nessa faixa. A concentração do sal para que essa condição fosse atendida variou na faixa de 16-18% em massa.

A Figura 30 mostra a variação de pH das amostras antes e depois da adição do sal e das nanopartículas de vidro bioativo.

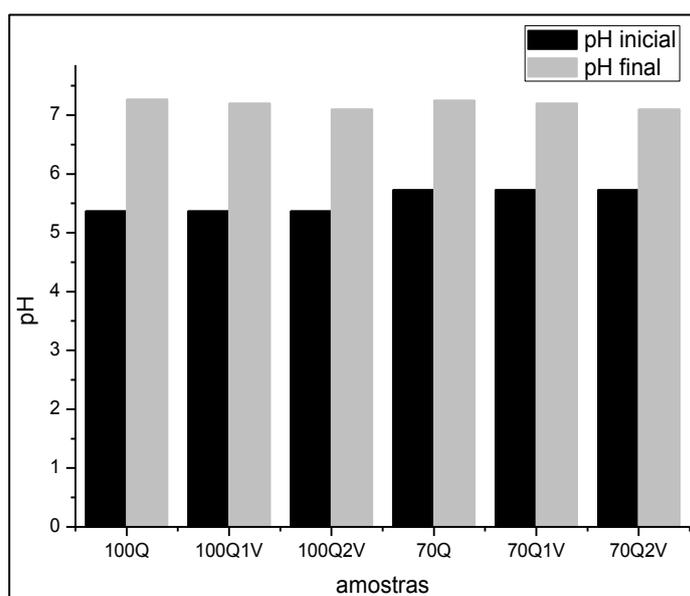


Figura 30. Variação de pH das amostras com adição de β -GP e vidro bioativo.

O pH inicial das amostras se manteve na faixa de 5,30-5,70, com os valores mais altos para as formulações 70Q, já que a solução de colágeno 2mg.mL^{-1} apresenta pH próximo à neutralidade devido a adição de NaOH e DMEN. Como previsto, a adição de β -GP aumentou o pH das amostras para a faixa de 7,10-7,31. As amostras contendo vidro bioativo apresentaram valores de pH pouco menores, pois o material cerâmico libera íons H^+ em solução, devido à reações de troca iônica com o meio.

Durante o preparo das amostras foram encontradas algumas dificuldades quando o colágeno era adicionado às soluções. Por ser muito sensível a diferenças de temperatura e agitação, algumas amostras contendo a proteína coagularam ou não chegaram a gelificar até a temperatura de 40°C . Os resultados reológicos, mostrados mais adiante, refletem essa dificuldade.

5.2.2. Caracterização Morfológica

Para aplicação na engenharia de tecidos, uma das propriedades mais importantes de um *scaffold* diz respeito à sua morfologia. Essas matrizes devem apresentar uma estrutura com alta porosidade e poros interligados, para assegurar a adesão celular e a difusão de nutrientes entre as células e a matriz extracelular a ser formada. O'BRIEN (2011) ressalta, ainda, que é preciso existir um intervalo de tamanhos de poros crítico para cada *scaffold*, o qual pode variar dependendo do tipo de célula e do tecido que irá ser reparado.

A Figura 31 mostra as micrografias de MEV dos hidrogéis sintetizados após liofilização. Pelas imagens é possível notar claramente que a estrutura das matrizes mudou com a composição, porém todas apresentaram alta porosidade. As formulações contendo apenas quitosana (Figura 31. A, B) apresentaram estrutura porosa, e com indícios de interconexões entre si. Já as formulações com adição de colágeno (Figura 31. C, D) exibiram uma estrutura composta pelas fibras de colágeno intercaladas pela matriz porosa da quitosana.

Os hidrogéis de quitosana apresentaram poros com tamanho na faixa de 100 a $300\mu\text{m}$, enquanto nas amostras contendo colágeno a variação foi de 100- $900\mu\text{m}$. Portanto, assim como em outros estudos (FERNANDES et al., 2011); (ZHU et al., 2009), observa-se

que a adição de colágeno provoca um aumento nos poros dos hidrogéis, pois as fibras da proteína se arranjam entre os poros da quitosana.

