

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,  
MATERIAIS E DE MINAS

TESE DE DOUTORADO

**Biocompósitos de quitosana e derivados/nanohidroxiapatita reticulados com  
epicloridrina e dopados com Zinco para potencial aplicação em engenharia  
tecidual**

Autor: Vitor César Dumont

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur, Dr.

Belo Horizonte

Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,  
MATERIAIS E DE MINAS

Vitor César Dumont

**Biocompósitos de quitosana e derivados/nanohidroxiapatita reticulados com  
epicloridrina e dopados com Zinco para potencial aplicação em engenharia  
tecidual**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas, área de concentração Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte

Escola de Engenharia - UFMG

2017

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais, irmãos e a Camila.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser presença constante, nos desafios, nas oportunidades, nas conquistas. Protegendo-me com Seu Amor e orientando-me com Sua Sabedoria.

Ao Prof. Dr. Herman Sander Mansur, meu orientador, por ter se mostrado sempre presente, seja por meio de uma palavra amiga, do incentivo, da confiança ou do simples desejo que tudo desse certo. Agradeço pelos ensinamentos, pelas oportunidades, e pelos momentos inesquecíveis compartilhados.

À Dra. Alexandra A. P. Mansur, gerente do Laboratório LASMAT, pela preocupação, dedicação e por todos os ensinamentos frente a realização deste trabalho.

Aos meus amados pais, por acreditarem e lutarem para concretização dos meus sonhos. Agradeço a benção do imensurável amor de vocês, pelo exemplo de dignidade e coragem, e por se fazerem presentes em mais uma conquista.

Às minhas irmãs, por estarem ao meu lado sempre, por todo o carinho e ternura.

À Camila, por ser uma grande incentivadora em tudo que proponho.

À Maria Helena Santos e Adriana Gonçalves Silva, pelo carinho, incentivo e pela amizade.

Aos professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas – UFMG.

A todos os amigos dos Laboratórios de Análise de Superfícies e Materiais – LASMAT, pela cumplicidade e preciosas colaborações, especialmente à Nádia e Patrícia.

Ao Prof. Dr. Marcus Sá e a Sandhra Carvalho, pela contribuição neste trabalho.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e à UFMG, pela liberação de bolsas e recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Lista de Figuras                                                                                                                       | ix        |
| Lista de Tabelas                                                                                                                       | xvi       |
| Lista de Notações                                                                                                                      | xvii      |
| Resumo                                                                                                                                 | xx        |
| Abstract                                                                                                                               | xxi       |
| <b>CAPÍTULO I.....</b>                                                                                                                 | <b>01</b> |
| 1.1 Introdução.....                                                                                                                    | 01        |
| 1.2 Objetivos.....                                                                                                                     | 05        |
| 1.3 Revisão Bibliográfica.....                                                                                                         | 06        |
| 1.3.1 Tecido ósseo.....                                                                                                                | 06        |
| 1.3.1.1 Remodelação óssea.....                                                                                                         | 11        |
| 1.3.1.2 Engenharia de tecido ósseo.....                                                                                                | 17        |
| 1.3.1.3 Enxertos de tecido ósseo.....                                                                                                  | 20        |
| 1.3.2 Biomateriais.....                                                                                                                | 22        |
| 1.3.2.1 Biocerâmicas.....                                                                                                              | 26        |
| 1.3.2.1.1 Fosfato de Cálcio.....                                                                                                       | 27        |
| 1.3.2.1.1.1 Hidroxiapatita.....                                                                                                        | 29        |
| 1.3.2.1.1.2 Fosfato de Cálcio Tri-básico.....                                                                                          | 34        |
| 1.3.2.1.1.3 Fosfato de Cálcio BiFásico.....                                                                                            | 34        |
| 1.3.2.2 Polímeros.....                                                                                                                 | 35        |
| 1.3.2.2.1 Quitosana e derivados.....                                                                                                   | 37        |
| 1.3.2.3 Agentes Reticulantes .....                                                                                                     | 41        |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>                                                                                                                | <b>44</b> |
| 2.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho.....                                                                                         | 44        |
| 2.2 Procedimento Experimental.....                                                                                                     | 45        |
| 2.2.1 Materiais .....                                                                                                                  | 46        |
| 2.2.2 Síntese da O-carboximetil quitosana (CMQ).....                                                                                   | 47        |
| 2.2.3 Síntese dos filmes de quitosana (QUI), O-carboximetil quitosana (CMQ) e glicol quitosana (GLI-Q) por evaporação do solvente..... | 47        |
| 2.2.4 Síntese das nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP).....                                                                       | 48        |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.5 Síntese dos biocompósitos de quitosana (QUI), O-carboximetil quitosana (CMQ) e glicol quitosana (GLI-Q) por evaporação do solvente..... | 49 |
| 2.2.6 Caracterização da QUI e CMQ.....                                                                                                        | 50 |
| 2.2.6.1 Titulação Potenciometrica.....                                                                                                        | 50 |
| 2.2.6.2 Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear.....                                         | 51 |
| 2.2.7 Caracterização dos filmes e biocompósitos.....                                                                                          | 52 |
| 2.2.7.1 Análise morfológica.....                                                                                                              | 52 |
| 2.2.7.1.1 Microscopia de Luz.....                                                                                                             | 52 |
| 2.2.7.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia.....                                       | 52 |
| 2.2.7.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....                                                                                          | 53 |
| 2.2.7.1.4 Microscopia de Força Atômica.....                                                                                                   | 53 |
| 2.2.7.1.5 Microtomografia de Raios-X.....                                                                                                     | 53 |
| 2.2.7.1.6 Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X com Dispersiva por Comprimento de Onda.....                                              | 53 |
| 2.2.7.1.7 Difração de Raios-X.....                                                                                                            | 54 |
| 2.2.7.1.8 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....                                                                    | 54 |
| 2.2.8 Ensaio Biológicos.....                                                                                                                  | 54 |
| 2.2.8.1 Ensaio de (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide).....                                                         | 55 |
| 2.2.8.2 Atividade da Fosfatase Alcalina.....                                                                                                  | 55 |
| 2.2.8.3 Live/Dead.....                                                                                                                        | 56 |
| 2.3 Resultados e Discussão.....                                                                                                               | 57 |
| 2.3.1 Caracterização da QUI, CMQ e GLI-Q.....                                                                                                 | 57 |
| 2.3.1.1 Titulação Potenciometrica.....                                                                                                        | 57 |
| 2.3.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....                                                                      | 57 |
| 2.3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear.....                                                                                                    | 60 |
| 2.3.2 Caracterização dos Biocompósitos.....                                                                                                   | 62 |
| 2.3.2.1 Análise Morfológica.....                                                                                                              | 62 |
| 2.3.2.2 Difração de Raios-X.....                                                                                                              | 71 |
| 2.3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....                                                                      | 72 |
| 2.3.2.4 Nucleação e Crescimento das partículas de nHA.....                                                                                    | 76 |
| 2.3.2.5 QUI, CMQ e GLI-Q em meios ácidos.....                                                                                                 | 78 |

|                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.3.2.6 Mecanismo de nucleação de partículas de nHA com ligantes de QUI, CMQ e GLI-Q..... | 78         |
| 2.3.2.7 Mecanismo de crescimento de partículas de nHA com ligantes QUI, CMQ e GLI-Q.....  | 81         |
| 2.3.2.8 Ensaio Biológicos.....                                                            | 82         |
| 2.4 Conclusão.....                                                                        | 85         |
| <b>CAPÍTULO III.....</b>                                                                  | <b>87</b>  |
| 3.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho.....                                            | 87         |
| 3.2 Procedimento Experimental.....                                                        | 88         |
| 3.2.1 Materiais .....                                                                     | 89         |
| 3.2.2 Preparação dos filmes de quitosana (QUI).....                                       | 90         |
| 3.2.3 Preparação dos filmes de quitosana com epiclorigina (QUI-ECH).....                  | 91         |
| 3.2.4 Preparação dos biocompósitos de quitosana (nHA/QUI).....                            | 91         |
| 3.2.5 Preparação dos biocompósitos de quitosana com epiclorigina (nHA/QUI-ECH)            | 92         |
| 3.2.6 Caracterizações dos filmes e biocompósitos.....                                     | 93         |
| 3.2.6.1 Avaliação Quantitativa e Qualitativa.....                                         | 93         |
| 3.2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....                 | 94         |
| 3.2.6.3 Difração de Raios-X .....                                                         | 94         |
| 3.2.6.4 Intumescimento.....                                                               | 94         |
| 3.2.6.5 Degradação.....                                                                   | 95         |
| 3.2.6.6 Ângulo de contato.....                                                            | 96         |
| 3.2.6.7 Propriedades Mecânicas.....                                                       | 96         |
| 3.2.6.8 Análise Estatística.....                                                          | 96         |
| 3.3 Resultados e Discussão.....                                                           | 97         |
| 3.3.1 Caracterizações dos filmes.....                                                     | 97         |
| 3.3.2 Caracterizações dos biocompósitos.....                                              | 113        |
| 3.4 Conclusão.....                                                                        | 120        |
| <b>CAPÍTULO IV.....</b>                                                                   | <b>122</b> |
| 4.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho.....                                            | 122        |
| 4.2 Procedimento Experimental.....                                                        | 123        |
| 4.2.1 Materiais .....                                                                     | 124        |
| 4.2.2 Preparação das partículas de fosfato de cálcio (CaP).....                           | 124        |
| 4.2.3 Preparação das partículas de fosfato de cálcio dopadas com Zinco (CaP/Zn)...        | 126        |

|             |                                                                                                                          |     |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.4       | Preparação dos bicompositos de fosfato de cálcio dopados com Zinco (nHA/QUI/Zn).....                                     | 127 |
| 4.2.5       | Preparação dos bicompositos de fosfato de cálcio reticulados com epiclоридrina e dopados com Zinco (nHA/QUI-ECH/Zn)..... | 128 |
| 4.2.6       | Caracterizações das partículas e dos biocompositos.....                                                                  | 129 |
| 4.2.6.1     | Difração de Raios-X.....                                                                                                 | 129 |
| 4.2.6.2     | Ensaio Biológicos.....                                                                                                   | 130 |
| 4.2.6.2.1   | Ensaio de (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)...                                              | 130 |
| 4.2.6.2.2   | Atividade da Fosfatase Alcalina.....                                                                                     | 130 |
| 4.2.6.2.3   | Ensaio <i>in vivo</i> .....                                                                                              | 130 |
| 4.2.6.2.3.1 | Animais.....                                                                                                             | 130 |
| 4.2.6.2.3.2 | Procedimento cirúrgico de perfuração da tíbia.....                                                                       | 131 |
| 4.2.6.2.3.3 | Processamento histológico.....                                                                                           | 132 |
| 4.2.6.2.3.4 | Análise histológica e morfométrica.....                                                                                  | 132 |
| 4.3         | Resultados e Discussão.....                                                                                              | 134 |
| 4.3.1       | Caracterização das partículas e dos biocompositos.....                                                                   | 134 |
| 4.3.1.1     | Difração de Raios-X.....                                                                                                 | 134 |
| 4.3.1.2     | Ensaio Biológicos.....                                                                                                   | 136 |
| 4.4         | Conclusão.....                                                                                                           | 145 |
|             | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                          | 146 |
|             | ANEXOS.....                                                                                                              | 158 |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 – Ilustração representativa da evolução clínica da Doença Periodontal. Fonte: LINDHE, 2010.....                                                                                                                                                                                       | 01 |
| Figura 1.2 – Corte transversal do fêmur: camada externa de osso cortical e rede interna de osso trabecular. Fonte: MAGALHÃES e SILVA, 2012.....                                                                                                                                                  | 09 |
| Figura 1.3 - Esquema ilustrativo da organização hierárquica do osso esponjoso humano a partir da nano escala. Fonte: Adaptado de NEWMAN <i>et al.</i> , 2013.....                                                                                                                                | 10 |
| Figura 1.4 - Esquemática da diferenciação das células precursoras. Fonte: Adaptado de BATISTA, 2009.....                                                                                                                                                                                         | 13 |
| Figura 1.5 - Esquema da remodelação de ossos esponjosos. Fonte: Adaptado de MARIEB <i>et al.</i> , 2008.....                                                                                                                                                                                     | 15 |
| Figura 1.6- Modelo biomecânico dos processos de (re) modelação. Fonte: Adaptado de BONEWALD e JOHNSON, 2008.....                                                                                                                                                                                 | 15 |
| Figura 1.7 - Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea observado no tecido ósseo esponjoso. Fonte: Adaptado de COXON (2004).....                                                                                                                                                      | 17 |
| Figura 1.8- Os três componentes essenciais que constituem a tríade de engenharia de tecidos . Fonte: MURPHY <i>et al.</i> , 2013.....                                                                                                                                                            | 19 |
| Figura 1.9 – Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais. Fonte: Adaptado de PATEL e GOHIL, 2012.....                                                                                                                                            | 24 |
| Figura 1.10- Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C: isoterma de solubilidade mostrando $\log[\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais. Fonte: Adaptado de GUASTALDI e APARECIDA, 2010..... | 29 |
| Figura 1.11- Espectro de EDS característico de HAP com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos. Fonte: SANTOS, 2005.....                                                                                                                                           | 30 |
| Figura 1.12 - A estrutura de cristal de hidroxiapatita idealizada, vistos ao longo do eixo c. Fonte: Adaptado de JONES, 2001.....                                                                                                                                                                | 30 |
| Figura 1.13 – Espectros de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da HA (A) e HA/ $\beta$ -TCP (B). Fonte: Adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2005.....                                                        | 33 |
| Figura 1.14 – Esquema representativo das possibilidades de processamento da QUI em diferentes formas. Fonte: Adaptada de ANITHA <i>et al.</i> , 2014.....                                                                                                                                        | 39 |
| Figura 1.15 – Estrutura química da QUI. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2015.....                                                                                                                                                                                                                     | 40 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.16 - Métodos preparos de derivados carboximetilados da QUI. Fonte: Adaptado de UPADHYAYA <i>et al.</i> , 2013.....                                                                                                                                                                 | 42 |
| Figura 1.17 - Estrutura molecular e tridimensional da ECH. Fonte: Adaptado de COSTA-JUNIOR, 2008.....                                                                                                                                                                                       | 43 |
| Figura 2.1 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                      | 46 |
| Figura 2.2- Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de QUI, CMQ e GLI-Q. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                               | 48 |
| Figura 2.3 - Representação esquemática do processo de síntese das nanopartículas de CaP. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                   | 49 |
| Figura 2.4 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de QUI, CMQ e GLI-Q. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                       | 50 |
| Figura 2.5 - Curva de titulação potenciométrica da CMQ. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                    | 57 |
| Figura 2.6 - Espectro de FTIR da QUI (a) e CMQ (b). Fonte: Elaborado pelo autor....                                                                                                                                                                                                         | 59 |
| Figura 2.7 - Espectro de FTIR da GLI-Q. Detalhe: Estrutura química da GLI-Q com os principais grupamentos químicos (círculos). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                             | 60 |
| Figura 2.8 – Espectro de <sup>1</sup> H NMR da QUI. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                        | 61 |
| Figura 2.9 – Espectro de <sup>1</sup> H NMR da CMQ. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                        | 61 |
| Figura 2.10 - Análise morfológica por imagens da QUI (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/QUI (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor.....     | 63 |
| Figura 2.11 - Análise morfológica por imagens da CMQ (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/CMQ (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor.....     | 64 |
| Figura 2.12 - Análise morfológica por imagens da GLI-Q (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/GLI-Q (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor..... | 65 |

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.13 - Distribuição do tamanho da CaP sem ligante, com ligante QUI, CMQ e GLI-Q. Histograma do tamanho médio de nHA para os sistemas em avaliação. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                 | 67 |
| Figura 2.14- Imagem 3D por $\mu$ -CT do biocompósito nHA/QUI (a), nHA/CMQ (b) e nHA/GLI-Q (c). Inserções: imagem ampliada com contraste de densidade identificando a fase inorgânica (distribuição da nHA). Fonte: Elaborado pelo autor... | 69 |
| Figura 2.15 – Imagem por MET (a) e padrão SAED (b) da nHA/QUI. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                            | 70 |
| Figura 2.16 - Imagem por MET (a) e padrão SAED (b) da nHA/CMQ. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                            | 70 |
| Figura 2.17 - Padrões de DRX da CaP (a), nHA/QUI (b), nHA/CMQ (c) e nHA/GLI-Q (d). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                        | 72 |
| Figura 2.18 - Espectros de FTIR do ligante QUI (a) e composto de nHA/QUI(b). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                              | 73 |
| Figura 2.19 - Espectros de FTIR do ligante CMQ (a) e composto de nHA/CMQ(b). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                              | 74 |
| Figura 2.20 - Espectros de FTIR do ligante GLI-Q (a) e composto de nHA/GLI-Q(b). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                          | 75 |
| Figura 2.21 - Processo de nucleação e crescimento de partículas em solução através do mecanismo LaMer. Fonte: Adaptado de DUMONT <i>et al.</i> , 2016.....                                                                                 | 77 |
| Figura 2.22- Representação esquemática do mecanismo de nucleação e crescimento de nanopartículas de nHA na presença dos ligantes QUI (A), CMQ (B) e GLI-Q (C). Fonte: Adaptado de DUMONT <i>et al.</i> , 2016.....                         | 79 |
| Figura 2.23- Resultados do ensaio de viabilidade celular, utilizando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) brometo de tetrazólio 2,5-difenil (MTT)(SAOS). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                           | 83 |
| Figura 2.24 - Resultados do ensaio de atividade de ALP após 24 h de incubação com a linha celular (SAOS). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                 | 84 |
| Figura 2.25 - Resultados do ensaio de LIVE/DEAD após 24 h de incubação com a linha celular (SAOS). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                        | 85 |
| Figura 3.1 – Ilustra um sistema de otimização da neoformação óssea (sem escala). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                          | 87 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 3.2 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                              | 89  |
| Figura 3.3 - Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de quitosana. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                             | 90  |
| Figura 3.4 - Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de quitosana com epiclоридrina. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                           | 91  |
| Figura 3.5 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de quitosana (nHA/QUI). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                            | 91  |
| Figura 3.6 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de quitosana com epiclоридrina (nHA/QUI-ECH). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                      | 92  |
| Figura 3.7 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ ) e estrutura química), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                             | 97  |
| Figura 3.8 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ ) e estrutura química), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI/ECH (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                 | 98  |
| Figura 3.9 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ ) e estrutura química), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                 | 98  |
| Figura 3.10 - Esquema de síntese da quitosana reticulada com epiclоридrina em pH 10 à $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ . Fonte: Adaptado do SILVA <i>et al.</i> , 2010.....                                                                                                                                                | 99  |
| Figura 3.11 – Espectro de FTIR Quitosana em pH 10 à $50\pm 1^\circ\text{C}$ . Detalhe: Estrutura da quitosana em ácido ortofosfórico. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                              | 100 |
| Figura 3.12 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à $50\pm 1^\circ\text{C}$ . Detalhe: Esquema ilustrativo da quitosana modificada com epiclоридrina. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                       | 101 |
| Figura 3.13 – Espectro de FTIR das amostras QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ na região de vibração: $2800$ a $4000\text{cm}^{-1}$ . Detalhe: Razão entre as intensidades das bandas $3400\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ . Fonte: Elaborado pelo autor..... | 102 |
| Figura 3.14 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à $50\pm 1^\circ\text{C}$ na região de vibração: $950$ a $1150\text{cm}^{-1}$ .                                                                                                                            |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Detalhes: Razões entre as intensidades das bandas $1065\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ e $1030\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                   | 103 |
| Figura 3.15 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ na região de vibração: $1400$ a $1600\text{cm}^{-1}$ .<br>Detalhe: Razão entre as intensidades das bandas $1552\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ . Fonte: Elaborado pelo autor..... | 104 |
| Figura 3.16 – Histograma de Intumescimento (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,3h e 24h) à $(36\pm 2)^\circ\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                               | 105 |
| Figura 3.17 – Gráfico de Intumescimento (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,3h,24h e 96h) à $(36\pm 2)^\circ\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                              | 107 |
| Figura 3.18 – Histograma de Degradação (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,24h e 96h) à $(36\pm 2)^\circ\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                  | 108 |
| Figura 3.19 – Ângulo de contato das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                        | 109 |
| Figura 3.20 – Valores médios do Módulo de Elasticidade (ME), em MPa, das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor                                                                                                                                                                  | 110 |
| Figura 3.21 – Valores médios da Dissipação (MDi), em KeV, das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                        | 111 |
| Figura 3.22 – Valores médios da Deformação (MDe), em nm, das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                               | 111 |
| Figura 3.23 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca- $K\alpha$ nos biocompósitos de QUI (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                  | 114 |
| Figura 3.24 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca- $K\alpha$ nos biocompósitos de QUI/ECH (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                              | 114 |
| Figura 3.25 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca- $K\alpha$ nos biocompósitos de QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                              | 114 |

|                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 3.26 – Histrograma do tamanho médio das partículas de HA nos sistemas. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                | 115 |
| Figura 3.27 – Difratoograma das nanopartículas de fosfato de cálcio (A), nHA/QUI (B), nHA/QUI-ECH (1:0,1)(C) e nHA/QUI-ECH(1:0,2) (D) sintetizados em valores de pH=10. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                      | 116 |
| Figura 3.28 – Espectro de FTIR das amostras de nHA/QUI (a),nHA/QUI-ECH (1:0,1)(b) e nHA/QUI-ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Detalhe: Esquema ilustrativo do biocompósito modificado com epiclоридrina. Fonte: Elaborado pelo autor..... | 117 |
| Figura 3.29 – Histograma de Intumescimento (%) das amostras de nHA/QUI, nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,3h e 24h) à $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.....                     | 118 |
| Figura 3.30 – Histograma de Degradação (%) das amostras de nHA/QUI, nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,24h e 96h) à $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.....                        | 119 |
| Figura 4.1 – Ilustra um sistema de estimulação a ação osteoblástica pelos biocomósitos doados com Zinco (sem escala). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                        | 122 |
| Figura 4.2 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                        | 123 |
| Figura 4.3 - Representação esquemática do processo de síntese das partículas de fosfato de cálcio. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                           | 124 |
| Figura 4.4 - Representação esquemática do processo de síntese das partículas de fosfato de cálcio dopadas com zinco. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                         | 126 |
| Figura 4.5 - Representação esquemática do processo de síntese do biocompósito de fosfato de cálcio dopado com zinco. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                         | 127 |
| Figura 4.6 - Representação esquemática do processo de síntese do biocompósito de fosfato de cálcio reticulado com epiclоридrina e dopado com zinco. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                          | 128 |
| Figura 4.7 – Defeito ósseo confeccionado na tíbia dos animais. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                               | 130 |
| Figura 4.8 – Imagem representativa de um defeito ósseo de tíbia de rato. Cada um dos quadrados vermelhos representa uma foto digitalizada no interior do defeito ósseo que                                                                                    |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| será quantificxado o percentual de trabéculas ósseas neoformadas. Fonte: Elaborada pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 132 |
| Figura 4.9 – Difrátograma das partículas de fosfato de cálcio (A), nHA (B) e nHA/Zn (C). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 134 |
| Figura 4.10 - Tamanho de cristalitos das amostras de nHA e nHA/Zn. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 135 |
| Figura 4.11 - Resultados do ensaio de viabilidade celular, utilizando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) brometo de tetrazólio 2,5-difenil (MTT)(SAOS) após 24 h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B), nHA/QUI/Zn (C) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (D). Detalhe: Adesão celular. Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                  | 136 |
| Figura 4.12 - Resultados do ensaio de proliferação celular, utilizando fosfatase alcalina (ALP)(SAOS) após 24 h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B), Controle osteo (C), nHA/QUI/Zn (D) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (E). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 138 |
| Figura 4.13 - Resultados do ensaio de proliferação celular (SAOS), utilizando fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B), Controle osteo (C), nHA/QUI/Zn (D) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (E). Fonte: Elaborado pelo autor.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 139 |
| Figura 4.14 - Fotomicrografias representativas de secções histológicas de defeitos ósseo de tibias 7 dias após as cirurgias. Tibias controles – coágulo (a); Tibias cujos defeitos foram revestidos com membranas nHA/QUI (b); membranas nHA/QUI-ECH 10% (c); membranas nHA/QUI-ECH 20% (d); membranas membranas nHA/QUI-ECH-Zn 10% (e) e membranas membranas nHA/QUI-ECH-Zn 20% (f). O defeito ósseo foi delimitado pelas setas amarelas ao seu redor e os asteriscos amarelos destacam uma menor formação óssea no centro do defeito. Fonte: Elaborada pelo autor..... | 141 |
| Figura 4.15 – Gráfico da análise morfométrica. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. * p<0,05 vs grupo controle (coágulo). Fonte: elaborado pelo autor....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 142 |

**LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1.1 - Composição típica da fase inorgânica de tecidos humanos adultos calcificados (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).....                     | 07  |
| Tabela 1.2 – Componentes orgânicos do tecido ósseo e suas funções na mineralização (PALMER <i>et al.</i> , 2008; BOSE e TARAFTER, 2012)..... | 08  |
| Tabela 1.3 – Diferentes Fosfatos de Cálcio (BOSE e TARAFTER, 2012)....                                                                       | 28  |
| Tabela 1.4 - Polímeros naturais e sintéticos utilizados na engenharia do tecido ósseo (SALGADO <i>et al.</i> , 2004).....                    | 36  |
| Tabela 3.1 – Valores médios das propriedades mecânicas dos filmes mensuradas por AFM.....                                                    | 111 |



**LISTA DE NOTAÇÕES**

|       |                                                             |
|-------|-------------------------------------------------------------|
| A     | Área da seção                                               |
| AA    | Fração amorfa                                               |
| ABNT  | Associação Brasileira de Normas Técnicas                    |
| ACP   | Fosfato de cálcio amorfo                                    |
| AFM   | Microscopia de Força Atômica                                |
| BMP   | Proteínas morfogenéticas ósseas                             |
| BPS   | Sialoproteína óssea                                         |
| C     | Concentração                                                |
| CA    | Apatita carbonada                                           |
| CDHA  | Hidroxiapatita deficiente de cálcio                         |
| CHS   | Sulfato de condroitina                                      |
| DBTS  | Impressão molecular de dibenzotiofenos                      |
| DCP   | Fosfato dicálcio                                            |
| DCPD  | Fosfato dicálcio dihidratado                                |
| DFDBA | Aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado             |
| DRX   | Difração de Raios X                                         |
| DSC   | Análise Calorimétrica Diferencial                           |
| DTA   | Análise Térmica Diferencial                                 |
| E     | Módulo de elasticidade                                      |
| ECM   | Matriz extracelular                                         |
| EDS   | Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia          |
| FDDBA | Aloenxerto ósseo seco congelado                             |
| FFB   | Oso fresco congelado                                        |
| FTIR  | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier |
| GA    | Glutaraldeído                                               |
| GC    | Grau de cristalinidade                                      |
| GD    | Grau de desacetilação                                       |
| GI    | Grau de intumescimento                                      |
| HA    | Hidroxiapatita                                              |
| ID    | Índice de degradação                                        |
| ISSO  | International Standardization Organization                  |

|               |                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------|
| IUPAC         | International Union of Pure and Applied Chemistry             |
| Kv            | Quilovolt                                                     |
| M             | Massa                                                         |
| mBar          | Milésimos de bar                                              |
| MCP           | Fosfato monocálcio                                            |
| MCPM          | Fosfato monocálcio monohidratado                              |
| MEV           | Microscopia eletrônica de varredura                           |
| ML            | Microscopia de Luz                                            |
| mol/L         | mol do soluto em um litro da solução                          |
| MTT           | brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio   |
| MW            | Massa molar                                                   |
| N             | Número de mols                                                |
| OC            | Osteocalcina                                                  |
| OCP           | Fosfato octacálcio                                            |
| ON            | Osteonectina                                                  |
| OP            | Osteopontina                                                  |
| OXA           | Oxiapatita                                                    |
| PBS           | (Phosphate buffered saline) – Tampão fosfato salino           |
| PGA           | Ácido poli(glicólico)                                         |
| pH            | Potencial hidrogeniônico                                      |
| PLA           | Ácido poli(láctico)                                           |
| PM            | Peso molecular                                                |
| QUI           | Quitosana                                                     |
| T             | Temperatura                                                   |
| T             | Tempo                                                         |
| TGA           | Análise termogravimétrica                                     |
| TGF- $\beta$  | (Transforming growth factor- $\beta$ ) - fator de crescimento |
| TTCP          | Fosfato tetracálcio                                           |
| VEGFs         | Fatores de crescimento vascular endotelial                    |
| $\alpha$ -TCP | Fosfato $\alpha$ -tricálcio                                   |
| B             | Ângulo da célula unitária monoclínica                         |
| $\beta$ -TCP  | Fosfato $\beta$ -tricálcio                                    |
| $\Theta$      | Ângulo de contato                                             |

|       |                        |
|-------|------------------------|
| μm    | Micrometro             |
| N     | Estiramento            |
| ECH   | Epicloridrina          |
| CMQ   | Carboximetil-quitosana |
| GLI-Q | Glicol-quitosana       |

## RESUMO

Os biomateriais baseados em fosfatos de cálcio representam uma alternativa promissora na regeneração tecidual. A colocação dos biomateriais em formato de membranas sobre os defeitos periodontais evita que o processo de regeneração e reparação óssea seja prejudicado pela proliferação de células epiteliais provenientes do tecido gengival, permitindo que células osteoprogenitoras proliferem e diferenciem dentro da área isolada. O presente estudo relata a síntese de biocompósitos com base em matrizes poliméricas de quitosana (QUI), O-carboximetil-quitosana (CMQ) ou glicol-quitosana (GLI-Q) com nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) sintetizadas em rota aquosa modificadas quimicamente com epiclorigrina (ECH) e dopadas com  $Zn^{2+}$ . A estrutura, morfologia e cristalinidade dos componentes e biocompósitos modificados foram extensivamente caracterizadas. Ensaio de intumescimento e degradação *in vitro* foram realizados. Testes de viabilidade e atividade celular foram realizados com diferentes linhagens celulares, utilizando-se o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, ensaio de Atividade da fosfatase alcalina e *LIVE/DEAD*. Experimentos *in vivo* permitiram analisar o efeito dos biocompósitos no reparo ósseo na tíbia de ratos. Os resultados demonstraram que os ligantes utilizados durante a síntese desempenharam um papel importante nos mecanismos da cinética de nucleação e crescimento de partículas de HA em escala nanométrica. Foram observadas diferenças no tamanho de nHA produzida sem ligante, com QUI, CMQ e GLI-Q com os tamanhos médios de  $335\pm 70\text{nm}$ ,  $220\pm 50\text{nm}$ ,  $90\pm 20\text{nm}$  e  $74\pm 15\text{nm}$ , respectivamente. As análises por FTIR e DRX indicaram que a hidroxiapatita foi a fase predominante de fosfato de cálcio produzida. A reticulação com ECH foi detectada por diferenças significativas observadas por FTIR, identificando uma diminuição da banda em  $1.030\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento do tipo  $C_6-OH$  e pela diminuição significativa no intumescimento e na solubilização dos biocompósitos reticulados. Os biocompósitos reticulados e dopados com  $Zn^{2+}$  apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. No ensaio *in vivo*, os biocompósitos aumentaram a formação óssea nos defeitos após 7 dias de inserção, com destaque para os biocompósitos reticulados com 10% de ECH e dopados com  $Zn^{2+}$ . Os resultados mostraram que os biocompósitos desenvolvidos apresentam características promissoras para aplicações em engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Quitosana, hidroxiapatita, epiclorigrina, nanocompósitos, biocompósitos.

## ABSTRACT

Biomaterials based on calcium phosphate represent a promising alternative in tissue regeneration. Placement of membrane-shaped biomaterials on the periodontal defects prevents the bone regeneration and repair process from being harmed by the proliferation of epithelial cells from the gum tissue, allowing osteoprogenitor cells to increase and differentiate within the isolated area. The present study reports the synthesis of biocomposites based on polymeric matrices of chitosan (QUI), O-carboxymethyl chitosan (CMQ) or glycol chitosan (GLI-Q) with nanoparticles of hydroxyapatite (nHA) synthesized in aqueous route chemically modified with epichlorohydrin (ECH) and doped with  $Zn^{2+}$ . The structure, morphology and crystallinity of the components and biocomposites modified were extensively characterized. *In vitro* swelling and degradation assays were performed. Viability and cellular activity tests were performed with different cell lines, using 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-il]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, assay of Alkaline Phosphatase Activity and *LIVE/DEAD*. *In vivo* experiment allowed analysis of the effect of the biocomposites in the bone repair in rats' tibia. Results showed that the binders used during the synthesis played an important role on the mechanisms of nucleation kinetics and growth of HA particles at nanometer scale. Differences in the size of nHA produced without binder were observed, with QUI, CMQ and GLI-Q with average sizes of  $335\pm 70\text{nm}$ ,  $220\pm 50\text{nm}$ ,  $90\pm 20\text{nm}$  and  $74\pm 15\text{nm}$ , respectively. Analysis through FTIR and XRD indicated that hydroxyapatite was the predominant phase of calcium phosphate produced. Crosslinking with ECH was detected by significant differences observed by FTIR, identifying a decrease of the band in  $1.030\text{cm}^{-1}$  attributed to the C6-OH type stretching and by the significant decrease in swelling and solubilization of the crosslinked biocomposites. Biocomposites crosslinked with ECH and doped with  $Zn^{2+}$  presented satisfactory results in the cytotoxicity and cellular viability assays. In the *in vivo* assay, biocomposites increased the bone formation in the defects after 7 days of insertion, emphasizing the biocomposites crosslinked with 10% of ECH and doped with  $Zn^{2+}$ . Results showed that the biocomposites presented promising characteristics for applications in bone tissue engineering.

Keywords: Chitosan, hydroxyapatite, epichlorohydrin, nanocomposite, biocomposite.

## CAPÍTULO I

### 1.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observou-se um nítido envelhecimento populacional em todo o mundo, e especialmente no Brasil uma diminuição da taxa de fecundidade paralelamente ao aumento da longevidade (REZENDE *et al.*, 2012). Em 2010, no Brasil estima-se que havia 14 milhões de idosos, dos quais mais da metade era composto por mulheres (55,8%). Assim, com o aumento da sobrevivência, se eleva a ocorrência de doenças relacionadas ao envelhecimento (BUTTROS *et al.*, 2011). Entre essas doenças destaca-se a osteoporose, que resulta em maior fragilidade óssea (BUTTROS *et al.*, 2011). A osteoporose e a periodontite apresentam fatores etiológicos comuns que podem influenciar diretamente ou modular ambas as doenças.

A Doença Periodontal (DP) é caracterizada pela reabsorção do osso alveolar e pela perda de tecidos de inserção dental (Figura 1.1). A etiologia da DP como infecção bacteriana é bem aceita, entretanto, a perda de tecido ósseo como resultado da osteopenia provavelmente seja importante na criação de um hospedeiro suscetível (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

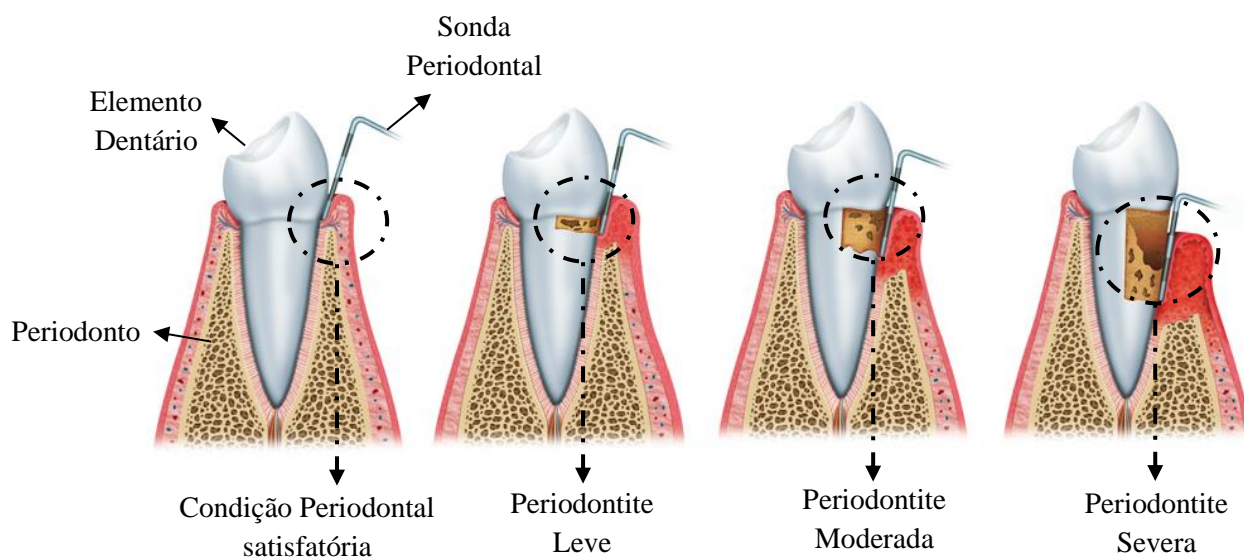


Figura 1.1 – Ilustração representativa da evolução clínica da Doença Periodontal. Fonte: LINDHE, 2010.

A DP caracteriza-se como um grupo de doenças inflamatórias de origem infecciosa, incluindo gengivite e periodontite, que afetam os tecidos de sustentação do dente (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992). A enfermidade periodontal pode levar a perda do periodonto de maneira irreversível e, em seus estágios mais avançados, resultar na perda do elemento dentário (PAGE & SCHROEDER, 1990). Este dano aos tecidos bucais causa evidente repercussão negativa na qualidade de vida do indivíduo. Aspectos funcionais do sistema estomatognático, como mastigação, deglutição e fonética podem ficar comprometidos assim como a estética do sorriso e, frequentemente, a autoestima pessoal (ARAÚJO e SUKEKAVA, 2007).

Existem diversas estratégias terapêuticas para a promoção da regeneração tecidual dependendo das especificidades da deficiência e da condição clínica do indivíduo (BHUMIRATANA e VUNJAK-NOVAKOVIC, 2012).

O tecido ósseo apresenta excelente habilidade de regeneração e pode reparar-se em resposta a um trauma ou lesão, por possuir uma estrutura de compósitos, principalmente de nanohidroxiapatita e matriz composta por fibras de colágeno que proporcionam propriedades físicas e biológicas adequadas, especialmente de apoio mecânico e proteção (SAHOO *et al.*, 2013). No entanto, se a lesão excede o tamanho crítico, a neoformação óssea é prejudicada e torna-se necessário uma intervenção cirúrgica (MURPHY *et al.*, 2013).

O enxerto ósseo é uma das modalidades mais comuns de terapia regenerativa e, geralmente, o material de enxerto ideal deve ter fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora, promover a osteogênese, não apresentar resposta imunológica insatisfatória ao hospedeiro, revascularizar rapidamente, estimular a osteoindução, promover a osteocondução e ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (FARDIN *et al.*, 2010).

Uma variedade de biomateriais, naturais e sintéticos, podem ser combinados para a síntese de vários suportes, visando melhorias da bioatividade, osteoindução e as propriedades mecânicas (QI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Os nanocompósitos envolvendo polímeros biodegradáveis e cerâmicas bioativas têm sido consideradas como

uma estratégia promissora para otimizar a terapia de regeneração tecidual (PINA *et al.*, 2015).

A quitosana (QUI) [poli- $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) -2-amino-2-desoxi-D-glicose] tem sido considerada como um dos materiais mais investigados para aplicações biomédicas, sendo um dos mais abundantes polissacarídeos disponíveis, processados a partir de fontes naturais (ZHANG *et al.*, 1998; MUZZARELLI *et al.*, 2012). Têm propriedades interessantes para aplicações em engenharia de tecidos, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade (BERGER *et al.*, 2004). As propriedades da QUI podem ser melhoradas através da introdução de grupos químicos, uma vez que possui grupamentos funcionais amino reativos e grupos hidroxilas primários e secundários, os quais podem ser utilizados para a modificação química (RAMANERY *et al.*, 2014). Além disso, para aplicações em engenharia de tecidos duros, a QUI requer baixa solubilidade inicial acompanhada por uma cinética de biodegradação controlada (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009).

A QUI apresenta solubilidade apenas em soluções aquosas ácidas devido à protonação dos grupos amino ( $R-NH_3^+$ ) e baixa solubilidade acima de um pH de 6,5 ( $pK_a = 6,5$ ), tal como as condições fisiológicas comuns a animais vivos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Neste contexto, derivados da QUI, tais como a carboximetil-quitosana (CMQ) e a glicol-quitosana (GLI-Q) chamam a atenção devido à solubilidade em água, em condições ácidas, alcalinas e fisiológicas (CHEN *et al.*, 2003; MANSUR *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014).

A utilização de biomateriais em escala nanométrica para estimular regeneração óssea é inspirada na arquitetura óssea nativa. O tecido ósseo possui uma estrutura de nano compósitos orgânica-inorgânica complexa. A fase orgânica é composta principalmente de colágeno tipo I, o qual está disposto em nanofibras variando de 50 a 500nm de diâmetro (KADLER *et al.*, 1996). A fase inorgânica consiste em cristais de hidroxiapatita não estequiométrica (HA), com comprimentos de cerca de 100nm, larguras de 20-30nm, e uma espessura de 3-6nm, que são incorporados entre as fibras de colágeno (SU *et al.*, 2003; LANDIS *et al.*, 2009). Biomateriais a base de fosfato de cálcio (CaP) são de especial interesse por mimetizarem o principal componente inorgânico do osso, por apresentarem bioatividade e estabelecerem relação íntima e funcional com o tecido ósseo adjacente (WANG *et al.*, 2014).



Além disso, a inclusão de nanopartículas inorgânicas de fosfato de cálcio (nCaP) na matriz do biopolímero tem dois grandes objetivos: melhorar as propriedades mecânicas e incorporar características topográficas na escala nanométrica que mimetizam a nanoestrutura do osso natural. Assim, o principal método de obtenção de biomateriais a serem utilizados como substitutos ósseos artificiais, inspirados em abordagens biomiméticas, é associar nanocristalitos de CaP com biopolímeros, tais como a QUI (EHRICH *et al.*, 2006).

Estudos anteriores focaram-se, principalmente, em adicionar nCaP na matriz polimérica e analisar a biocompatibilidade da QUI e do CaP. A QUI degrada-se rapidamente e tem uma baixa resistência mecânica, enquanto as nCaP degradam-se lentamente e têm uma maior resistência mecânica (EMERICH *et al.*, 2005). Essencialmente, estes materiais podem reunir as funcionalidades intrínsecas das nanopartículas inorgânicas e as biointerfaces oferecidas por biomoléculas e polímeros de origem natural (ETHERIDGE *et al.*, 2013; RAMANERY *et al.*, 2014). Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido publicados investigando membranas/filmes à base de HA e biopolímeros, que foram preparados por muitos métodos, tais como: mistura, processo biomimético, precipitação *situ* e deposição eletroquímica (ERLICH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012).

Reações de reticulação também visam modificar propriedades dos biopolímeros, tais como, estabilidade química e térmica, propriedades mecânicas da estrutura, permeabilidade e capacidade de imobilização proteica e celular. Um dos principais agentes de reticulação utilizado com esta finalidade é a epiclorigrina (ECH), que por sua vez apresenta a vantagem de reagir, preferencialmente, pelos grupos hidroxilas em temperaturas acima de  $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$  deixando os grupamentos amino mais susceptíveis às interações químicas com as partículas de CaP e com o tecido ósseo (SILVA *et al.*, 2010; GONSALVES *et al.*, 2011).

O Zinco (Zn) tem sido usado para dopar os materiais à base de fosfatos de cálcio. Os íons  $\text{Zn}^{2+}$ , em baixas concentrações, podem comportar-se como estimuladores da formação óssea em curto período de tempo, sendo considerado um promissor adjuvante para otimizar a ação de certos biocompósitos (SANTOS, 2005).

Estudos prévios (COSTA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; RAMANERY *et al.*, 2013; MANSUR e MANSUR, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; MANSUR *et al.*, 2015; CAPANEMA *et al.*, 2015) foram conduzidos no intuito de sintetizar biocompósitos a base de diferentes polímeros: quitosana, colágeno e glicol-quitosana e biocerâmicas, reticulados com glutaraldeído e dopados com íons (Cadmio, Bismuto, Nióbio e Zinco) para melhoria dos aspectos morfológicos, químicos, estruturais e funcionais.

No entanto, surpreendentemente, nenhum relato foi encontrado na literatura investigando a influência de ligantes poliméricos (QUI e derivados) e do agente de reticulação ECH no processo de nucleação/crescimento de partículas de hidroxiapatita nanométricas (nHA), bem como a dopagem destes sistemas com  $Zn^{2+}$  no intuito promover melhorias nas propriedades biológicas, além de caracterização extensiva dos biocompósitos sintetizados.

## 1.2 OBJETIVOS

Avaliar a influência dos ligantes poliméricos na precipitação de partículas nanométricas de CaP e dos processos de reticulação com ECH e dopagem com  $Zn^{2+}$ , no controle de aspectos morfológicos, químicos, estruturais e funcionais de biocompósitos à base de quitosana e derivados.

Os objetivos específicos envolvem:

- caracterização da QUI de alta e baixa massa molar em relação à estrutura;
- caracterização dos derivados da QUI (CMQ e GLI-Q) em relação à estrutura e comparação com a QUI referência;
- síntese de biocompósitos de QUI e derivados, analisando a influência dos ligantes poliméricos na nucleação e crescimento de partículas de CaP; caracterização dos produtos em relação à morfologia, cristalinidade, estrutura química e citotoxicidade *in vitro*;
- síntese de biocompósitos de QUI reticulados com ECH nas proporções 1:0,10 e 1:0,20;
- caracterização dos biocompósitos reticulados em relação ao intumescimento, degradação, temperaturas de transição, estrutura e morfologia, citotoxicidade *in vitro*;
- avaliar o efeito da dopagem com  $Zn^{2+}$  na biocompatibilidade e bioatividade em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.3.1 Tecido ósseo

A complexidade do tecido ósseo promove um grande desafio para a engenharia de tecido que busca atingir resultados promissores na substituição e reparo de lesões a essa estrutura do corpo humano.

O osso é um tecido altamente vascularizado e dinamicamente ativo, possui grande capacidade de regeneração e alteração das suas propriedades em resposta às mudanças na demanda mecânica, e remodela por toda a vida do indivíduo (LATORRE e COSTA, 2011).

O tecido ósseo pode ser visto como um compósito constituído de uma matriz polimérica (principalmente colágeno) e cristais cerâmicos (na forma de apatita carbonatada). A porção inorgânica, que corresponde a 65% da sua massa, é formada em sua maioria por íons cálcio e fosfato, formando um cristal que tem a estrutura semelhante à hidroxiapatita, envolto por uma capa de hidratação que facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. Assim, essa estrutura funciona como reserva destes íons, controlando a liberação dos mesmos nos líquidos corporais (SOUZA *et al.*, 2010; BOSE e TARAFDER, 2012). A Tabela 1.1 mostra a composição típica da fase inorgânica de tecidos humanos adultos calcificados (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).

**Tabela 1.1** - Composição típica da fase inorgânica de tecidos humanos adultos calcificados (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).

| Composição                                                               | Esmalte  | Dentina  | Osso   | Hidroxiapatita (HA) |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|----------|--------|---------------------|
| Cálcio (% em massa)                                                      | 36,5     | 35,1     | 34,8   | 39,6                |
| Fósforo (% em massa)                                                     | 17,7     | 16,9     | 15,2   | 18,5                |
| Ca/P (Razão molar)                                                       | 1,63     | 1,61     | 1,71   | 1,67                |
| Sódio (% em massa)                                                       | 0,5      | 0,6      | 0,9    | -                   |
| Magnésio (% em massa)                                                    | 0,44     | 1,23     | 0,72   | -                   |
| Potássio (% em massa)                                                    | 0,08     | 0,05     | 0,03   | -                   |
| Carbonatos (CO <sub>2</sub> ) (% em massa)                               | 3,5      | 5,6      | 7,4    | -                   |
| Fluoretos (% em massa)                                                   | 0,01     | 0,06     | 0,03   | -                   |
| Cloretos (% em massa)                                                    | 0,3      | 0,01     | 0,13   | -                   |
| Pirofosfatos (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>-4</sup> ) (% em massa) | 0,022    | 0,1      | 0,07   | -                   |
| Total Inorgânico (% em massa)                                            | 97       | 70       | 65     | 100                 |
| Total Orgânico (% em massa)                                              | 1,5      | 20       | 25     | -                   |
| Água (% em massa)                                                        | 1,5      | 10       | 10     | -                   |
| Produtos Ignição (800 °C)                                                | β-TCP+HA | β-TCP+HA | HA+CaO | HA                  |

A matriz orgânica do osso corresponde a 22% da sua massa e constitui-se de colágeno do tipo I (90% da matriz orgânica), além de com algumas proteínas não colagenosas (proteoglicanos, lipídios) e fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFs). Os 9% restantes são representados pela água (BOSE e TARAFDER, 2012). A tabela 1.2 mostra os componentes orgânicos do tecido ósseo e as suas funções no processo de mineralização (PALMER *et al.*, 2008; BOSE e TARAFDER, 2012).

Além de atuar fisiologicamente como reservatório mineral, principalmente de íons cálcio, funcionalmente é responsável pela sustentação e proteção de órgãos do corpo. Serve também de alavanca para os músculos, impulsionando a movimentação (ISOLA e MORAES, 2012).

**Tabela 1.2** – Componentes orgânicos do tecido ósseo e suas funções na mineralização (PALMER *et al.*, 2008; BOSE e TARAFDER, 2012).

| NOME                                          | FUNÇÃO                                                                                                             |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colágeno                                      | Proteína estrutural encontrada em muitos tecidos.                                                                  |
| Sialoproteína óssea                           | Proteína com ácido poli (ácido glutâmico) executar e liga ao cálcio RGD.                                           |
| Osteonectina e osteopontina                   | Glicoproteínas que podem formar núcleos ou blocos de HA pela mineralização.                                        |
| Sulfato de condroitina e sulfato de queratano | Elevado peso molecular, glicosaminoglicanos sulfatados que são encontrados em tecidos ósseos e cartilagosos.       |
| Osteocalcina                                  | Inibe a formação óssea, parece não afetar a mineralização de HA.                                                   |
| Biglicano e decorina                          | Proteoglicanas que se ligam ao colágeno tipo I e estão envolvidas na formação da matriz óssea.                     |
| Trombospondina e fibronectina                 | Glicoproteínas da matriz que se ligam as integrinas e componentes matrix extra celular (colágeno, a fibrina, etc). |

Dois tipos de ossos compõem o esqueleto humano: o osso cortical (compacto), e o osso trabecular (esponjoso) (Figura 1.2). O osso cortical compõe aproximadamente 80% do esqueleto, é constituído por aproximadamente 30% de poros, além de canais densos por onde passam vasos sanguíneos circundados por osso maduro. O osso trabecular apresenta-se esponjoso com aproximadamente 70% de poros, e altamente vascularizado. Compõe 20% do esqueleto e suas lamelas formam uma matriz menos densa que resiste às tensões aplicadas ao osso. As células do osso trabecular estimulam a formação óssea. Os ossos maduros ou adultos, sejam trabeculados ou compactos, são histologicamente idênticos (MAGALHÃES E SILVA, 2012).

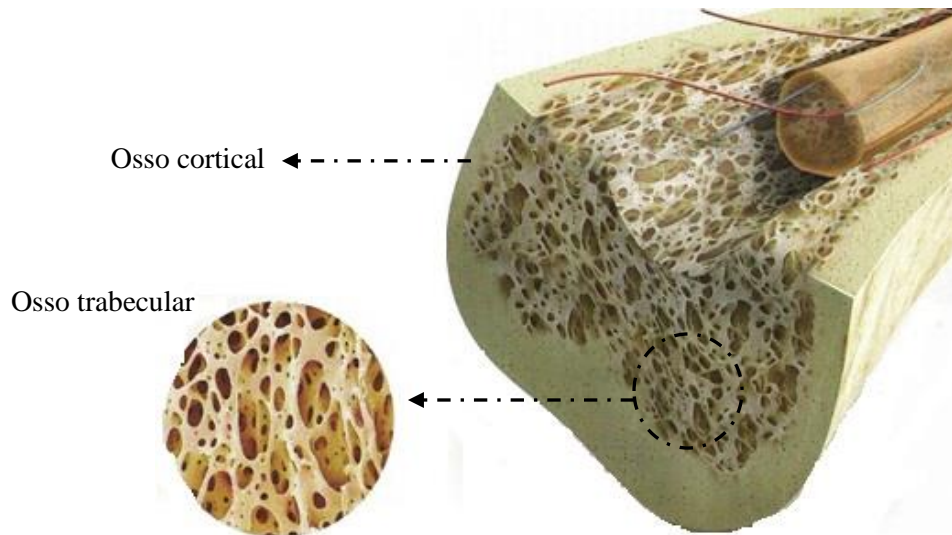


Figura 1.2 – Corte transversal do fêmur: camada externa de osso cortical e rede interna de osso trabecular. Fonte: MAGALHÃES e SILVA, 2012.

Os dois principais constituintes do osso, o colágeno e a apatita, são organizados hierarquicamente entre múltiplos comprimentos de escala como representado na Figura 1.3. Esta hierarquia começa com a organização de sequências de proteínas para formar a molécula de tropocolágeno e se estende até os macroporos do osso esponjoso e cortical, respectivamente. É importante lembrar que as proteínas da matriz óssea formam uma estrutura complexa, com uma grande diversidade de proteoglicanos e glicoproteínas, além do colágeno, que é relativamente mais abundante. Da mesma forma, possuem os reguladores bioquímicos, tais como fatores de crescimento, citocinas e outras enzimas (NEWMAN *et al.*, 2013).

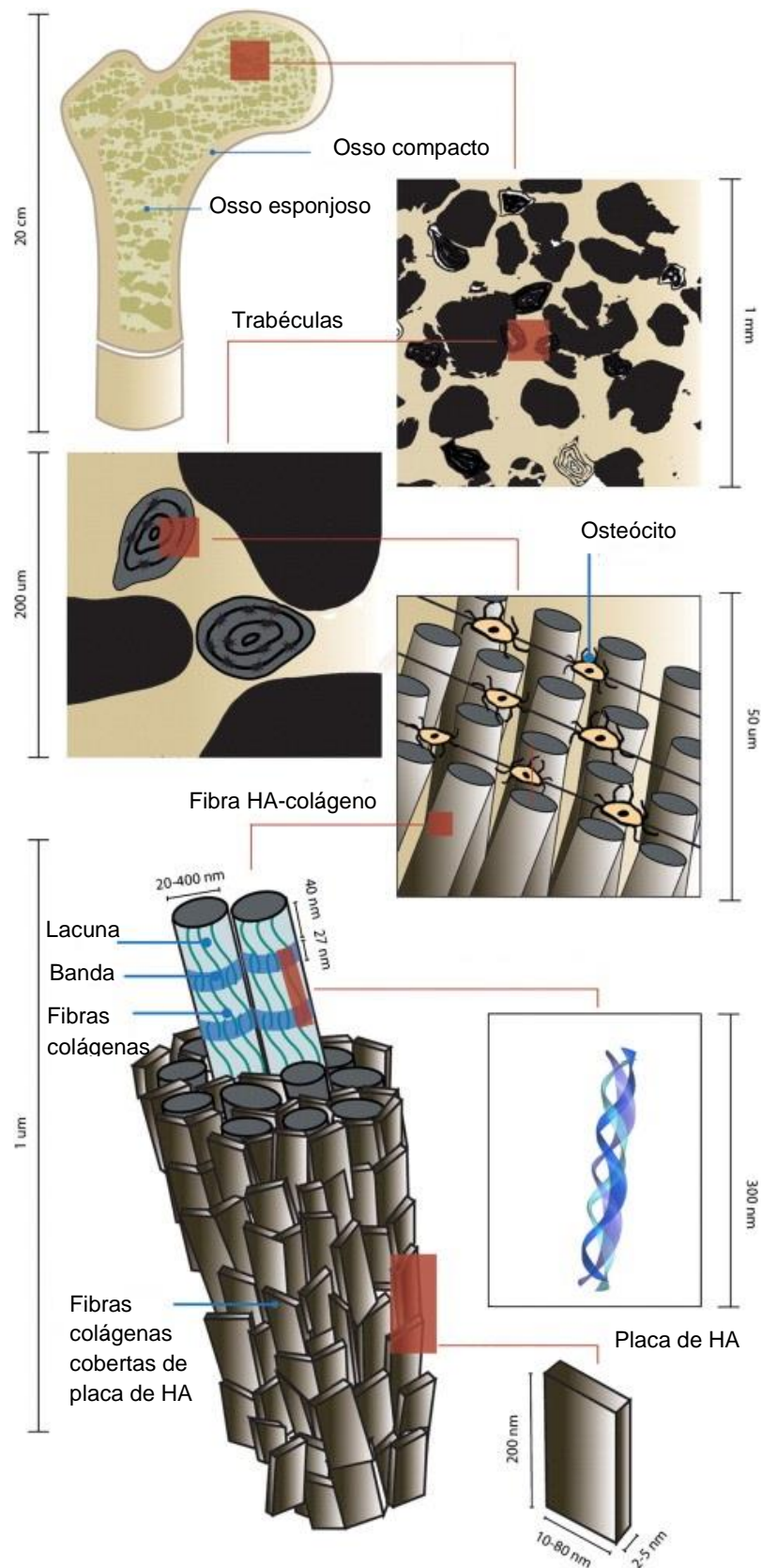


Figura 1.3 - Esquema ilustrativo da organização hierárquica do osso esponjoso humano a partir da nano escala. Fonte: Adaptado de NEWMAN *et al.*, 2013.

A formação de tecido ósseo pode ser realizada de duas maneiras: intramembranosa e endocondral. O tecido ósseo não apresenta diferença histológica, porém a ossificação intramembranosa ocorre dentro do tecido, no qual células progenitoras diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea. Já na ossificação endocondral ocorre o adensamento de células mesenquimais, que se diferenciam em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Este permite o desenvolvimento de tecido ósseo (MACKIE *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2012).

Seja qual for o processo de ossificação pelo qual o osso é formado, o tecido resultante não apresenta diferença. Existem dois tipos de tecido ósseo: o primário, denominado embrionário, imaturo ou osteóide; e o secundário, denominado maduro ou lamelar. O tecido ósseo primário forma-se durante o período embrionário e durante a reparação óssea. Apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções, sem organização definida, com menor quantidade de mineral e maior de osteócitos em comparação ao tecido ósseo secundário. O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido primário pela deposição gradual de fibras colágenas, modelando a forma trabecular do osso primário em lamelas dispostas paralelamente umas às outras e formando o osso esponjoso. Quando as fibras colágenas se organizam em camadas concêntricas em torno de capilares sanguíneos e nervos, denominados canais de *Havers*, forma-se o osso compacto (MACKIE *et al.*, 2008; NEWMAN *et al.*, 2013).

O tecido ósseo apresenta variação de todas as propriedades mecânicas e biológicas em função do seu tipo, idade, localização anatômica, região, posição e direção. Essa variação decorre da função estrutural (suporte ou sustentação de órgãos ou sistemas), transmissão de forças ou alavancas (controle de movimentos de articulações), proteção e o nível de atividade (intensidade, direção, frequência e duração das solicitações – tensões internas) (MAGALHÃES e SILVA, 2012).

#### 1.3.1.1 Remodelação óssea

A superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrocelular constituída por uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico, denominado perióstio. Sua superfície interna possui estrutura semelhante, denominada endóstio, responsável pela nutrição do tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).



Em termos microscópicos, o perióstio é formado por uma membrana de tecido conjuntivo vascularizado com a função de prover o aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo compacto, através da sua camada externa fibrosa; e uma camada interna osteogênica, formada por células osteoprogenitoras, com especial importância no crescimento e regeneração ósseos. O endóstio pode ser considerado uma camada periférica condensada do estroma da medula óssea e, tal como o perióstio, também possui células osteoprogenitoras capazes de se diferenciarem em osteoblastos e o seu próprio sistema vascular. Apresenta, dessa forma, potencial osteogênico e hematopoiético, atuando na regeneração da parte interna do osso e da medula óssea. Ainda possui a função de restabelecer o suprimento sanguíneo à área em regeneração (DIAS, 2004).

As células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima, também designadas células pluripotentes do estroma fibroblástico da medula óssea, possuem grande capacidade de diferenciação, podendo originar vários tipos celulares, tais como: osteoblastos, condroblastos, mioblastos, fibroblastos e adipócitos. Tal diferenciação depende de vários mecanismos de regulação, regidos por fatores de crescimento específicos (Figura 1.4) (BATISTA, 2009).

O fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) têm importante função na diferenciação em osteoblastos. A linhagem osteoblástica inicia-se com a célula osteoprogenitora, observando-se a diferenciação progressiva em pré-osteoblasto, osteoblasto e osteócito (BATISTA, 2009).

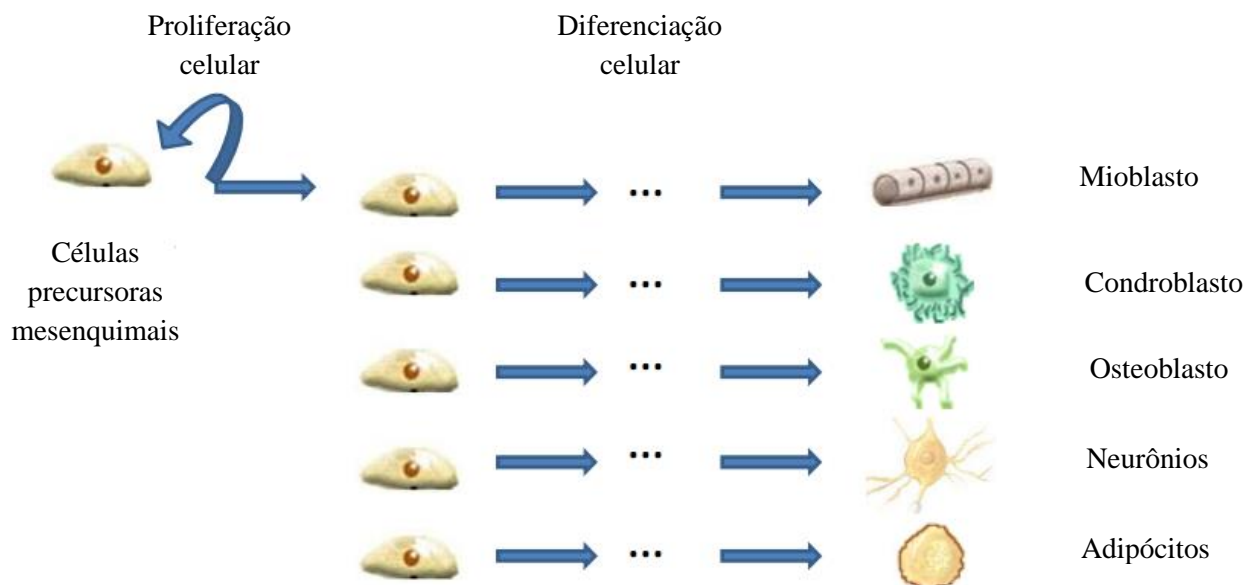


Figura 1.4 - Esquemática da diferenciação das células precursoras. Fonte: Adaptado de BATISTA, 2009.

Os osteoblastos ativos são caracterizados por uma membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina, receptores de vários hormônios e fatores de crescimento. São semelhantes aos fibroblastos e aos condroblastos por apresentarem intensa capacidade de secreção e divisão, sendo responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas como a osteocalcina, osteopontina, BMPc, entre outros. Concentram fosfato de cálcio participando da mineralização da matriz. Os osteoblastos estão presentes nas superfícies ósseas, um ao lado do outro, semelhante ao tecido epitelial. À medida que secretam a matriz, eles fazem sua deposição e acabam aprisionados nela, tornando-se menos ativos e, nesta fase, são chamados osteócitos, células terminais e mais maduras da diferenciação celular da linhagem osteoblástica (BONEWALD e JOHNSON, 2008; MARIEB *et al.*, 2008).

Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea, formando canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando possível a difusão de nutrientes, graças à comunicação entre os osteócitos por junções comunicantes. São pobres em organelas e seu núcleo tem a cromatina bastante condensada, refletindo pouca atividade. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea,

que ainda não é bem entendida, porém sabe-se que após a sua morte ocorre reabsorção da matriz circunvizinha (BONEWALD e JOHNSON, 2008; MARIEB *et al.*, 2008).

Os osteoclastos são células que diferem da linhagem celular dos osteoblastos, uma vez que as suas células precursoras, presentes em nível da medula óssea, são também as responsáveis pela diferenciação nas várias linhas das células hematopoiéticas (monócitos, macrófagos e outros leucócitos presentes no sangue periférico). São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Elas diferenciam-se na medula, caem na circulação sanguínea, chegam ao osso, fundem-se e formam os osteoclastos, que podem ter mais de 20 núcleos. Seu citoplasma se caracteriza por apresentar retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas carregadas de enzimas digestivas e mitocôndrias, pois participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São capazes de remover tanto a parte orgânica como inorgânica da matriz (TAKAHASHI *et al.*, 2002).

O tecido ósseo se encontra em estado dinâmico, marcado por um processo contínuo de formação e reabsorção, ou seja, remodelação óssea, que é a alternância da formação óssea realizada pelos osteoblastos com a reabsorção realizada pelos osteoclastos, ocorrendo de maneira sincronizada (Figura 1.5). Durante o crescimento, a taxa de formação óssea é superior à de reabsorção e o balanço de cálcio é positivo. A partir da quarta ou quinta décadas de vida, a reabsorção óssea predomina sobre a formação, resultando em perda progressiva de massa óssea (MARIEB *et al.*, 2008).

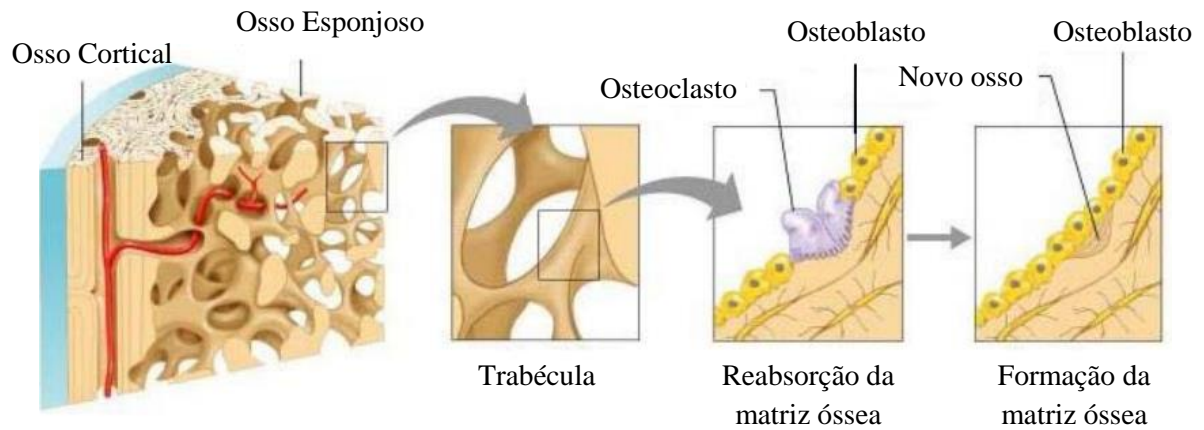


Figura 1.5 - Esquema da remodelação de ossos esponjosos. Fonte: Adaptado de MARIEB *et al.*, 2008.

No tecido ósseo, em condições fisiológicas, existe uma íntima relação e integração entre estímulos mecânicos e respostas celulares, visando a constante adaptação ou reparação da microestrutura óssea (Figura 1.6) (BONEWALD e JOHNSON, 2008).

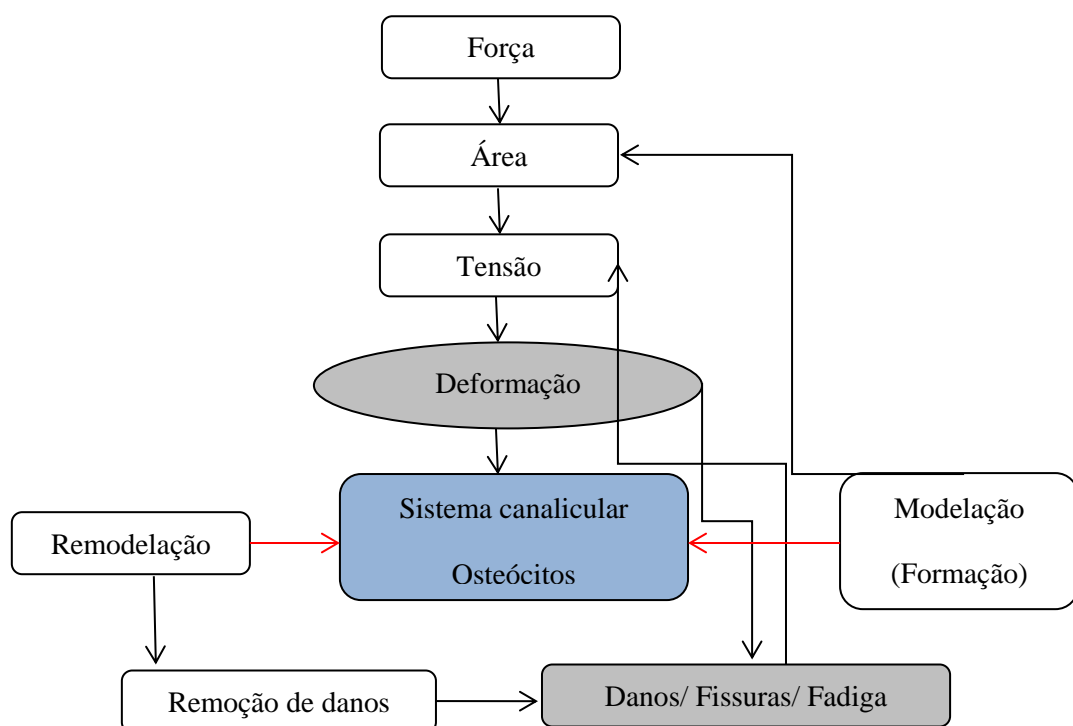


Figura 1.6- Modelo biomecânico dos processos de (re) modelação. Fonte: Adaptado de BONEWALD e JOHNSON, 2008.

A aplicação de uma força por unidade de área (tensão) causa a deformação da matriz óssea. Esta deformação é transmitida aos osteócitos que desencadeiam processos de modelação (aumento da massa óssea e da área de aplicação da força), ou remodelação (substituição do tecido ósseo para adaptação funcional ou remoção dos danos) (BONEWALD e JOHNSON, 2008).

A consolidação óssea é um processo extremamente complexo que pode ser dividido em três estágios principais: fase inflamatória, fase de reparo e de remodelação. A fase inflamatória começa imediatamente após a fratura e ocorre aproximadamente nas primeiras duas a três semanas. Após 48 horas, o exsudato do hematoma contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e de crescimento, liberados pelas plaquetas, células locais, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (ISOLA e MORAES, 2012). Os estágios de reparo após fratura ou osteotomia e sua relação com o suprimento sanguíneo são fundamentais. Os leitos circulatórios, tanto medulares quanto periosteais, proliferam muito, mas o sistema arterial medular representa um papel fundamental no suprimento sanguíneo para a formação do calo ósseo. O predomínio desse suprimento medular aumenta à medida que progride a fase de reparação (MORAES, 2006).

A cicatrização não ocorre sem a angiogênese, que é reconhecida como passo essencial na osteogênese, na qual as células epiteliais dos capilares possuem relação direta na formação óssea. Isto se deve à sua proximidade com os osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) atua induzindo a angiogênese, que é o processo de formação de novos vasos e ocorre antes da etapa de osteogênese. A indução da formação de uma rede de capilares no início do processo de reparação é necessária para que o tecido ósseo possa ser regenerado e tenha nutrientes para seu desenvolvimento (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; ISOLA e MORAES, 2012).

O ciclo de remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos (Figura 1.7) que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação, seguindo uma sequência imutável de ativação (A) → reabsorção (R) → formação (F). A remodelação óssea consiste, pois, num processo pelo qual é eliminada uma área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea. Este

fenómeno pode verificar-se, igualmente, (e seguindo a mesma ordenação) noutros tecidos duros (COXON, 2004; HENRIKSEN *et al.*, 2009; JUDAS *et al.*, 2012).

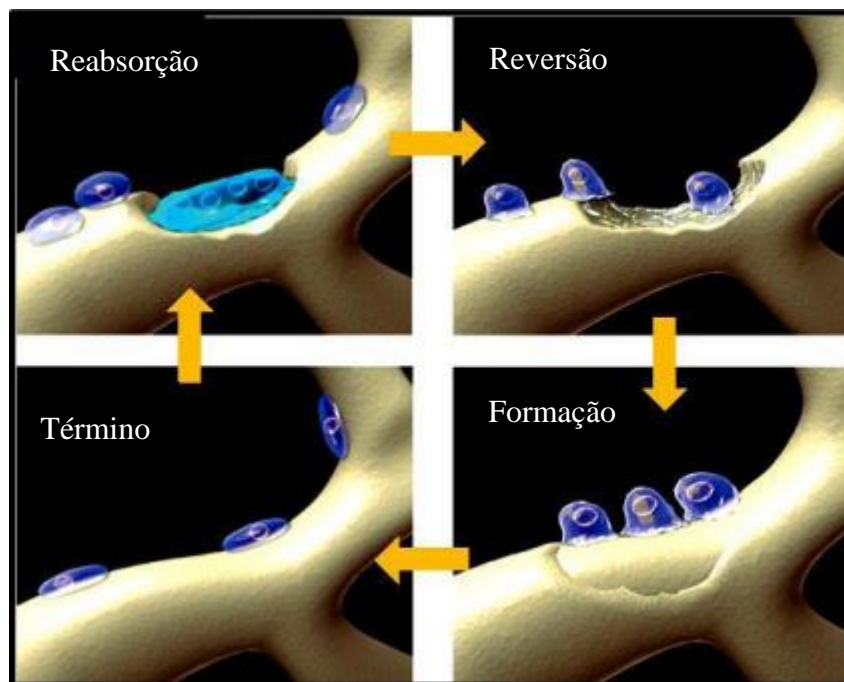


Figura 1.7 - Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea observado no tecido ósseo esponjoso. Fonte: Adaptado de COXON (2004).

As falhas destes processos biológicos podem causar distúrbios na reparação de fraturas, tendo como consequência a consolidação tardia ou não consolidação do foco da fratura (ISOLA e MORAES, 2012).

### 1.3.1.2 Engenharia de tecido ósseo

Nas três últimas décadas, a osteoporose tornou-se alvo de atenção de várias especialidades médicas, graças a maior compreensão das doenças ósseo-metabólicas e particularmente ao desenvolvimento de métodos de medida da massa óssea. Dois fatores contribuem para maior importância da osteoporose: a longevidade populacional, e os custos gerados pelas fraturas, principalmente de quadril (DOURADOR, 1999).

Sabe-se que à medida que a pessoa envelhece, os ossos apresentam a tendência de desmineralizar, ou seja, perdem cálcio e se tornam tão fracos e quebradiços que as fraturas

passam a constituir ameaça real para a vida dessas pessoas. Contudo, entre outros fatores, a resistência dos ossos esta ligada a atividade física.

Os ossos, assim como os músculos, tornam-se mais fortes e resistentes sob determinado estresse mecânico propiciado pela pratica regular de atividades físicas obedecendo certos limites. Por outro lado, o sedentarismo é, sem dúvida, um dos mais importantes fatores relacionados aos grandes males que acometem a sociedade atual (OURIQUES e FERNANDES, 1997).

A falta de atividade física é relacionada como causa de inúmeros danos a saúde e tem como consequência direta ou indireta o aparecimento de doenças tais como: hipertensão, obesidade, doenças arteriais e coronarianas, ansiedade, depressão e problemas de coluna. Estas alterações da normalidade também estão relacionadas ao estilo de vida das pessoas: alimentação inadequada, o consumo de álcool e o tabagismo (BATISTA *et al.*, 2012).

O aumento da expectativa de vida, que ocorre em muitas partes do mundo, evidencia que as mulheres agora vivem mais de um terço de suas vidas após a menopausa, e que o número de mulheres na pós-menopausa está aumentando. No Brasil, por exemplo, em 1990, o número de mulheres com mais de 50 anos era de 10.345.440; 20 anos depois, esse número praticamente duplicou – e o número de mulheres é 18,0% maior que o número de homens. Essa é igualmente uma tendência em outros países da América e da Europa. Considerando-se o envelhecimento populacional, o aumento da expectativa de vida e a feminização das idades mais avançadas, torna-se grande o impacto socioeconômico da osteoporose (BRANDÃO *et al.*, 2012).

Em condições normais, a maioria das fraturas não apresenta problemas de consolidação, mas existem algumas situações em que o processo de reparo pode ser acelerado, o que assegura rápido retorno da função musculoesquelética e evita longos períodos de inatividade, facilitando o retorno e a readaptação do indivíduo às suas atividades laborais.

Dentro dessa perspectiva de busca por padrões superiores de vida e longevidade, cada vez mais, se torna evidente a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos ósseos lesados.

O recente progresso científico em biomateriais e células terapêuticas para o desenvolvimento de novos materiais sintéticos substitutos de tecidos ósseos proporcionou avanços excepcionais para o desenvolvimento da Engenharia de Tecidos, que por sua vez, apresenta três componentes principais, um *scaffold* que forneça estrutura e substrato para o crescimento e desenvolvimento do tecido, uma fonte de células para facilitar a formação tecidual necessária e fatores de crescimento ou estímulos biofísicos para direcionar o crescimento e diferenciação das células no interior do *scaffold* (Figura 1.8) (MURPHY *et al.*, 2013).

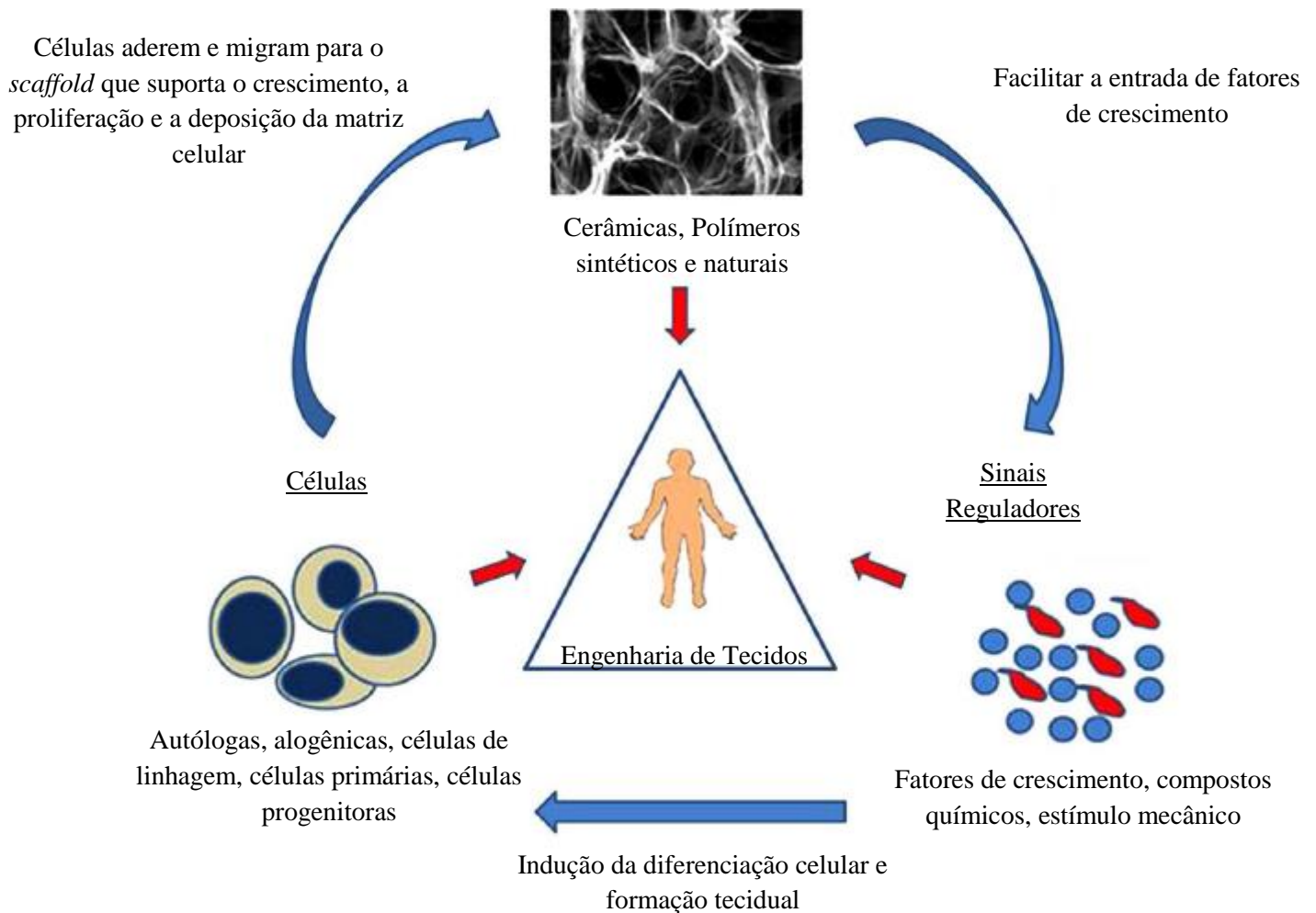


Figura 1.8- Os três componentes essenciais que constituem a tríade de engenharia de tecidos. Fonte: MURPHY *et al.*, 2013.

### 1.3.1.3 Enxertos de tecido ósseo



Existem inúmeras opções de enxerto ósseo para cumprir várias necessidades, dependendo das especificidades da deficiência e da condição clínica do indivíduo (BHUMIRATANA e VUNJAK-NOVAKOVIC, 2012). Frequentemente, é realizado enxerto de osso, no qual o tecido pode ser retirado do próprio paciente ou de outra via (banco de tecidos músculo esqueléticos) para, em seguida, realizar o enxerto na região de interesse.

Os enxertos ósseos são fragmentos de osso removidos de uma parte do sistema esquelético e usados para curar e/ou fortalecer determinada área de interesse. Podem ser usados em diversas regiões esqueléticas. As enxertias são comumente para correções de distúrbios na coluna vertebral, tais como infecção, traumatismo, tumores, degeneração e deformidade, ou para obter a fusão de estruturas em casos de fraturas. Também podem ser aplicados em reconstruções na região oral e mandibular, no qual aspectos anatômicos, funcionais e estéticos devem ser levados em conta durante a realização de cirurgia reconstrutiva. Enxertos ósseos retirados de fíbula, escápula, crista ilíaca e das costelas são amplamente usados em regiões superiores, inferiores e nasal com diferentes taxas de sucesso (FARDIN *et al.*, 2010; BHUMIRATANA e VUNJAK-NOVAKOVIC, 2012).

O material de enxerto ideal deve ter fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora, promover a osteogênese, não apresentar resposta imunológica do hospedeiro, revascularizar rapidamente, estimular a osteoindução, promover a osteocondução e ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (FARDIN *et al.*, 2010).

Várias técnicas de enxertia foram ou são realizadas com o uso dos enxertos autógenos, dos aloenxertos e dos enxertos xenógenos (CARVALHO *et al.*, 2003) e aloplásticos (BUSER, 2010). O osso autógeno é consagrado na literatura mundial como o que consegue reunir características mais próximas do ideal (FARDIN *et al.*, 2010), pois trata-se de tecido do próprio indivíduo. Entre os tipos de enxerto é considerado padrão ouro em termos de potencial osteogênico, sendo o único que fornece células ósseas vivas imunocompatíveis (SCARANO *et al.*, 2006).

Os enxertos autógenos podem ser obtidos de diferentes partes do corpo, sendo que a crista do osso ilíaco (enxertos ósseos esponjoso-medulares), a calota craniana, a tíbia, as costelas, e a mandíbula (especialmente para enxertos de menores proporções) são consideradas as áreas doadoras de eleição (PINTO *et al.*, 2007). O viés desta intervenção

é a limitação no volume de tecido a ser retirado do sítio doador, o desconforto pós-operatório e o custo elevado.

Os aloenxertos consistem de tecido ósseo obtido de um doador e usado em outro indivíduo. Geralmente, são armazenados em banco de ossos e podem ser usados na forma de osso fresco congelado (FFB), aloenxerto ósseo seco congelado (FDBA) ou aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado (DFDBA). O FFB é usado com menor frequência, devido ao alto risco de rejeição imunológica e transmissão de doenças, já o FDBA e DFDBA reduzem a imunogenicidade do material, melhorando potencialmente o resultado clínico. Aloenxertos são disponibilizados em blocos ou formatos particulares, provenientes da medula ou do córtex (BUSER, 2010).