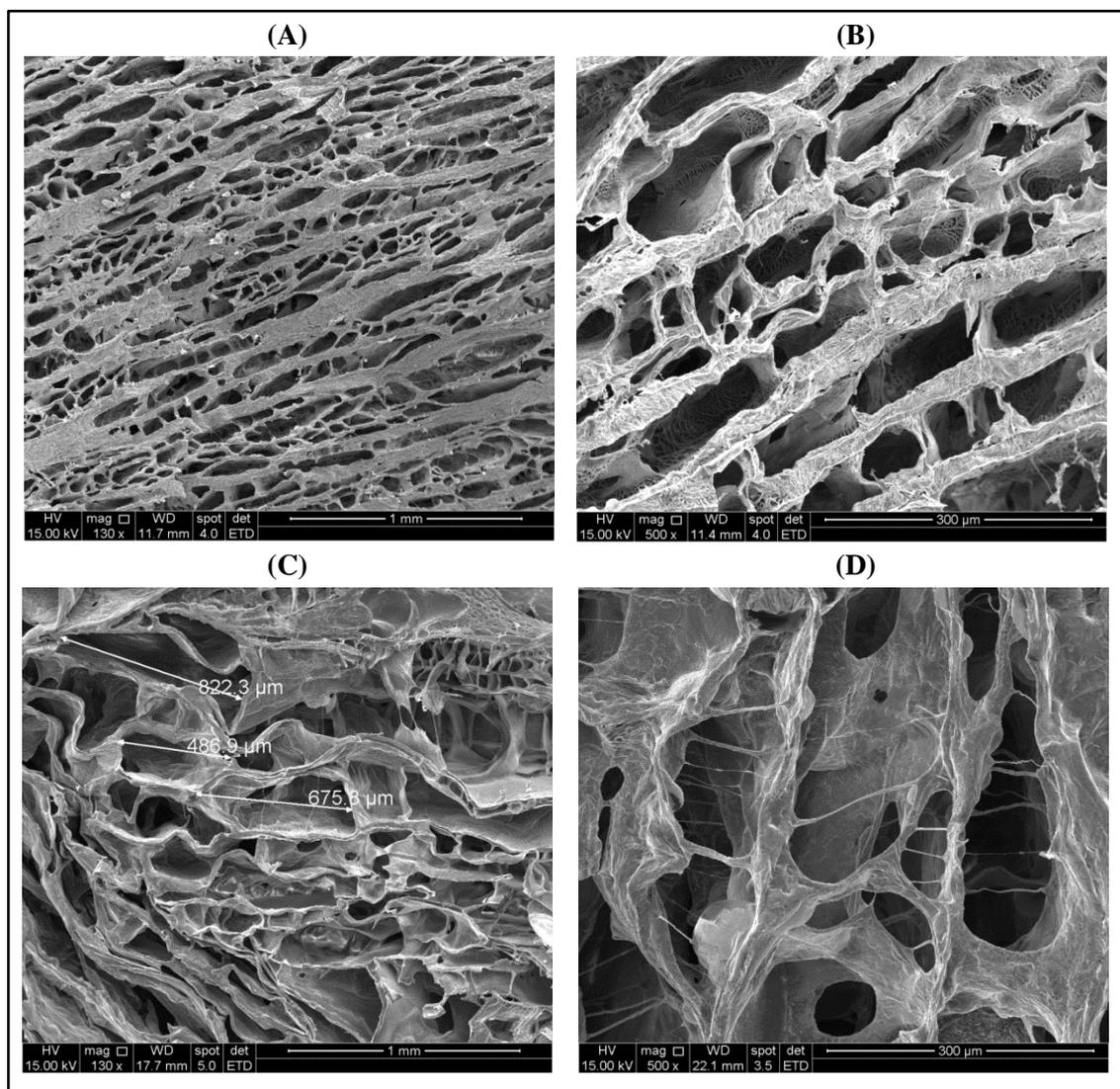


Figura 31. Micrografias (MEV) das amostras em diferentes ampliações: 100Q (A e B) e 70 Q (C e D).

A adição de vidro bioativo não provocou nenhuma mudança na estrutura dos hidrogéis (Figura 32), que mantiveram o mesmo tamanho e distribuição de poros.

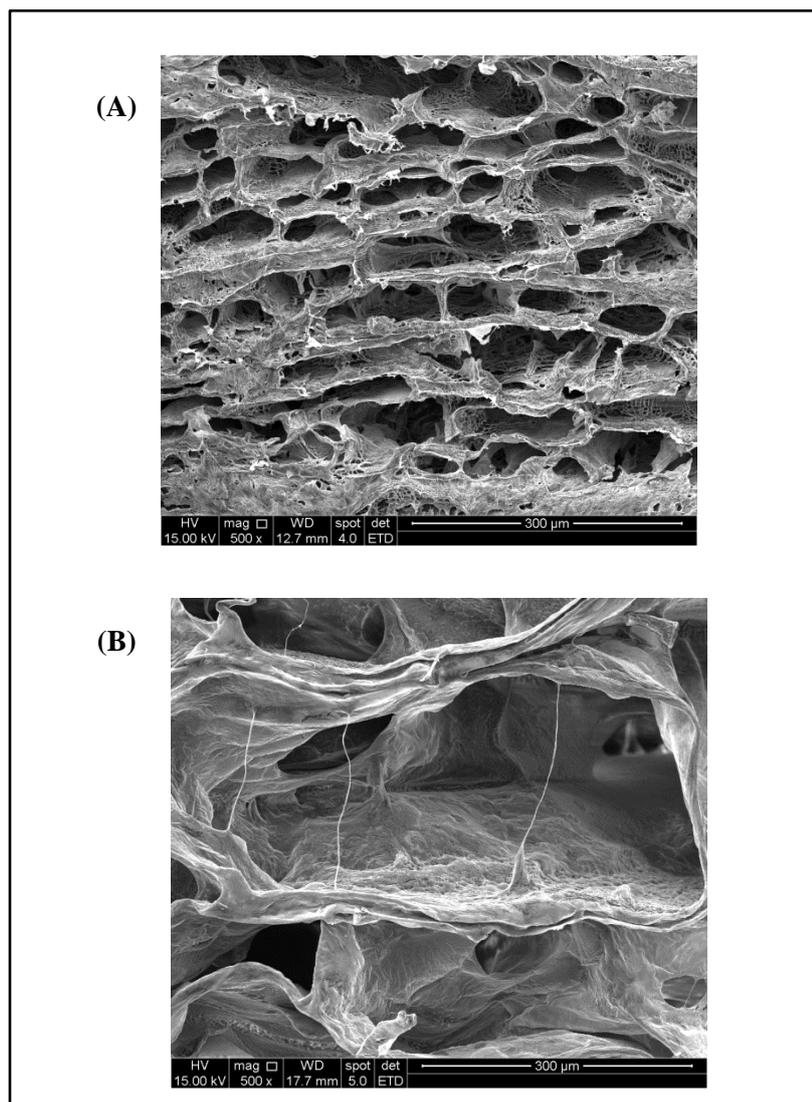


Figura 32. Micrografias (MEV) das amostras contendo 2% de vidro bioativo. (A) 100Q2V; (B) 70Q2V.

Na Figura 33 encontram-se os resultados das análises por EDS das respectivas amostras. O aparecimento de um pico correspondente ao silício comprova a presença do vidro bioativo no *scaffold*. A baixa intensidade desse pico se deve a pequena quantidade de nanopartículas de vidro bioativo adicionada aos hidrogéis, a qual se encontra próxima ao limite de detecção da técnica. Apesar da dificuldade de se visualizar as nanopartículas, optou-se por não aumentar a proporção de vidro bioativo nos hidrogéis porque acima de 2% as nanopartículas não se dispersavam no hidrogel, mostrando macroscopicamente uma separação de fases no sistema.

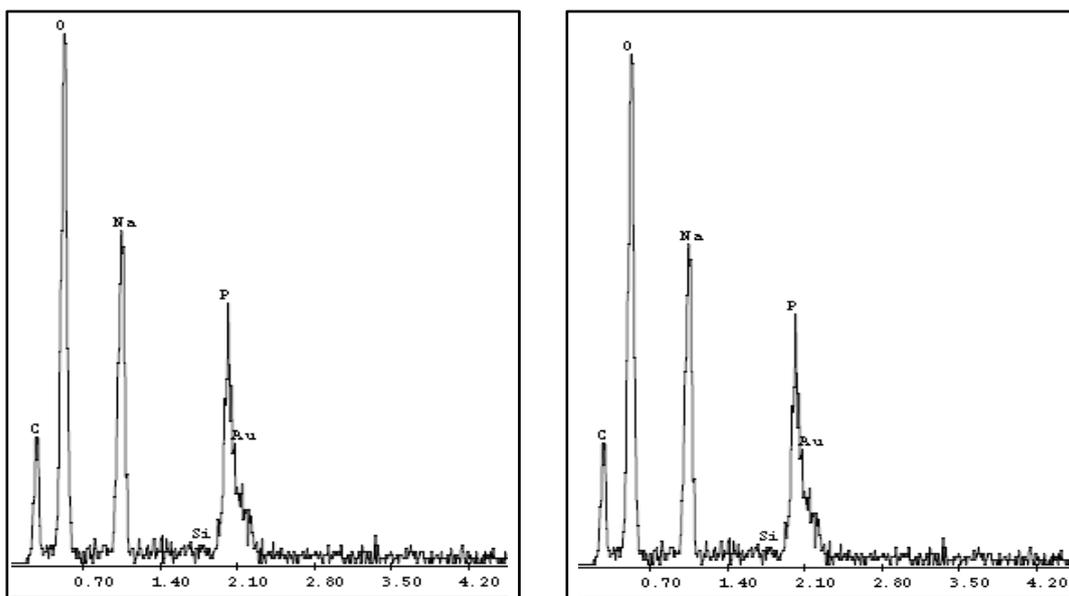


Figura 33. Espectros EDS das respectivas imagens MEV dos hidrogéis (A) 100Q2V e (B) 70Q2V.