O processo de ossificação e reparo de fraturas utilizando enxertos alógenos e autógenos são distintos. O enxerto autógeno usado como tecido de reconstrução inter-fragmentária sofre um reparo concomitante de ossificação do tipo endocondral e intramembranosa, com presença de calo ósseo após quatro semanas. Quando do uso de enxerto alógeno, ocorre apenas ossificação endocondral, no qual há presença de cartilagem ao redor do enxerto e atraso no reparo ósseo. Na literatura, este fato justifica-se pela deficiência de fatores de crescimento nos enxertos alógenos, que exibem papel importante na vascularização (Fator de Crescimento Vascular Endotelial- VEGF) e no processo de remodelação óssea (ligante para receptor ativador do fator nuclear – RANCKL), (HAWTHORNE, 2010).

O enxerto ósseo xenógeno é retirado de uma espécie e transplantado em outra, como exemplo, o osso de origem bovina. As diferenças antigênicas desses enxertos são mais pronunciadas do que no osso alógeno (PINTO *et al.*, 2007). Os xenoenxertos mais usados derivam da porção mineral do osso animal e representam um arcabouço para a angiogênese e migração celular, importantes características osteocondutoras (TULASNE e ANDRÉANI, 2010).

Os materiais aloplásticos ganharam aceitação no mercado, devido à facilidade no manuseio e a diminuição da morbidade do sítio doador do enxerto (PINTO *et al.*, 2007). São dispositivos de origem sintética, bioinertes e/ou bioativos, podendo ser porosos, cristalinos, amorfos e granulados, porém, sobretudo, devem garantir a formação de

ligações estáveis com o osso neoformado (LOPES, 2009; AZAMBUJA-SANTOS *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que os materiais osteocondutores não possuem a capacidade de promover a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem a falha, orientando as novas células originadas por proliferação das osteoprogenitoras, provenientes da margem dos defeitos, a promoverem a neoformação de tecido ósseo (LOPES, 2009).

A recuperação de defeitos ósseos de grandes dimensões provocados por traumas, infecções e malformações desperta o interesse no desenvolvimento de novos biomateriais com o propósito de minimizar esses agravos. Assim, a interação entre o tecido e o biomaterial suporte usado para seu desenvolvimento conduz a propriedades físico-químicas e cinéticas específicas, que são decisivas para a sua utilização prática, sendo que um biomaterial suporte criteriosamente escolhido poderá aumentar significativamente o desempenho operacional de tal sistema (COSTA-JUNIOR, 2008).

### 1.3.2 Biomateriais

Biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para aplicação biomédica, sendo definidos como uma substância, com exceção de drogas, ou a combinação de duas ou mais substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado, é usada com a intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (MIRTCHI *et al.*, 1989).

Dados históricos, que datam de 4000 anos a.C., registram a primeira utilização dos biomateriais como materiais de sutura. Placas de ouro foram utilizadas para o reparo de lesões cranianas pelos egípcios, cerca de 1000 a.C., e são registros de biomateriais ortopédicos. Membros artificiais eram conhecidos desde a época do Império Romano até a Idade Média. No século XX, surgiu a era moderna de biomateriais com a introdução dos conceitos de assepsia e esterilização (ORÉFICE *et al.*, 2012). Após os anos 70, surgiu o conceito de que a substituição de um tecido deve ser feita por uma estrutura funcionalmente semelhante, de acordo com a natureza e características funcionais do

tecido a ser substituído. Inicialmente, tenta-se o uso de tecidos naturais, que são limitados pela disponibilidade e altos índices de reações imunológicas (PARK, 1984); ou envolve o uso de materiais com características químicas similares, como por exemplo, a seda, o Nylon e o colágeno; ligas metálicas de alta resistência mecânica e livres de corrosão, como Ti-Al-V; e cerâmicas como os vidros bioativos e a hidroxiapatita (RATNER, 1996).

Atualmente, a prática médica utiliza grande número de dispositivos e implantes (Figura 1.9). Biomateriais, sob a forma de implantes (ligamentos, enxertos vasculares, valvas cardíacas, lentes intra-oculares, implantes dentários, etc) e dispositivos médicos (biossensores, corações artificiais, etc) são amplamente utilizados para substituir e / ou restabelecer a função de tecidos/ órgãos traumatizados ou degenerados (MANIVASAGAM *et al.*, 2010; PATEL e GOHIL, 2012).

Os pesquisadores classificaram os vários tipos de materiais em relação ao comportamento fisiológico dos mesmos. Os materiais que apresentam uma resposta interfacial mínima, não resultando na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro são denominados biotoleráveis. São isolados dos tecidos adjacentes através da encapsulação por uma camada de tecido fibroso, devido à liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. A maioria dos polímeros sintéticos e dos metais são materiais biotoleráveis. Os bioinertes também apresentam resposta interfacial mínima, com formação de fina capa fibrosa envoltória, praticamente imperceptível, e liberação mínima de componentes. Como exemplo, podemos citar a alumina ( $Al_2O_3$ ), a zircônia ( $ZrO_2$ ) e o dióxido de titânio ( $TiO_2$ ). Por sua vez, os materiais bioativos apresentam resposta biológica caracterizada pela interação íntima com o tecido, que parece ser química, sem a interposição da camada fibrosa. Como exemplo dessa classe de materiais temos a hidroxiapatita [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ], o fosfato tricálcio [ $Ca_3(PO_4)_2$ ] e os vidros bioativos. Já os absorvíveis, são os biomateriais que depois de certo período de tempo em contato com os tecidos são degradados ou fagocitados pelo organismo. Os principais exemplos são o fosfato tricálcio e o ácido polilático (SANTOS, 2005).

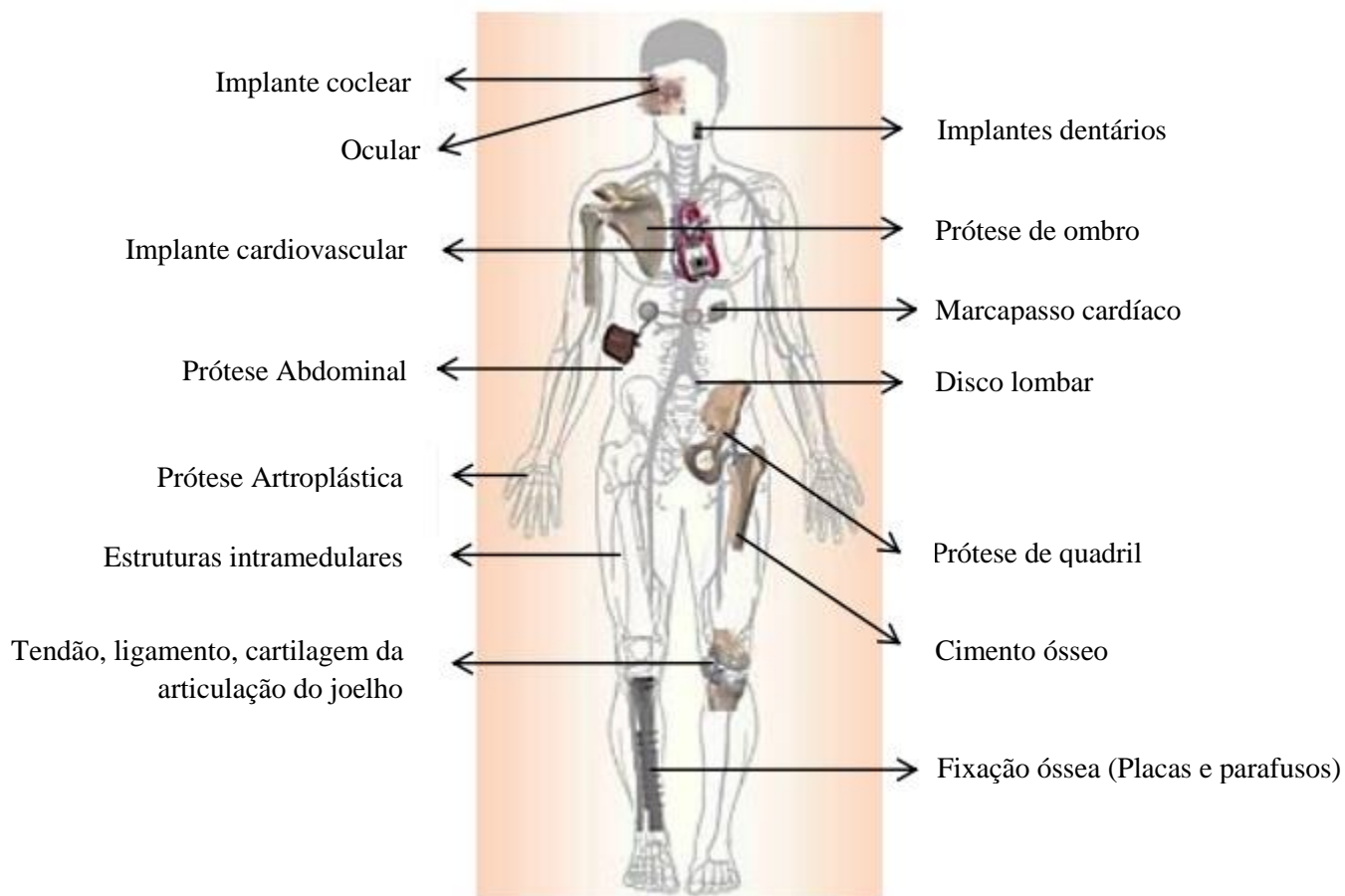


Figura 1.9 – Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais. Fonte: Adaptado de PATEL e GOHIL, 2012.

Em termos gerais, são requisitos desejáveis de um biomaterial, a biocompatibilidade com o tecido, atoxicidade, não ser carcinogênico ou pirogênico, apresentar estabilidade química e biológica, baixa densidade, pouco peso, resistência mecânica e elástica adequadas, e ter baixo custo (SANTOS, 2005).

Para o desenvolvimento de biomateriais em geral, um pré-requisito é o conhecimento do processamento, da estrutura e das propriedades do material. Cada material apresenta um comportamento típico diante de determinadas situações e isto caracteriza suas propriedades. As propriedades dos materiais originam-se em sua estrutura interna e esta estrutura não envolve apenas os átomos, mas também o modo como estes se associam com seus vizinhos, em cristais ou moléculas. As modificações das propriedades podem acontecer toda vez que o processo de fabricação alterar a estrutura interna dos materiais.

A Engenharia de Materiais, empregando os conhecimentos fundamentais, sintetiza, desenvolve, prepara, modifica e aplica os materiais para suas exigências (SANTOS, 2005).

O advento da nanotecnologia no campo da medicina regenerativa vislumbra o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais contendo características nanométricas capazes de orquestrar o comportamento celular apresentando sinais morfológicos e biológicos específicos melhores em comparação com materiais microestruturados (CARDOSO *et al.*, 2012).

Os nanocompósitos são uma nova classe de materiais poliméricos que contém quantidades relativamente pequenas de nanopartículas (tipicamente <5%). Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou ainda orgânica/orgânica (PAMPA-QUISPE, 2011).

Tal como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve de matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas. As partículas tendo dimensões nanométricas (1-100nm), apresentam uma área de superfície elevada, promovendo melhor dispersão na matriz polimérica e por isso uma melhoria das propriedades físicas do compósito que dependem da homogeneidade do material. A interação dessas partículas nanométricas com as moléculas da matriz do compósito ocorre em escala molecular, além disso, a área superficial onde estas interações ocorrem é extremamente maior em comparação com os materiais de dimensões convencionais, tais fatores determinam uma melhoria significativa das propriedades da matriz-reforço, normalmente maior do que se verifica em compósitos tradicionais (PAMPA-QUISPE, 2011).

Nanocompósitos normalmente contêm de 2 a 10% de nanopartículas com melhoria de propriedades igual ou superior ao efeito observado em compósitos tradicionais contendo de 20 a 35% de partículas. Devido ao fato do tamanho de partícula ser diferenciado, entre os compósitos e nanocompósitos, o comportamento previsto para as propriedades esperadas podem alterar-se drasticamente (SILVA *et al.*, 2006).

A nanotecnologia está emergindo como novo paradigma tecnológico que prevê contribuições significativas para os campos científico, e que irão influenciar decisivamente o futuro da humanidade. As pesquisas e manipulações de nível de escala nanométrica implicam numa revolução tecnológica real e complexa sobre disciplinas científicas e tecnológicas ao mesmo tempo.

#### 1.3.2.1 Biocerâmica

Os materiais cerâmicos utilizados em aplicações biomédicas, também denominados biocerâmicos, destacam-se por serem mais biocompatíveis que qualquer outro biomaterial, apresentando como desvantagens baixa resistência à fratura (DUBOK, 2000). Entre os biocerâmicos mais utilizados destacam-se a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), a zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) e os fosfatos de cálcio. Tanto a alumina como a zircônia são consideradas cerâmicas bioinertes, não desenvolvendo ligações químicas com o osso, enquanto que os fosfatos de cálcio destacam-se por serem bioativos (DUBOK, 2000).

Alguns vidros, contendo cálcio e fósforo na sua composição, apresentam elevada bioatividade que se evidencia pela formação de microcristais de hidroxiapatita na sua superfície após contato com o plasma humano. Por esta razão, tais materiais são também bastante utilizados na engenharia do tecido ósseo (DUBOK, 2000).

As cerâmicas bioativas interagem com o tecido através de modificações superficiais decorrentes de interações com o organismo e através de ligações bioquímicas, seguidas da completa substituição pelo osso saudável (DUBOK, 2000). Entre as biocerâmicas utilizadas, grande interesse destina-se a utilização dos fosfatos de cálcio visto que, além de bioativos, têm composição química semelhante à da fase mineral do tecido ósseo (ARAÚJO-JÚNIOR, 2005).

##### 1.3.2.1.1 Fosfato de cálcio

O primeiro relato sobre a utilização bem sucedida de uma combinação de materiais com CaP ou materiais de CaP no reparo de defeitos ósseos aconteceu em 1920. O segundo

relato foi publicado por outros pesquisadores 30 anos depois e sugeria que a HA ou a fluorapatita fossem utilizadas para implantes ósseos. Entre 1976 e 1986, trabalhos foram feitos para o desenvolvimento e comercialização de CaP (principalmente HA) como biomaterial para reparo, substituição e aumento de tecido ósseo (DALAPÍCULA *et al.*, 2008).

A fabricação de estrutura mineralizada é um fenômeno largamente difundido entre os organismos vivos como exemplo, a fabricação de cascas de ovos, de moluscos, de crustáceos, carapaças, espinha dorsal, ossos e dentes. Estes biocompósitos cerâmicos consistem de montagens laminadas de macromoléculas com fases inorgânicas bem ordenadas, ricas em cálcio, resultando em produtos de morfologia e propriedades únicas. Baseados nos dados colhidos dos sistemas de caracterização, o processo de mineralização pode ser descrito em quatro etapas: a fabricação do substrato (matriz e íons), a nucleação na superfície (associada à agregação e à aglomeração), o crescimento na solução e a mineralização.

Fases diferentes de CaP são obtidas dependendo da temperatura, impurezas e da presença de água (Tabela 1.3). A bioatividade e o comportamento de degradação dependem da relação Ca/P, da cristalinidade e pureza da fase. Independentemente da relação Ca/P, da fase e da cristalinidade, CaP's são relativamente insolúveis em pH fisiológico 7,4, no entanto, têm cada vez mais alta solubilidade em ambientes ácidos (BOSE e TARAFDER, 2012).

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição. Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio, a qual é explorada nas diversas aplicações e que pode predizer seu comportamento *in vivo*, é a solubilidade em água. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. Observando-se as isotermas de solubilidade de fases de fosfatos de cálcio, Figura 1.10, nota-se a inclinação negativa nas regiões neutras e ácidas do diagrama de fases. Isso reflete o fato de que todos os compostos são mais solúveis conforme o pH diminui. Na região alcalina, a concentração de cálcio aumenta com o aumento do pH. Dessa forma, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e,



consequentemente, sua degradação in vivo, é dada pela seguinte ordem: MCPM >  $\alpha$ -TCP > DCPD > DCP > OCP >  $\beta$ -TCP > HA (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

**Tabela 1.3** – Diferentes Fosfatos de Cálcio (BOSE e TARAFDER, 2012).

| Fosfatos de Cálcio                  |            | Abreviatura   | Fórmula química                                                                    | Razão molar<br>Ca/P |
|-------------------------------------|------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Fosfato monohidratado               | monocálcio | MCPM          | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$                      | 0,5                 |
| Fosfato monocálcio                  |            | MCP           | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$                                               | 0,5                 |
| Fosfato dicálcio dihidratado        |            | DCPD          | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                         | 1,0                 |
| Fosfato dicálcio                    |            | DCP           | $\text{CaHPO}_4$                                                                   | 1,0                 |
| Fosfato octacálcio                  |            | OCP           | $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                   | 1,33                |
| Fosfato $\alpha$ -tricálcio         |            | $\alpha$ -TCP | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                                | 1,5                 |
| Fosfato $\beta$ -tricálcio          |            | $\beta$ -TCP  | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                                 | 1,5                 |
| Fosfato de cálcio amorfo            |            | ACP           | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$                             | 1,2-2,2             |
| Hidroxiapatita deficiente de cálcio |            | CDHA          | $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} (0 < x < 1)$ | 1,5-1,67            |
| Apatita carbonada                   |            | CA            | $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3$                                          | 1,67                |
| Hidroxiapatita                      |            | HÁ            | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$                                       | 1,67                |
| Oxiapatita                          |            | OXA           | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{\circ}$                                            | 1,67                |
| Fosfato tetracálcio                 |            | TTCP          | $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$                                               | 2,0                 |

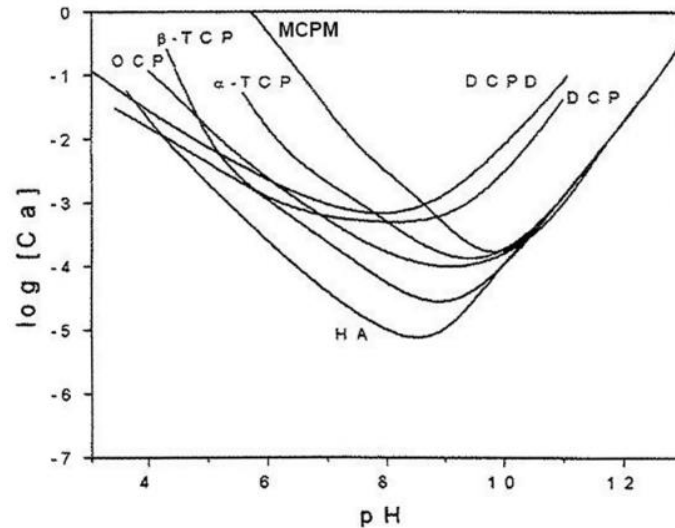


Figura 1.10 - Diagrama de solubilidade para o sistema ternário  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$ : isoterma de solubilidade mostrando  $\log[\text{Ca}]$  e pH de soluções em equilíbrio com vários sais. Fonte: Adaptado de GUASTALDI e APARECIDA, 2010.

#### 1.3.2.1.1.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) faz parte do grupo mineral apatita e sua fórmula mais empregada é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , apresentando estequiometria com razão Ca/P de 1,67 (Figura 1.11). Embora a estrutura da apatita mineral seja conhecida desde 1930, a estrutura da HA foi realmente esclarecida em 1964, quando as posições dos átomos de hidrogênio foram estabelecidas pela difração de raios-X. Desde então, representações gráficas de computador levaram à ideia da forma da HA em estrutura cristalina hexagonal, com eixo  $a = b = 0,9422\text{nm}$  e eixo  $c = 0,6880\text{nm}$ . Os grupos OH estão ordenados no eixo  $c$  e os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ocupam duas posições diferentes, conforme Figura 1.12 (JONES, 2001).

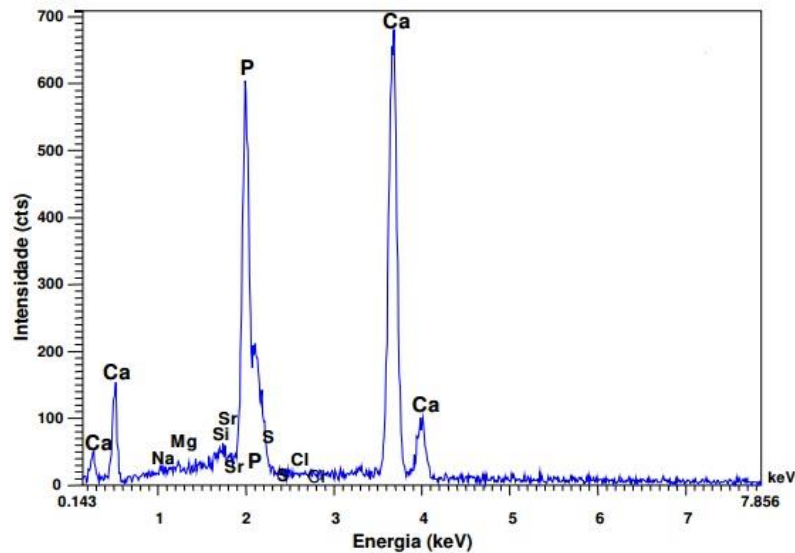


Figura 1.11- Espectro de EDS característico de HAP com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos. Fonte: SANTOS, 2005.

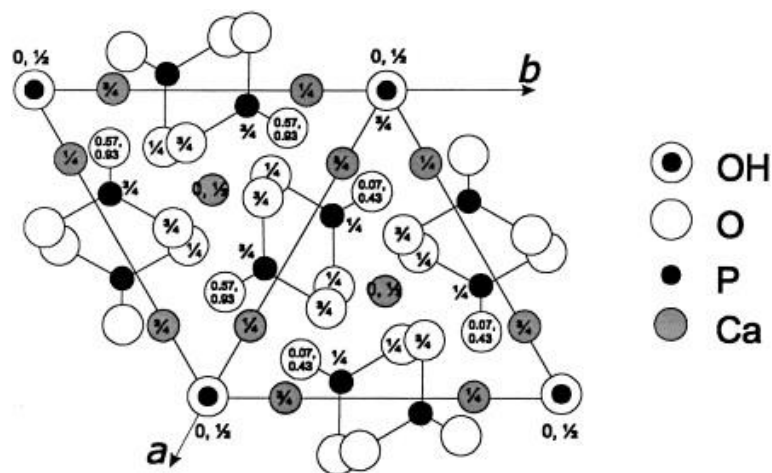


Figura 1.12 - A estrutura de cristal de hidroxiapatita idealizada, vistos ao longo do eixo c. Fonte: Adaptado de JONES, 2001.

A HA é considerada uma das cerâmicas mais biocompatíveis, devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. Esse material tem sido sintetizado de diversas formas, tais como blocos, grânulos ou recobrimentos, igualmente densos ou porosos, usando materiais precursores de custo baixo e disponível no comércio nacional. Estes fatores geram um produto final bastante acessível, já que o grama de HA de boa qualidade comercializada no mercado nacional ou importada ainda tem um custo bastante elevado (MARTINS *et al.*, 2010).

A HA é a fase mais frequente e termodinamicamente estável em pH fisiológico, sendo o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e, também proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície (MACHADO *et al.*, 2010).

A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção (COSTA *et al.*, 2009). Além disso, a composição uniforme, a segurança comprovada (não é tóxica, alergênica ou carcinogênica) e a microestrutura completamente controlável são características vantajosas desse material sintético (MARTINS *et al.*, 2010).

O grande número de publicações a respeito da produção e sinterização da hidroxiapatita relata variações no comportamento e propriedades do material de acordo com o método utilizado. Os pós-cerâmicos podem ser obtidos por via seca ou úmida. Alguns pesquisadores chamam atenção para o processo por via seca, apontando como grande vantagem a alta reprodutibilidade (HONDA *et al.*, 1990; VARM *et al.*, 2005), onde a reação de estado sólido resulta em pós-cerâmicos muito finos e homogêneos. Outros destacam a via-úmida pela sua relativa simplicidade e defendem que a técnica tem baixo custo, além de permitir a obtenção de biomaterial homogêneo, reativo e de composição estequiométrica melhor definida, possibilitando controle nas condições de síntese (RODRIGUEZ-LORENZO *et al.*, 2001). Porém, em consequência de modificações sofridas na produção e sinterização da HA, propriedades tais como dissolução e reabsorção são afetadas.

Assim, mesmo que se consiga controlar todos os parâmetros que governam a produção, o uso clínico da hidroxiapatita pode ser limitado por sua lenta biodegradação (DE GROOT, 1980). Estudos por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente apenas após 4 ou 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, de modo que ele possa ser degradado lentamente, enquanto é repostado por osso

em formação, evitando a presença de material estranho ao organismo durante longos períodos de tempo (NORDSTROM *et al.*, 1990).

A HA e outras formas de fosfatos de cálcio possuem habilidade de manter e estimular o crescimento de células humanas; a presença de poros com tamanho variando entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  permite a interconectividade favorecendo o crescimento de osteoblastos acima e dentro dos poros (MENDELSON *et al.*, 2010). O grande desafio da engenharia de tecidos é definir as condições de processamento que resultem na presença de microporosidade de aproximadamente 1 $\mu\text{m}$  nas paredes dos poros para a fixação efetiva das células e crescimento interno. Já o controle da porosidade também permite grande potencial no desenvolvimento de implantes para a liberação lenta de agentes terapêuticos. Além disso, a estrutura porosa da HA funciona como suporte passivo a neoformação vascular, o que leva a proliferação de fatores indutores da aposição óssea. Sua superfície porosa parece fornecer um substrato adicional a proliferação do tecido ósseo. Contudo, a hidroxiapatita permite a junção, proliferação e migração de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em oposição direta ao biomaterial (SAKANO *et al.*, 2001).

A estrutura cristalina da HA lhe confere uma de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes, tais como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , e íons trivalentes. A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons  $\text{PO}_4^{3-}$  podem ser substituídos por íons  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{VO}_4^{3-}$  e os íons  $\text{OH}^-$  por íons  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA que, por sua vez, alteram a degradação e o comportamento *in vivo*. O íon  $\text{CO}_3^{2-}$  pode fazer tanto substituições no sítio do  $\text{OH}^-$ , originando a denominada HA carbonatada do tipo A, quanto no sítio do  $\text{PO}_4^{3-}$ , originando HA carbonatada do tipo B. Para estas substituições ocorrem efeitos opostos nos parâmetros de rede: substituição do tipo A causa expansão no eixo a e contração no eixo c, enquanto que a substituição do tipo B causa contração no eixo a e expansão no eixo c. Além disso, a substituição do tipo B acarreta também a diminuição

do tamanho dos cristais e da cristalinidade. As substituições catiônicas por  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  causam aumento da solubilidade (REY *et al.*, 2007).

A estrutura molecular da HA apresenta excitações vibracionais resultantes das ligações interatômicas fortes (ligações covalentes) dos grupos funcionais específicos. O perfil do espectro de FTIR de HA mostra bandas de absorção mais intensas em  $964\text{cm}^{-1}$ ,  $1044\text{cm}^{-1}$  e  $1090\text{cm}^{-1}$  pertencentes aos grupos de fosfato da HA (Figura 1.13) (SANTOS *et al.*, 2005).

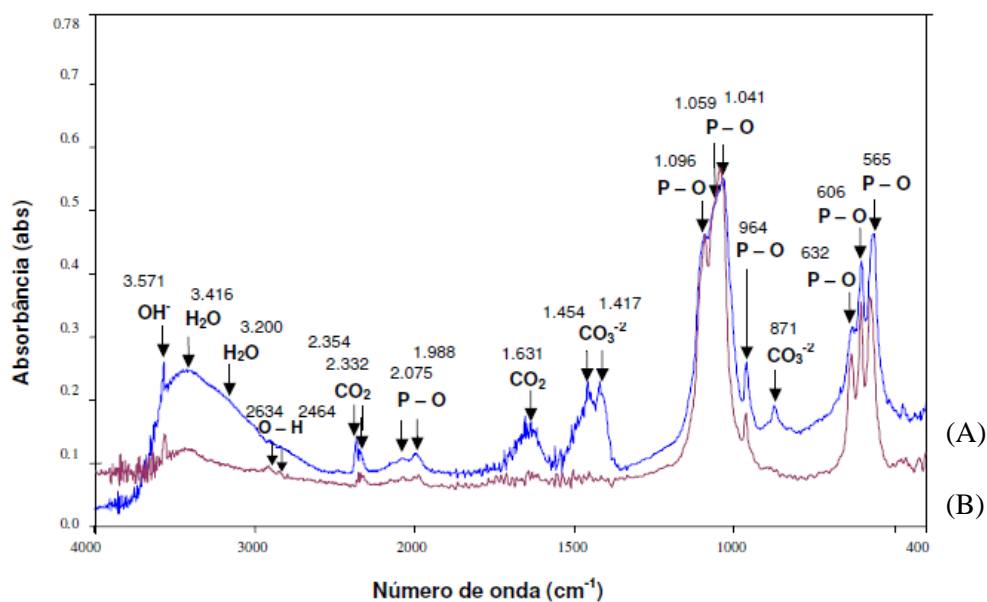


Figura 1.13 – Espectros de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da HA (A) e HA/ $\beta$ -TCP (B). Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.*, 2005.

Do ponto de vista biomimético, apesar de todas as características favoráveis para a substituição óssea da hidroxiapatita, o recente progresso do ramo da Ciência e Engenharia dos Materiais mostra que compósitos de nanohidroxiapatita podem potencialmente melhorar a biocompatibilidade e propriedades mecânicas dos materiais de enxerto ósseo (SANTOS *et al.*, 2005).

#### 1.3.2.1.1.2 Fosfato de Cálcio Tribásico

Entre os fosfatos de cálcio que apresentam velocidade de reabsorção apreciável, um dos mais estudados é o fosfato de cálcio tribásico com razão Ca/P igual a 1,5. Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade. A taxa de biodegradação do material é reduzida conforme a diminuição da razão  $\beta$ -TCP/HA (SANTOS *et al.*, 2005).

O  $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , é um fosfato de cálcio que possui cristal romboédrico com as medidas de  $a = 10,43\text{\AA}$  e  $c = 37,37\text{\AA}$ , e apresenta imperfeições na estrutura que levam a grande instabilidade (OKAZAKI e SATO, 1990). O tamanho das partículas de  $\beta$ -TCP e suas propriedades variam de acordo com os parâmetros de síntese. Estes materiais são absorvíveis em condições fisiológicas podendo ser substituídos por osso gradativamente, quando usados como biomateriais em defeitos ósseos (YANG e WANG, 1998; PEÑA e VALLET-REGI, 2003). De acordo com o método de síntese e da estequiometria de  $\beta$ -TCP, observa-se a seguinte ordem de solubilidade (LEGEROS, 2002): CaP amorfo > fosfato dicálcico > fosfato tetracálcico >  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP >> HA. A dissolução  $\beta$ -TCP na água depende da razão Ca/P, sendo que há inicialmente, liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , para depois acontecer a liberação de íons  $\text{PO}_4^{-3}$  (SANTOS, 2005).

#### 1.3.2.1.1.3 Fosfato de Cálcio Bifásico

O  $\beta$ -TCP está quase sempre associado a sínteses de HA, sendo observado em tratamentos térmicos em temperaturas inferiores a  $1100^\circ\text{C}$ . Modificações nas condições de síntese deste material levam a obtenção de materiais que variam entre HA pura e  $\beta$ -TCP puro, passando por composições intermediárias de HA/ $\beta$ -TCP, e conseqüentemente levam à modificação das suas propriedades. Um material bifásico HA/ $\beta$ -TCP com grande quantidade de HA leva a maior biocompatibilidade, enquanto que com maior quantidade de  $\beta$ -TCP leva a maior biodegradabilidade (ARENDS *et al.*, 1987; YANG e WANG, 1998; PEÑA e VALLET-REGI, 2003).

O material bifásico HA/ $\beta$ -TCP pode ser alterado de acordo com a proporção dos reagentes na mistura (YANG e WANG, 1998; PEÑA e VALLET-REGÍ, 2003). Assim, partindo-se de uma mistura estequiométrica para a obtenção de HA pura, se conseguiria um aumento gradativo na quantidade de formação de  $\beta$ -TCP com um aumento da quantidade

de fosfato adicionado na síntese. Haveria a formação de material bifásico com aumento gradativo de  $\beta$ -TCP até a obtenção de  $\beta$ -TCP puro. A obtenção de HA ou  $\beta$ -TCP também pode estar relacionado a temperatura de sinterização que, até 900°C favorece a formação de HA, de 900°C a 1100°C favorece a formação de  $\beta$ -TCP e de 1100°C até 1400°C favorece novamente a formação de HA, mesmo com equação estequiométrica para obtenção de HA. Assim, pode-se controlar a concentração bifásica (SANTOS, 2005).

#### 1.3.2.2 Polímeros

A utilização de materiais poliméricos biodegradáveis em Engenharia de Tecidos reside no fato destes materiais satisfazerem muitos dos requisitos técnicos e biológicos necessários para tal aplicação. Esses polímeros podem ser de origem sintética ou natural. Os polímeros biodegradáveis sintéticos são atualmente os mais utilizados, destacando-se os poli(hidroxiácido), os poli(propileno fumarato), o poli(caprolactona), os poli(carbonatos) e os poli(anidridos) (CHOUEKA *et al.*, 1996; UHRICH *et al.*, 1998; GOGOLEWSKI, 2000; HE, 2001; KWEON *et al.*, 2003).

Os polímeros biodegradáveis naturais são obtidos a partir de fontes naturais, sejam elas de origem animal ou vegetal, tais como: colágeno, quitosana, amido, ácido hialurônico e o poli(hidroxiacetato), entre outros (MADHALLY e MATTHEW, 1990; MARQUES *et al.*, 2002; SACHLOS *et al.*, 2003). As principais vantagens desses materiais são: induzirem baixas respostas imunológicas adversas, grande aptidão para ser quimicamente modificados e, sobretudo no caso do amido e da quitosana, a facilidade com que podem ser encontrados na natureza (SALGADO *et al.*, 2004).

A Tabela 1.4 apresenta detalhes sobre a origem e as principais características de alguns dos polímeros anteriormente mencionados (SALGADO *et al.*, 2004).



**Tabela 1.4** - Polímeros naturais e sintéticos utilizados na engenharia do tecido ósseo (SALGADO *et al.*, 2004).

| Material                  | Origem    | Características                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colágeno                  | Natural   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa resposta imunológica.</li> <li>• Bom substrato para adesão das células.</li> </ul>                                                                                      |
| Quitosana                 | Natural   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promove osteocondução e regeneração do tecido.</li> </ul>                                                                                                                     |
| Amido                     | Natural   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bom substrato para adesão das células.</li> <li>• Biocompatível e não tóxico.</li> </ul>                                                                                      |
| Ácido Hialurônico         | Natural   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa resposta imunológica.</li> <li>• <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas.</li> </ul>                                                                         |
| Poli(hidroxiбутирато)     | Natural   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Osteocondutivo, embora de natureza frágil.</li> </ul>                                                                                                                         |
| Poli(hidroxiácidos)       | Sintética | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradados por hidrólise.</li> <li>• Aprovados para uso clínico.</li> <li>• Podem ocasionar problemas de biocompatibilidade e citotoxicidade no local do implante.</li> </ul> |
| Poli(caprolactona)        | Sintética | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradado lentamente por hidrólise.</li> </ul>                                                                                                                                |
| Poli(propileno fumaratos) | Sintética | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradados em ácido fumárico e propileno glicol.</li> <li>• Comportamento biológico satisfatório.</li> </ul>                                                                  |
| Poli(anidridos)           | Sintética | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Normalmente utilizados como transportadores de drogas.</li> <li>• Biocompatíveis.</li> <li>• Suportam a regeneração do osso cortical e do osso trabecular.</li> </ul>         |

Relativamente aos polímeros sintéticos, os poli(hidroxiácidos), tais como os polímeros do ácido poli(láctico) (PLA) e do ácido poli(glicólico) (PGA), bem como os copolímeros destes, são, atualmente, os mais utilizados. Quando em contato com o organismo, o PLA e o PGA são hidrolisados em ácido láctico e glicina ( $\text{CH}_2\text{COONH}_3$ ), respectivamente,

sendo tais substâncias metabolizadas pelo organismo e convertidas em água e dióxido de carbono. Devido à presença de um grupo metil adicional na sua estrutura, o PLA é mais hidrofóbico que o PGA. Quando em contato com o plasma humano, o PGA degrada mais rapidamente (algumas semanas) do que o PLA, que, por seu turno, pode permanecer estável por períodos superiores a um ano. Estes polímeros apresentam ainda propriedades mecânicas interessantes: o PLA possui módulo de compressão da ordem de 3-4 GPa, e o PGA apresenta valores entre 6-7 GPa, valores estes muito superiores aos do osso trabecular (AN *et al.*, 2000; MANO *et al.*, 2004).

O colágeno é o polímero mais abundante na constituição dos tecidos animais, desempenhando um papel importante no suporte estrutural e nas propriedades mecânicas destes mesmos tecidos. Embora existam cerca de 20 tipos diferentes de colágeno, os mais importantes são: tipo I (presente na pele, nos tendões e nos ossos), tipo II (presente nas cartilagens) e tipo III (presente na pele e nos vasos sanguíneos). As propriedades mecânicas dos materiais e dos tecidos à base de colágeno estão relacionadas com o volume, com a proporção e, sobretudo, com a orientação das suas fibras (SEAL *et al.*, 2001; SIONKOWSKA e WESS, 2004). Além do colágeno, também tem sido investigada a utilização da quitosana em engenharia de tecidos.

#### 1.3.2.2.1 Quitosana e seus derivados

Dos muitos polímeros biodegradáveis estudados como substrato-suporte para desenvolvimento de tecido, a quitina, natural ou sintética, e a quitosana são largamente empregadas, pois oferecem a maioria das características desejáveis associados aos biomateriais (BARAT *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; COSTA-JUNIOR, 2008; LEE *et al.*, 2009).

A quitina e a quitosana (QUI) são poliaminossacarídeos de origem natural, sendo a quitina um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo (KRAJEWSKA, 2004). A quitina é o polissacarídeo natural mais abundante depois da celulose, extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos ou ainda da parede celular dos fungos do gênero *mycelia* (COSTA-JUNIOR e MANSUR, 2008; SPIN NETO *et al.*, 2008).

Biomateriais a base de QUI [poli- $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) -2-amino-2-desoxi-D-glicose] apresentam propriedades interessantes para aplicações em engenharia de tecidos (Figura 1.14), tais como a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade (BERGER *et al.*, 2004) e atividades antimicrobianas e antioxidantes (KAYA *et al.*, 2014; KAYA *et al.*, 2015) conjugadas com propriedades de adsorção, permitindo que sejam usados no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas e até mesmo em terapias genéticas. Também poderão ser usados como bioadesivos, agente cicatrizador e antimicrobiano e molde para enxerto epitelial (MEYERS, 1997; MADIHALLY e MATTHEW, 1999; LIU *et al.*, 2007). A QUI fomenta o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente, além de aumentar a produção de matriz extracelular através da elevação da produção de fatores de crescimento (MUZZARELLI e MUZZARELLI, 2002). A presença desse polímero acelera a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na lesão em cicatrização (SPIN NETO *et al.*, 2008).

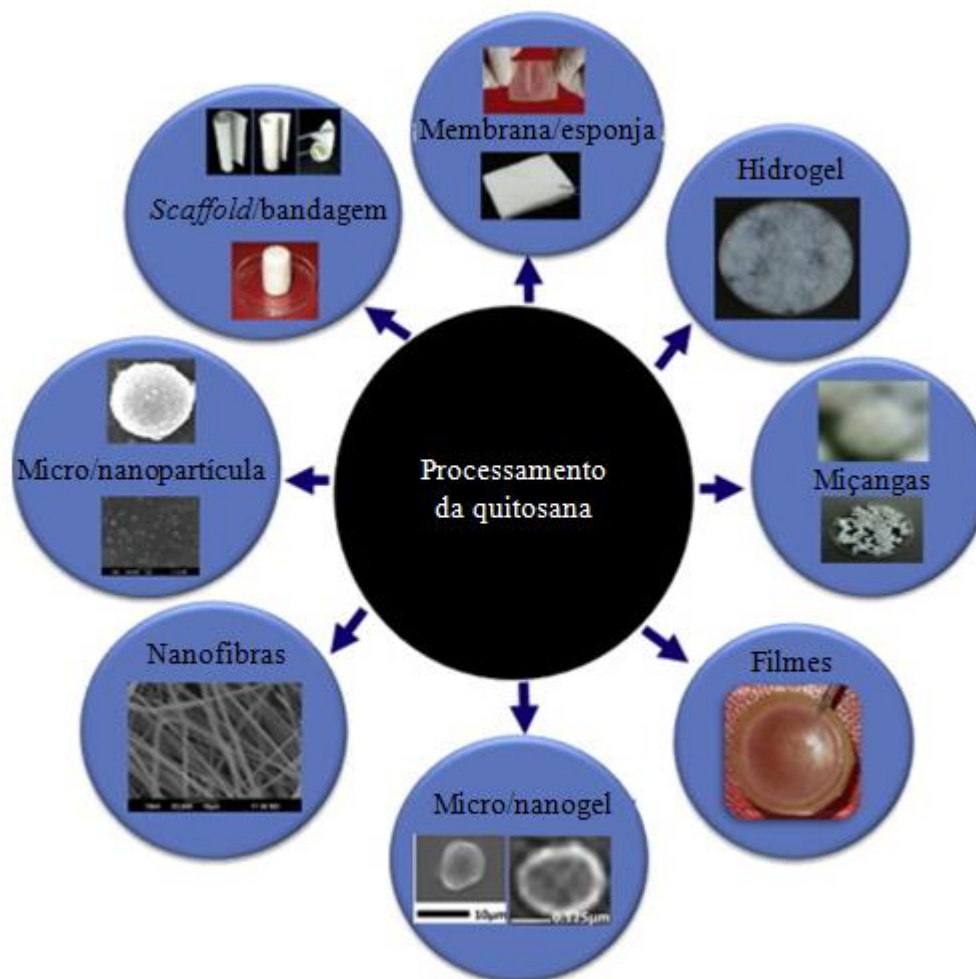


Figura 1.14 – Esquema representativo das possibilidades de processamento da QUI em diferentes formas. Fonte: Adaptada de ANITHA *et al.*, 2014.

A QUI é o derivado da quitina mais usado devido às propriedades polieletrólíticas, à presença de grupos reativos funcionais, à habilidade para formação de gel e à capacidade de adsorção. Além disso, a QUI, cuja estrutura está mostrada na Figura 1.15, pode ser modificada quimicamente ou enzimaticamente. Para muitas aplicações, a massa molar e o grau de N-acetilação são importantes, pois influenciam não só na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas, como também em sua atividade imunológica e biocompatível. Também foi descoberto que a capacidade de adsorção da quitina e da QUI melhora com o aumento dos grupos aminas livres existentes (ANDRADE, 2011).

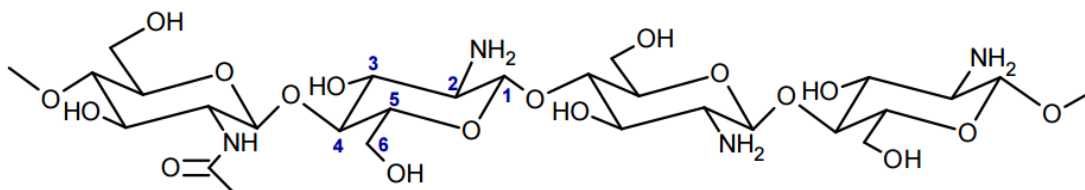


Figura 1.15 – Estrutura química da QUI. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2015.

Em suas cadeias lineares de poli(glicosamina), a QUI possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amino e hidroxila reativos capazes de serem submetidos à modificações químicas. A QUI é solúvel em ácidos orgânicos diluídos, como os ácidos acético e fórmico ( $\text{pH} < 6,5$ ) e quando dissolvida possui alta carga positiva sobre os grupos  $-\text{NH}_3^+$ . Adere a superfícies carregadas negativamente, agrega-se com compostos polianiónicos e forma complexos com íons de metais pesados. Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes a QUI na forma de gel.

O pH interfere significativamente no grau de desacetilação (GD) deste polissacarídeo, que por sua vez é responsável pelo controle da quantidade de grupamentos aminas livres na cadeia polimérica, conferindo carga positiva, e estes grupos funcionais associados aos grupamentos hidroxilas, o tornam altamente reativo (LEE *et al.*, 2009).

A QUI apresenta cinética de degradação aparentemente relacionada ao grau de cristalinidade que é controlado principalmente pelo GD, entretanto sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas em determinadas aplicações, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação deste biomaterial, bem como a utilização de agentes reticuladores que permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes (COSTA-JUNIOR e MANSUR, 2008) e melhorando de forma controlada sua resistência à degradação em ambiente fisiológico (SANTOS e MANSUR, 2007).

A carboximetil-quitosana (CMQ) é um derivado éter anfótero que contém grupos  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{COOH}$ . A representação esquemática dos métodos de preparação de vários derivados de CMQ é mostrado na Figura 1.16 (UPADHYAYA *et al.*, 2013). A preparação da O-CMQ

envolve a suspensão da quitosana no isopropanol e NaOH; em seguida, o ácido monocloroacético dissolvido em isopropanol é adicionado gota a gota durante 30 min e reage durante 4 horas a 55°C. O sólido é filtrado e lavado com álcool etílico e seco à vácuo. Assim, o meio de reação utilizado para a síntese O-CMQ é fortemente alcalino. A solubilidade em água da O-CMQ é regida pelas condições de preparação, bem como grau de carboximetilação (CHEN *et al.*, 2003).

A CMQ é carregada negativamente em pH fisiológico e positivamente em ambientes ácidos. Além disso, o CMQ é um material biocompatível e biodegradável, que é adequado para diversas aplicações, tais como a entrega sustentada ou controlada de libertação de fármaco, entrega de drogas dependentes do pH, etc (YAO *et al.*, 2015).

O processo de carboximetilação é a modificação preferida destinada a aumentar a solubilidade em água da quitosana atribuindo novas funcionalidades (CHEN *et al.*, 2003).

O glicol-quitosana (GLI-Q) é um derivado da quitosana que também apresenta características relevantes, hidrofiliicidade e biocompatibilidade. Este polímero apresenta solubilidade em quaisquer faixas de pH, tornando-o promissor para o desenvolvimento de nanocompósitos com ampla aplicação biológica (MANSUR e MANSUR, 2015).

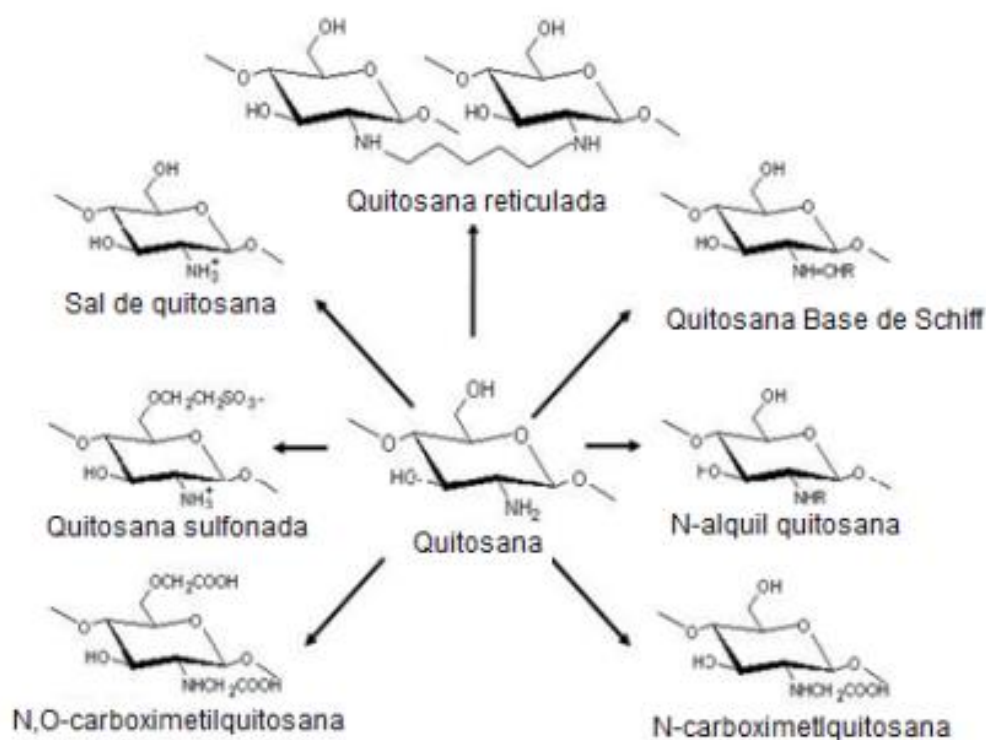


Figura 1.16 - Métodos de preparação de derivados carboximetilados da QUI. Fonte: Adaptado de UPADHYAYA *et al.*, 2013.

### 1.3.2.3 Agentes reticulantes

A reticulação é um processo baseado na interligação de cadeias poliméricas através de reações físicas e químicas capazes de gerar redes poliméricas bi ou tridimensionais mais rígidas (BERGER, 2004). O processo de reticulação das cadeias poliméricas de QUI, também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (BERGER, 2004; GONSALVES *et al.*, 2011). Esse procedimento ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da QUI e alguns reagentes reticulantes (GONSALVES *et al.*, 2011).

O processo de reticulação sofre influência tanto de algumas características físico-químicas da QUI utilizada quanto das condições reacionais adotadas. O grau de desacetilação (GD) é um parâmetro capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero, haja visto que a presença de grupos funcionais amino

propiciam inúmeras modificações químicas da superfície do polímero (LAUS *et al.*, 2006; GONSALVES *et al.*, 2011). Do ponto de vista químico, o GD da QUI exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, hidrofobia, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes de entrecruzamento, solubilidade e viscosidade de suas soluções. O GD, a massa relativa, a temperatura e o tempo reacional elevado, em geral, favorecem as reações e conseqüentemente promovem o aumento do grau de reticulação (GONSALVES *et al.*, 2011).

Essas modificações aumentam a resistência química e mecânica, a estabilidade, assim como a resistência contra a degradação bioquímica e microbiológica do material. Aumenta-se a estabilidade química em meios ácidos e especialmente, diminui a solubilidade na maior parte dos ácidos orgânicos (COSTA-JUNIOR, 2008).

Um agente reticulante muito empregado é a ECH (Figura 1.17), um reticulante solúvel em água (6,6%) e miscível em álcool, éter, clorofórmio. A reação com a QUI envolve a abertura do anel epóxido, reagindo apenas com os grupos hidroxila da QUI, sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres, formando uma rede polimérica tridimensional (COSTA-JUNIOR, 2008). A ECH apresenta a vantagem de reagir, preferencialmente, pelos grupos hidroxila do carbono-6 da cadeia polimérica. Assim, os grupos aminados do carbono-2 ficam mais disponíveis para interações químicas específicas (SILVA *et al.*, 2010).

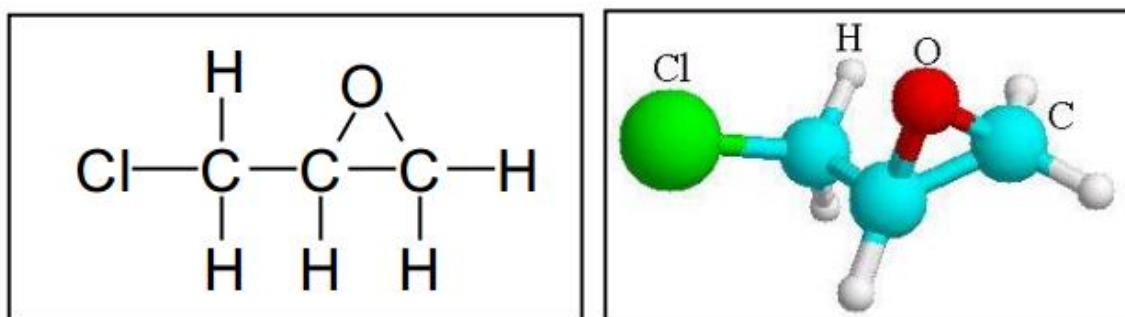


Figura 1.17 - Estrutura molecular e tridimensional da ECH. Fonte: Adaptado de COSTA-JUNIOR, 2008.



## CAPÍTULO II

### **“LIGANTES POLIMÉRICOS QUITOSANA, CARBOXIMETIL QUITOSANA E GLICOL QUITOSANA: EFEITO SOBRE A NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA PARA PRODUÇÃO DE MEMBRANAS BIOCAMPATÍVEIS”**

#### 2.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O uso de biomateriais nanoestruturados na regeneração óssea é inspirado na arquitetura óssea nativa. O osso é um nanocompósito orgânico-inorgânico com estrutura complexa, cuja fase orgânica é composta principalmente de colágeno tipo I, que é disposto em nanofibras que variam de 50 a 500nm de diâmetro (KADLER *et al.*, 1996). A fase inorgânica consiste em cristais de hidroxiapatita não estequiométrica (HA) com comprimento de cerca de 100nm, largura de 20-30nm e espessura de 3-6nm, que são incorporados entre as fibras de colágeno (SU *et al.*, 2003; LANDIS e SILVER, 2009).

Os biomateriais sintéticos baseados em diferentes formas de fosfato de cálcio (CaP) têm sido amplamente estudados para terapias de reconstrução de tecido ósseo porque imitam o componente inorgânico principal do osso (WANG *et al.*, 2014), são bioativos e podem formar interfaces íntimas e funcionais com o tecido ósseo vizinho. Entretanto ainda não foi encontrada nenhuma solução definitiva que preencha todas as propriedades requeridas.

Estudos prévios têm focado principalmente na adição de nanopartículas de fosfato de cálcio na matriz polimérica, além da biocompatibilidade da partícula de quitosana e do fosfato de cálcio, a quitosana se degrada rapidamente e tem baixa resistência mecânica, enquanto as nanopartículas de fosfato de cálcio se degradam lentamente e apresentam alta resistência mecânica. Essencialmente, esses materiais podem reunir as funcionalidades intrínsecas de nanopartículas inorgânicas e biointerfaces oferecidos por biomoléculas e polímeros de origem natural (ETHERIDGE *et al.*, 2013; RAMANERY *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido publicados investigando membranas e filmes baseados em hidroxiapatita e biopolímeros, que foram preparados por muitos métodos como misturas, processo biomimético, precipitação *in situ* e deposição eletroquímica (KIM *et al.*, 2006; EHRLICH *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012). No entanto, não foi encontrado qualquer relato na literatura consultada, que investigou a nucleação/crescimento das partículas de hidroxiapatita em escala nanométrica (nHA) associadas ao uso de diferentes ligantes poliméricos para cofragem destas partículas durante o processo de co-precipitação.

A quitosana é razoavelmente solúvel em soluções aquosas ácidas, principalmente devido à protonação de grupos amino ( $R-NH_3^+$ ) com fraca solubilidade acima de um pH de 6,5 ( $pK_a = 6,5$ ), tal como em condições fisiológicas comuns a animais vivos (SOLIER *et al.*, 2002; RAMANERY *et al.*, 2009). Assim, para alargar a faixa de solubilidade e adicionar simultaneamente novas propriedades ao biopolímero, derivados da quitosana, tais como O-carboximetil quitosana (CMQ) (MANSUR e MANSUR, 2013; MANSUR *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015) e glicol quitosana (GLI-Q) (MANSUR e MANSUR, 2015) foram utilizados.

Assim, neste capítulo é relatada a síntese de membranas baseadas em partículas de nanohidroxiapatita (nHA) incorporadas em matrizes de quitosana (QUI), O-carboximetil quitosana (CMQ) e glicol quitosana (GLI-Q) produzidas utilizando um método de co-precipitação em meio aquoso.

## 2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento desta etapa, foram realizadas as síntese e caracterização dos biocompósitos polímeros/cerâmica produzidos com diferentes ligantes, QUI, CMQ e GLI-Q, para regeneração e reparação óssea, e foram extensamente caracterizados conforme a Figura 2.1.

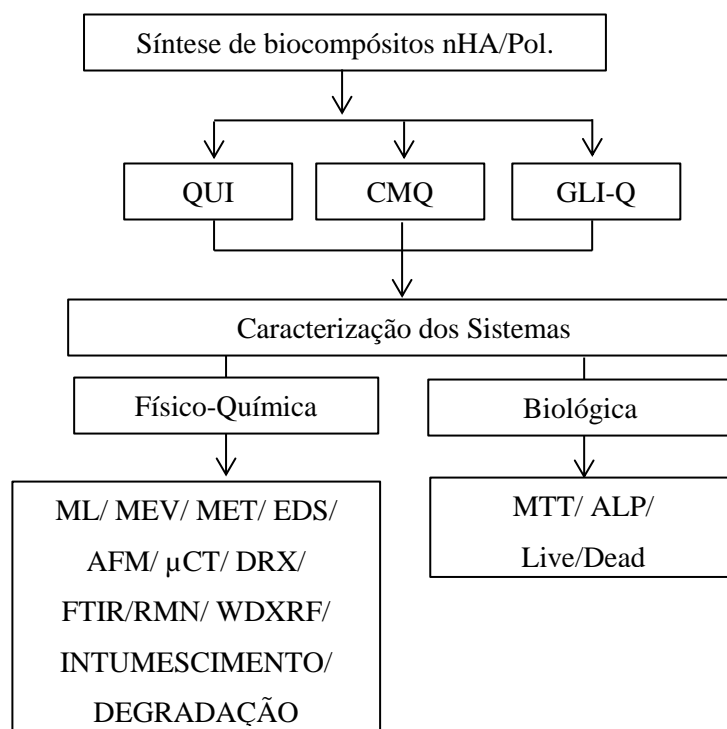


Figura 2.1 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.2.1 Materiais

Foram utilizados todos os reagentes e precursores, hidróxido de sódio (MERCK, EUA,  $\geq 99\%$ , NaOH), ácido fosfórico (SIGMA-ALDRICH, EUA,  $85\%$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hidróxido de cálcio (SIGMA-ALDRICH, EUA,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), ácido clorídrico (SIGMA-ALDRICH, USA,  $36,5\text{-}38,0\%$ , HCl), hidróxido de amônio (SYNTH, Brasil,  $30\%$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), ácido monocloroacético (SIGMA-ALDRICH, EUA,  $99\%$ ,  $\text{ClCH}_2\text{COOH}$ ), Etanol (SYNTH, Brasil,  $99,8\%$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) e isopropanol (SIGMA-ALDRICH, EUA,  $99,5\%$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ). Utilizou-se pó da quitosana (SIGMA-ALDRICH, EUA,  $\text{MM} = 310000$  a  $> 375000 \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{DD} \geq 75,0\%$  e viscosidade  $800\text{-}2000$  cPoise) como o ligando polimérico e como precursor para síntese de O-carboximetil quitosana (CMQ). O pó do Glicol quitosana (GLI-Q) (SIGMA-ALDRICH, EUA, PN# G7753; Grau de polimerização=2.000,  $\text{Mw} \sim 410 \text{k Da}$ ; Grau de desacetilação  $\text{GD} = 76,2\%$ ). Utilizou-se água deionizada (Millipore Simplicity™) com resistividade de  $18 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  na preparação de todas as soluções. Os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente,  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

### 2.2.2 Síntese da O- carboximetil quitosana (CMQ)

Um método semelhante ao relatado na literatura (CHEN e PARK, 2003; BOSARGLI *et al.*, 2015) foi utilizado para preparar CMQ à  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Em resumo, foram suspensos aproximadamente 3g de pó de quitosana em 70,8mL de isopropanol. Depois de 30min de agitação magnética, dissolveram-se 12,24g de NaOH em 15g de água deionizada (60% em água) e adicionaram-se 15mL de isopropanol à suspensão e manteve-se sob agitação durante 1h.

Em seguida, adicionou-se à suspensão 14,4g de uma solução de ácido monocloroacético/isopropanol (1:1 em massa). A reação prosseguiu durante 4h sob agitação magnética moderada e parou-se pela adição de 100mL de metanol. Em seguida, filtrou-se a suspensão e lavou-se o filtrado sólido (Na-CMQ) com misturas de etanol / água com um teor crescente de etanol (desde 90% até 100%). A neutralização de qualquer hidróxido residual foi realizada suspendendo 1g do sal de Na-CMQ numa solução de etanol a 80% / água (100mL), adicionando ácido clorídrico (10mL, 37%) e agitando durante 30min. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o filtrado sólido foi abundantemente enxaguado com etanol e seco à vácuo para favorecer a formação do derivado CMQ na forma ácida.

### 2.2.3 Síntese dos filmes de quitosana (QUI), O-carboximetil quitosana (CMQ) e glicol quitosana (GLI-Q) por evaporação do solvente

Prepararam-se soluções de QUI, CMQ e GLI-Q (1%, p/v) dispersando 1g do polímero numa solução aquosa de 100 mL de ácido fosfórico (0,6% v/v). A mistura foi colocada sob agitação constante durante 24 h até que ocorresse a completa solubilização dos polímeros (pH~2,0). Na sequência, as soluções foram vertidas em moldes de plástico (polietileno, forma de placa redonda, diâmetro =65mm) e deixadas secar durante 96h à  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.2).

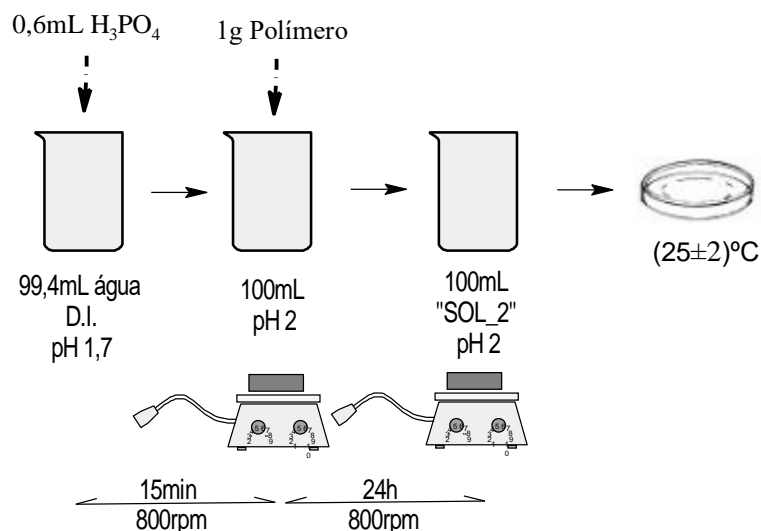


Figura 2.2- Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de QUI, CMQ e GLI-Q. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.2.4 Síntese das nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP)

As partículas de CaP foram sintetizadas a partir da via de precipitação aquosa à  $(25\pm 2)^\circ C$ . Os precursores foram preparados como se segue: 0,6 mL de  $H_3PO_4$  foram adicionados lentamente a 99,4 mL de água deionizada sob agitação magnética durante 15 min. A solução foi mantida à  $(40\pm 1)^\circ C$  até permanecerem 90 mL. Esta solução precursora de fosfato foi referida como "SOL\_1". Aproximadamente 1,1 g em pó de  $Ca(OH)_2$  foram adicionados a 10 mL de água deionizada e vigorosamente agitados durante 15 min. Esta suspensão de cálcio foi referida como "SUS\_1". Em seguida, "SUS\_1" foi adicionado lentamente a "SOL\_1" para a reação de síntese de CaP e esta mistura ("SUS\_2") foi submetida a agitação magnética constante durante 1 h. Na sequência, esta mistura foi envelhecida durante 24 h à  $(25\pm 2)^\circ C$ . O sobrenadante foi decantado a partir do material sólido. O precipitado foi submetido à filtração a vácuo utilizando papel de filtro adaptado num funil Büchner, lavado 3 vezes com água deionizada e filtrado novamente. O material retido foi submetido à secagem por 96 h à  $(25\pm 2)^\circ C$  (Figura 2.3). A reação química da formação de CaP é representada na equação 2.1.



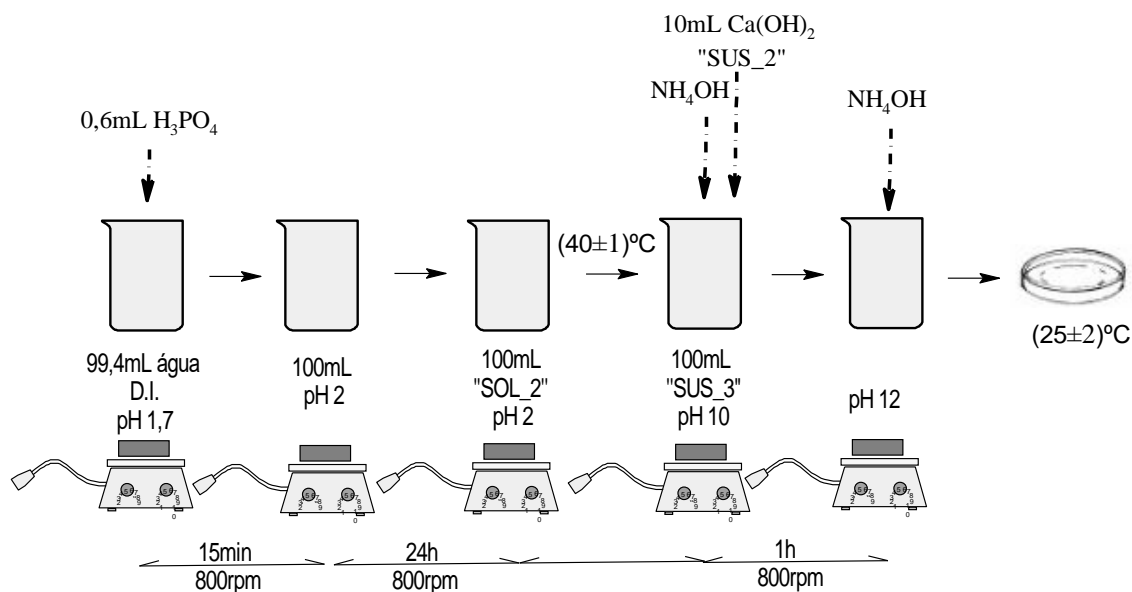


Figura 2.3 - Representação esquemática do processo de síntese das nanopartículas de CaP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.2.5 Síntese dos biocompósitos de quitosana (QUI), O-carboximetil quitosana (CMQ) e glicol quitosana (GLI-Q) por evaporação do solvente.

Após preparo das soluções de QUI, CMQ e GLI-Q conforme secção 3.2.3, as mesmas foram mantidas à  $(40\pm 1)^{\circ}\text{C}$  até permanecerem 90mL (redução de 10% do volume). Estas soluções de polímero-ácido foram referidas como "SOL\_2". Na sequência, adicionou-se lentamente "SUS\_1" (Etapa 2.2.4) ao "SOL\_2" (QUI, CMQ ou GLI-Q) conduzindo à formação imediata da mistura em suspensão ("SUS\_3") mantida sob agitação magnética constante durante 1h. Em seguida, o pH de "SUS\_3" foi medido e ajustado a  $12,0 \pm 0,2$  com  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e mantida sob agitação por 24h.

Em seguida, as suspensões de polímero/CaP foram vertidas em moldes de plástico (polietileno, forma de placa redonda, diâmetro de 65mm) e submetidas a secagem durante 96h à  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  (Figura 3.4). Os biocompósitos sintetizados com base na nano-hidroxiapatita (nHA) foram referidos como nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q, dependendo do ligante pomimérico utilizado para a síntese, quitosana, O-carboximetil quitosana e glicol quitosana, respectivamente. A reação química da formação de CaP é representada na equação 2.1.

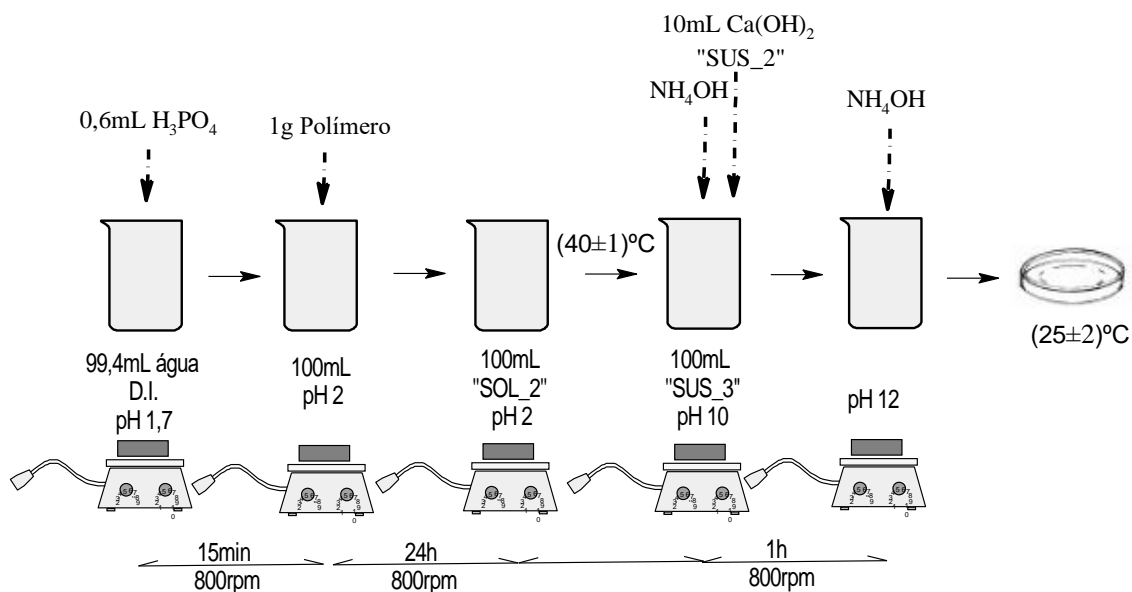


Figura 2.4 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de QUI, CMQ e GLI-Q. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 2.2.6 Caracterização da QUI e CMQ

### 2.2.6.1. Análise de Titulação Potenciométrica

O grau de desacetilação (GD) da QUI e o grau de substituição (GS) de CMQ foram determinados por análise de titulação potenciométrica. Para o ensaio GD, dissolveu-se pó de quitosano (seco, 0,20g) em 20mL de HCl 0,10mol.L<sup>-1</sup> com agitação moderada durante 12h e diluiu-se com 20mL de água DI. Sob agitação contínua, adicionou-se 100μL de solução de NaOH a 0,010mol.L<sup>-1</sup>, depois de alcançar equilíbrio foi registrado o pH (medidor de pH com eletrodo de vidro, Analion, Ribeirão Preto, Brasil). Esta sequência foi repetida até à neutralização do HCl com desprotonação de grupos amina. O GD foi calculado usando as Equações 2.3 e 2.4 (TAN *et al.*, 1998).

$$GD = (\Phi / \{ [((m - 161) * \Phi) / 204] + \Phi \}) * 100\% \quad (\text{Eq.2.3})$$

Onde:

$$\Phi = \{ [HCl] * V_{HCl} - [NaOH] * V_{NaOH} \} / 1000 \quad (\text{Eq. 2.4})$$

[HCl] é a concentração de ácido clorídrico ( $\text{mol.L}^{-1}$ ), [NaOH] é a concentração de hidróxido de sódio ( $\text{mol.L}^{-1}$ ),  $V_{HCl}$  é o volume de ácido clorídrico (mL),  $V_{NaOH}$  é o volume de Hidróxido de sódio na extremidade (mL) e 161 e 204 são a massa molecular da 2-amina-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) respectivamente.

De forma semelhante, para o ensaio de titulação potenciométrica de CMQ sintetizada, dissolveu-se 0,10g de CMC em 100 mL de HCl 0,10 $\text{mol.L}^{-1}$  com agitação branda durante 12h. Em seguida, sob agitação contínua, adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  de solução de NaOH 0,10 $\text{mol.L}^{-1}$ , depois de alcançar equilíbrio foi registrado o pH. Esta sequência foi repetida até que a neutralização completa do HCl e dos grupos carboxílicos tivesse ocorrido. O GS foi calculado usando a Equação 2.5 (ABREU e CAMPANA-FILHO, 2009; YADAV e SHIVAKUMAR, 2012).

$$\%GS = \{ \{ (M * (V_2 - V_1) * [NaOH]/100)/m \} - \{ 80 * [NaOH] * (V_2 - V_1) \} \} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Onde: M é 161, a massa molecular de 2-amina-2-desoxi-D-glicose ( $\text{g.mol}^{-1}$ ), [NaOH] é a concentração de hidróxido de sódio ( $\text{mol.L}^{-1}$ ),  $V_1$  é o volume de NaOH necessário para neutralizar o excesso de HCl,  $V_2$  é o volume de NaOH para neutralizar os grupos carboximetil protonados em mL e m é a massa de CMQ utilizada em 100mL.

#### 2.2.6.2. Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na gama de 650 a 4000 $\text{cm}^{-1}$  (Thermo Fischer, Nicolet 6700) utilizando o modo de transmissão. Os filmes foram colocados num suporte de amostras e imediatamente escaneados (16 scans) a uma resolução de 2 $\text{cm}^{-1}$  com subtração de fundo. A espectroscopia de FTIR também foi usada para calcular o valor médio de GS usando a Equação 2.6.

$$GS = \{(A_n/A_x)/1.33\} * 100\% \quad (\text{Eq.2.6})$$



Onde:  $A_n$  está associado com a absorvância das aminas protonadas ( $-\text{NH}_3^+$ ) banda a  $1624\text{cm}^{-1}$  e  $A_x$  com a absorvância das carboxilas a  $1745\text{cm}^{-1}$  para CMQ (ABREU e CAMPANA-FILHO, 2009).

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN (ressonância magnética nuclear) foram registados a  $30^\circ\text{C}$  em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  utilizando um espectrômetro BRUKER-200 MHz Varian (90 pulsos e 16 scans).

## 2.2.7 Caracterização dos filmes e biocompósitos

### 2.2.7.1. Análise morfológica

#### 2.2.7.1.1. Microscopia de Luz

Amostras representativas dos filmes poliméricos e biocompósitos foram examinadas por Microscopia Óptica (Microscópio de Luz Stemi 2000-C) acoplado a uma câmara Merdia Cybernetics (PL-A662) e usando um programa de processamento de imagem (ImageJ, versão 1.44, domínio público, National Institutes of Health).

#### 2.2.7.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia

A morfologia dos filmes, biocompósitos e das partículas de fosfato de cálcio foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, FEI-INSPECTTM S50) acoplada à Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS, EDAX GENESIS). As amostras foram revestidas com uma fina película de carbono por pulverização catódica utilizando baixa taxa de deposição, arrefecimento do substrato e distância máxima entre o alvo e a amostra de modo a evitar danos nas amostras. As imagens de elétrons secundários (SE) foram obtidas usando uma tensão de aceleração de 15kV.

O tamanho das partículas nHA e os dados de distribuição do tamanho foram obtidos com base nas imagens por MEV, mensurando pelo menos 100 nanopartículas selecionadas

aleatoriamente utilizando um programa de processamento de imagem (ImageJ, versão 1.44, domínio público, National Institutes of Health).

#### 2.2.7.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As caracterizações nano estruturais dos compósitos, com base nas imagens e nos padrões de difração de elétrons de área selecionada (SAED), foram obtidas utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET, Tecnai G2-20-FEI) a uma tensão de aceleração de 200kV. As amostras de MET foram preparadas por adição de uma alíquota de dispersão etanólica de "SUS\_3" (1,0mL de "SUS\_3": 4mL de etanol agitado magneticamente durante 5h).

#### 2.2.7.1.4. Microscopia de Força Atômica

Análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) dos biocompósitos foram conduzidas usando ScanAsyst-Air em um MultiMode 8 AFM (Bruker). A taxa de varredura foi 1,0Hz, e as imagens foram adquiridas com uma resolução de  $512 \times 512$  pixels. As áreas foram selecionadas aleatoriamente para fins estatísticos.

#### 2.2.7.1.5. Microtomografia de Raios-X ( $\mu$ -CT)

As estruturas tridimensionais dos biocompósitos foram investigadas em um Microtomógrafo 3D (SkyScan 1174, micro-CT Bruker) com resolução de  $12,18\mu\text{m}$  usando tensão de 40kV e corrente de  $100\mu\text{A}$ , com passo de rotação de  $0,7^\circ$  e sem filtro. As imagens foram reconstruídas utilizando o *software* NRecon Reconstruction (v. 1.6.1.18, micro-CT de Bruker). Utilizou-se o *software* CTAn (v. 1.15.4.0, micro-TC de Bruker) para a análise dos conjuntos dos dados do Micro-CT em 2D e 3D para morfometria e densitometria, e *software* CTVol (v 2.3.1.0, micro-TC de Bruker) para visualização das imagens 3D dos biocompósitos.

#### 2.2.7.1.6. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X com Dispersiva por Comprimento de Onda

A análise da composição inorgânica dos biocompósitos foi realizada utilizando espectroscopia de fluorescência de raios X dispersiva por comprimento de onda (Espectrômetro WMXRF SuperMini 200 Rigaku) com tensão de 50kV, corrente de 4mA e potência de 200W a aproximadamente 20°C e umidade controlada para a análise elementar do reagente Fluor (F) através de urânio (U).

#### 2.2.7.1.7. Difração de Raios-X

A cristalinidade das fases presentes nos biocompósitos foi determinada por padrões de difração de Raios-X (DRX) que foram registados utilizando um difratometro PANalytical X'Pert (radiação Cu-K $\alpha$  com  $\lambda = 1,5406\text{\AA}$ ). As medições foram obtidas na gama  $2\theta$  de 15° a 75° com passos de 0,06°.

#### 2.2.7.1.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

As partículas de fosfato de cálcio foram analisadas usando o método de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier de refletância difusa (DRIFTS, Nicolet 6700, Thermo-Fischer) na faixa de 400 a 4000cm<sup>-1</sup> usando 64 *scans* e uma resolução de 2cm<sup>-1</sup> com a subtração do KBr. As amostras foram misturadas numa proporção de 1% (% em peso) em pó de KBr seco a (110±5)°C durante 2h. Os espectros FTIR dos biocompósitos foram obtidos usando refletância total atenuada (ATR, 4000-675cm<sup>-1</sup> utilizando 32 *scans* e uma resolução de 4cm<sup>-1</sup>) com subtração do fundo.

#### 2.2.8 Ensaios Biológicos

Cultura de células de linhagem de sarcoma humano (células SAOS) foram utilizadas. As células SAOS foram gentilmente cedidas pelo Prof. Alfredo Góes do Departamento de Imunologia e Bioquímica da UFMG. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, penicilina G sódica (10units.mL<sup>-1</sup>), sulfato de estreptomicina (10mg.mL<sup>-1</sup>) e anfotericina-b (0,025mg.mL<sup>-1</sup>) todos da (Gibco BRL, NY, EUA), em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% a (37±1)°C. As células utilizadas para os experimentos foram das passagens 23 para SAOS.

Ensaio de toxicidade: Todos os experimentos foram realizados de acordo com a ISO 10993-5:2009 (*Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for in vitro cytotoxicity and Part 12-7; Sample preparation of extracts of test materials*).

#### 2.2.8.1 Ensaio de (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

Células SAOS da passagem 23 foram plaqueadas ( $3 \times 10^5$  células / poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro fetal bovino durante 24h, após este período, o meio foi aspirado e substituído por meio contendo 10% de SFB e as amostras de QUI, CMQ, GLI-Q, nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q para 24h. Foram utilizados como controle de referência DMEM com 10% de SFB, como controle positivo Triton x-100 (1%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e como controle negativo lascas estéreis de *ependorfs* de polipropileno ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ ) da Eppendorf (Hamburg, Germany). Após 24h, todo o meio foi aspirado e trocado por  $60\mu\text{L}$  de meio de cultura com 10% de SFB. Foram acrescentados  $40\mu\text{L}$  de MTT ( $5\text{mg.mL}^{-1}$ ) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) em cada poço e incubadas por 4h em estufa a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida foram microfotografadas para visualização dos cristais de formazan em microscópio invertido (Leica DMIL, Alemanha) e colocados  $40\mu\text{L}$  de solução de SDS/ 4% HCL com incubação por 16h em estufa a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois, foram retirados  $100\mu\text{L}$  de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação da absorbância foi feita em Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis.

Viabilidade celular (%) = (absorbância das células em contato com as amostras X 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de viabilidade celular.

#### 2.2.8.2 Atividade da Fosfatase Alcalina.

A análise quantitativa da atividade da ALP foi realizada bioquimicamente usando 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium (BCIP / NBT) como substrato. Este ensaio baseia-se no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina, onde o BCIP é hidrolisado e o NBT é reduzido formando um

produto azul escuro (SMEJKAL E KAUL, 2001; REILLY *et al.*, 2007; VERN'E *et al.*, 2010). O ensaio foi realizado no *pellet* celular após 24h de cultura celular. As células SAOS da passagem 23 foram tripsinizadas e semeadas ( $3 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> por poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas com meio sem soro durante 24h, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio com 10% de SFB e as amostras de QUI, CMQ, GLi-Q, nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q para 24h. Após 24h, 100µl de BCIP-NBT (Life Technologies do Brasil Ltda, SP) foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante e adicionados a cada poço e incubados por 2h em estufa a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foram microfotografadas em microscópio invertido (Leica DMIL, Alemanha) e colocados 40µL de solução de SDS/ 4% HCL com incubação por 16h em estufa a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois, foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação da absorbância foi feita em Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual da atividade da fosfatase alcalina.

Atividade da fosfatase alcalina (%) = (absorbância das células em contato com as amostras X 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de atividade da fosfatase alcalina.

#### 2.2.8.3 LIVE/DEAD.

Células SAOS da passagem 23 foram plaqueadas ( $3 \times 10^5$  células / poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem de soro durante 24h, após este período, o meio foi aspirado e substituído por meio contendo 10% de SFB e as amostras de QUI, CMQ, GLi-Q, nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q. Foram utilizados como controle de referência DMEM com 10% de SFB. Após 24h, todo o meio foi aspirado e os poços lavados com PBS por duas vezes com 10mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) da (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA). As células SAOS foram tratadas durante 30min com o kit Live/Dead (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo), de acordo com as especificações do fabricante. As imagens foram obtidas com um microscópio óptico invertido fluorescente (Leica DMIL LED, Alemanha), as emissões de fluorescência foram adquiridas em separado, calceína a  $530 \pm 12,5\text{nm}$ , e EthD-1 a  $645 \pm 20\text{nm}$ .

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Caracterização da QUI, CMQ e GLI-Q

#### 2.3.1.1. Análise de Titulação Potenciométrica

A curva de titulação da CMQ esta apresentada na Figura 2.5. Considerando os valores médios das titulações realizadas e utilizando as Equações 2.4 e 2.5, o valor de GD da QUI foi estimado anteriormente em  $78 \pm 2\%$ , o que está de acordo com o valor fornecido pelo fabricante ( $> 75,0\%$ ). Adicionalmente, o valor do GS da CMQ foi  $(36 \pm 6)\%$  determinado usando a Equação 2.5 indicando uma funcionalização eficiente do polímero de QUI.

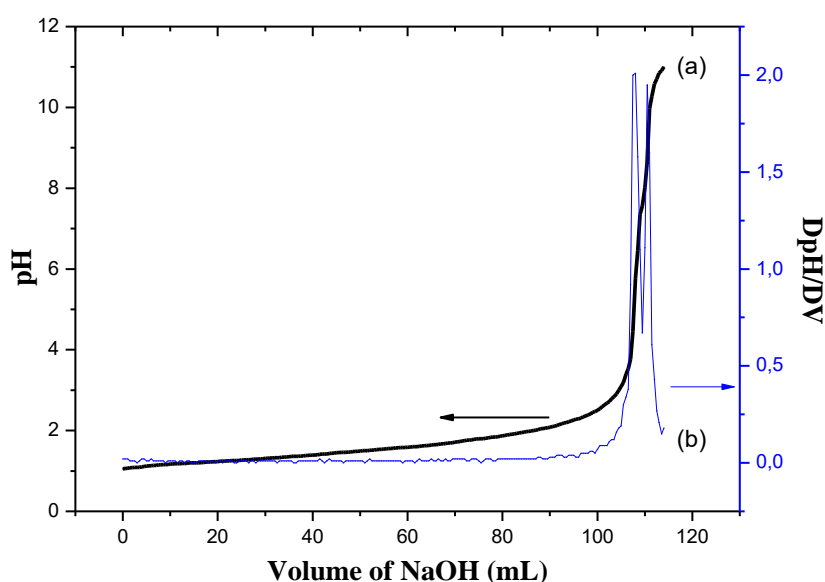


Figura 2.5 - Curva de titulação potenciométrica da CMQ. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro FTIR do copolímero de QUI representado na Figura 2.6(a) apresentou bandas de absorção em  $1650-1630\text{cm}^{-1}$  atribuídos ao estiramento carbonila das amidas secundárias (banda da amida I). As bandas de vibração da flexão N-H da amina primária desacetilada ( $-\text{NH}_2$ ,  $1590-1570\text{cm}^{-1}$ ) e amida II ( $1560-1550\text{cm}^{-1}$ ) estão sobrepostas em

1590-1550 $\text{cm}^{-1}$  (ABREU *et al.*, 2009). Além disso, as vibrações de estiramento NH ocorreram na faixa entre 3400 $\text{cm}^{-1}$  e 3200 $\text{cm}^{-1}$  sobrepondo a banda do OH do anel de hidrato de carbono (não ilustrado). As bandas entre 1420-1380 $\text{cm}^{-1}$  são associadas às vibrações de flexão -CH e a vibração de estiramento de -CN (Amida III) podendo ser observada em aproximadamente 1320 $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, as absorções em 1030 $\text{cm}^{-1}$  e 1080 $\text{cm}^{-1}$  indicaram a vibração de estiramento C-O da QUI, que estão associados com o álcool primário (C6-OH) e o álcool secundário (C3-OH), respectivamente. As bandas em 1155 $\text{cm}^{-1}$  e 895 $\text{cm}^{-1}$  são típicas das vibrações do estiramento C-O-C do anel sacarídeo (SANTOS *et al.*, 2013).