Os picos de oxigênio, sódio e fósforo aparecem com alta intensidade no EDS e são provenientes do sal β -GP, que está presente em alta concentração nas formulações propostas (cerca de 18% em massa).

5.2.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 34 apresenta os espectros no infravermelho das formulações investigadas. Observa-se que os espectros são bem semelhantes, apresentando bandas de absorção características de cada componente da formulação.

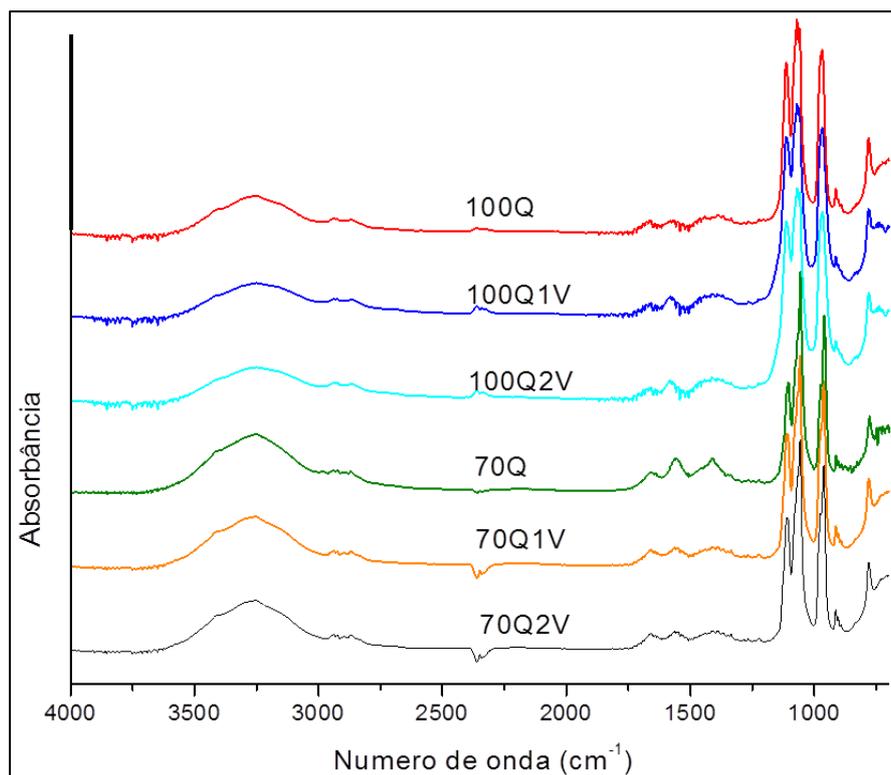


Figura 34. Espectros FTIR dos hidrogéis formulados (4000-600 cm^{-1}).

Foram identificadas algumas bandas novas em relação à quitosana e colágeno puros entre 1200-750 cm^{-1} . Se compararmos os espectros dos hidrogéis (Figura 35A) com o do sal β -GP (Figura 35 B), nessa faixa de número de onda, nota-se que os novos picos correspondem aos picos característicos do sal. Essas bandas aparecem com alta intensidade, devido a alta concentração do sal nos hidrogéis.

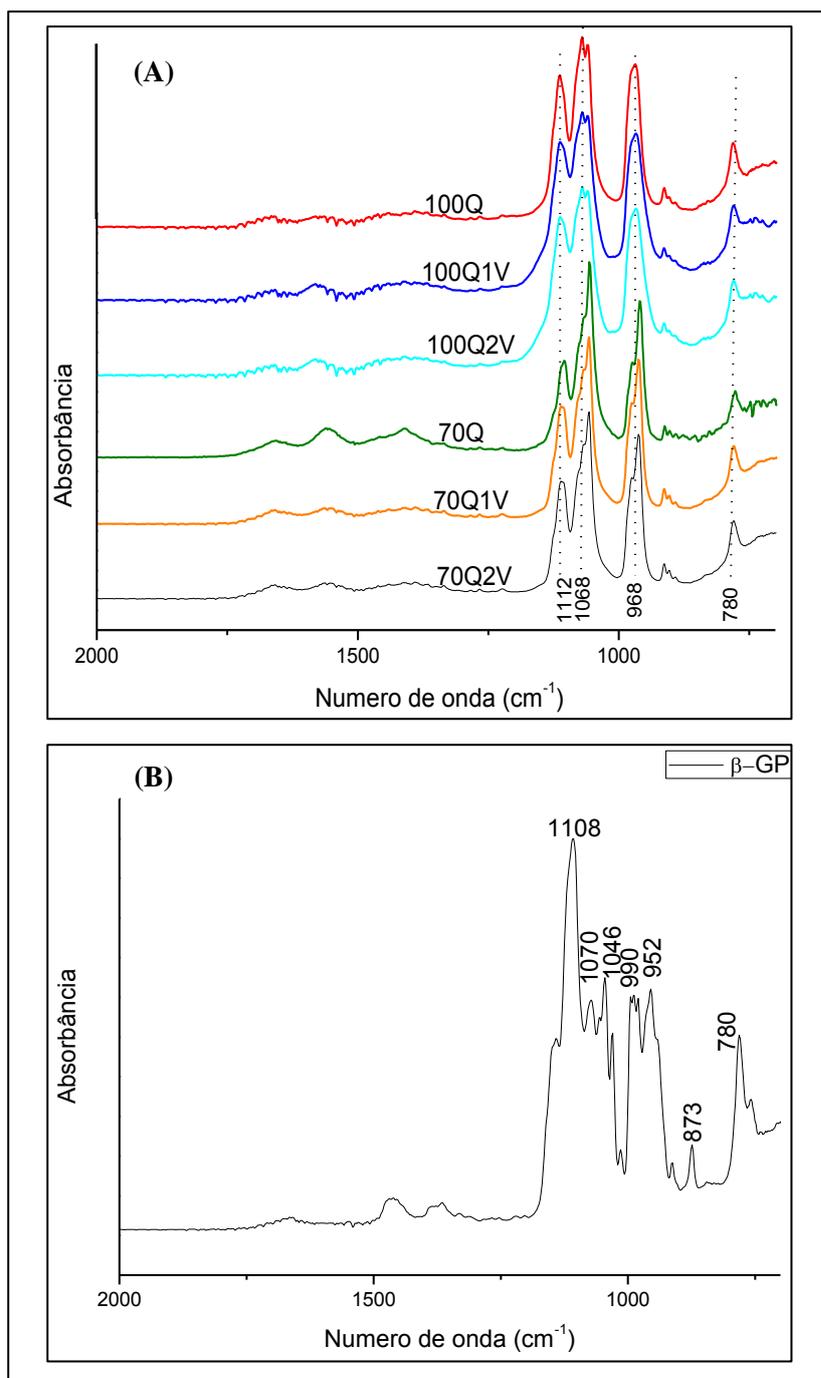


Figura 35. Espectros FTIR: (A) Hidrogéis formulados ($2000\text{-}700\text{cm}^{-1}$); (B) Sal β -GP ($2000\text{-}700\text{cm}^{-1}$).