Após a modificação química, as alterações na macromolécula da QUI podem ser observadas por espectroscopia de infravermelho representada na Figura 2.6 (b). Observa-se uma banda característica do grupamento carboxila (-COOH) em aproximadamente 1730 $\text{cm}^{-1}$  evidenciando a síntese do derivado CMQ (ABREU *et al.*, 2009). Além disso, a protonação do grupo amina na CMQ causou o aparecimento de duas novas bandas. A primeira banda em 1630 $\text{cm}^{-1}$  associada ao anti-simétrico -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sobrepondo a banda da amida I, e uma segunda banda em 1527 $\text{cm}^{-1}$  relacionada com a deformação simétrica do -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Com base no espectro da CMQ, o valor de GS estimado foi de 36±1% (calculado usando a Equação 2.6) em concordância com o valor mensurado na seção 2.3.1.1. Isso demonstrou a funcionalização química covalente da QUI pela formação do derivado CMQ.

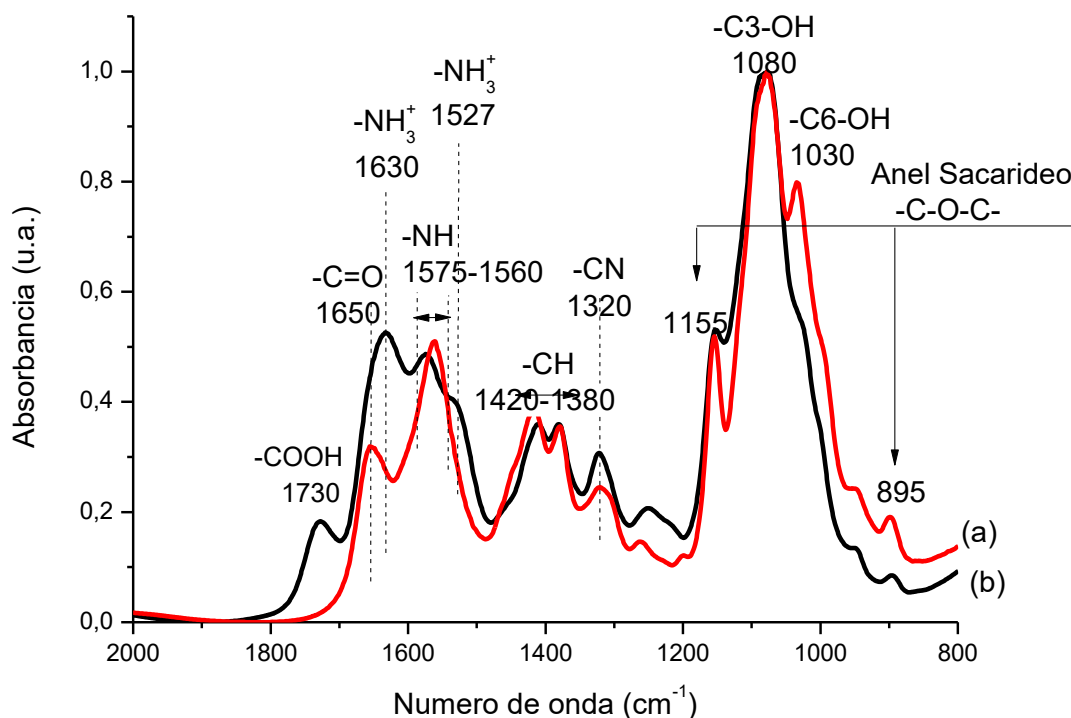


Figura 2.6 - Espectro de FTIR da QUI (a) e CMQ (b). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de FTIR do GLI-Q representado na Figura 2.7 revelou a presença de vibrações em 1660-1640cm<sup>-1</sup> associadas ao estiramento C=O da amida e entre 1590 e 1545cm<sup>-1</sup> a banda de dobramento do -NH da amina primária (1590-1560cm<sup>-1</sup>) e amida II (1560-1545cm<sup>-1</sup>). As bandas entre 1150 e 1020cm<sup>-1</sup> ilustram as contribuições associadas ao éter (C-O-C, 1150-1050cm<sup>-1</sup>), ao álcool primário (1050-1030cm<sup>-1</sup>) e álcool secundário (~1100-1070cm<sup>-1</sup>) associadas a QUI e aos grupos etileno glicol (ARAI e SPARKS, 2001; LI *et al.*, 2003; BORSAGLI *et al.*, 2015). Além disso, as bandas em 1450-1380cm<sup>-1</sup> estão relacionadas com a flexão -CH, e as vibrações a 1160cm<sup>-1</sup> e 890cm<sup>-1</sup> são atribuídas às vibrações da estrutura de sacarídea C-O-C (BORSAGLI *et al.*, 2015).



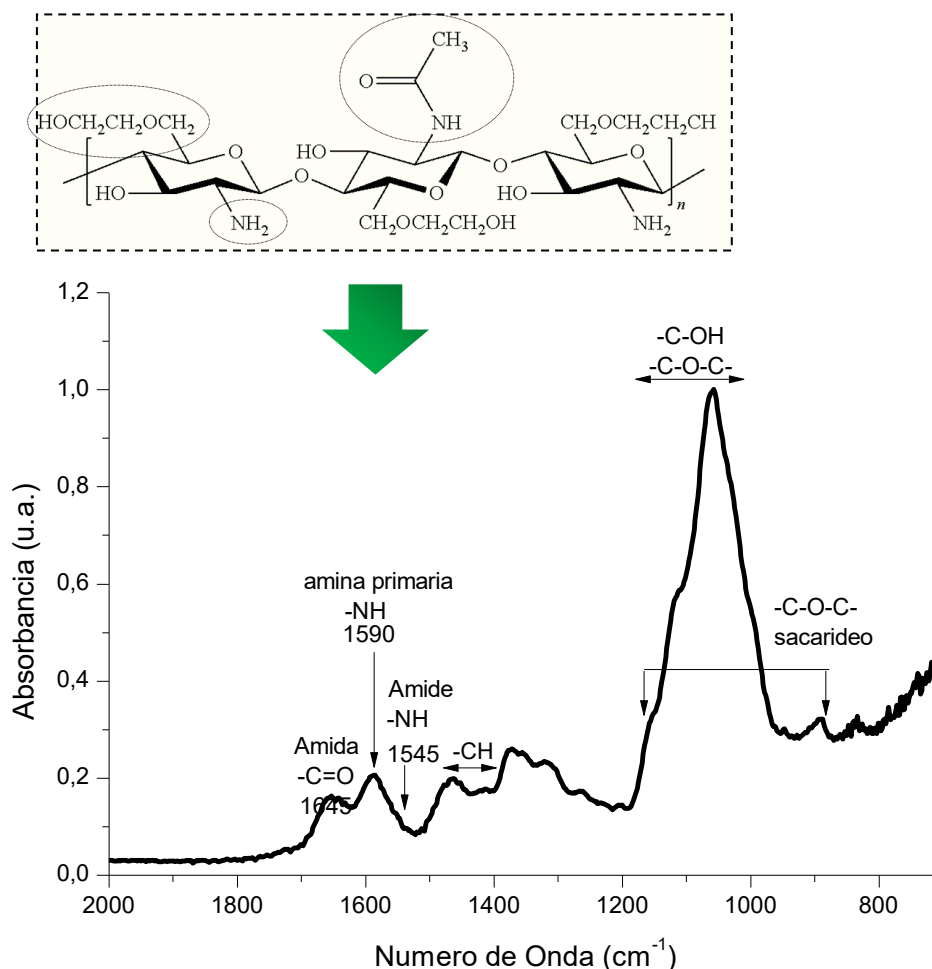


Figura 2.7 - Espectro de FTIR da GLI-Q. Detalhe: Estrutura química da GLI-Q com os principais grupamentos químicos (círculos). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.1.3. Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) da QUI, representado na figura 2.8 permitiu observar em  $\delta = 1,92\text{ppm}$  o sinal referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida. O sinal de deslocamento químico  $\delta = 3,05\text{ppm}$  apresentado está relacionado ao hidrogênio ligado ao carbono C2 do anel glicosamino. Além disso, os hidrogênios que apresentaram deslocamento químico entre 3,30ppm e 3,90ppm sendo referentes aos carbonos C3, C4, C5 e C6 apresentaram sobreposição dos sinais devido a sua proximidade (CHEN e PARK, 2003; ABREU e CAMPANA-FILHO, 2009, SANTOS *et al.*, 2013).

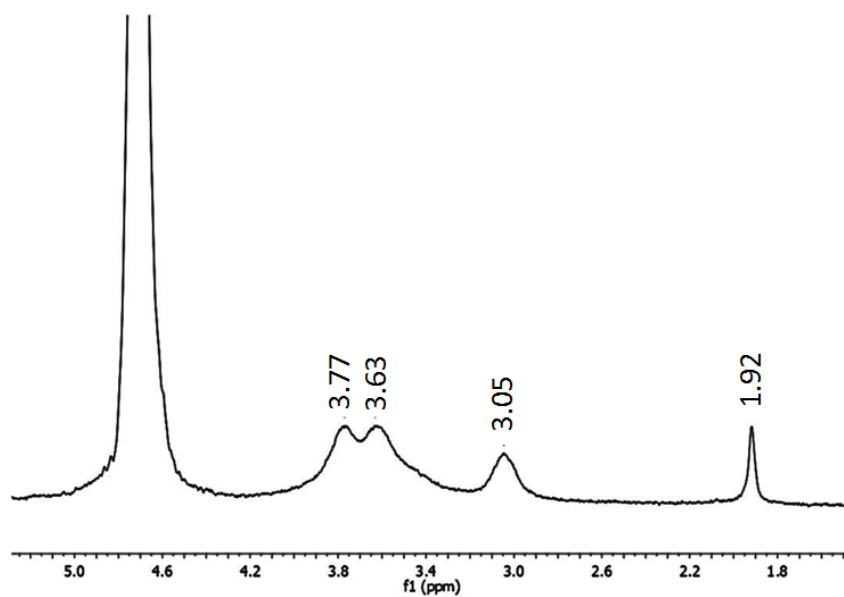


Figura 2.8 – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR da QUI.

Na Figura 2.9 observou-se as modificações estruturais resultantes da carboximetilação, notando-se uma ligeira modificação em relação ao espectro de  $^1\text{H}$  RMN da QUI.

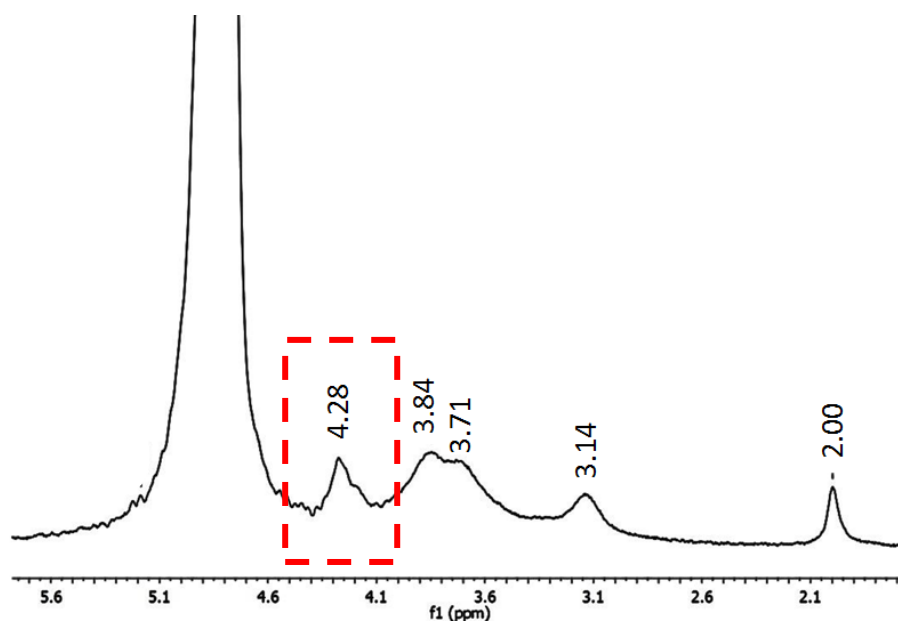


Figura 2.9 – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR da CMQ.

A região entre 4,05 e 4,55ppm indicada na figura, corresponde aos hidrogênios dos grupos carboximetil substituídos nos carbonos C3 e C6 das OCMQ. Nos espectros de <sup>1</sup>H RMN das amostras observou-se um sinal com intensidade considerável apresentando deslocamento químico aproximadamente em 4,28ppm, que não foi observado no espectro da QUI, sendo atribuído aos grupos carboximetil, indicando que a substituição ocorreu principalmente nos carbonos C3 e C6 (CHEN & PARK, 2003; ABREU, 2006; MUZZARELLI et al., 1994).

A partir das análises dos espectros de <sup>1</sup>H RMN das amostras pôde-se inferir que as inserções dos grupos carboximetil ocorreram quase que majoritariamente na hidroxila e em pouca extensão no grupo amina, conforme era esperado em razão do objetivo desse projeto.

### 2.3.2 Caracterização dos Biocompósitos

#### 2.3.2.1 Análise Morfológica

A avaliação morfológica dos filmes de QUI (Figuras 2.10(a) e 2.10(c)) e das membranas de nHA/QUI (Figuras 2.10(b), 2.10(d) e 2.10(e)) foi baseada em observações realizadas no conjunto de imagens obtidas por microscopia digital, microscopia de luz (ML). O mapeamento de elementos e o espectro EDS dos biocompósitos nHA/QUI são apresentados nas Figuras 2.10(f) e 2.10(g), respectivamente.

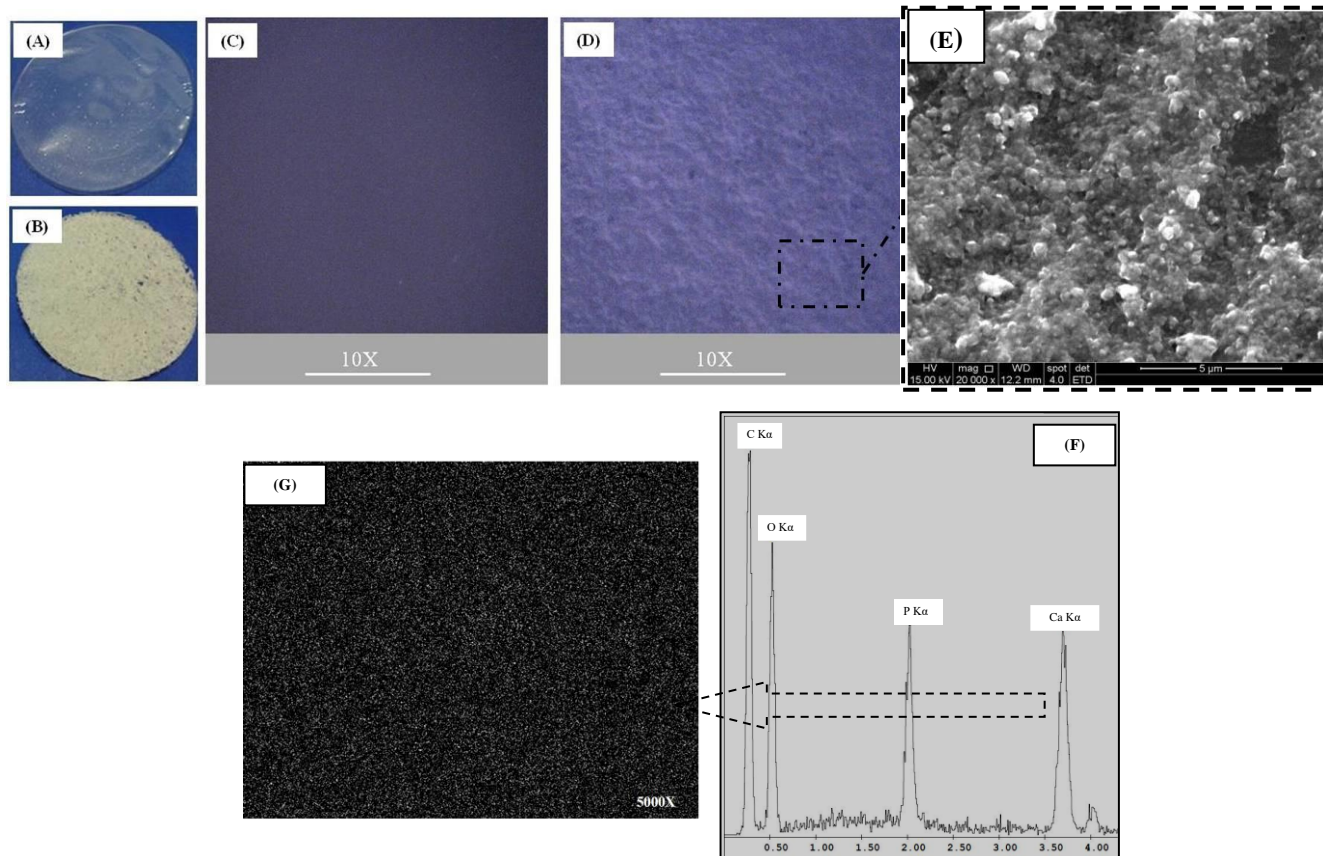


Figura 2.10 - Análise morfológica por imagens dos filmes da QUI (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/QUI (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que o sistema nHA/QUI se comporta como membrana uniforme sem heterogeneidade detectável na ampliação utilizada. É imperioso ressaltar a diferença observada na morfologia do biocomposto nHA/QUI com considerável rugosidade superficial (Figuras 2.10(B) e 2.10(D)), com aspecto opaco e uma coloração branca-amarelada devido à presença de partículas de nHA no compósito, em comparação à superfície lisa e transparente do filme de QUI (Figuras 2.10(A) e 2.10(C)). Pela análises por MEV (Figura 2.10(E)), é possível observar que as partículas de HA estão uniformemente dispersas na matriz do compósito sem qualquer segregação detectada e com típico espectro de EDS (Figura 2.10(F)). Isto foi endossado pela distribuição homogênea do sinal de Ca-K $\alpha$ , capturado pelo mapeamento de imagem apresentado na Figura 2.10(G).

A análise morfológica dos filmes de CMQ (Figuras 2.11(A) e 2.11(C)) e das membranas de nHA/CMQ (Figuras 2.11(B), 2.11(D) e 2.11(E)), foi realizada seguindo os padrões adotados na análise dos biocompósitos da nHA/QUI. Os espectros de EDS e mapeamento dos elementos químicos do biocompósito nHA/CMQ são apresentados nas Figuras 2.11(F) e 2.11(G), respectivamente.

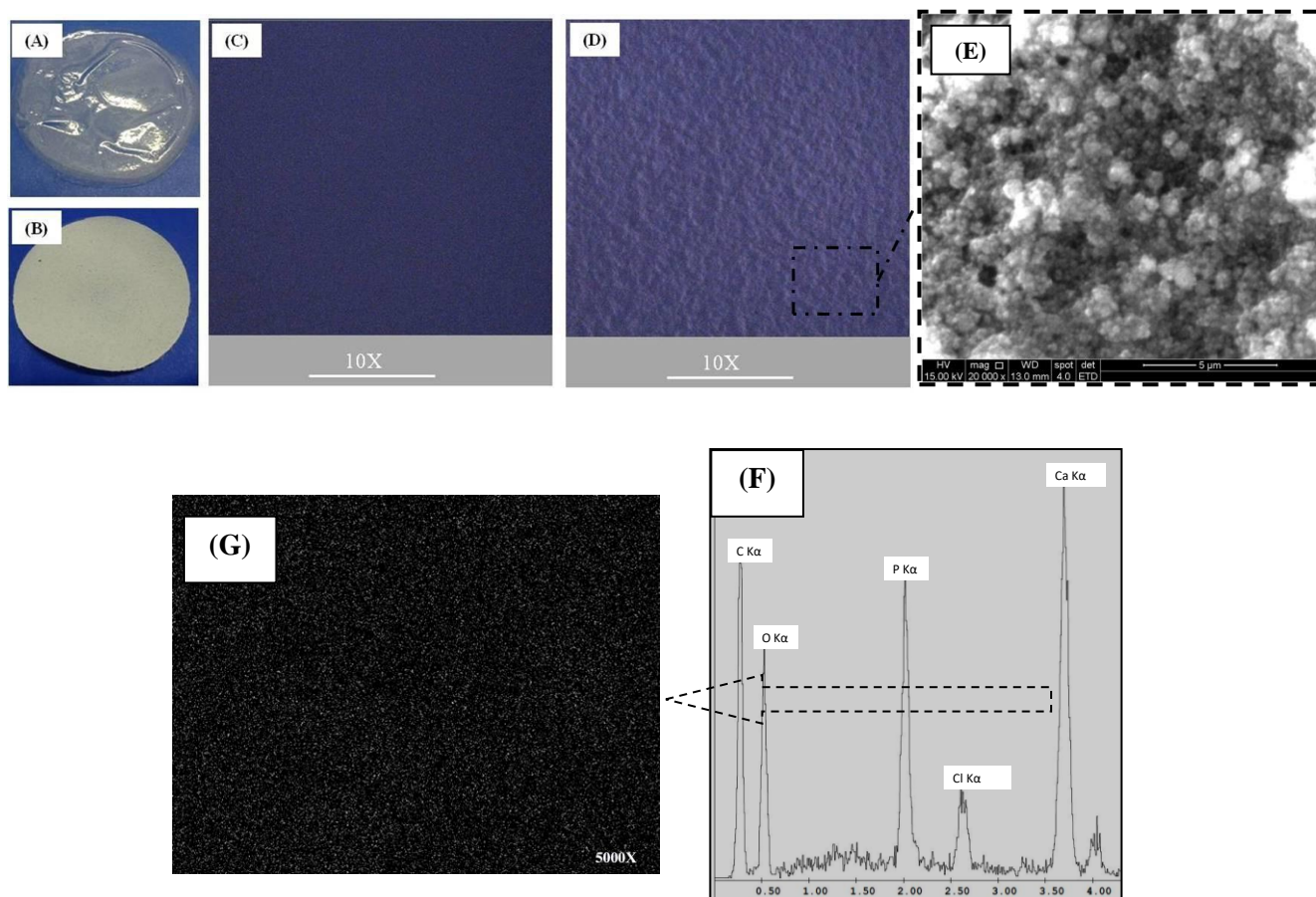


Figura 2.11 - Análise morfológica por imagens dos filmes da CMQ (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/CMQ (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação morfológica dos filmes GLI-Q (Figuras 2.12(A) e 2.12(C)) e do biocompósito nHA/GLI-Q (Figuras 2.12(B), 2.12(D) e 2.12(E)) caracterizou um sistema sem heterogeneidade perceptível nas ampliações utilizadas. A membrana apresentou aspecto opaco e coloração branca-amarelada, devido à presença de partículas de nHA no compósito e o tom amarelado associado a GLI-Q.



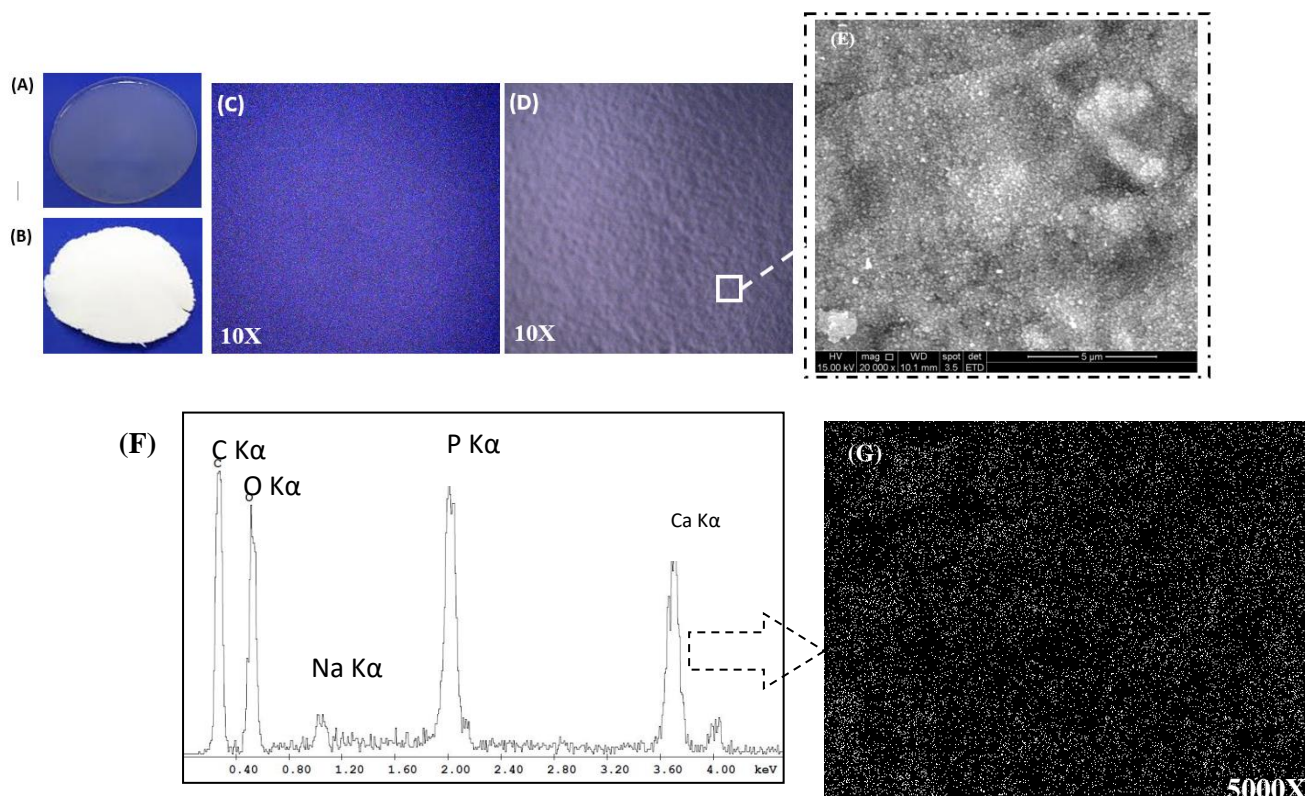


Figura 2.12 - Análise morfológica por imagens dos filmes da GLI-Q (imagem digital (A) e imagem por MEV (C)) e do biocompósito de nHA/GLI-Q (imagem digital (B) e imagem por MEV (E)). Análise química elementar: espectros de EDS (F) e mapeamento dos elementos (G). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de EDS de todos os biocompósitos apresentaram os principais elementos Ca e P atribuídos a nanopartículas de HA com a razão molar média calculada (Ca/P) de aproximadamente 1,7, consistente com a proporção estequiométrica HA teórica.

Adicionalmente, com uma maior amplificação utilizando a análise MEV foi possível verificar que a morfologia das superfícies nHA/QUI, nHA/CMQ e nHAGLI-Q apresentaram algumas diferenças, com o refinamento qualitativo das nanopartículas de HA (nHA) e uma distribuição mais homogênea dentro da matriz polimérica quando da utilização do GLI-Q como ligante em comparação aos outros sistemas. Para obter uma avaliação mais aprofundada do efeito do ligante na formação de partículas de HA, as imagens por obtidas por MEV foram analisadas utilizando o programa de processamento de imagem (ImageJ, versão 1.44, de domínio público, National Institutes of Health) e o tamanho de partícula e a distribuição foram calculadas usando mais de 200 medições de

partículas selecionadas aleatoriamente. Pode-se observar claramente as diferenças notáveis na distribuição de tamanho de nHA produzida sem uso de ligante e com utilização de QUI, CMQ e GLI-Q obtendo se os tamanhos médios de  $335\pm 70\text{nm}$ ,  $220\pm 50\text{nm}$ ,  $90\pm 20\text{nm}$  e  $74\pm 15\text{nm}$ , respectivamente. Estes resultados demonstraram o efeito do ligante no processo de formação de nanopartículas de HA, em que a adição de QUI causou uma redução relativa de 34%, CMQ de 73% e GLI-Q de 78% em comparação com nenhum ligante de cobertura. Além disso, o CMQ e GLI-Q resultaram numa redução notável do tamanho de nHA em comparação com sistemas de QUI. Estes resultados são representados na Figura 2.13.

A técnica de AFM foi utilizada visando o acesso aos aspectos morfológicos com maior resolução dos compósitos de biopolímero de nHA. Os resultados indicaram uma tendência semelhante para a formação de partículas de nHA com tamanho variando de 100-200nm para QUI, de 50-100nm para CMQ e 20-50nm para ligante GLI-Q, o que validou os resultados descritos na análise por MEV.

A microtomografia de raios-X (micro-CT) é uma técnica não destrutiva que resolve a estrutura tridimensional dos materiais, revelando suas características microestruturais (fases, inclusões, trincas, poros). Nesse sentido, as imagens de micro-CT permitem obter a distribuição das fases na membrana biocompósito uma vez que o coeficiente de atenuação de uma fase ao longo do feixe de raios-X é dependente da composição local, principalmente na densidade e no número atômico, sendo muito diferentes para polímeros e cerâmicas (MAIRE *et al.*, 2001). Em relação à estrutura tridimensional, os aspectos morfológicos dos biocompósitos também foram coletados e as imagens típicas para nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q são apresentadas nas Figuras 2.14(A), 2.14(B) e 2.14(C), respectivamente.

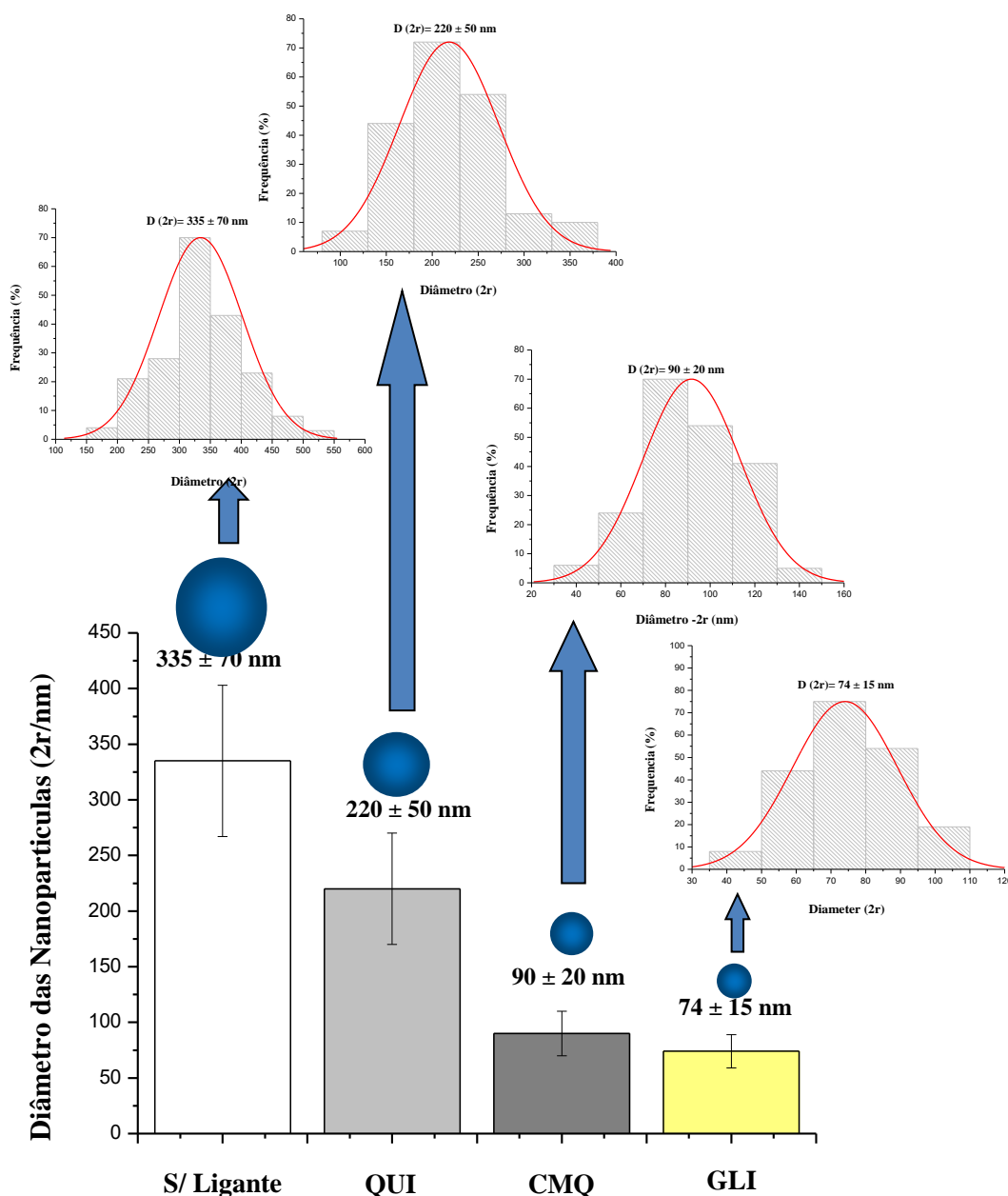


Figura 2.13 - Distribuição do tamanho da CaP sem ligante, com ligante QUI, CMQ e GLI-Q. Histograma do tamanho médio de nHA para os sistemas em avaliação. Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

Em relação à análise de micro-TC, pode-se considerar que as membranas se comportaram realmente como um sistema 2D, devido à espessura fina relativa com menor atenuação dos feixes de Raios-X (isto é, comprimento do caminho foi pequeno para a radiação). Para avaliar a distribuição das fases, foram separadas as regiões identificadas como ricas em orgânicos (menor atenuação, cor cinza) e ricas em inorgânicos (maior atenuação, cor



laranja) utilizando o software CTAn. Qualitativamente, pode-se observar que as amostras apresentaram texturas e densidades uniformes, mas nHA/QUI indicou algumas descontinuidades e vazios na distribuição de nanopartículas inorgânicas na estrutura tridimensional da matriz biocompósito em relação às amostras de nHA/CMQ e nHA/GLI-Q, o que pode ser observado nas imagens de micro-TC ampliadas (inserções das Figuras 2.14(A), 2.14(B) e 2.14(C)) usando contraste de densidade inorgânica (distribuição de fase de nHA). Isso pode ser atribuído ao processo de co-precipitação, em que o ligante QUI é solúvel apenas em condições ácidas, existindo apenas nos estágios iniciais da síntese e a subsequente insolubilidade em meio alcalino resultando numa dispersão não uniforme das partículas de nHA dentro da rede tridimensional do compósito.

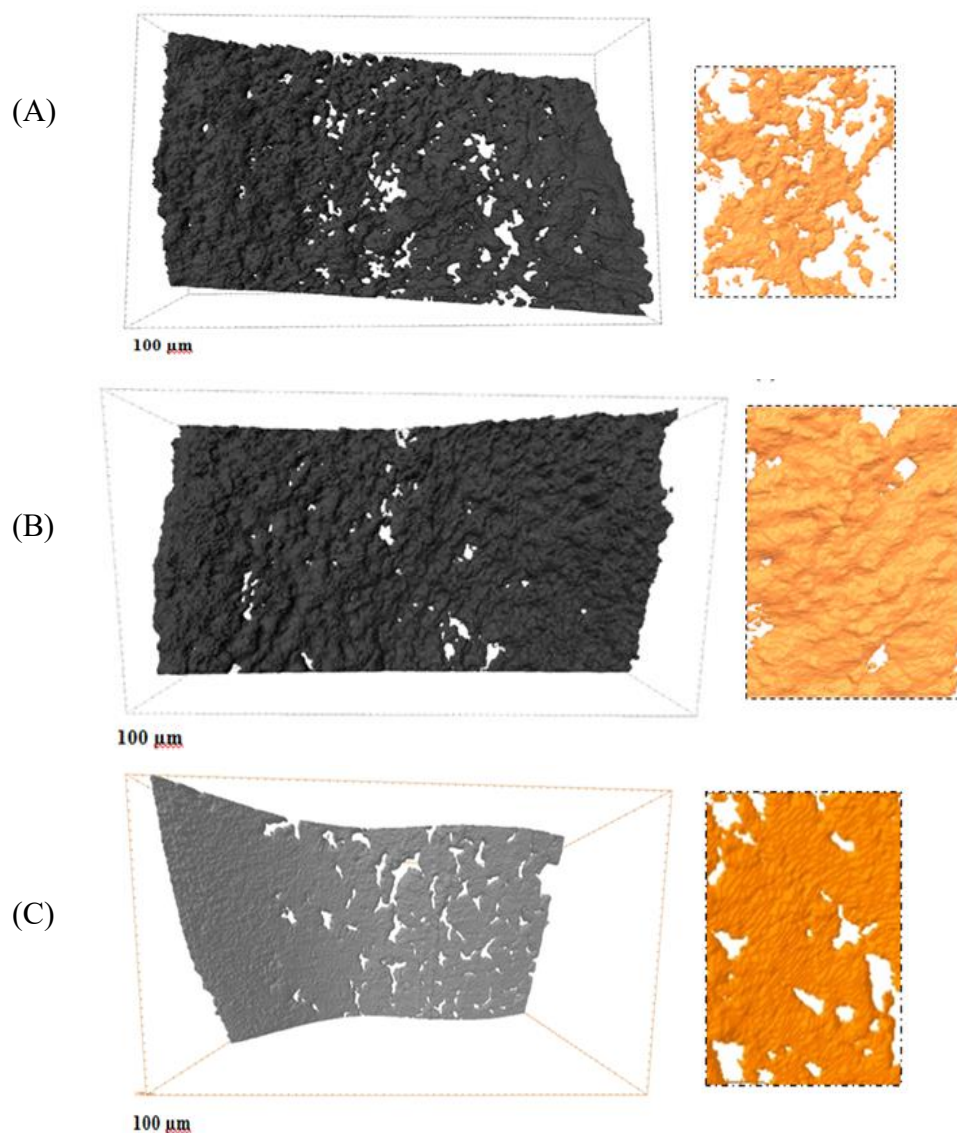


Figura 2.14- Imagem 3D por  $\mu$ -CT do biocompósito nHA/QUI (a), nHA/CMQ (b) e nHA/GLI-Q (c). Inserções: imagem ampliada com contraste de densidade identificando a fase inorgânica (distribuição da nHA). Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

A análise por MET dos sistemas permitiu a observação em altíssima resolução de nanopartículas HA ultra-pequenas, com tamanhos tipicamente abaixo de 10nm, com uma imagem representativa de nHA/QUI e nHA/GLI-Q apresentadas nas Figuras 2.15 e 2.16 e o padrão de difração de elétrons (Figuras 2.15(B) e 2.16(B)) com uma distância interplanar de aproximadamente  $0,23 \pm 0,01\text{nm}$  que pode ser atribuído ao plano (1 3 0) e  $0,27 \pm 0,01\text{nm}$ , que pode ser atribuída ao plano (211) da célula unitária hexagonal de HA

nanocristalina (JCPDS 86-1203), para as amostras de nHA/QUI e nHA/GLI-Q, respectivamente.

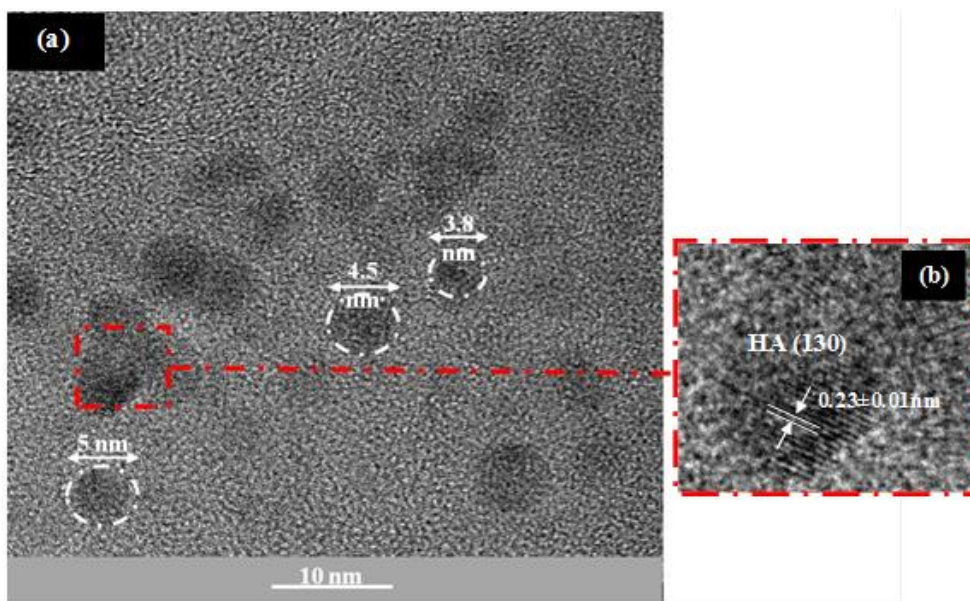


Figura 2.15 – Imagem por MET (a) e padrão SAED (b) da nHA/QUI. Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

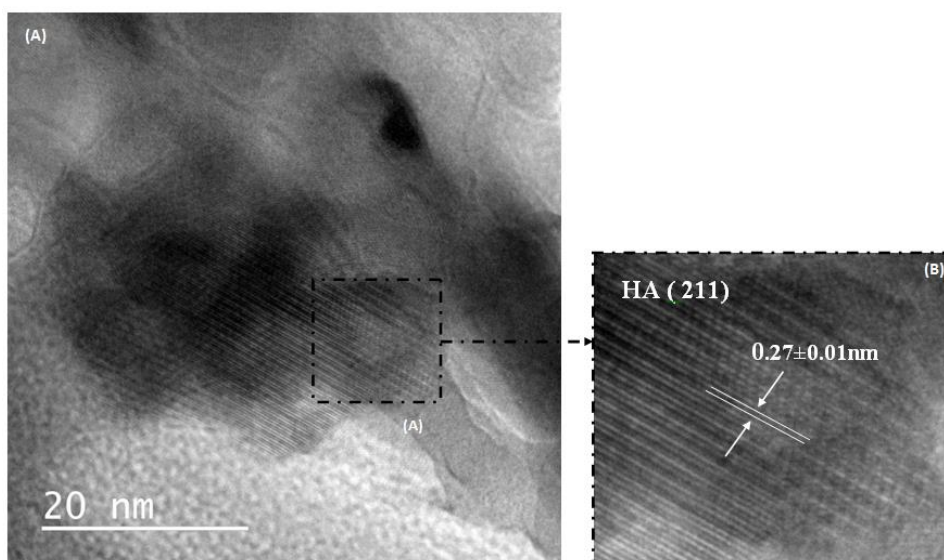


Figura 2.16 - Imagem por MET (a) e padrão SAED (b) da nHA/GLI-Q. Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

### 2.3.2.2 Difração de Raios-X

Os padrões de DRX da CaP sintetizada e dos biocompósitos estão ilustrados na Figura 2.17. As partículas de CaP (Figura 2.17(A)) apresentaram os principais picos característicos da HA em 2theta iguais a 31,7° (2 1 1), 32,8° (3 0 0), 32,2° (1 1 2) e 25,9° (0 0 2), entre outros picos de intensidades menores. Além disso, detectaram-se três picos que podem ser associados à fase de fosfato  $\beta$ -tri-cálcio ( $\beta$ -TCP) em aproximadamente 28,0°, 31,2° e 34,5°. Os padrões também revelaram que os biocompósitos (Figuras 2.17(B), 2.17(C) e 2.17(D)) apresentaram menor cristalinidade com halos de difração de acordo com os picos característicos da hidroxiapatita (International Center for Diffraction Data, JCPDS 86-1203). A presença de fases secundárias, como  $\beta$ -TCP,  $\alpha$ -TCP, CaO e outros, não foi detectada nos biocompósitos. Independentemente dos diferentes ligantes, tendência semelhante foi observada para ambos os sistemas (nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q (DUMONT *et al.*, 2016). A relativa cristalinidade inferior dos biocompósitos em comparação com o CaP pode ser atribuída à soma das contribuições dos ligantes poliméricos semicristalinos (QUI) e amorfos (CMQ e GLI-Q) que afetaram a cinética e termodinâmica da nucleação e crescimento das nanopartículas durante a síntese. Além disso, durante a preparação das amostras, a suspensão de nanopartículas de CaP foi agitada durante 1h enquanto as suspensões de biocompósitos (nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q) foram agitadas magneticamente durante 24h após o ajuste do pH. O processo de agitação pode ter favorecido a incorporação de CO<sub>2</sub> do ar no meio aquoso, reduzindo a cristalinidade das nanopartículas de HA (DOROZHKIN e EPPLE, 2004; DUMONT *et al.*, 2016).

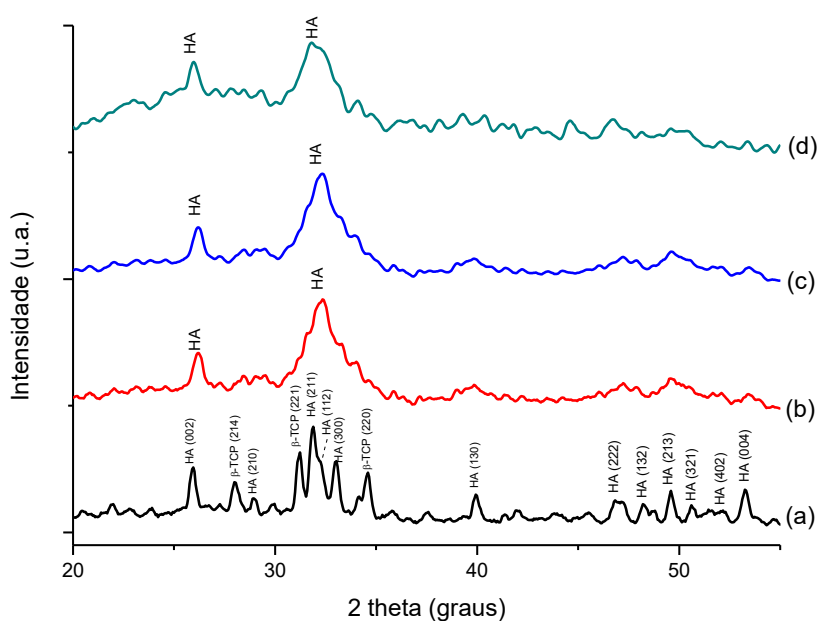


Figura 2.17 - Padrões de DRX da CaP (A), nHA/QUI (B), nHA/CMQ (C) e nHA/GLI-Q (D). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros FTIR dos nanocompósitos sintetizados são apresentados na Figura 2.18 (B), 2.19 (b) e 2.20 (B) para nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q, respectivamente, em comparação com os espectros sem os ligantes (curvas (A)). Os espectros infravermelhos de biocompósitos são largamente dominados por absorções associadas à fase de fosfato de cálcio. Eles mostraram o modo  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  assimétrico na faixa de  $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$  e a banda de vibração do  $\nu_1$   $\text{PO}_4^{3-}$  em  $963\text{cm}^{-1}$  suportando que ocorreu a formação de hidroxiapatita nos biocompósitos (UYSAL *et al.*, 2014). Os espectros de FTIR dos biocompósitos de nHA/polímero revelaram também bandas típicas de grupos carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) a  $1415\text{-}1470\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) e  $874\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) indicando a formação de hidroxiapatita carbonatada com íons  $\text{CO}_3^{2-}$  incorporados em  $\text{PO}_4^{3-}$  (Tipo  $\beta$ -HA carbonatada) (DEMIRTAŞ *et al.*, 2015) independente do ligante polimérico. A ocorrência de HA carbonatada está relacionada principalmente ao gás dióxido de carbono incorporado via de reação aquosa durante a síntese (DOROZHKIN e EPPLE, 2004). Além disso, a faixa vibratória em aproximadamente  $1640\text{cm}^{-1}$  é atribuída à água fisicamente e quimicamente

adsorvida (dobragem H-O-H), que são típicas de hidroxiapatitas obtidas por rotas de precipitação úmida (LIAO *et al.*, 1999).

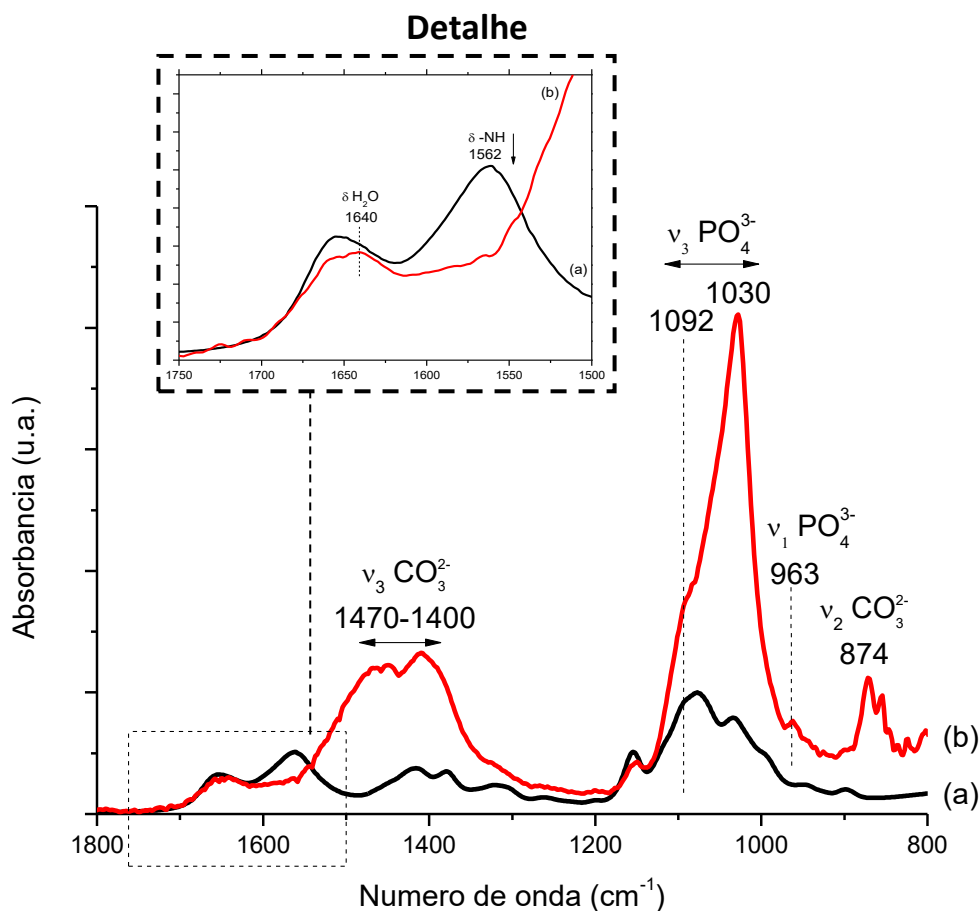


Figura 2.18 - Espectros de FTIR do ligante QUI (A) e composto de nHA/QUI(B). Fonte: Elaborado pelo autor.

A principal alteração observada entre os espectros de QUI e da nHA/QUI (Detalhe na Figura 2.18) foi na diminuição da intensidade da vibração -NH em  $1562\text{cm}^{-1}$ . Nos espectros do polímero CMQ e do biocompósito nHA/CMQ (Detalhe na Figura 2.19), nota-se que a banda de estiramento  $\text{C}=\text{O}$  do grupo carboxila está ausente nos espectros devido à desprotonação total do grupo carboxílico por causa do pH alcalino da síntese. Em contrapartida, a banda que é atribuída ao carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) é observada em  $1595\text{cm}^{-1}$  para CMQ (Detalhe na Figura 3.19) sobrepondo as bandas das aminas primárias desprotonadas entre  $1590\text{-}1570\text{cm}^{-1}$ . Para o espectro de nHA/CMQ (Detalhe na Figura

2.19) a banda de carboxilato ( $1595\text{cm}^{-1}$ ) é deslocada para um número de onda inferior de  $7\text{cm}^{-1}$  e a intensidade relativa da absorção na banda -NH e carboxilatos foi reduzida.

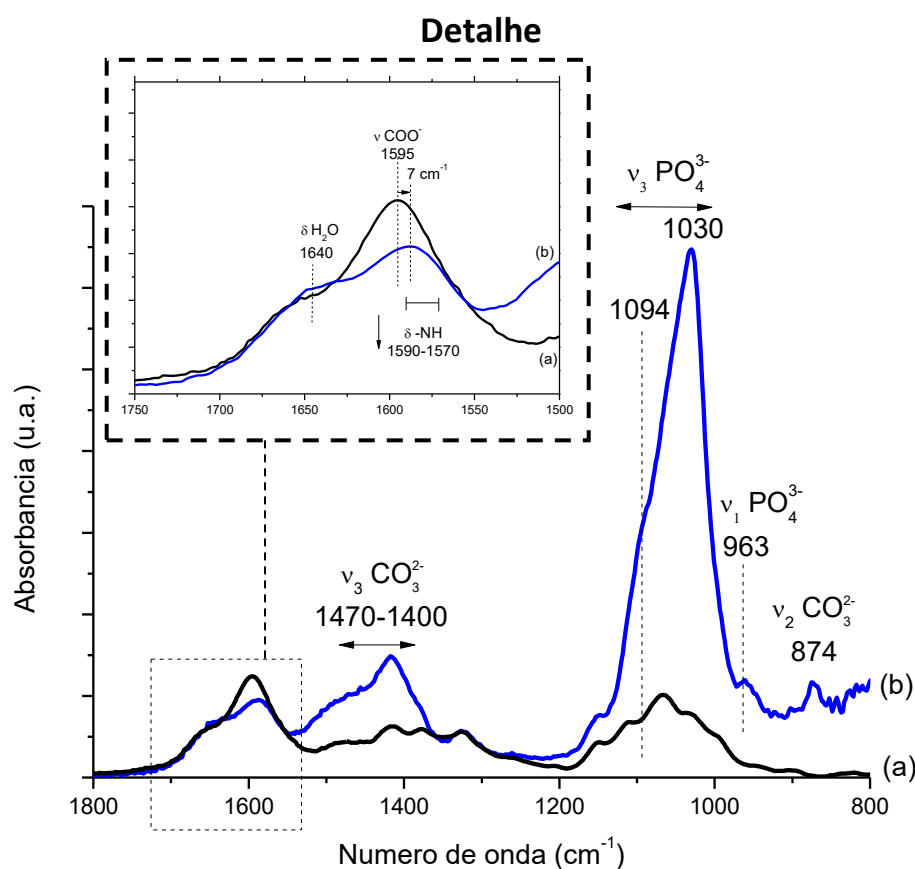


Figura 2.19 - Espectros de FTIR do ligante CMQ (a) e composto de nHA/CMQ(b). Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

No espectro do filme de GLI-Q (Figura 2.20), observaram-se os modos vibratórios de estiramento simétricos e anti-simétricos da amina protonada a  $1630\text{cm}^{-1}$  e  $1527\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (RANGEL-MENDEZA *et al.* 2009). Estas bandas são esperadas uma vez que quase todos os grupos amina do polímero foram protonados a estas condições de pH. Observou-se também uma banda a  $971\text{cm}^{-1}$  associada com a espécie  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Em um meio ácido de  $\text{pH} \leq 2$  ( $\text{pK}_1 = 2,20$ ), as espécies de ácido fosfórico são dominantes e caracterizadas pela banda de absorção principal em  $\sim 1006\text{cm}^{-1}$ , que é atribuído ao alongamento assimétrico ( $\nu_3$ ) da molécula. O deslocamento de energia detectado nesta banda está provavelmente relacionado com a formação de interações entre as espécies de fosfato e o biopolímero uma vez que as vibrações  $\nu_3$  tornam-se sensíveis ao ambiente de coordenação dos fosfatos (BAMGBOSE *et al.*, 2010). No espectro do composto

nHA/GLI-Q (Figura 3.20), foi observada a presença de bandas da HA em  $1030\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ ) e  $965\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ ) além das bandas características de  $-\text{COC}-$  e  $\text{C-OH}$  do biopolímero. A comparação entre o espectro do nHA/GLI-Q e GLI-Q mostrou o desaparecimento da banda a  $1590\text{-}1570\text{cm}^{-1}$  atribuído à flexão  $-\text{NH}_2$ , que pode ser associada à formação de complexos de coordenação entre estes grupos amino primários de GLI-Q e o  $\text{Ca}^{2+}$  da HA através de ligações (VARMA *et al.*, 2004; REILLY *et al.*, 2007; BENAVENTE, 2008; VERNÉ *et al.*, 2010; DUMONT *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2016).

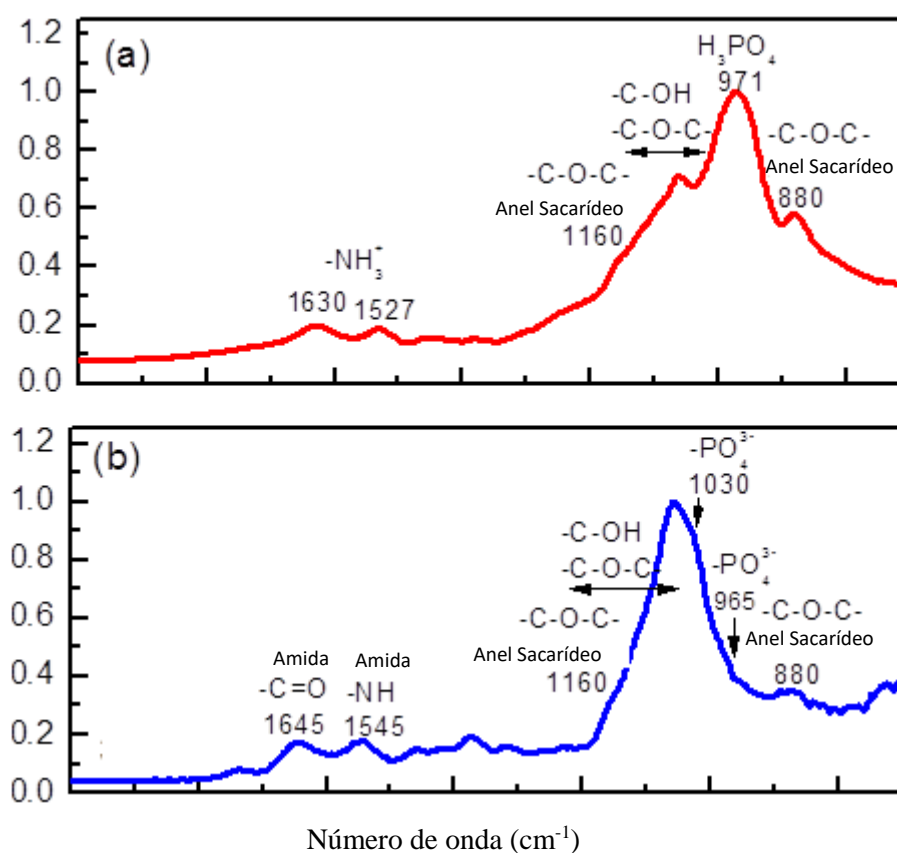


Figura 2.20 - Espectros de FTIR do ligante GLI-Q (a) e composto de nHA/GLI-Q(b).  
Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

As interações entre grupos hidroxilo e biocerâmicos nos compósitos não puderam ser detectadas uma vez que as bandas de absorção de HA sobreponham as vibrações  $\text{C3-OH}$  e  $\text{C6-OH}$  dos ligantes poliméricos. Essas mudanças nas energias e/ou intensidades relativas das bandas nos compósitos podem estar associadas às interações entre os grupos reativos do polímero e a fase cerâmica inorgânica (DEACON e PHILLIPS, 1980; COOPER *et al.*, 2011).



#### 2.3.2.4 Nucleação e Crescimento das partículas de nHA

Neste ponto, é importante ressaltar que este capítulo se concentrou principalmente no estudo dos efeitos da adição de QUI e derivados de QUI para controlar simultaneamente a nucleação e crescimento de nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) e produzir biocompósitos pelo processo de co-precipitação. Como é amplamente conhecido, a hidroxiapatita (HA) é o principal constituinte inorgânico de tecidos duros humanos, tais como ossos e dentes. Além disso, as partículas de HA no corpo humano estão presentes como nanocristais prismáticos com tamanhos variando de  $130 \times 30 \text{ nm}$  no esmalte dos dentes até  $20 \times 4 \text{ nm}$  na dentina e nos ossos (RODRÍGUEZ-CLEMENTE *et al.*, 1998). O próprio processo biológico forneceu algumas pistas para conseguir isso controlando o processo de nucleação e crescimento cristalino mediado pelo modelo macromolecular (GUANG *et al.*, 2015). Nesse sentido, a síntese de partículas de HA com dimensões nanométricas projetadas e controladas via rotas de processamento aquosas combinadas com biomacromoléculas é um objetivo muito interessante no desenvolvimento de biomateriais inovadores para imitar os tamanhos presentes no corpo humano. Os resultados apresentados na seção anterior mostraram que o uso de QUI, CMQ ou GLI-Q durante a síntese de partículas de nHA afetou drasticamente os tamanhos médios de nanopartículas, o que sugeriu uma forte dependência dos mecanismos de nucleação e crescimento e com a presença de ligantes poliméricos nas soluções.

Portanto, propõe-se que o mecanismo adaptado do modelo de LaMer (1950), que tem essencialmente a separação conceitual da nucleação e crescimento em duas etapas principais, e que possa ser usado para descrever preliminarmente as observações da formação de partículas de nHA em neste capítulo. Em conformidade, o processo de nucleação e crescimento de partículas em solução através do modelo de mecanismo LaMer pode ser dividido em três regiões principais, como esquematicamente ilustrado na Figura 2.21, em que a concentração dos monómeros é esquematicamente traçada em função do tempo de reação; (I) Um aumento rápido na concentração de monômeros livres em solução, (II) o monômero sofre uma "nucleação por rebentamento" que reduz significativamente a concentração de monômeros livres em solução. A taxa desta nucleação é descrita como "efetivamente infinita" e após este ponto, quase não ocorre nucleação devido à baixa concentração de monômeros após este ponto; (III) após

nucleação, o crescimento ocorre sob o controle da difusão dos monômeros através da solução (LARSEN, 1966; THANH *et al.*, 2014).

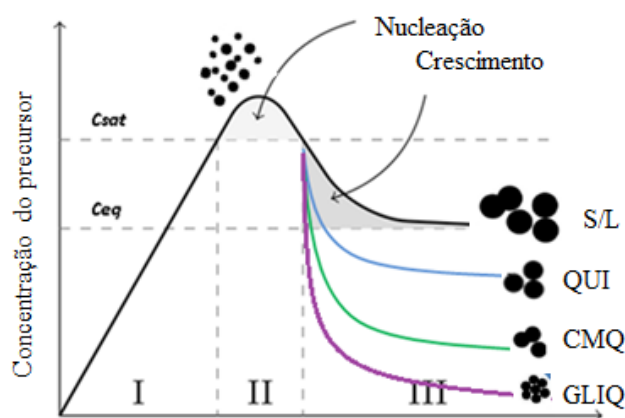


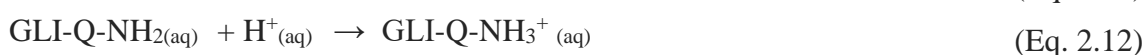
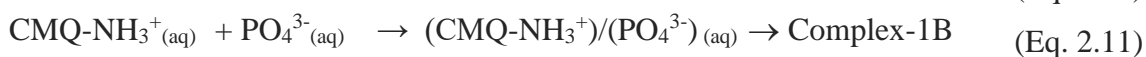
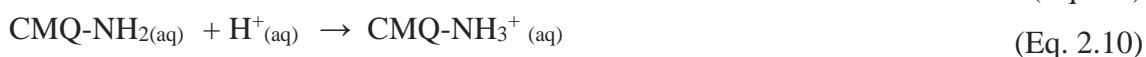
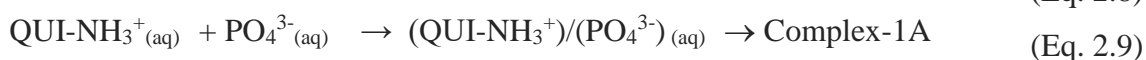
Figura 2.21 - Processo de nucleação e crescimento de partículas em solução através do mecanismo LaMer. Fonte: Adaptado de DUMONT *et al.*, 2016.

Como pode ser observado na Figura 2.21, o estágio de nucleação, envolvendo as porções (I) e (II) é considerado essencialmente o mesmo para todos os sistemas em nossa pesquisa, as curvas (a) sem ligantes, (b), (c) e (d) com ligante QUI, CMQ e GLI-Q, respectivamente. Esta hipótese baseia-se no fato de que, na primeira fase (I), com a concentração inicial de fosfatos na solução em níveis mais elevados, a adição gradual do precursor  $\text{Ca}^{2+}$  no meio provoca a formação instantânea de embriões de HA. Ocorre a supersaturação dos reagentes acima das concentrações de equilíbrio termodinâmico com base no produto da constante de solubilidade ( $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2, K_{sp} = 1,0 \times 10^{-36})$ ). Assim, "estouro" da nucleação ocorre a taxas muito elevadas formando núcleos de HA dispersos no meio, causando a diminuição significativa nas concentrações dos reagentes (região II). Subsequentemente, na fase final (III) praticamente não há mais nucleação e o crescimento de nanocristais de HA ocorre essencialmente através de um processo de difusão, onde a presença de ligante desempenha um papel importante na cinética. As diferentes taxas de diminuição das concentrações apresentadas nas curvas (a), (b), (c) e (d) na Figura 2.21 na região III estão predominantemente associadas ao crescimento de nHA controlada pela presença de ligantes poliméricos no meio. Para uma abordagem mais aprofundada, o mecanismo de nucleação e crescimento de nanopartículas de HA na presença dos ligantes QUI, CMQ e GLI-Q é representada pela sequência de passos na Figura 2.21(a), (b) e (c), respectivamente. Do ponto de vista químico, esses resultados foram interpretados

sugerindo que o mecanismo de formação molecular de nanopartículas de HA na presença de macromoléculas funcionais poderia envolver os seguintes passos principais e reações químicas, desconsiderando o papel das espécies menores.

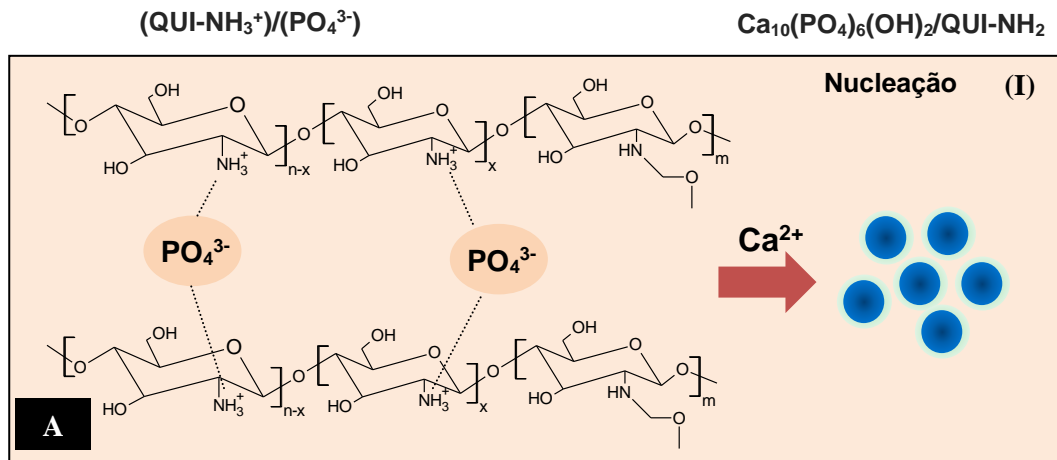
#### 2.3.2.4.1 QUI, CMQ e GLI-Q em meios ácidos

As soluções aquosas de QUI, CMQ e GLI-Q foram preparadas utilizando ácido ortofosfórico (Equação 2.7), que se espera a formação de complexos eletrostáticos entre grupos das aminas protonadas positivamente carregadas a partir dos polissacáridos QUI (Equação 2.8), CMQ (Equação 2.10) e GLI-Q (Equação 2.12) PH (ie  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).

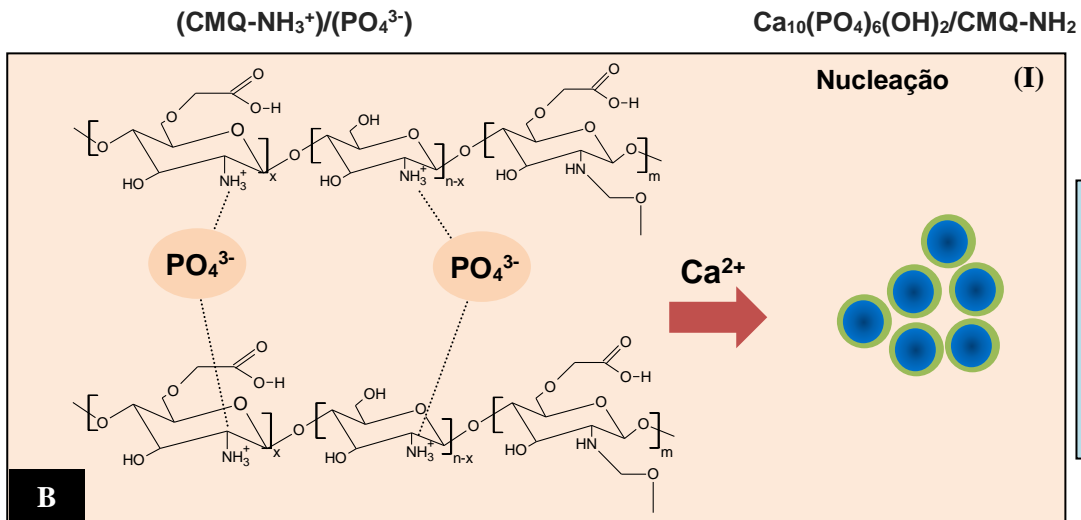
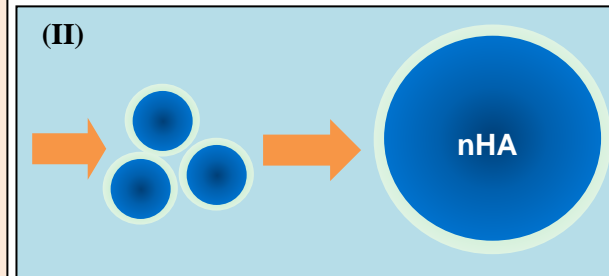


#### 2.3.2.4.2 Mecanismo de nucleação de partículas de nHA com ligantes de QUI, CMQ e GLI-Q

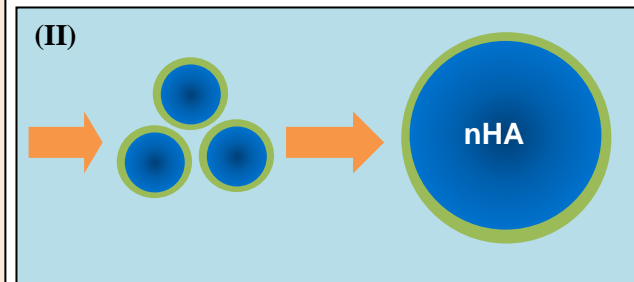
Na sequência, o precursor de  $\text{Ca}^{2+}$  foi adicionado ao sistema como uma suspensão saturada de hidróxidos de cálcio (Equação 2.14), originando a formação instantânea de embriões de HA no meio (Equação 2.15). Espera-se que estes embriões sejam originados principalmente nos locais onde os fosfatos são contrabalançados pelas aminas positivamente carregadas pelos ligantes poliméricos em baixo pH, envolvendo mecanismo de troca catiónica, isto é,  $\text{RNH}_3^+$  ( $\text{R} = \text{QUI, CMQ ou GLI-Q}$ ) substituído por  $\text{Ca}^{2+}$  (Equações 2.16, 2.17 e 2.18).



**Crescimento (nHA)<sub>k</sub> + nHA → (nHA)<sub>k+1</sub>**



**Crescimento (nHA)<sub>k</sub> + nHA → (nHA)<sub>k+1</sub>**



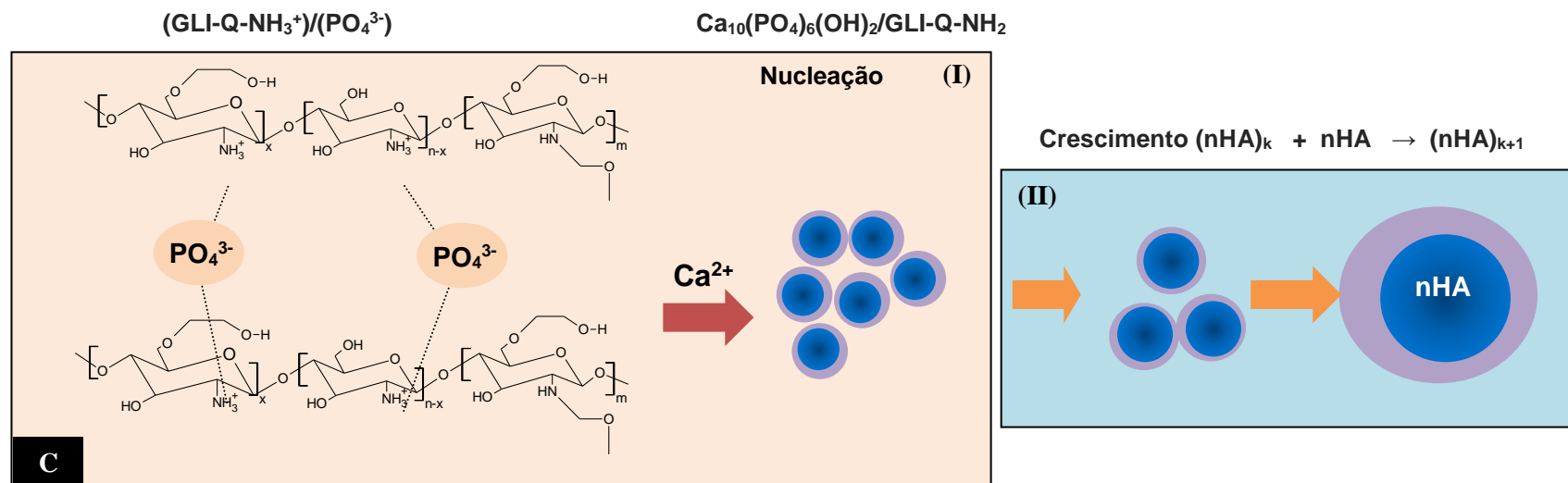
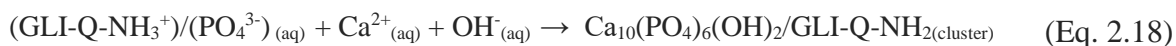
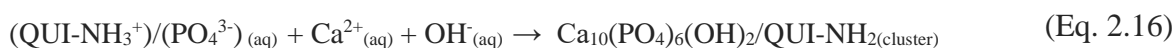
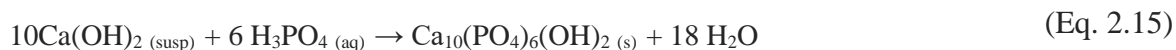


Figura 2.22- Representação esquemática do mecanismo de nucleação e crescimento de nanopartículas de nHA na presença dos ligantes QUI (A), CMQ (B) e GLI-Q (C). Fonte: Adaptado de DUMONT *et al.*, 2016.

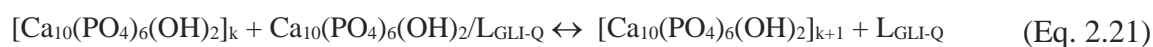
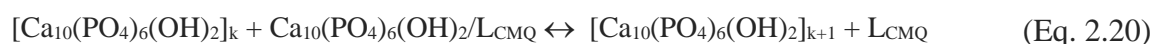
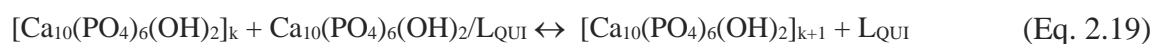
Após um tempo muito curto, estes embriões atingem o raio crítico termodinâmico estável como núcleos de nanopartículas de HA rodeadas pela concha de ligando polimérico. A taxa e a extensão do processo de nucleação são predominantemente dependentes da supersaturação de fosfatos e  $\text{Ca}^{2+}$  nos meios e, à medida que as concentrações destas espécies caem, a nucleação é drasticamente cessada. Nesta fase, estes sistemas são considerados como dispersões coloidais aquosas de agregados de hidroxiapatita feitas do núcleo inorgânico rodeado pelo ligante polimérico orgânico construindo uma nanoestrutura núcleo-casca solvatada em meio aquoso. Assim, como as concentrações iniciais dos precursores  $[\text{PO}_4^{3-}]$  e  $[\text{Ca}^{2+}]$  são os mesmos para todos os sistemas (isto é, supersaturado), não se espera que ocorra qualquer diferença relevante na taxa de nucleação de partículas de nHA com cinética muito rápida com a presença do ligante.



#### 2.3.2.4.3 Mecanismo de crescimento de partículas de nHA com ligantes QUI, CMQ e GLI-Q

Como a concentração original de espécies em solução ( $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi drasticamente reduzida durante a fase de nucleação (I e II), a taxa de crescimento das partículas será predominantemente determinada pela cinética do processo de difusão das espécies nos meios e a coalescência de complexos coordenados nHA-biopolímero formados nos estádios anteriores. Nesse sentido, o sistema é composto por uma nanoestrutura núcleo-casca feita de um núcleo inorgânico (nHA) e do ligante orgânico (biopolímero, QUI, CMQ ou GLI-Q), com base no equilíbrio global de cargas eletrostáticas e interações na superfície do nHA. Além dos grupos amina comuns ao QUI e ao CMQ, o CMQ tem também grupos funcionais carboxila e o GLI-Q possui grupamentos polietileno glicol, que aumentam consideravelmente a estabilidade do sistema por interações eletrostáticas com as espécies de  $\text{Ca}^{2+}$  na superfície de nanopartículas de HA, limitando seu crescimento

em comparação com partículas sem ligantes e ao sistema da QUI. Do ponto de vista termodinâmico, para se desenvolver, as nanopartículas de nHA devem superar a barreira energética da nanoestrutura núcleo-casca associada à estabilidade do complexo eletroestático de coordenação formado entre o núcleo da nHA e a casca do ligante, como representado nas reações das Equações 2.19, 2.20 e 2.21. Ressalta-se que as interações coordenativas entre  $\text{Ca}^{2+}$  na superfície da partícula nHA e os ligantes QUI, CMQ e GLI-Q são mais fortes do que a força dirigida para coalescência e agregação de nanopartículas, interrompendo assim o crescimento nanocristalino (reduzindo o índice k nas Equações 2.19, 2.20 e 2.21). Assim, a maior estabilidade dos complexos nHA/GLI-Q devido à presença de grupos multifuncionais, tais como aminas e hidroxilos, foi responsável pela menor taxa de crescimento, levando à formação do menor tamanho de nanopartículas na HA. Por outro lado, a ausência de ligante polimérico permitiu a taxa de crescimento mais elevada sem restrição relevante para a coalescência de partículas resultando no maior tamanho de nHA. Nesse caso, os núcleos formados podem crescer mais por mecanismo difusivo. As partículas primárias resultantes (singlets) agregam-se para formar partículas secundárias. Com base nas razões acima mencionadas, o sistema que utiliza QUI como o ligante mostrou tamanhos de partículas de nHA intermediárias, menores do que não bloqueados mas maiores do que os sistemas de CMQ e GLI-Q, como resultado de algumas limitações na coalescência de partículas para crescimento imposta pela estabilização química do ligante ( $k_{\text{GLI-Q}} < k_{\text{CMQ}} < k_{\text{QUI}} < k_{\text{sem ligante}}$ ).



### 2.3.2.5 Ensaios Biológicos

No presente estudo, a toxicidade dos filmes QUI, CMQ e GLI-Q e dos biocompósitos de nHA/QUI, nHA/CMQ e nHA/GLI-Q foi avaliada com base na análise da viabilidade celular de células de osteossarcoma humano (SAOS) por ensaio de MTT. Este teste é utilizado especificamente para avaliar a função mitocondrial e a viabilidade celular. Na Figura 2.23 pode observar-se que os sistemas apresentaram comportamento de respostas de viabilidade celular semelhantes em comparação com a condição de controle (dentro da variação estatística).

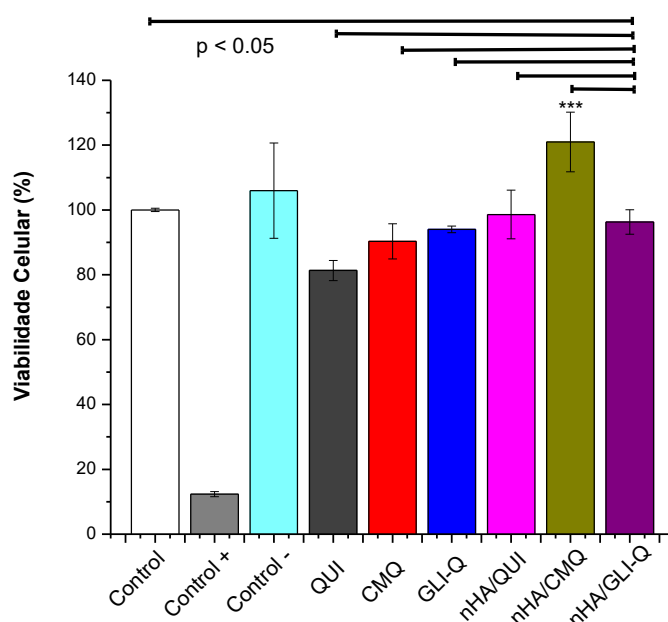


Figura 2.23 - Resultados do ensaio de viabilidade celular, utilizando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) brometo de tetrazólio 2,5-difenil (MTT)(SAOS). Fonte: Elaborado por DUMONT *et al.*, 2016.

Observou-se resposta de viabilidade celular relativamente maior para os biocompósitos de nHA/CMQ, onde podem ser consideradas como contribuições, a presença do grupo funcional carboximetil da CMQ, como mencionado anteriormente, este grupamento interage com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  formando partículas de HA em escala nanométrica, que pode ter promovido aumento na adsorção celular em resposta a maior área superficial. Apesar do ligante GLI-Q promover a precipitação de partículas de HA menores que a CMQ, um fator relevante que pode ter comprometido a viabilidade celular dos biocompósitos com GLI-Q foi a uma maior solubilização desses sistemas em pH fisiológico, corroborando com os resultados de degradação. Assim, sugere-se que a integridade da membrana compromete de forma significativa a viabilidade celular dos sistemas, uma vez que as células necessitam de suporte para proliferação.

A fosfatase alcalina é uma enzima importante envolvida na formação e mineralização óssea e é um marcador bem conhecido e amplamente utilizado de diferenciação osteoblástica para testes *in vitro* (REILLY *et al.*, 2007; VERNÉ *et al.*, 2010). Neste estudo, os resultados da ALP com células SAOS em contato direto com amostras são apresentados na Figura 2.24, e não foi identificada diferença significativa na atividade da



ALP dos biohíbridos quando comparados com o grupo controle ( $p > 0,05$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism). Resultado melhor foi identificado nos biocompósitos de nHA/CMQ corroborando com os ensaios de MTT.