Percebe-se, também, que não há diferenças significativas nos hidrogéis contendo vidro bioativo. Provavelmente as bandas características do material cerâmico não são visíveis nos espectros porque coincidem com as bandas do β -GP e pela pequena quantidade presente na formulação.

Com excessão das bandas característicos do sal, a ausência de novas bandas de absorção pode ser um indicativo de que as interações entre a quitosana e o colágeno são puramente físicas, sejam elas eletrostáticas (entre os grupos NH_3^+ da quitosana e COO^- do colágeno) ou interações do tipo ligações de hidrogênio estabelecidas entre as espécies (TONHI; PEPLIS, 2002; FERNANDES et al., 2011).

Entre as formulações com e sem colágeno pode ser vista uma pequena diferença na intensidade das bandas da amida I (1658cm^{-1}) e amida II (1560cm^{-1}). Essa mudança condiz com os resultados encontrados por FERNANDES et al. (2011), que estudou a interação entre quitosana e colágeno em blendas e percebeu que a banda da amida I tem intensidade maior nas blendas com maior quantidade de colágeno. A banda de amida II também manteve a mesma tendência, contradizendo os resultados encontrados por FERNANDES et al. (2011) e SIONKOWSKA (2004). A tendência observada por esses autores é que, aumentando a proporção de colágeno, essa banda diminui. No entanto, essa tendência pode ser justificada se compararmos os espectros das matérias-primas, onde nota-se que essa banda é mais intensa no colágeno, em comparação à quitosana. Dessa forma, ao adicionar-se colágeno às formulações, a banda de amida II aumenta em intensidade.

5.2.4. Ensaio Reológico

Para avaliar a temperatura e tempo de gelificação, as amostras foram submetidas a um ensaio reológico, onde foram aquecidas de 4°C (temperatura de armazenamento) a 45°C . As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis foram avaliadas pela medida dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') frente ao aquecimento. A Figura 36 mostra a evolução de G' e G'' dos hidrogéis de quitosana e quitosana/colágeno sob aquecimento.

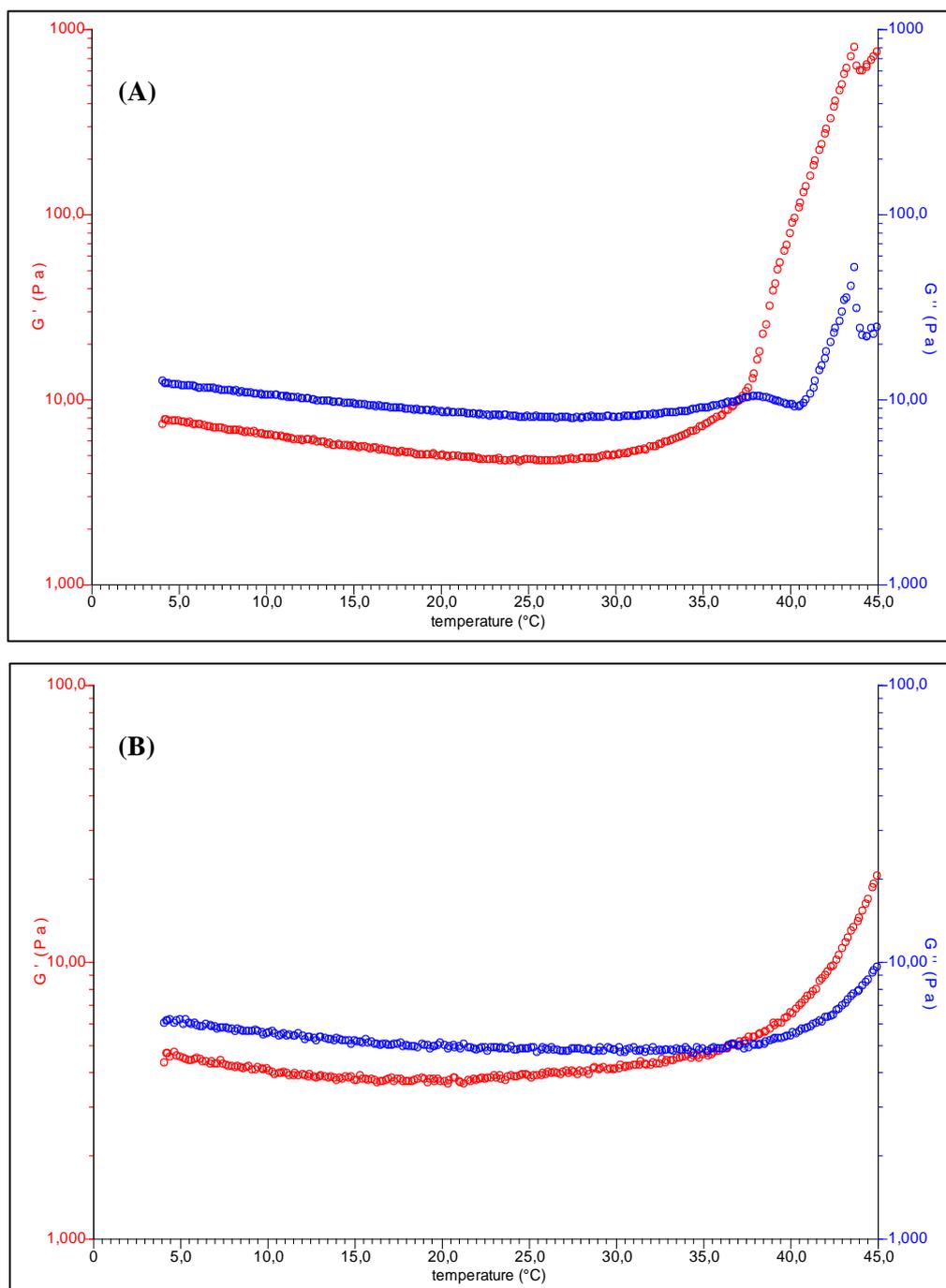


Figura 36. Perfil do comportamento reológico dos hidrogéis frente ao aquecimento controlado. (A) amostra 100Q; (B) amostra 70Q.