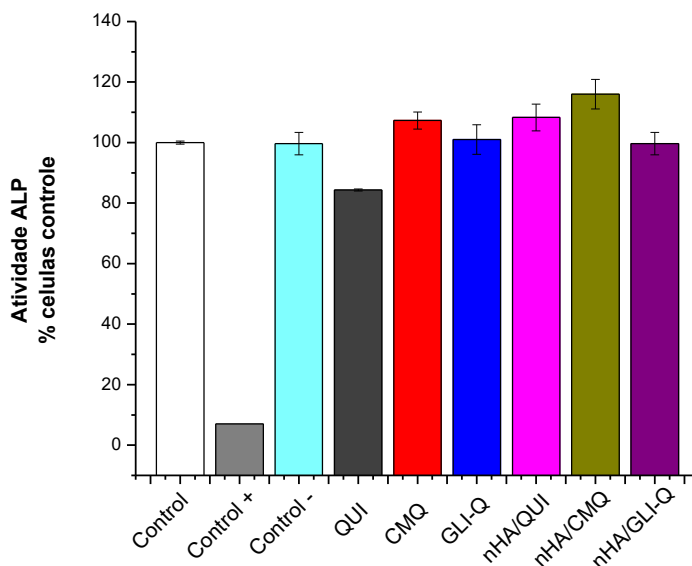


Figura 2.24 - Resultados do ensaio de atividade de ALP após 24 h de incubação com a linha celular (SAOS). Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio citotoxicidade e viabilidade LIVE/DEAD<sup>®</sup> proporciona um teste de viabilidade de células de fluorescência bicolor, que se baseia essencialmente na determinação simultânea de células vivas (coradas em verde,  $\lambda_{ex}$  495 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm) e células mortas (coradas em vermelho, que mede os parâmetros conhecidos de viabilidade celular, a atividade da esterase intracelular e a integridade da membrana plasmática (WALKER *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2016), com as duas sondas, Calcein AM (éster acetoximetílico de calceína) e EthD-1 (homodímero de etídio). Por isso, o ensaio LIVE / DEAD foi realizado para validar os resultados dos testes MTT e ALP utilizando células SAOS (células semelhantes a osteoblastos humanos) em contato com as amostras.

Na Figura 2.25 observa-se que as células em contato com os biocompósitos apresentaram padrão de fluorescência semelhante ao grupo de controle, isto é, elevada fluorescência verde (células viáveis) e pouca ou nenhuma fluorescência vermelha (células mortas). Assim, como esperado, os resultados deste ensaio confirmaram os resultados anteriores mostrados nos ensaios de viabilidade celular por MTT e ALP.

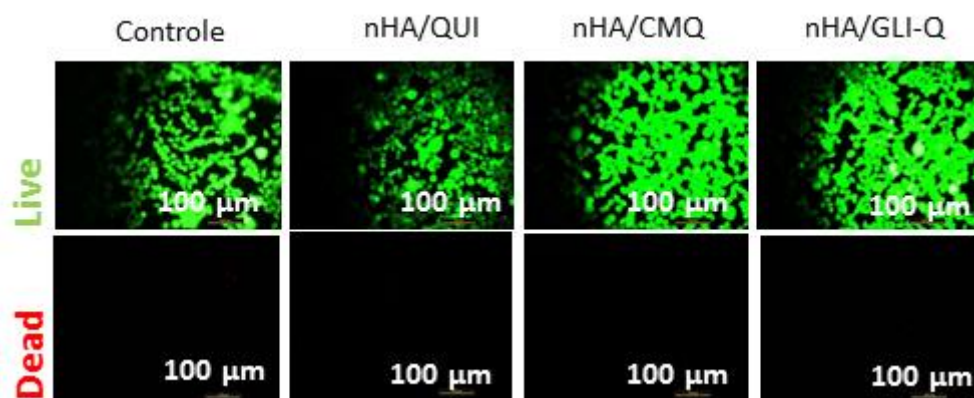


Figura 2.25 - Resultados do ensaio de LIVE/DEAD após 24 h de incubação com a linha celular (SAOS). Fonte: Elaborado pelo autor.

## CONCLUSÃO

É demonstrado neste capítulo, pela primeira vez, que a QUI, CMQ e GLI-Q utilizados como ligantes poliméricos durante a síntese de nanopartículas de HA desempenhou papel importante na determinação do tamanho final médio, afetando a cinética de nucleação e crescimento das partículas. O composto com base em CMQ e GLI-Q apresentaram os menores tamanhos de partículas de nHA ( $90 \pm 20$ )nm e ( $74 \pm 15$ )nm, os sistemas sem ligante com o maior tamanho médio ( $335 \pm 70$ )nm e sistema com QUI apresentou partículas com dimensões intermediárias ( $220 \pm 50$ )nm. Sugere-se que o estágio de nucleação é praticamente semelhante para todos os sistemas devido à "nucleação de explosão", dependendo apenas da mesma concentração de fosfatos. Por outro lado, supõe-se que o crescimento seja primariamente um mecanismo controlado por difusão, o qual é consideravelmente afetado pela presença da camada de cobertura orgânica de QUI, CMQ ou GLI-Q envolvendo as nanopartículas de HA formadas na primeira fase. Além disso, os resultados mostraram que estes ligantes conduzem à formação de membranas de biocompósito relativamente homogêneas feitas de partículas de nano hidroxapatita uniformemente incorporadas em matrizes de polímero. Além disso, em relação à citocompatibilidade in vitro, não foi verificada toxicidade para os nanobiocompósitos testados utilizando células semelhantes a osteoblastos humanos como um modelo para mimetizar a resposta do tecido ósseo. Portanto, pode-se afirmar que novos biocompósitos

baseados na nHA foram efetivamente produzidos à temperatura ambiente usando a via de co-precipitação aquosa, que oferece um biomaterial promissor para potencial substituição e reparo ósseo no futuro.

## CAPÍTULO III

### “ESTUDO DO EFEITO DA RETICULAÇÃO POR EPICLORIDRINA EM SUPORTES BIOCOMPATÍVEIS DE POLIMÉROS/CERÂMICA”

#### 3.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O maior desafio em engenharia de tecido periodontal é prevenir a migração e aderência das células epiteliais gengivais para o espaço do defeito, limitando a regeneração tecidual (SHEIKH *et al.*, 2016). A utilização de membranas como barreiras em técnicas de regeneração guiada de tecidos (RGT) periodontais favorece a migração e permanência de células osteogênicas, permite melhor difusão de plasma e nutrientes, estabiliza os materiais de enxerto, além de atuar no controle da reabsorção deste material (BUSER *et al.*, 1999; SHEIKH *et al.*, 2015; SHEIKH *et al.*, 2016) (Figura 3.1).

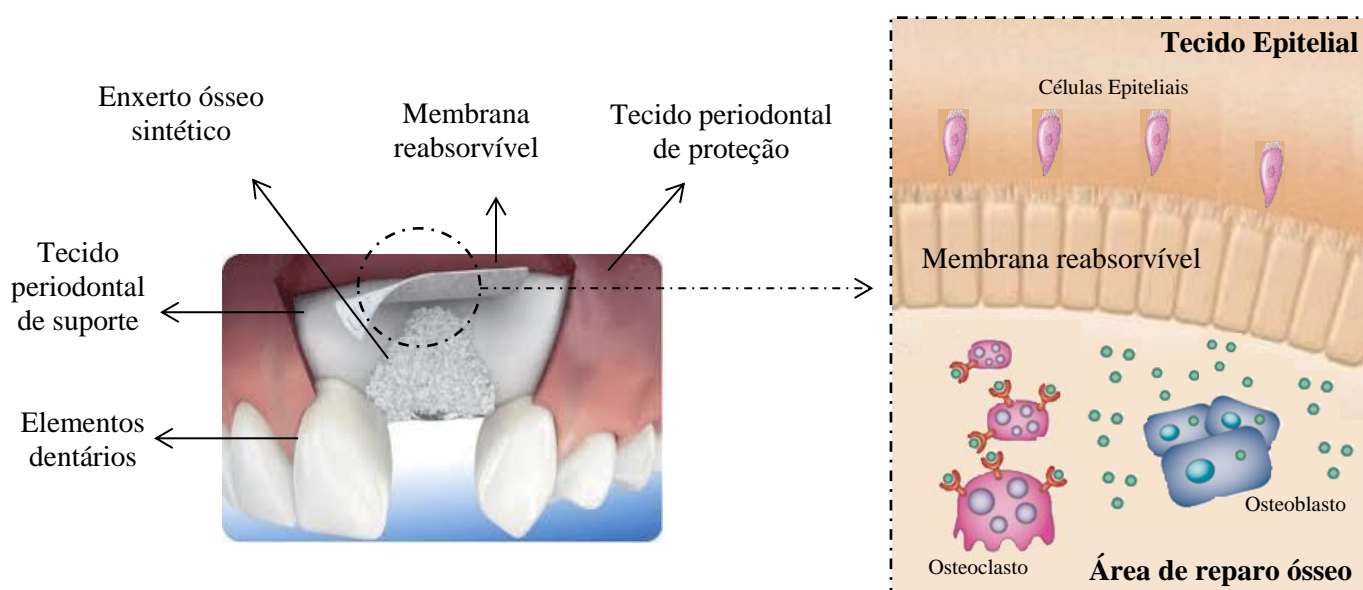


Figura 3.1 – Ilustra um sistema de otimização da neoformação óssea (sem escala).

Atualmente, as membranas absorvíveis com maior disponibilidade no comércio são sintetizadas com colágeno (COL) ou poliésteres biodegradáveis tais como ácido poli-lático (PLLA) e poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA). Estudos mostram que o PLLA

e o PLGA apresentam degradação lenta e melhores propriedades mecânicas que as membranas de COL, entretanto apresentam baixa afinidade celular (PIATTELLI *et al.*, 1996; ALPAR *et al.*, 2000; RAKHMATIA *et al.*, 2013; TORRICELLI *et al.*, 2014). As membranas de COL apresentam maior afinidade celular, porém apresentam propriedades inferiores caracterizada pela imprevisibilidade da taxa de degradação em detrimento do pH (ALPAR *et al.*, 2000; SCHMIDMAIER *et al.*, 2006; BEHFARNIA *et al.*, 2012; BOTTINO *et al.*, 2012; SAM *et al.*, 2014). Assim, o desempenho clínico destes materiais não são totalmente previsíveis, especialmente em casos de maior complexidade (NYGAARD-OSTBY *et al.*, 2010).

### 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Tendo em vista os resultados obtidos no capítulo anterior e considerando as características da quitosana, a utilização de um agente reticulante pode possibilitar o controle da degradação e intumescimento, características desejáveis ao biocompósito melhorando sua aplicabilidade na técnica RGT. Assim, para o desenvolvimento desta etapa, foram realizadas a síntese e caracterização dos polímeros formadores dos filmes e biocompósitos polímeros/cerâmica. Os filmes e os biocompósitos foram produzidos com e sem reticulação por epícloridrina para aplicação potencial na regeneração e reparação óssea e também foram caracterizados por análises físicas, químicas e biológicas. Procurou-se com estes testes o conhecimento das propriedades dos materiais sintetizados e a verificação da similaridade com as propriedades do tecido ósseo. A Figura 3.2 apresenta as etapas desenvolvidas neste trabalho.

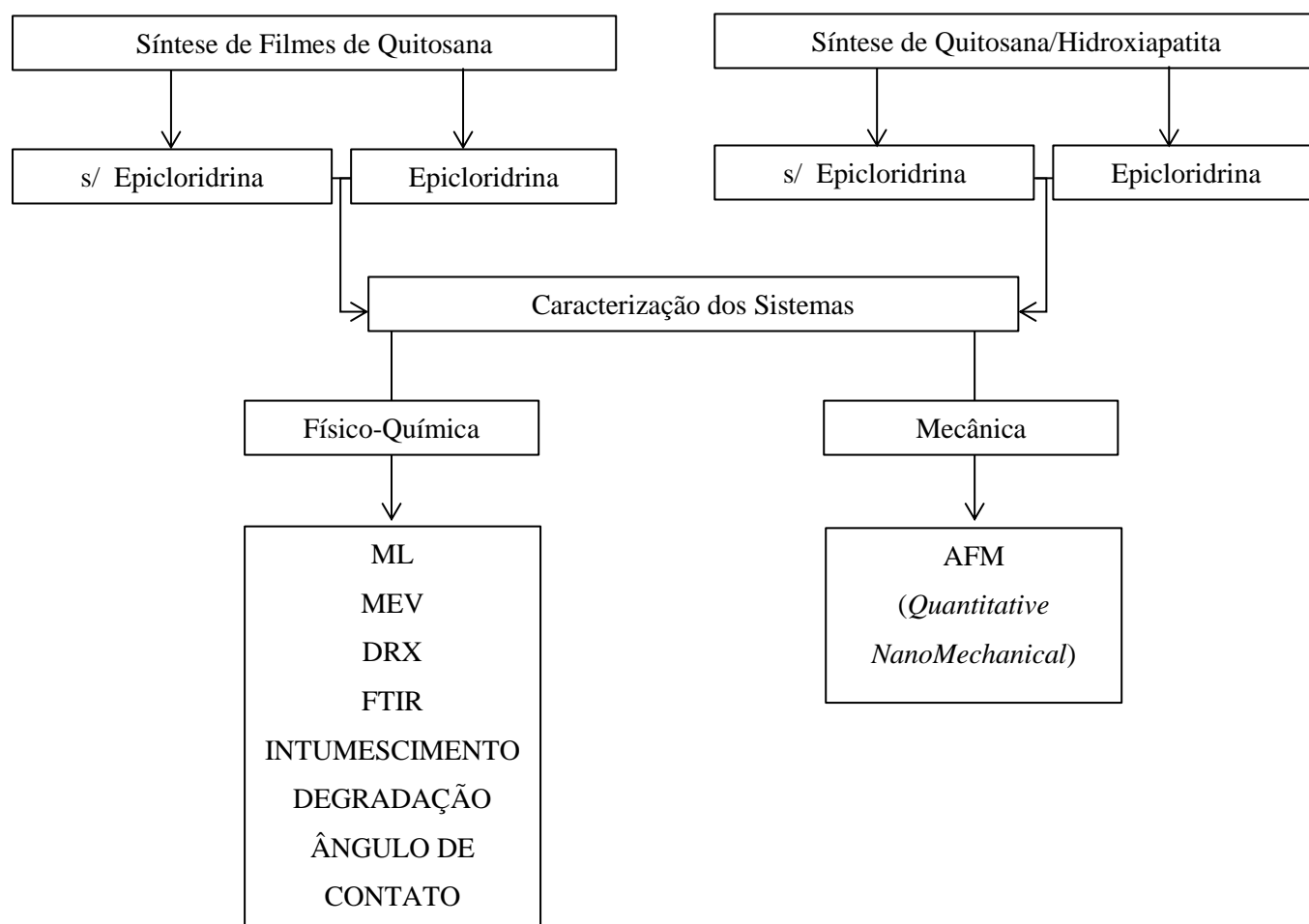


Figura 3.2 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.1 Materiais

Todos os reagentes e precursores, ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EUA, 85%,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hidróxido de cálcio (Sigma-Aldrich, EUA,  $\geq 96\%$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), hidróxido de amônio (Synth, Brasil, 30%,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), epicloridrina (ECH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA,  $\geq 99\%$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$ , E1055,  $1.183\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{PM}=92,52\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e quitosana (QUI) em pó (Aldrich, EUA,  $\text{PM}=310.000$  para  $375.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{DD}\geq 75\%$ , e viscosidade 800-2000 cP) foram utilizados tal como recebidos. Água deionizada (Millipore Simplicidade™) com uma resistividade de  $18\text{M}\Omega\text{ cm}$  foi utilizada na preparação de todas as soluções.

### 3.2.2 Preparação dos filmes de quitosana (QUI)

Soluções de 1% (em massa) de quitosana (QUI) foram preparadas pela dissolução de 1g de QUI em 100mL de solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,51% v/v) ("SOL\_2"). Para a solubilização e homogeneização, as soluções foram mantidas sob agitação magnética constante durante 24h à temperatura ambiente ( $25\pm 2$ )°C.

O pH da SOL\_2 foi corrigido e ajustado para  $7,0\pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ). O pH foi novamente corrigido para  $10,0\pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e a temperatura elevada para ( $50\pm 1$ )°C permanecendo por 2h sob agitação constante.

A SOL\_2 foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10 mL da SOL\_2 filtradas foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura ( $50\pm 1$ )°C por 24h. Os filmes de quitosana resultantes foram referidos como QUI (Figura 3.3).

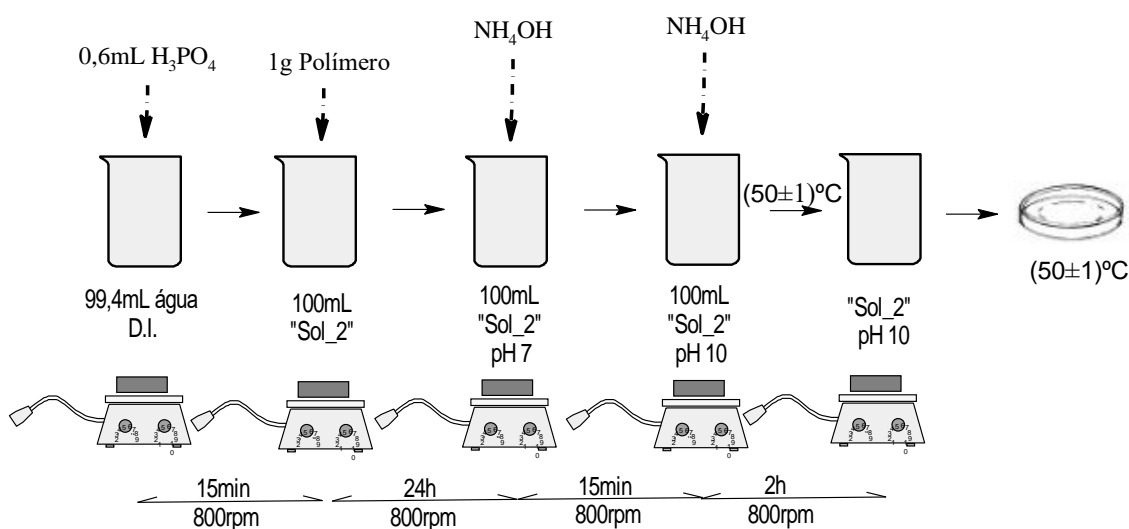


Figura 3.3 - Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de quitosana.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.3 Preparação dos filmes de quitosana com epiclоридrina (QUI-ECH)

Após completa homegeinização da SOL\_2, foram lentamente adicionados 0,08mL e 0,16mL de epiclorigrina (ECH) para obter razões em massa de QUI/ECH de (1:0,1) e (1:0,2) (“SOL\_3”), respectivamente, sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

A SOL\_3 foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10mL da SOL\_3 filtrada foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$  por 24h. Os filmes de quitosana reticulados resultantes foram referidos como QUI-ECH (Figura 3.4).

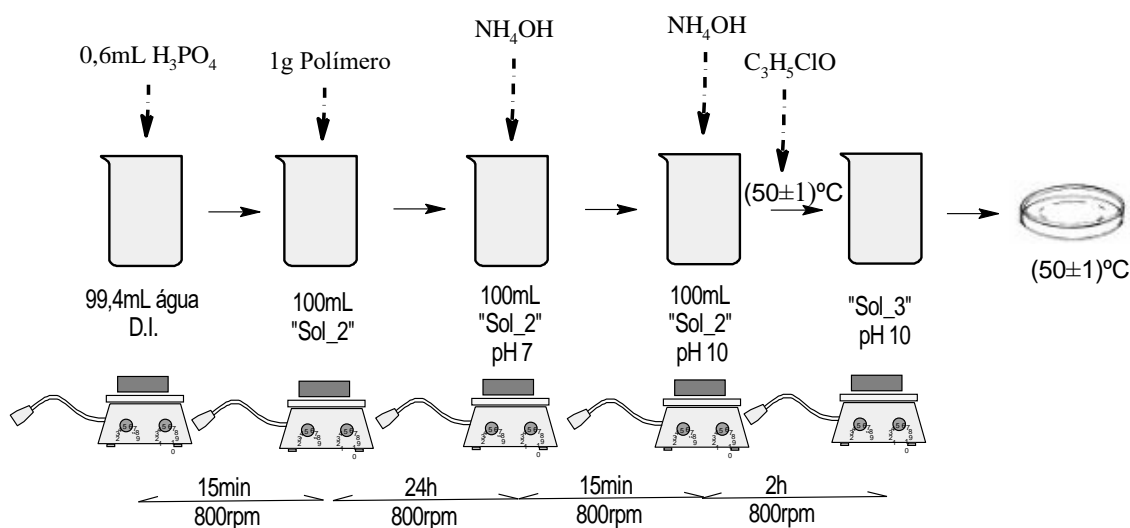


Figura 3.4 - Representação esquemática do processo de síntese dos filmes de quitosana com epiclorigrina. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.4 Preparação dos biocompósitos de quitosana (nHA/QUI)

Aproximadamente 1,1g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em pó foi adicionado a 10mL de água deionizada e sob agitação vigorosa durante 15min. Esta suspensão de cálcio foi referida como "SUS\_1". Em seguida, "SUS\_1" foi adicionada lentamente à "SOL\_2" para a reação de síntese e esta mistura ("SUS\_2") foi agitada magneticamente durante 15min. O pH foi



novamente corrigido para  $10,0 \pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e mantida sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

A SUS\_2 foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10mL da SUS\_2 filtrada foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$  por 24h. Os biocompósitos de quitosana resultantes foram referidos como nHA/QUI-ECH (Figura 3.5).

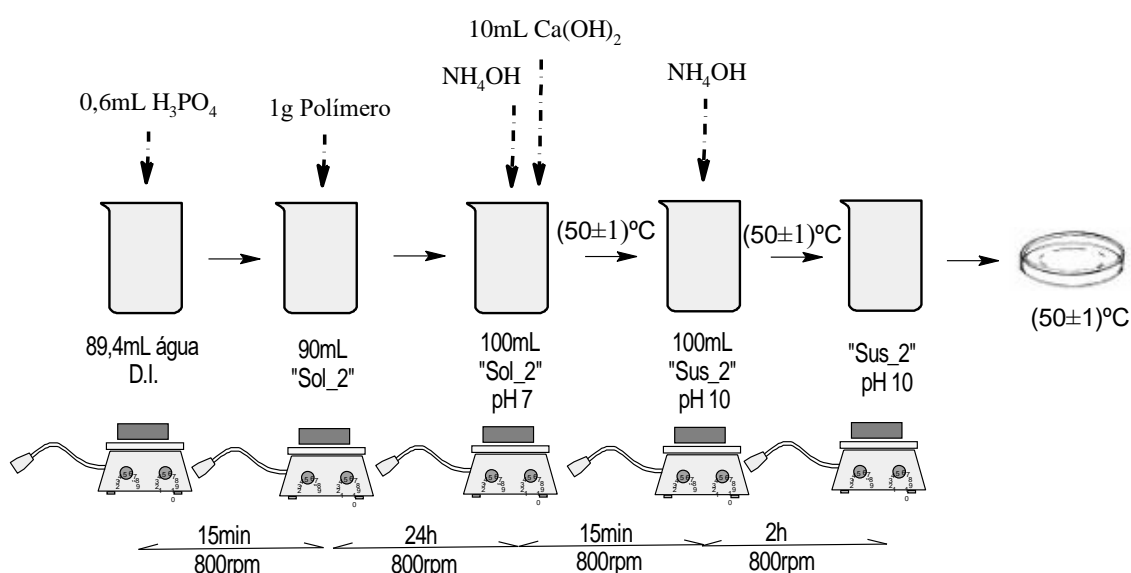


Figura 3.5 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de quitosana (nHA/QUI). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.5 Preparação dos biocompósitos de quitosana com epicloridrina (nHA/QUI-ECH)

Para a reação de síntese e esta mistura ("SUS\_3"), 0,08mL e 0,16mL de epicloridrina (ECH) foram lentamente adicionados a solução SUS\_2 para obter razões em massa de QUI/ECH de (1:0,1) e (1:0,2) ("SOL\_3"), respectivamente, e foram mantidas sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

A SUS\_3 foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10mL da SUS\_3 filtrada foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$  por 24h. Os biocompósitos de quitosana resultantes foram referidos como nHA/QUI-ECH (Figura 3.6).

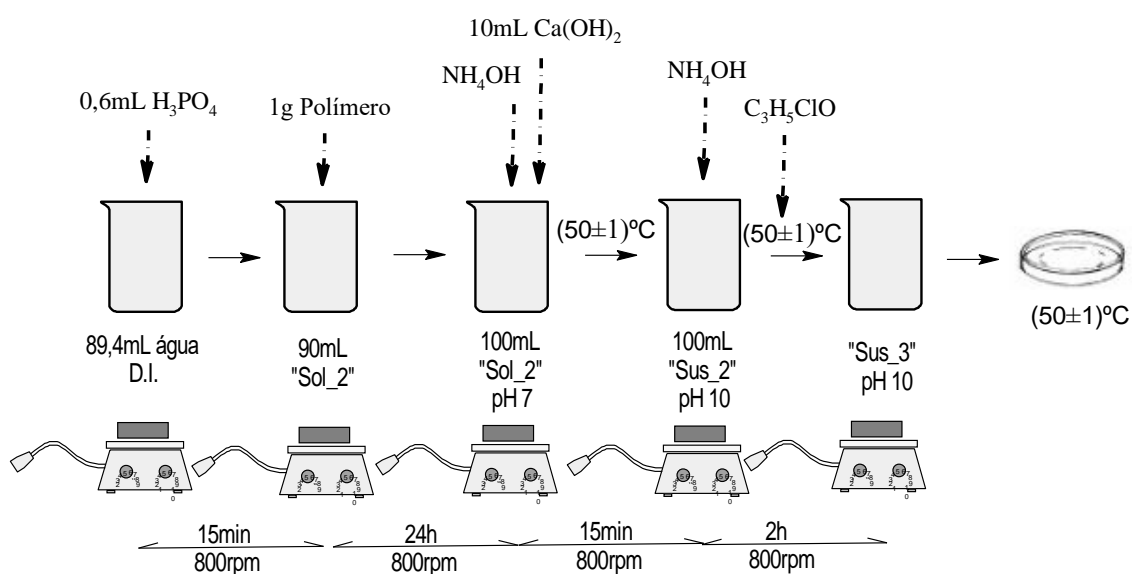


Figura 3.6 - Representação esquemática do processo de síntese dos biocompósitos de quitosana com epiclorigrina (nHA/QUI-ECH). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.6 Caracterizações dos filmes e biocompósitos

#### 3.2.6.1 Avaliação Quantitativa e Qualitativa

A avaliação qualitativa e dimensional dos filmes e biocompósitos foram executadas através de observações visuais levando-se em conta a coloração e textura superficial além de se verificar a espessura das amostras que foi obtida com um micrômetro Mitotoyo ( $\pm 10\mu\text{m}$ ).

As morfologias dos filmes e biocompósitos foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV, FEI-INSPECT<sup>TM</sup> S50) acoplada a espectrômetro de

energia dispersiva (EDS, EDAX GENESIS). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 15kV. Antes do exame as amostras foram revestidas com fina camada de carbono por aspersão usando baixa taxa de deposição, refrigeradas e assegurando uma máxima distância do alvo a fim de evitar danos às mesmas.

Os tamanhos e a distribuição do tamanho das partículas de HA foram obtidos a partir das imagens de MEV, medindo pelo menos 100 partículas selecionados aleatoriamente usando ImageJ (versão 1.50, National Institutes of Health).

### 3.2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras representativas foram obtidos conforme seção 2.2.7.1.8.

### 3.2.6.3 Difração de Raios-X (DRX)

Padrões de difração de raios-X (DRX) foram obtidos conforme seção 2.2.7.1.7.

### 3.2.6.4 Intumescimento

As amostras (n=5) foram recortadas nas dimensões de 10x10mm<sup>2</sup> e posteriormente foram secas em estufa (40±1)°C até atingir a estabilização da massa. As amostras foram colocadas em frascos de polietileno e imersas em solução de PBS (tampão fosfato salino) obedecendo à relação entre a área superficial e o volume de solução igual a 0,1cm<sup>-1</sup> (COSTA-JÚNIOR, 2009).

As amostras foram mantidas a (36±2)°C em banho-maria. Após os períodos de tempo (1, 3, 24, e 96 horas) as amostras foram retiradas do recipiente e pesadas. A fim de retirar o excesso de fluído as amostras foram colocadas rapidamente (<20s) sobre papel filtro e então pesadas em balança analítica (precisão de 0,0001g). Para reduzir o erro da pesagem, cada amostra foi pesada quatro vezes. O GI foi obtido conforme a Equação 3.1 (LIMA *et al.*, 2007; COSTA-JÚNIOR, 2008):

$$GI (\%) = (M_{SI} - M_{SF})/M_{SF} \times 100 \quad (\text{Eq.3.1})$$

onde  $M_{SI}$  é a massa intumescida e  $M_{SF}$  é a massa da amostra após a secagem final. Cada experimento foi repetido três vezes.

### 3.2.6.5 Degradação

Os ensaios de degradação foram conduzidos em amostras quitosana e quitosana reticuladas com epícloridrina em frações de 0,1% e 0,2% p/p. As amostras após cortadas ( $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ) foram pesadas, sendo realizadas seis medidas e adotando o valor das médias como a massa seca de equilíbrio.

Após esse procedimento as amostras foram mantidas por 24h em dessecador com sílica gel a vácuo, à temperatura de  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$  e pesadas. O valor medido após a estabilidade do peso das amostras foi definido como massa seca antes da imersão.

Em seguida as amostras foram imersas em PBS mantidas a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  em banho-maria pelos períodos de 1, 3, 24 e 96 h. Decorrido o tempo de imersão as amostras foram novamente secas em dessecador com sílica gel, sob vácuo à temperatura de  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ . A partir disso foram feitas medidas das massas, sendo esse procedimento repetido até que fosse atingida a condição de massa constante, valor definido como sendo a massa seca após a imersão. A perda de massa,  $\Delta M$ , foi calculada usando a Equação 3.2 (COSTA-JÚNIOR, 2008):

$$\Delta M(\%) = (M_{SI} - M_{SF})/M_{SI} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde  $M_{SI}$  é a massa seca antes da imersão na solução de degradação e  $M_{SF}$  é a massa seca após os períodos de imersão no meio de degradação. Cada experimento foi repetido três vezes.

### 3.2.3.6 Ângulo de contato

A avaliação da evolução do ângulo de contato com o teor de epícloridrina nos filmes de quitosana foi adaptada de MANSUR (2007) e feita entre as superfícies dos filmes e a água deionizada (18M $\Omega$ .cm). A medição do ângulo foi realizada utilizando-se o software IMAGEJ®, a partir do tratamento da imagem digitalizada da gota (volume=50 $\mu$ L) depositada sobre as superfícies dos filmes com microseringa. Todas as fotos foram realizadas dentro do tempo máximo de 1min, empregando-se uma câmera EOS REBEL T3/1100D CMOS 12,2 megapixels DIGIC 4 (CANON INC30-2, TOKYO, JAPÃO). As medições foram conduzidas em temperatura ambiente de (26 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C.

### 3.2.3.7 Propriedades Mecânicas

Análises de microscopia de força atômica (AFM) dos sistemas reticulados foram conduzidas usando MultiMode 8 AFM (Bruker) operando no modo Peak Force Tapping, utilizando uma ponta de nitreto de silício, K 0,4N/m, frequência de 70kHz e raio de curvatura de 2nm. O sistema foi calibrado pelo método absoluto e os valores de referência ajustados K=0,2427N/m, frequência de ressonância da ponta f=78KHz, e raio da ponta para r=9,8nm. Em seguida, o sistema foi testando com amostras padrão de PDMS-SOFT-1 e PDMS-SOFT-2, com módulos de elasticidade de 2,5 MPa e 3,5 MPa, respectivamente, sendo obtidos valores experimentais (RMS) de 3,28 MPa para a amostra de PDMS-SOFT-1 e 4,78MPa para a amostra de PDMS-SOFT-2. As imagens foram adquiridas com frequência de varredura de 2Hz e 128 linhas. A técnica *Quantitative NanoMechanical* foi utilizada para determinação dos parâmetros mecânicos. Os experimentos foram realizados a (20 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C.

### 3.2.3.8 Análise Estatística

Para validação dos resultados do intumescimento, degradação e ângulo de contato, após a realização do teste de normalidade (Shapiro-Wilk), foi aplicado um teste estatístico paramétrico ANOVA e *post hoc* TUKEY para verificar diferenças entre os grupos utilizando o Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versão 17.0, SPSS Inc., USA). Para os resultados dos ensaios de toxicidade foi aplicado um teste estatístico ANOVA e *post hoc* BONFERRONI, utilizando o *software* Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As análises estatísticas dos dados foram realizadas com nível de significância de 95%.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSAO

#### 3.3.1 Caracterizações dos filmes

Os filmes produzidos foram analisados por avaliação qualitativa e quantitativa, por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), intumescimento, degradação e ângulo de contato.

##### 3.3.1.1 Avaliação qualitativa e quantitativa

A utilização da epícloridrina como agente de reticulação do sistema polimérico promoveu significativa influência nos aspectos visuais e na espessura ( $\mu\text{m}$ ) dos filmes sintetizados (Figuras 3.7(A), 3.8(A) e 3.9(A)). Os filmes poliméricos puros apresentaram características opticamente transparentes à luz visível, uniformes sem rugosidade superficial e os modificados com epícloridrina, se tornaram opacos e ligeiramente esbranquiçados. Em moléculas orgânicas, geralmente é a conjugação de ligações duplas e simples que gera mudança estrutural que por consequência altera o aspecto visual das substâncias. As diferenças nas interações da epícloridrina com os ligantes poliméricos podem ter ajudado à ocorrência de reflexão de uma parte da luz em diferentes comprimentos de onda promovendo variações na coloração dos filmes.

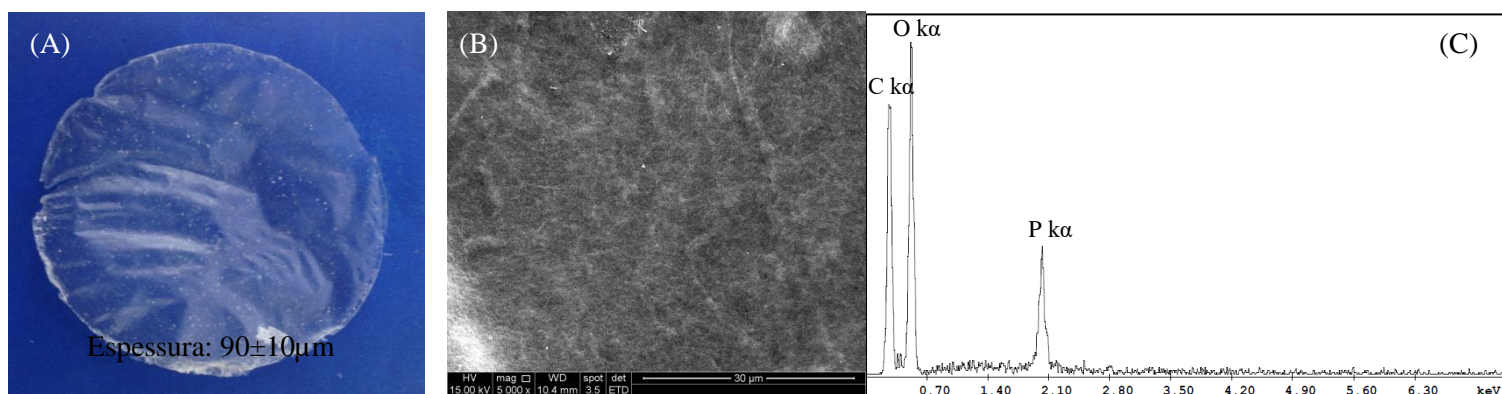


Figura 3.7 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI. Fonte: Elaborado pelo autor.

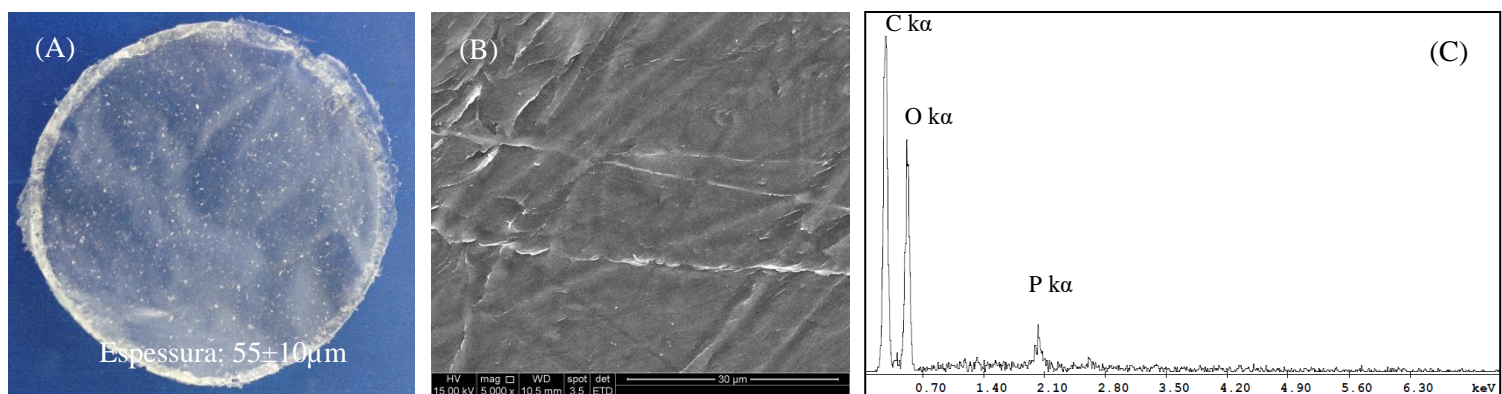


Figura 3.8 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI/ECH (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.

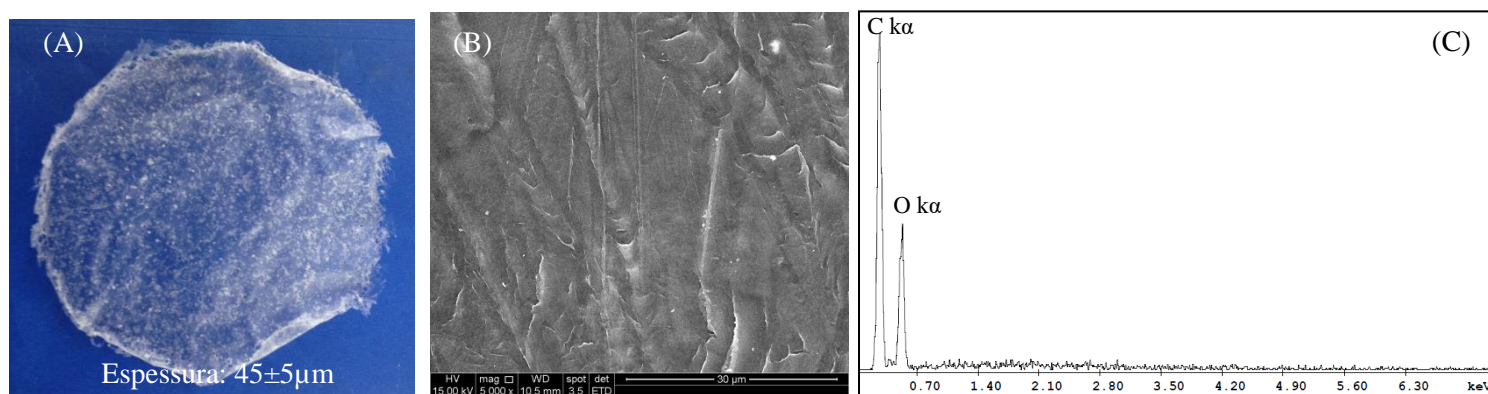


Figura 3.9 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV e (C) Espectro de EDS dos filmes de QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.

A quitosana é um polissacarídeo biopolimérico que pode apresentar estrutura primária com presença de grupos orgânicos hidroxila, amino e amida, que permitem obter mudanças de cargas ao longo da cadeia polimérica (MILAS, 1991). O processo de reticulação das cadeias poliméricas, também chamados de entrecruzamento de reação é de um tipo de modificação química, que combina cadeias poliméricas para gerar redes poliméricas (GONSALVES *et al.*, 2011). Neste estudo, a Epicloridrina (ECH) foi utilizada em decorrência do seu potencial de acoplamento que possibilita a formação de ligações cruzadas polissacárideas e poliaminas (O'CONNOR *et al.*, 2015). Nos filmes de quitosana reticulados (QUI-ECH), o emprego da epicloridrina (haleto de epóxi-alkila) na reticulação das cadeias é iniciado com uma reação de eliminação do haleto, seguida da abertura do epóxido, com consequente formação do entrecruzamento com os grupamentos funcionais da quitosana (Figura 3.10). As modificações nestes grupos podem ter favorecido uma menor adsorção de solvente intracadeia polimérica durante a síntese em decorrência de variações na hidrofiliabilidade dos sistemas, ocasionando a formação de filmes com menor espessura.

Além disso, a quitosana apresenta aplicações limitadas por problemas de hidrossolubilidade em água em meio neutro, condição necessária para aplicações como biomateriais, condições em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade (KUBOTA, *et al.*, 2000) e soluções aquosas alcalinas,  $\text{pH} > 7,0$ . Assim, as sínteses de modificações químicas na estrutura primária da quitosana permite suas aplicações em grande faixa de pH.