O perfil das curvas permaneceu o mesmo após adição das nanopartículas de vidro bioativo. Observando as curvas, nota-se que, no começo do aquecimento, as amostras apresentam $G' < G''$. Esse comportamento condiz com o esperado, pois até a

temperatura de gelificação, as amostras fluem, predominando seu comportamento viscoso. Dessa forma, o módulo característico do componente viscoso da amostra, G'' apresenta valores maiores que o componente elástico (G') no começo do aquecimento. Além disso, nota-se que ambos os módulos diminuíram com o aumento da temperatura, o que é um comportamento comum de soluções poliméricas. CHO et al. (2005) explica que essa redução nos parâmetros reológicos se deve ao fato de as cadeias poliméricas ganharem maior flexibilidade e compactação com o aumento de temperatura. Dessa forma, o volume molecular diminui e, conseqüentemente, a viscosidade do sistema. Em seguida, observou-se um intervalo de temperatura em que tanto G' quanto G'' apresentaram um aumento abrupto frente ao aquecimento, devido à rápida formação da rede tridimensional. No entanto, a taxa de crescimento de G' foi muito maior que a de G'' nesta região, o que indica que a evolução da estrutura do gel contribui para o aumento da elasticidade do sistema.

A temperatura onde G' e G'' se interceptam ($\tan \delta=1$) foi definida como a temperatura de gelificação do sistema (COUTO; HONG; MANO, 2009). A Tabela 6 mostra as temperaturas de gelificação das formulações estudadas e os valores de G' e G'' em diferentes temperaturas.

Tabela 6. Temperatura de gelificação e valores de G' e G'' das formulações propostas.

Amostra	Temperatura de gelificação ($^{\circ}\text{C} \pm$ desvio padrão)	4 $^{\circ}\text{C}$		25 $^{\circ}\text{C}$		37 $^{\circ}\text{C}$	
		G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
100Q	37 \pm 0,5	4,186	8,802	2,800	5,597	6,558	6,436
100Q1V	37 \pm 0,7	7,225	11,950	4,280	7,439	9,110	9,788
100Q2V	37 \pm 0,4	7,247	12,48	4,682	8,000	9,774	9,898

70Q	37± 2,1	3,003	5,674	2,599	4,013	9,112	6,457
70Q1V	37± 1,7	5,796	10,680	3,904	6,804	10,512	8,377
70Q2V	37± 1,9	7,004	11,312	6,344	8,245	12,770	9,570

As medidas reológicas foram realizadas em triplicata, em diferentes amostras que foram preparadas sob as mesmas condições e utilizando os mesmos parâmetros de análise. Os ensaios com os hidrogéis de quitosana mostraram melhor reprodutibilidade, apresentando uma diferença entre os pontos de gelificação de, no máximo, 0,7°C. Em contrapartida, os hidrogéis contendo colágeno apresentaram uma diferença de até 2,1°C entre os pontos de gelificação das amostras. Estes resultados reafirmam as dificuldades encontradas ao adicionar colágeno às formulações. Provavelmente, ao ser submetido ao teste, as fibras do colágeno podem ter sofrido alterações, que refletiram nos parâmetros reológicos.

Outra diferença notada entre as formulações com e sem colágeno está na rigidez do material após gelificação. As amostras com colágeno apresentaram maior rigidez, o que pode ser confirmado pelos valores de G' (módulo de elasticidade) à 37°C. Nessa temperatura, amostras 100Q, por exemplo, apresentaram um valor médio de $G' = 6,558$ Pa, enquanto para as amostras 70Q esse valor foi de 9,112 Pa.

A adição das nanopartículas de vidro bioativo também contribuiu para o aumento da rigidez das amostras. Observando-se os resultados, nota-se que quanto maior a quantidade de vidro bioativo, maior o valor da componente elástica (G') dos hidrogéis. Essa tendência é justificada, pois o material cerâmico é um material puramente elástico e contribui para o aumento de G' .

Para avaliar o tempo de gelificação dos hidrogéis, as amostras foram submetidas a um Teste de Varredura de Tempo (*Time Sweep*) à 37°C. No entanto, para realizar este teste é necessário garantir que a amostra esteja na *faixa de viscoelasticidade linear*, ou seja, deve-se garantir que a deformação imposta seja lenta ou pequena o bastante para que as respostas a esse estímulo respondam linearmente. Desta forma, as propriedades passam a ser independentes da tensão ou deformação imposta. Com essa finalidade as amostras foram submetidas a um teste de Varredura de Deformação (*Strain sweep*) à 37°C,

variando a deformação de 0,01 a 100% (1×10^{-4} a 1,00). O comportamento das componentes viscoelásticas com a deformação é ilustrado na Figura 35, destacando a faixa de viscosidade linear (Figura 37B).

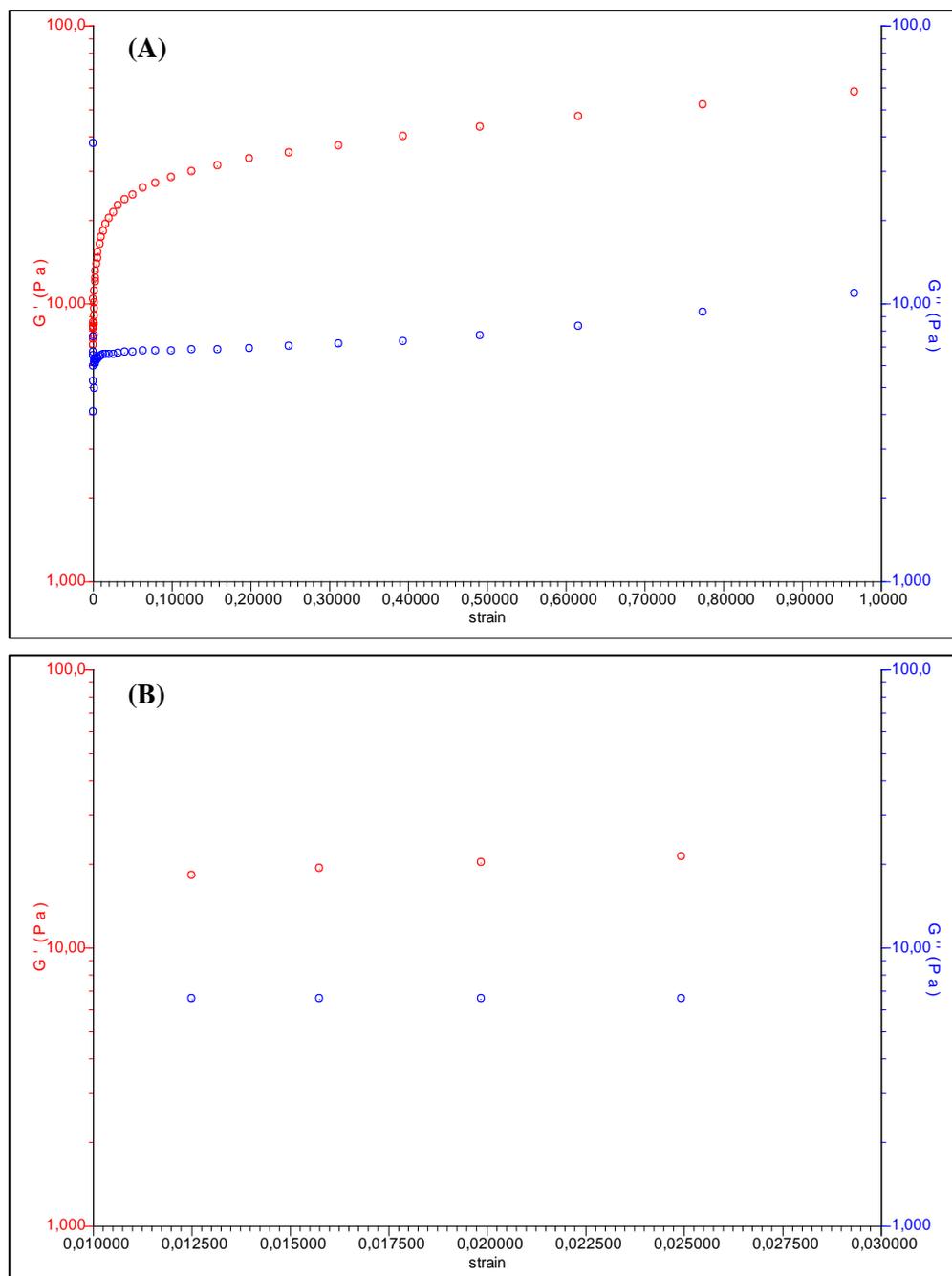


Figura 37. Comportamento viscoelástico da amostra 100Q frente à varredura de deformação (*strain sweep*).

(A) varredura de 1×10^{-4} - 1,00 (B) 0,01-0,03 (faixa de viscosidade linear).

O perfil das curvas G' e G'' foram semelhantes para todas amostras, que apresentaram faixa de viscosidade linear entre 0,008-0,030. Para cada amostra foi calculado o valor médio de deformação que, por fim, foi utilizado como parâmetro para o teste de *Time Sweep*.

Uma curva típica dos resultados do teste *Time Sweep* é ilustrada na Figura 38. No experimento, realizado à 37°C, é possível observar o tempo necessário para ocorrer a transição sol-gel das amostras.

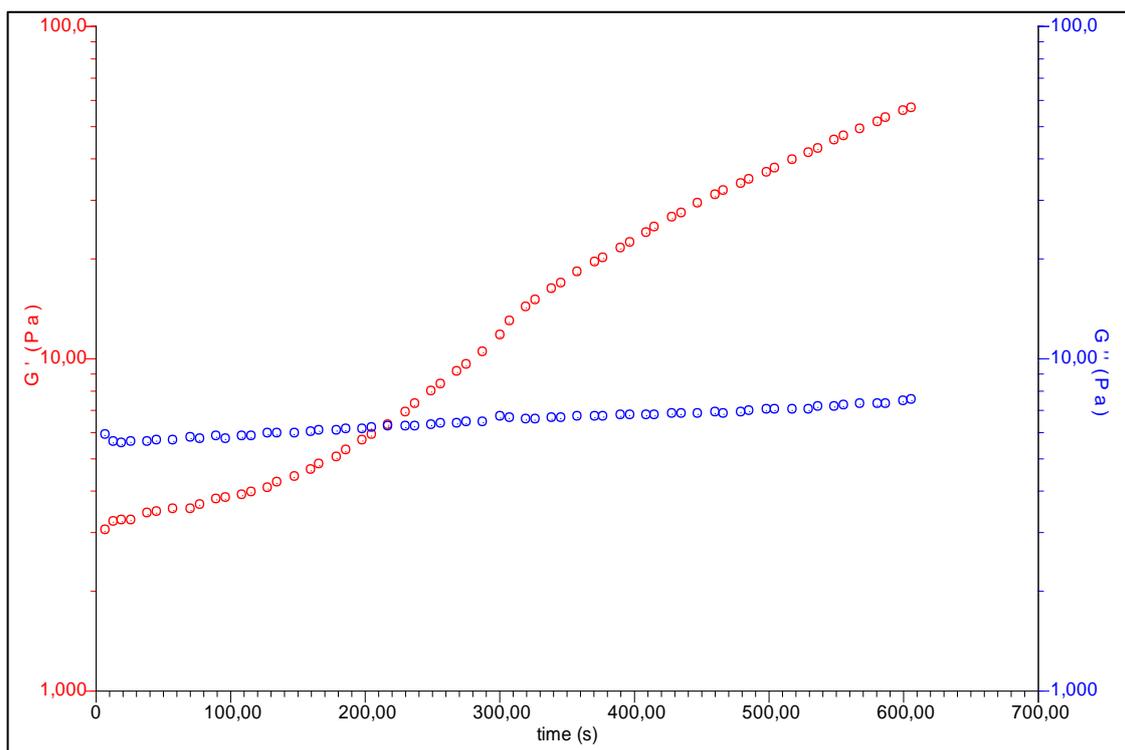


Figura 38. Resultado do teste *Time Sweep* (para determinação do tempo de gelificação) da amostra 100Q.

No início, há uma predominância do comportamento viscoso da amostra ($G'' > G'$), porém após alguns minutos há formação da rede tridimensional, fazendo com que o componente elástico predomine. O ponto de cruzamento de G' e G'' foi determinado como o ponto de gelificação das amostras. O tempo de gelificação de cada formulação proposta é exibido na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de gelificação das amostras estudadas.

Amostra	Tempo de gelificação (\pm desvio padrão)*
100Q	3'57'' \pm 22''
100Q1V	3'59'' \pm 26''
100Q2V	3'50'' \pm 20''
70Q	3'48'' \pm 25''
70Q1V	3'35'' \pm 19''
70Q2V	3'52'' \pm 27''

* Valor médio das amostras em triplicata.

Nota-se que não houve uma variação significativa no tempo de gelificação das amostras, que ficou na faixa de 3 min e 35 segundos a 3 minutos e 59 segundos. Provavelmente, isso se deve ao fato de a quantidade de sal β -GP não ter sido fixa para todas as formulações. Controlando o pH por meio da adição do sal permitiu que as formulações tivessem uma temperatura e tempo de gelificação próximos.

Qualitativamente, foi realizado um teste com seringa de insulina (1 mL) para verificar a injetabilidade dos hidrogéis. Todas as amostras mostraram comportamento viscoso adequado e fluíram pela abertura da agulha. Esse fato, aliado ao tempo de gelificação obtido confirmam a viabilidade de uso desses sistemas como *scaffolds* injetáveis.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram preparados e caracterizados hidrogéis termossensíveis a base de quitosana, colágeno e nanopartículas de vidro bioativo com potencial para uso como matriz injetável na engenharia de tecido.

A formulação dos hidrogéis foi realizada em pH e temperatura fisiológicos, o que sugere que esses materiais podem incorporar células vivas.

Os resultados mostraram que a adição de colágeno e vidro bioativo nos hidrogéis termossensíveis de quitosana modificam as propriedades do sistema, principalmente em relação à morfologia e propriedades reológicas.

Os hidrogéis preparados apresentaram características morfológicas adequadas para uso na engenharia de tecido, exibindo alta porosidade e interconectividade dos poros. As imagens obtidas por MEV mostraram que a adição de colágeno provoca um aumento do tamanho dos poros dos hidrogéis, o que pode ser um ponto positivo para a adesão celular.

O estudo reológico permitiu o acompanhamento do processo de gelificação desses hidrogéis, mostrando que a adição de colágeno e vidro bioativo aumenta a rigidez da matriz.

Todas as amostras mostraram comportamento viscoso adequado para fluírem e serem injetadas por meio de uma seringa e agulha. Além disso, na temperatura fisiológica, esses sistemas sofrem gelificação em um espaço de tempo relativamente curto (cerca de 4 minutos), o que pode agilizar o processo de implantação do hidrogel, evitando que ele sofra diluição na matriz extracelular.

Em resumo, os sistemas estudados apresentam propriedades físico-químicas, morfológicas e reológicas que os tornam potenciais candidatos para uso como *scaffolds* injetáveis.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a possibilidade de aplicação dos hidrogéis na área biomédica, estudos biológicos (*in vitro* e *in vivo*), utilizando cultura de células devem ser realizados para verificar a biocompatibilidade e citotoxicidade das matrizes desenvolvidas.

A realização de testes de bioatividade dos hidrogéis é outro ponto importante para verificar se a adição de vidro bioativo resulta na formação da camada de hidroxiapatita carbonatada, resultando em melhor interação entre o biomaterial e o tecido a ser tratado.

Além disso, também podem ser realizados testes de degradação para avaliar se a taxa de degradação dos hidrogéis é compatível com a taxa de crescimento do novo tecido.

Também pode ser feita avaliação do grau de intumescimento desses sistemas quando submetidos às condições fisiológicas.

8. REFERÊNCIAS

ALHOSSEINI, S. N. et al. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 25–34, jan. 2012.

ALLEGRETTI, L. J. M. **Estudo da formação de fosfatos de cálcio pela mineralização de matrizes de colágeno**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2009.

ANDRADE, Â. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas - Estado da Arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100–104, 2006.

AOUADA, A. F.; MATTOSO, L. H. C. **Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas** **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/658248>>

ARCA, H. Ç.; ŞENEL, S. Chitosan Based Systems for Tissue Engineering Part 1 : Hard Tissues. **Journal of Pharm. Sci.**, v. 33, p. 35–49, 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana : aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 3, p. 27–34, 2007.

BALAMURUGAN, A. et al. Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P2O5-SiO2-ZnO bioglass. **Acta biomaterialia**, v. 3, n. 2, p. 255–62, mar. 2007.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BOCCACCINI, A. R. et al. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 13, p. 1764–1776, nov. 2010.

BRAGHIROLI, D. I. **Produção de scaffolds contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bio-electrospraying**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

BRAMBILLA, R. **Sílicas funcionalizadas com octadecilsilano pelos métodos sol-gel e grafting**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

Brazil Biomaterial Market 2010-2015. Disponível em: <http://www.researchandmarkets.com/research/7d7049/brazil_biomaterial>. Acesso em: 6 out. 2012.

CACCIOTTI, I. et al. Sol-gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 23, n. 8, p. 1849–66, ago. 2012.

CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

CANELLA, K. M. N. D. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13–17, fev. 2001.

CARVALHO, B. B. DE; OLIVEIRA, A. A. R.; PEREIRA, M. DE M. **Produção de esferas de vidro bioativo por rota sol-gel usando um processo otimizado com cavitação ultrassônica e adição de polietileno glicol como agente surfactante** Produção de esferas de vidro bioativo por rota sol-gel usando um processo otimizado com cavitação ultrassônica e adição de polietileno glicol como agente surfactante Natal Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, , 2012. Disponível em: <<http://colaob.com.br/anais>>

CHANG, M. C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4811–8, dez. 2002.

CHAUDRY, Z. F. et al. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 40–46, 1997.

CHENITE, A et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n. 21, p. 2155–61, nov. 2000.

CHO, J. et al. Physical gelation of chitosan in the presence of beta-glycerophosphate: the effect of temperature. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3267–75, 2005.

CHO, M. H. et al. Chitosan Gel as an In Situ –Forming Scaffold for Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vivo. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 1099–1108, jun. 2008.

CHUANG, C.; DON, T.; CHIU, W. Synthesis of Chitosan-Based Thermo- and pH-Responsive Porous Nanoparticles by Temperature-Dependent Self-Assembly Method and Their Application in Drug Release. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 47, n. 19, p. 5126–5136, 2009.

COELHO, M. DE B. **Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

COSTA-PINTO, A. R.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 17, n. 5, p. 331–47, out. 2011.

COUTO, D. S.; HONG, Z.; MANO, J. F. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 115–23, jan. 2009.

CUNHA, M. R. DA. **Implantes tridimensionais de colágeno polianiônico em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratas ovariectomizadas**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparizon of methods. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. XVII, p. 5–20, 2012.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, ago. 2011.

DENG, C. et al. A collagen–chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 10, p. 3099–109, out. 2010.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, p. 1–19, 2011.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, nov. 2003.

FERNANDES, L. L. et al. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. **Polímeros**, v. 21, n. 1, p. 1–6, 2011.

FRATZL, P. Collagen: Structure and Mechanics. In: FRATZL, P. (Ed.). **Collagen: Structure and Mechanics**. Potsdam: Springer, 2008. p. 15–16.

GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J.; RAMAZANI S.A., A. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 47–53, 8 fev. 2007.

GELMAN, R. A.; WILLIAMS, B. R.; PIEZ, K. A. Collagen fibril formation. Evidence for a multistep process. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, p. 180–186, 1979.

GIBSON, M. I.; O'REILLY, R. K. To aggregate, or not to aggregate? considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 17, p. 7204–13, 7 set. 2013.

GIRI, T. K. et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, p. 1–11, set. 2012.

GRIGOLON, L. B. **Modificação de quitina e quitosana por via enzimática**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2001.

GUTOWSKA, A.; JEONG, B.; JASIONOWSKI, M. Injectable Gels for Tissue Engineering. **The Anatomical Record**, v. 263, n. 4, p. 342–349, 2001.

HASIRCI, V.; YUCEL, D. Polymers Used in Tissue Engineering. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–17, 2008.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M.; KEMP, P. Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds. In: HENCH, L. L.; POLAK, J. M.; KEMP, P. (Eds.). **Future strategies for tissue and organ replacement**. 1st. ed. [s.l.] Imperial College Press, 2002. p. 12–13.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33–72, jan. 1990.

HIN, T. S. Engineering materials for biomedical applications. In: TEOH, S. H. et al. (Eds.). **Engineering materials for biomedical applications**. Singapore: World Scientific Publishing, 2004. p. 1–13, 11–1, 11–2,.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico- química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171–180, 1995.

HOERSTRUP, S. P. et al. Tissue Engineering. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 710.

HORN, M. M. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. D. G. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 201–204, set. 2010.

Jl, Q. X. et al. Biocompatibility of a chitosan-based injectable thermosensitive hydrogel and its effects on dog periodontal tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1153–1160, nov. 2010.

JONES, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1275–1281, abr. 2009.

JUNIOR, E. D. S. C.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008.

JÚNIOR, E. DE S. C. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

JUNIOR, P. E. S.; ORÉFICE, R. L. Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 109–115, set. 2001.

KEW, S. J. et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 9, p. 3237–47, set. 2011.

KITTEN, G. T. et al. Type VI collagen in the cardiac valves and connective tissue septa during heart development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1189–1193, 1996.

KITTEN, G. T.; MARKWALD, R. R.; RUNYAN, R. B. Parameters influencing formation and migration of cardiac mesenchymal cells in three dimensional collagen gels. In: HAWKES, S.; WANG, J. (Eds.). **Extracellular Matrix**. New York: Academic Press, 1982. p. 159–163.

KOSEN, Y. et al. Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. **Journal of periodontal research**, v. 47, n. 5, p. 626–34, out. 2012.

KRETLOW, J. D.; KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4-5, p. 263–73, 2007.

KUCHARSKA, M. et al. Fabrication of in-situ foamed chitosan/ β -TCP scaffolds for bone tissue engineering application. **Materials Letters**, v. 85, p. 124–127, out. 2012.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.

LEE, C. H.; SINGLA, A; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International journal of pharmaceuticals**, v. 221, n. 1-2, p. 1–22, 19 jun. 2001.

LEE, S. J.; KIM, S. S.; LEE, Y. M. Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethylene glycol) macromer and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 2, p. 197–205, fev. 2000.

LIU, M. et al. Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 186–191, dez. 2013.

LIU, Y.; MA, L.; GAO, C. Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 8, p. 2361–2366, dez. 2012.

MA, L. et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4833–4841, nov. 2003.

MACEDO, T. L. **Características Estruturais e Degradação de Matrizes de Poli(álcool vinílico)/ Quitosana/ Vidro Bioativo Obtidas por Liofilização**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MARTINS, T. **Síntese e caracterização de hidrogéis de quitosana quimicamente reticulados para aplicação potencial no tratamento tópico de lesões cutâneas**. [s.l.] Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2013.

MIKOS, A. G. et al. Synthetic Bioresorbable Polymer Scaffolds. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier, 2004. p. 735–749.

MOLINARO, G. et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2717–22, jul. 2002.

MONTEIRO, N. DOS S. **Caracterização de matrizes de quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS**. [s.l.] Universidade Nova de Lisboa, 2008.

NETO, C. G. T. et al. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97–103, nov. 2005.

NEVES, S. C. et al. Chitosan/poly(epsilon-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1068–79, fev. 2011.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, mar. 2011.

OHARA, T. et al. Evaluation of scaffold materials for tooth tissue engineering. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 94, n. 3, p. 800–5, 1 set. 2010.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, n. 2, p. 025011, abr. 2013.

OLIVEIRA, A. A. R. DE. **Nova Metodologia de obtenção de nanopartículas de vidro bioativo, poliuretanas biodegradáveis e seus compósitos para aplicações biomédicas**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 72

PALLELA, R. et al. Biophysicochemical evaluation of chitosan-hydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering. **Journal of biomedical materials research. Part A**, p. 486–495, 29 nov. 2011.

PARENTEAU-BAREIL, R. et al. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3757–65, out. 2011.

PARK, J.; LAKES, R. S. Tissue Engineering Materials and Regeneration. In: PARK, J.; LAKES, R. S. (Eds.). **Biomaterials - An Introduction**. 3 rd ed. New York: Springer, 2007. p. 485–515.

PEREIRA, M. M.; HENCH, L. L. Bioactive Glass. In: WNEK, G. E.; BOWLIN, G. L. (Eds.). **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 53–62.

PEROGLIO, M. et al. Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, n. 7, p. 2679–2685, jan. 2007.

PINTO, M. DE F. F. V. L. **Gelificação de polímeros derivados da celulose**. [s.l.] Univeridade de Aveiro, 2007.

PIRES, G. **Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2010.

PRABAHARAN, M.; MANO, J. F. Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. **Macromolecular bioscience**, v. 6, n. 12, p. 991–1008, 8 dez. 2006.

RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–73, jun. 2011.

RAMALHO, E. G. **Otenção de carâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de manganês como aditivo**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

RATH, K. Novel Materials from Solgel Chemistry. **Science & Technology Review**, v. May, p. 24–26, maio 2005.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier, 2004. p. 879

RAVARIAN, R. et al. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. **Ceramics International**, v. 36, n. 1, p. 291–297, jan. 2010.

REIS, E. M. **Síntese e caracterização de híbridos porosos à base de sílica e quitosana obtidos através do processo sol-gel para aplicação em engenharia de tecidos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

RIVA, R. et al. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. **Advances in Polymer Sciences**, v. 244, p. 19–44, 2011.

RODRIGUES, C. V. M. et al. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4987–4997, dez. 2003.

RUEL-GARIÉPY, E. et al. Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 82, n. 2-3, p. 373–83, 21 ago. 2002.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular bioscience**, v. 4, n. 8, p. 743–65, 9 ago. 2004.

SANTOS, J. E. DOS et al. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.

SANTOS, M. H. et al. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 2, p. 790–800, mar. 2013.

SIONKOWSKA, A. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, fev. 2004.

SONG, K. et al. Preparation, fabrication and biocompatibility of novel injectable temperature-sensitive chitosan/glycerophosphate/collagen hydrogels. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 21, n. 10, p. 2835–42, out. 2010.

SOUSA, A. DE. **Híbridos de gel polimérico em sílica mesoporosa estruturalmente ordenada para liberação controlada de fármacos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

TAN, H. et al. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2499–506, maio 2009.

TONHI, E.; PEPLIS, A. M. DE G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943–948, 2002.

TRIPATHI, A. et al. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 294–9, 1 jan. 2012.

WANG, L.; STEGEMANN, J. P. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with beta-glycerophosphate for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 3976–85, maio 2010.

WANG, X. et al. **Investigation of a Collagen-Chitosan-Hydroxyapatite System for Novel Bone Substitutes** (X. Zhang et al., Eds.) Bioceramics 19. **Anais...Chengdu: TTP USA**, 2007

YAN, L.-P. et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 95, n. 2, p. 465–75, nov. 2010.

YANG, T.-L. Chitin-based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 3, p. 1936–63, jan. 2011.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, abr. 2010.

ZHOU, H. Y. et al. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 265–273, jul. 2008.

ZHU, Y. et al. Collagen-chitosan polymer as a scaffold for the proliferation of human adipose tissue-derived stem cells. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 20, n. 3, p. 799–808, mar. 2009.