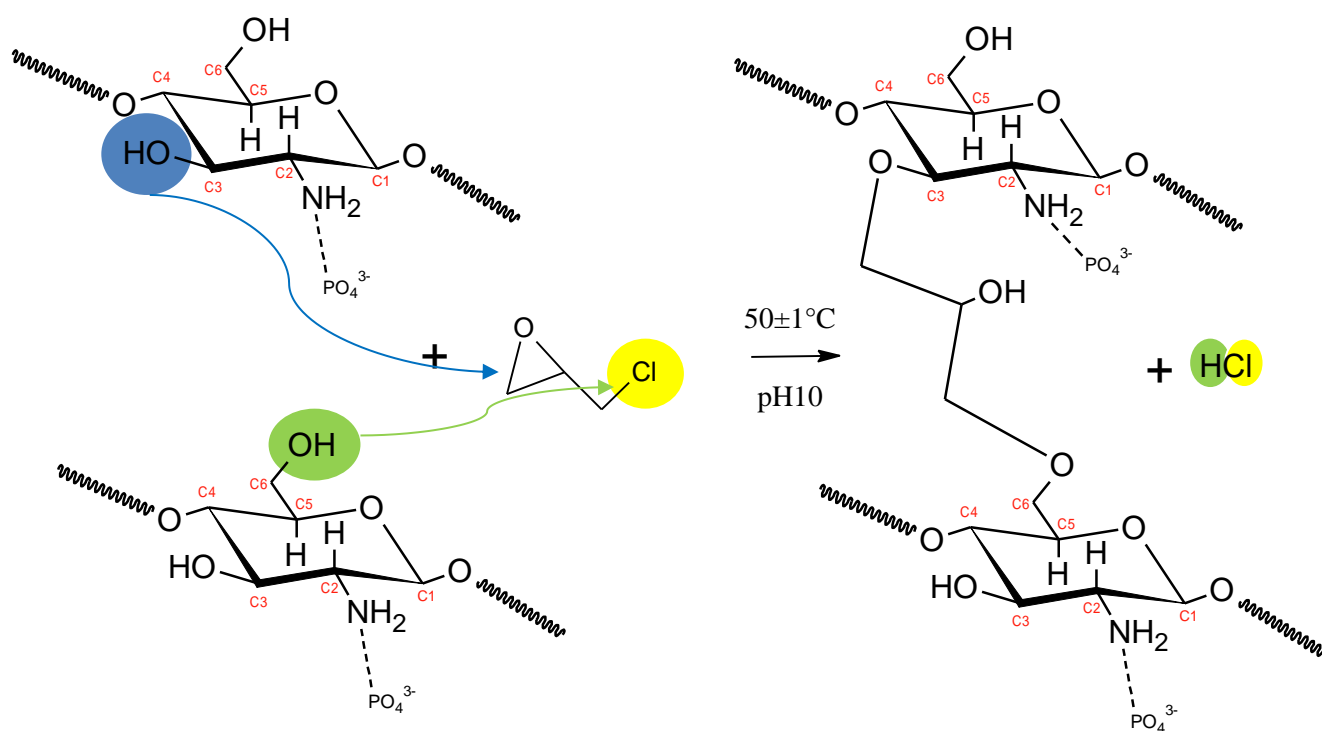


Figura 3.10 - Esquema de síntese da quitosana reticulada com epícloridrina em pH 10 à  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ . Fonte: Adaptado do SILVA *et al.*, 2010, JAWAD e NAWI, 2012.

As avaliações morfológicas das amostras por MEV confirmam a análise visual das amostras (Figuras 3.7(B), 3.8(B) e 3.9(B)), apresentando considerável heterogeneidade e maior rugosidade da superfície para as extensões utilizadas.

Os espectros de EDS característicos dos filmes estão apresentados nas Figuras 3.7(C), 3.8(C) e 3.9(C)) apresentando picos associados ao elemento P característico do ácido ortofosfórico utilizado na síntese das amostras.

### 3.3.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

No espectro de infravermelho obtido da quitosana, Figura 3.11, pode-se observar entre  $3200\text{-}3400\text{cm}^{-1}$  a banda do estiramento das hidroxilas em resposta a ocorrência das ligações de hidrogênio intermolecular (ZIVANOVIC *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013). Identificam-se também, as bandas de estiramento do grupo CH presente na cadeia alquílica correspondente as vibrações simétricas e assimétricas entre  $2840\text{ e }3000\text{cm}^{-1}$ .

Além disso, na banda característica da deformação angular do  $\text{CH}_2$  (tesoura) é observado o pico em  $1424\text{cm}^{-1}$  (SANTOS *et al.*, 2013). Identifica-se o modo assimétrico do  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$  no intervalo de  $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ , e as absorções a  $1030\text{-}1040\text{cm}^{-1}$  e  $1060\text{-}1100\text{cm}^{-1}$  que indicam as bandas de estiramento do grupo C-O na quitosana associadas às hidroxila primária do  $\text{C}_6\text{-OH}$  e hidroxila secundária  $\text{C}_3\text{-OH}$ , respectivamente (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009; MANSUR *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013). Esta banda  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$  e a banda de vibração  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  em  $963\text{cm}^{-1}$  estão associadas a solubilização da quitosana em solução de ácido orto-fosfórico. A banda em  $1320\text{cm}^{-1}$  esta associada com a ligação  $\text{-CN}$  (Amida III) e as vibrações em  $1150\text{cm}^{-1}$  e  $950\text{cm}^{-1}$  são contribuições do C-O-C (SANTOS *et al.*, 2013). As bandas de absorção em  $1638\text{cm}^{-1}$  e  $1552\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento assimétrico da carbonila dos grupos das amidas secundárias e dobramento da ligação N-H na amina primária ( $\text{-NH}_2$ ) e amida II, respectivamente (RIVA *et al.*, 2011).

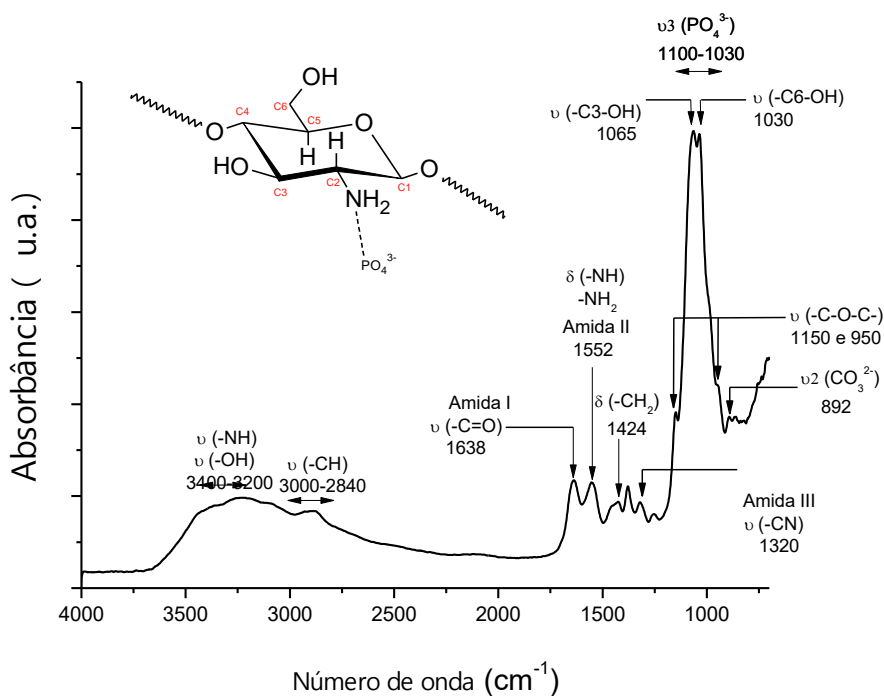


Figura 3.11 – Espectro de FTIR Quitosana em pH 10 à  $50\pm 1^\circ\text{C}$ . Detalhe: Estrutura da quitosana em ácido ortofosfórico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de quitosana modificada com epícloridrina (1:0,1) e (1:0,2) estão mostrados na Figura 4.12. Observa-se um aumento das bandas em  $3200\text{-}3400\text{cm}^{-1}$  nos sistemas reticulados em resposta às interações químicas da quitosana com a epícloridrina formando grupo químico éter (Detalhe da

Figura 3.12) corroborando com os resultados de ANDRADE (2012) que atribui a banda em  $3400\text{cm}^{-1}$  ao estiramento OH.

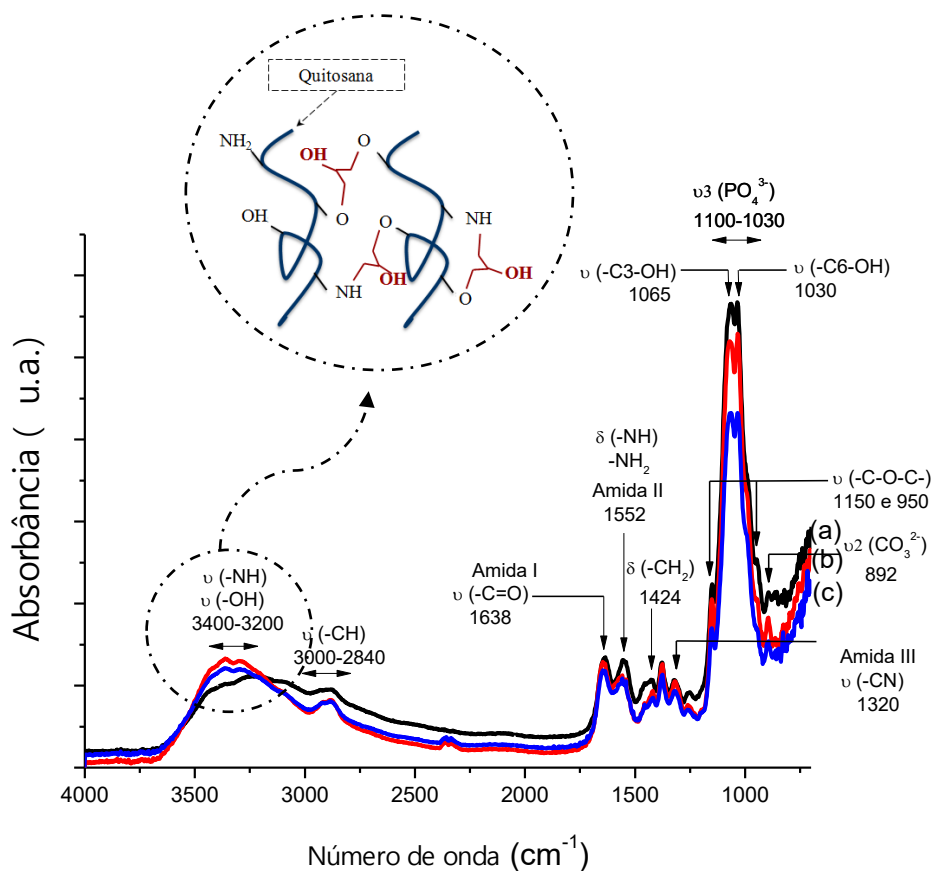


Figura 3.12 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à  $50\pm 1^\circ\text{C}$ . Detalhe: Esquema ilustrativo da quitosana modificada com epícloridrina. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 3.13 ilustra uma significativa redução de  $75\pm 5\%$  da banda em  $3400\text{cm}^{-1}$  no sistema não reticulado calculado pela razão entre as intensidades das bandas  $3400\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.13(Detalhe)) confirmando a interação da quitosana com epícloridrina aumentando as hidroxilas nos sistemas.



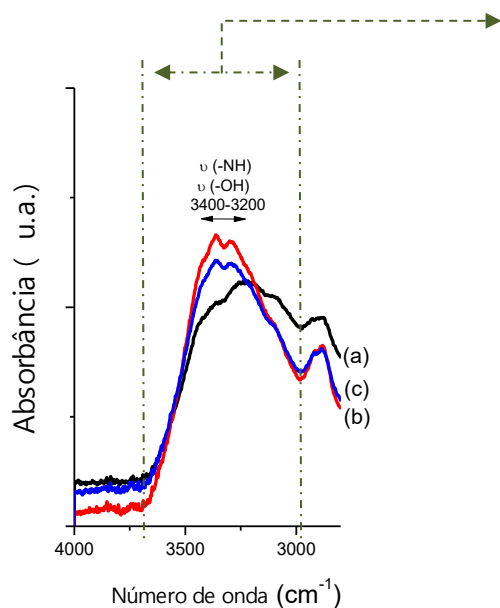


Figura 3.13 – Espectro de FTIR das amostras QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à  $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$  na região de vibração:  $2800$  a  $4000\text{cm}^{-1}$ . Detalhe: Razão entre as intensidades das bandas  $3400\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma alteração significativa também foi observada na região entre  $1000$  e  $1200\text{cm}^{-1}$  nos filmes reticulados, que foi essencialmente associada com grupos  $-\text{OH}$  do álcool primário C6-OH e do álcool secundário C3-OH da quitosana (Figura 3.14). Em temperaturas acima de  $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ , a epícloridrina apresenta a vantagem de reagir, preferencialmente, pelos grupos hidroxilas deixando os grupamentos amino mais susceptíveis às interações químicas com as partículas de fosfato de cálcio e com o tecido ósseo (SILVA *et al.*, 2010; GONSALVES *et al.*, 2011; ALTOMARE *et al.*, 2014). Assim, a diminuição de  $76\pm 2\%$  na intensidade das bandas dos sistemas reticulados (Detalhes da Figura 3.14) calculado pela razão entre as intensidades das bandas  $1065$  e  $1030\text{cm}^{-1}$  com a banda  $1424\text{cm}^{-1}$  pode estar associada com a formação da ligação covalente, entre a hidroxila da quitosana com o grupo funcional da epícloridrina.

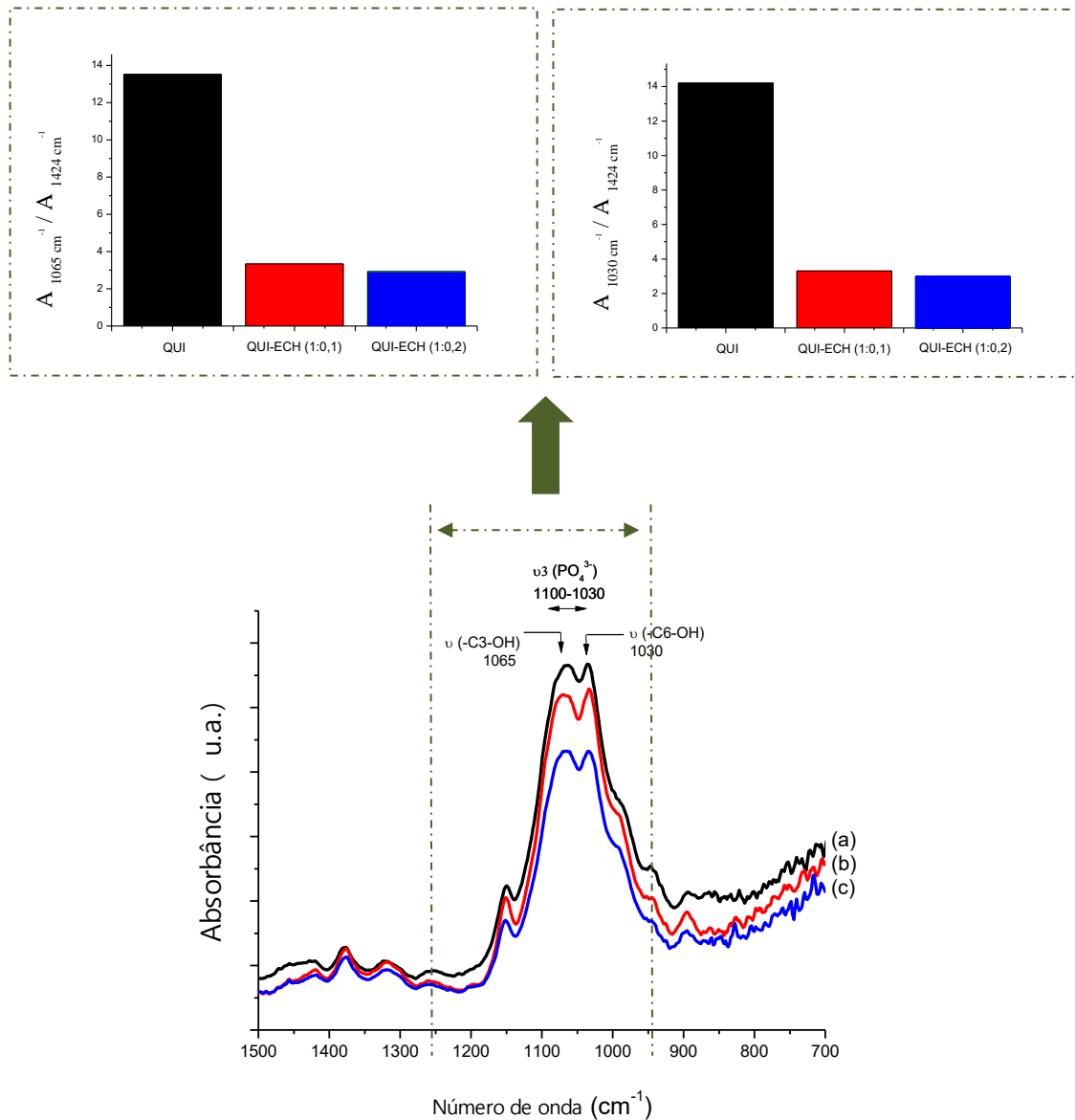


Figura 3.14 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  na região de vibração:  $950$  a  $1150\text{cm}^{-1}$ . Detalhes: Razões entre as intensidades das bandas  $1065\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$  e  $1030\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

A síntese de filmes sob condições alcalinas ( $\text{pK}_a < \text{pH}$ ) promove desprotonação dos grupos amina da quitosana ( $\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$ ), entretanto observa-se que o processo de síntese realizado nesta faixa de pH ( $10 \pm 0,1$ ) não dificultou a interação química do grupamento amina da quitosana com a epiclоридrina. Neste contexto, foram observadas variações nas bandas de absorção em  $1552 \text{ cm}^{-1}$  nos sistemas reticulados atribuída ao grupamento  $\text{O}=\text{C}-\text{O}$  (Figura 3.15) corroborando com os resultados de TORRES e colaboradores (2005).

Identificou-se uma redução de  $79 \pm 0,1\%$  na intensidade desta banda nos sistemas reticulados calculada pela razão entre as intensidades das bandas  $1552\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$  (Detalhe da Figura 3.15).

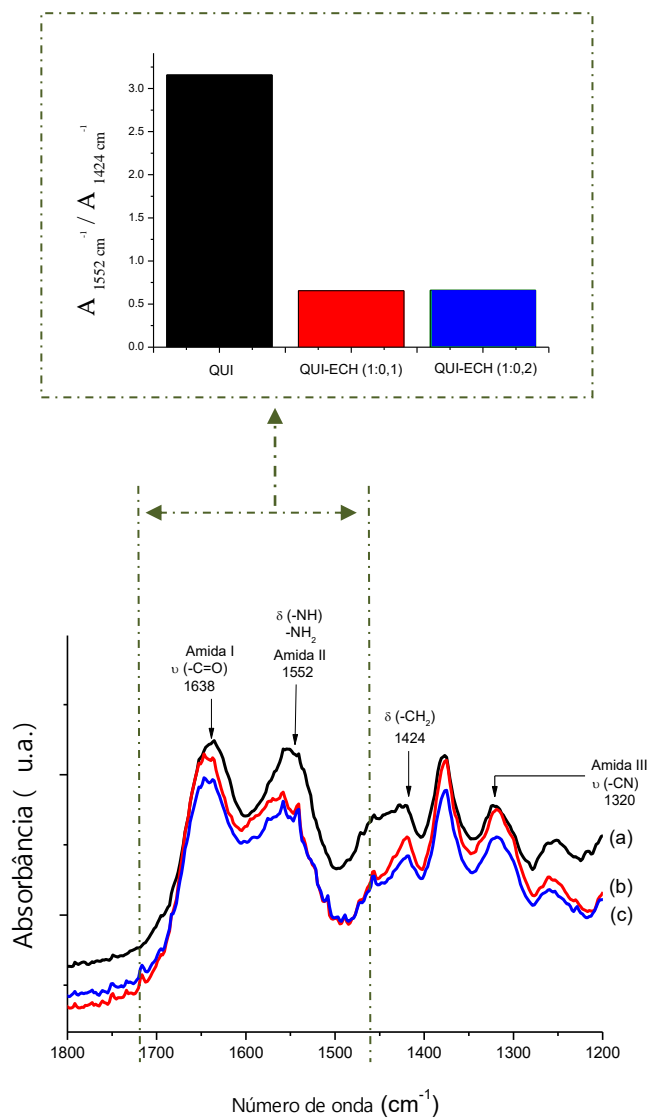


Figura 3.15 – Espectro de FTIR das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$  na região de vibração:  $1400$  a  $1600\text{cm}^{-1}$ . Detalhe: Razão entre as intensidades das bandas  $1552\text{cm}^{-1}/1424\text{cm}^{-1}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.1.3 Intumescimento

As propriedades hidrofílicas dos filmes obtidos foram estudadas por medidas de intumescimento (GI) em função do tempo. O intumescimento é descrito como aumento do volume do polímero quando este está imerso em um determinado solvente, ou também pode ser determinado a partir da quantidade de massa do fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial (RATNER, 1993; CAMPOS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007).

A habilidade de absorção e retenção de fluídos é fator importante para materiais implantáveis, pois permite a absorção de fluídos corpóreos e a transferência de metabólitos e nutrientes (OLIVEIRA, 2013). Entretanto, a elevada taxa de intumescimento favorece a redução da estabilidade estrutural e acelera a degradação do polímero (THEIN-HAN e KITTYANANT, 2007).

Segundo MEI e colaboradores (1995), o grau de intumescimento depende da interação polímero-solvente e do grau de reticulação do polímero. No presente estudo, os resultados estatísticos mostraram que houve diferença significativa entre os grupos reticulados e não reticulados (teste tukey,  $p < 0,05$ ), sendo que os filmes de quitosana apresentaram maiores capacidade de retenção de fluído pelas cadeias hidrofóbicas em todos os intervalos de tempo analisados (Figura 3.16). Importante ressaltar, conforme descrito por PEPPAS (2000), a proporção de ligações cruzadas foi fator importante nos resultados de intumescimento.

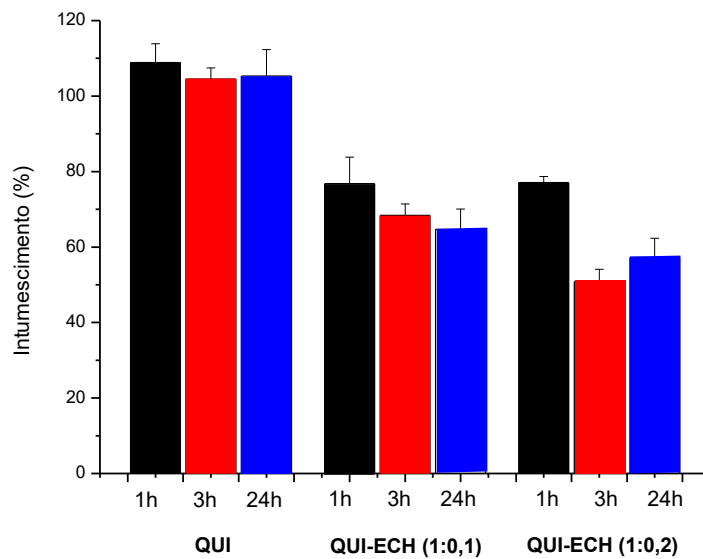


Figura 3.16 – Histograma de Intumescimento (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,3h e 24h) à  $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ .  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados mostraram um aumento acentuado do intumescimento dos filmes na primeira hora e em seguida um ligeiro decaimento nos valores médios de absorção dos fluídos (Figura 3.17 (a)). Os valores de intumescimento, em 1h, para a quitosana pura chegaram a aproximadamente  $108\pm 5\%$  enquanto os reticulados com epiclorigrina a  $77\pm 1\%$ . Observa-se que os polímeros atingiram estabilidade de intumescimento em 24h. Após 96h, os valores médios de intumescimento após equilíbrio foi de  $104\pm 4$ ,  $60\pm 2$  e  $59\pm 4\%$  para os filmes de quitosana, quitosana com epiclorigrina (1:0,1) e (1:0,2), respectivamente (Figura 3.17 (b)). A reticulação dos sistemas apesar de aumentar o número de grupamentos hidroxilas e melhorar a hidroflicidade como comprovado posteriormente na análise de ângulos de contato; observa-se que menores taxas de intumescimento nos materiais reticulados; sugere-se que o aumento das ligações cruzadas promoveram diminuição na mobilidade das cadeias poliméricas o que pode ter promovido uma menor adsorção de líquido para o interior da rede polimérica.



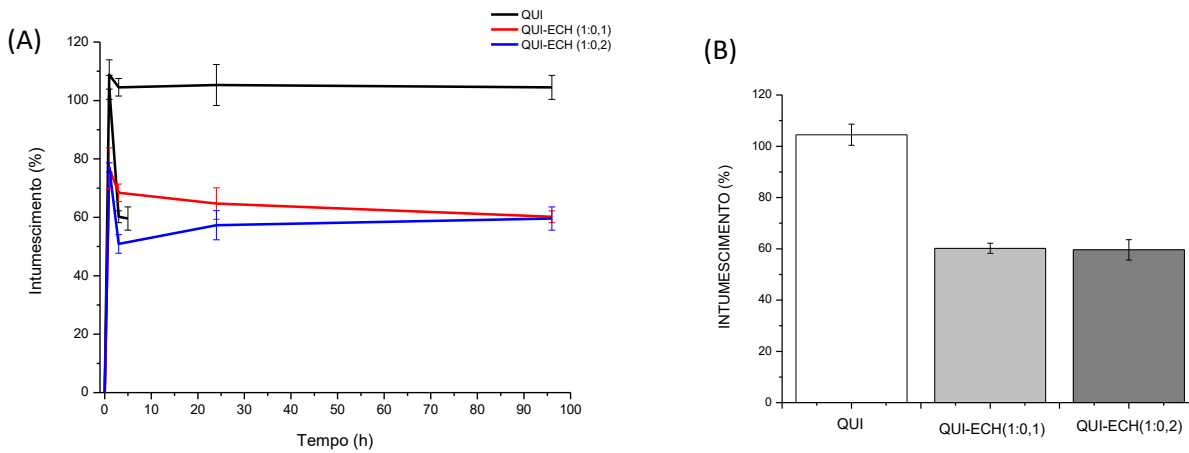


Figura 3.17 – Gráfico de Intumescimento (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,3h,24h e 96h)(A) e após 96h (B) à  $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 3.3.1.4 Degradação

Segundo COSTA-JUNIOR (2008), degradação é o processo onde a deterioração nas propriedades do polímero em resultado a atividades químicas como solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise e dissolução. Neste estudo, a perda de massa do polímero ocorre primeiramente por um processo de solvatação sendo que nos filmes de quitosana não reticulados ocorre maior despolimerização das cadeias (teste Tukey,  $p < 0,05$ ). A Figura 3.18 apresenta o comportamento de degradação correspondente aos filmes não reticulados e reticulados. Observa-se que a epicloridrina diminuiu a degradação dos filmes em PBS sugerindo maior interação das cadeias poliméricas em resposta a elevada densidade de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas.

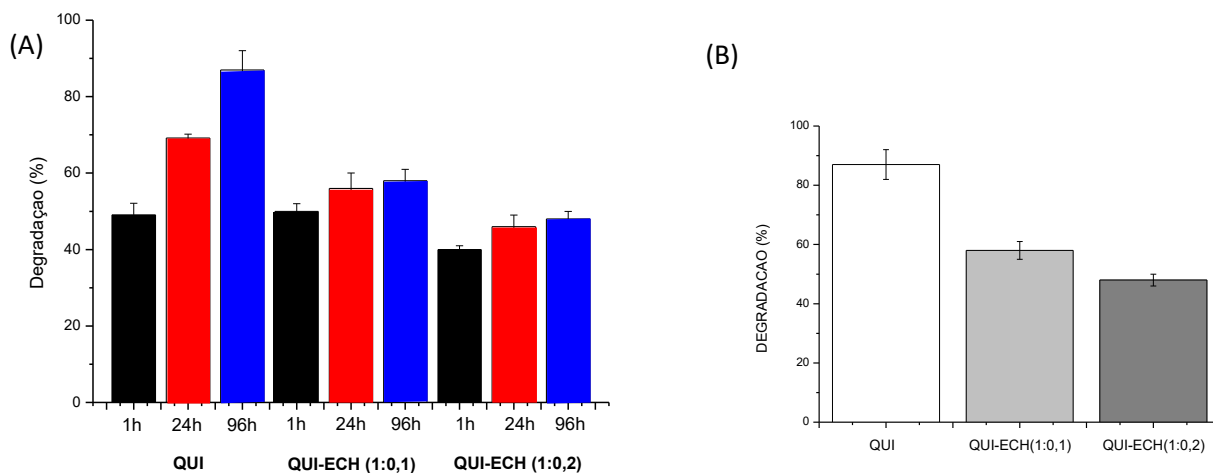


Figura 3.18 – Histograma de Degradação (%) das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h,24h e 96h) (A) e após 96h (B) à (36±2)°C. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 3.18 mostra que em todos os filmes sintetizados ocorre aumento na degradação em função do tempo. Os valores de degradação, em 1 hora, para a quitosana pura chegaram a aproximadamente 49±3% enquanto os reticulados com epicloridrina (1:0,1) e (1:0,2) apresentaram valores de 50±2% e 40±1%, respectivamente. Observa-se que os polímeros reticulados apresentaram estabilidade de degradação em 24h. Após 96h, os valores médios de degradação (%) foram de 87±5, 58±3 e 48±2 para os filmes de quitosana, quitosana com epicloridrina (1:0,1) e (1:0,2), respectivamente. Os resultados sugerem que o processo de reticulação é efetivo em ampliar a estabilidade da quitosana, propondo que uma maior quantidade de agente reticulante na faixa estudada diminui a permeabilidade dos sistemas em decorrência de alterações na hidrofiliabilidade devido diminuição de grupamentos químicos disponíveis para interação com as moléculas do fluido.

### 3.3.1.5 Ângulo de Contato

A Figura 3.19 apresenta os resultados de ângulo de contato mostrando que a reticulação dos sistemas com epicloridrina foi eficaz na modificação da molhabilidade dos filmes sintetizados. Observa-se menor molhabilidade dos filmes de quitosana puro em relação aos filmes reticulados, que é confirmada pela diminuição significativa do ângulo de

contato com o crescente teor de agente reticulante ( $p < 0,05$ ). Como mencionado anteriormente, a reação de reticulação promove um aumento dos grupamentos hidroxilas disponíveis no sistema indicando um aumento na hidrofiliicidade da superfície (JAYASEKARA *et al.*, 2004; COSTA-JÚNIOR, 2008).

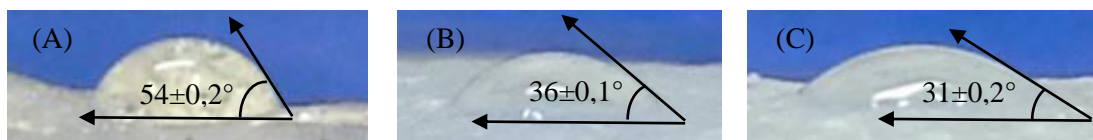


Figura 3.19 – Ângulo de contato das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c). Fonte: Elaborado pelo autor.

Desta forma, uma das maneiras de se avaliar qualitativamente a hidrofiliicidade de um sistema polimérico é através da determinação de seu ângulo de contato, que é uma medida de “molhabilidade” de uma superfície. Um dos métodos de determinação de ângulo de contato mais bem aceitos na literatura é a medição estática, caracterizada pela deposição vertical de uma gota do líquido sobre uma superfície sólida. Quando a gota desliza sobre a superfície, existe uma resistência de escoamento sobre a área seca. Como consequência, tem-se um aumento do ângulo de contato na extremidade de avanço da gota (ZHANG *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1990; NOGUEIRA, 2012).

### 3.3.1.6 Propriedades Mecânicas

A composição dos filmes em grande parte influencia a suas propriedades mecânicas, sendo que a reticulação é um processo baseado na interligação de cadeias poliméricas através de reações físicas e químicas capazes de gerar redes poliméricas bi ou tridimensionais mais rígidas (BERGER, 2004). O processo de reticulação das cadeias poliméricas dos sistemas avaliados, também denominado de reação de entrecruzamento, também pode ser confirmado pelas análises por AFM. Utilizando o *PeakForce Quantitative NanoMechanical* (QNM®) foi possível mapear e distinguir entre as propriedades nanomecânicas, incluindo módulo, aderência, dissipação e deformação, ao mesmo tempo que foram confeccionadas imagens da topografia das amostras (Figuras 4.20 a 4.23)(Tabela 3.1). Diferença significativa estatisticamente significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) foi observada entre os valores médios do módulo de elasticidade dos filmes de

QUI/ECH (1:0,2)(47±3MPa) em relação aos QUI (29±2MPa) e QUI/ECH (1:0,1) (26±1MPa) (Figura 3.20). Os valores médios de dissipação (Figura 3.21) e deformação (Figura 3.22) propõem uma maior rigidez dos sistemas reticulados em relação ao grupo controle (QUI).

Tabela 3.1 – Valores médios das propriedades mecânicas dos filmes mensuradas por AFM.

| Amostras        | Módulo de Elasticidade (MPa) | Deformação (nm) | Dissipação (KeV) |
|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------|
| QUI             | 29±2                         | 29±2            | 5,5±0,2          |
| QUI/ECH (1:0,1) | 26±1                         | 9,6±1           | 3,5±0,1          |
| QUI/ECH (1:0,2) | 47±3                         | 9,2±1           | 2,8±0,2          |

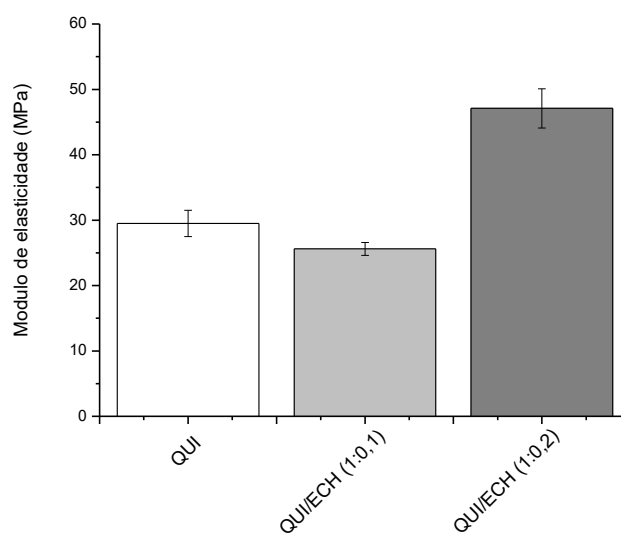


Figura 3.20 – Valores médios do Módulo de Elasticidade (ME), em MPa, das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.

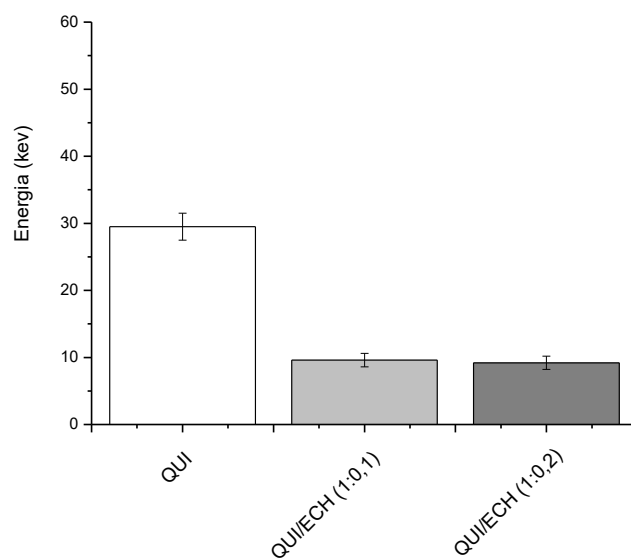


Figura 3.21 – Valores médios da Dissipação (MDi), em KeV, das amostras de QUI, QUI/ECH (1:0,1) e QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.

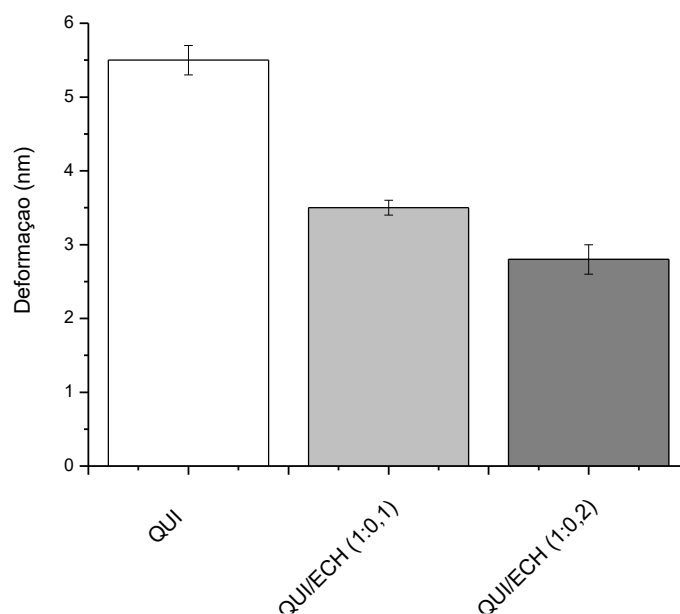


Figura 3.22 – Valores médios da Deformação (MDe), em nm, das amostras de QUI (a), QUI/ECH (1:0,1)(b) e QUI/ECH (1:0,2)(c). Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa técnica apresenta caráter não destrutivo tanto para a ponta como para a amostra, uma vez que é possível controlar de forma direta as forças da sonda. O módulo de elasticidade é determinado pelo ajuste da curva de retração (DERJAGUIN *et al.*, 1975; ADAMCIK *et al.*, 2011). A deformação é determinada pela máxima deformação que a ponta causa na

amostra. A dissipação é obtida por integração da área entre as curvas de traço e retraço. A força de adesão é determinada como o valor máximo entre a linha de base e o valor mínimo da curva. As análises foram realizadas utilizando o software *Nanoscope analysis* 8.5.

As propriedades mecânicas dos polímeros são dependentes da mobilidade molecular que é influenciada pela natureza química das macromoléculas, pela presença ou não de ramificações e de ligações cruzadas. Sendo que este comportamento mecânico é caracterizado pela resposta que estes sistemas apresentam quando submetidos à tensão ou deformação. Os polímeros apresentam um comportamento intermédio entre o de um sólido elástico, Hookeano, e de um líquido viscoso, Newtoniano, apresentando comportamento viscoelástico (WASILKOSKI, 2006). Neste contexto, observa-se que as reticulações possibilitaram a formação de estruturas poliméricas muito ramificadas e com maior coesão intermolecular garantida por ligações químicas fortes, diminuindo significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) os valores da deformação e da dissipação nos sistemas reticulados em aproximadamente 68% e 40%, respectivamente.

Observa-se também uma diferença significativa quanto ao módulo de elasticidade à medida que aumenta se a concentração do agente reticulante, a epiclorigidrina. O aumento na concentração de epiclorigidrina nos sistemas para 20% pode ter promovido uma reticulação heterógena nas amostras, ou seja, ocorreu uma reticulação não uniforme da cadeia polimérica precipiciando o surgimento de regiões com maior interação das moléculas em detrimento de outras da amostra modificando assim o comportamento do polímero no ensaio mecânico, que apresenta então um aumento estatisticamente significativo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) de 160% no valor do módulo de elasticidade deste sistema.

### 3.3.2 Caracterizações dos biocompósitos

Para o desenvolvimento de novos biocompósitos, antes de sua aplicação, é necessário um estudo da estrutura e também das suas propriedades a fim de se entender as interações e as modificações resultantes da incorporação de diferentes compostos na matriz polimérica. Neste contexto, os biocompósitos sintetizados foram analisados por avaliação

qualitativa e quantitativa, por difração de Raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), intumescimento e degradação.

### 3.3.2.1 Avaliação qualitativa e quantitativa

Os biocompósitos foram obtidos pela secagem em temperatura ( $50\pm 1$ ) °C e o pH da suspensão foi ajustado para aproximadamente 10 pela adição de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) eliminando a influência destas variáveis sob as características das amostras. No capítulo II foi realizada uma descrição detalhada sobre a influência dos ligantes poliméricos no processo de nucleação e crescimento das partículas de HA nos sistemas envolvidos, assim, o que justifica a significativa diferença observada no tamanho médio das partículas em relação aos biocompósitos. Entretanto, identifica-se também que a adição da epiclорidrina promoveu forte influência na precipitação das partículas de HA acentuando a diminuição no tamanho das mesmas (Figuras 3.23, 3.24 e 3.25). O processo de reticulação permitiu a síntese de biocompósitos mais compactos, homogêneos, menos flexíveis e maior lisura superficial sugerindo uma maior interação química dos componentes.

Os espectros de EDS apresentaram picos de Ca e P elementos atribuídos as nanopartículas de HA como identificado nas figuras 3.23, 3.24 e 3.25, com uma relação molar (Ca/P) média igual a  $1,7\pm 0,2$ , de acordo com a razão estequiométrica teórica de HA. Além disso, as análises de mapeamento do Ca- $K\alpha$  revelaram que as partículas de HA estão uniformemente dispersas na matriz dos compósitos sem a detecção de qualquer segregação.

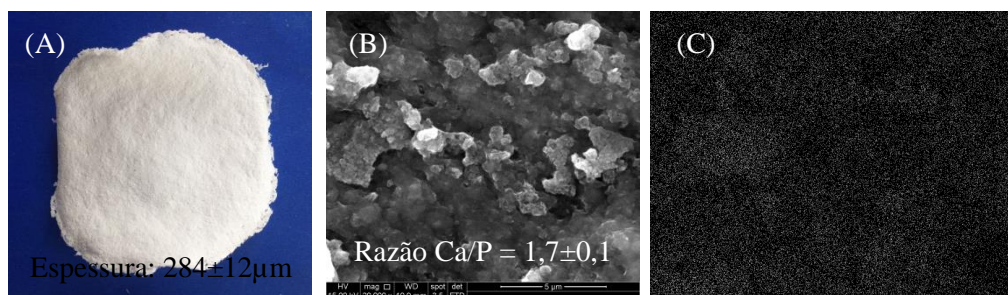


Figura 3.23 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca-K $\alpha$  nos biocompósitos de QUI (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.

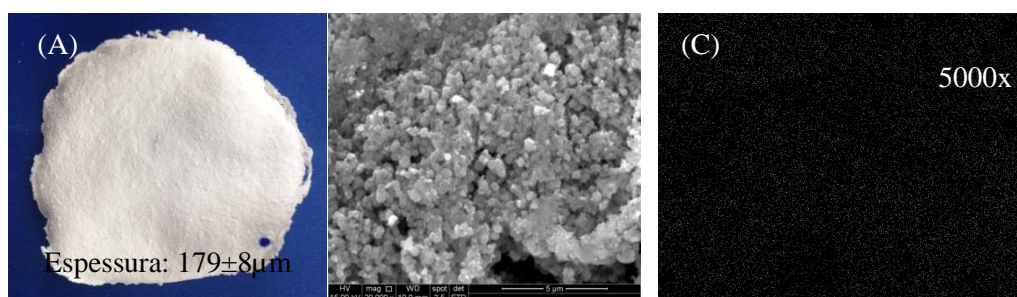


Figura 3.24 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca-K $\alpha$  nos biocompósitos de QUI/ECH (1:0,1). Fonte: Elaborado pelo autor.

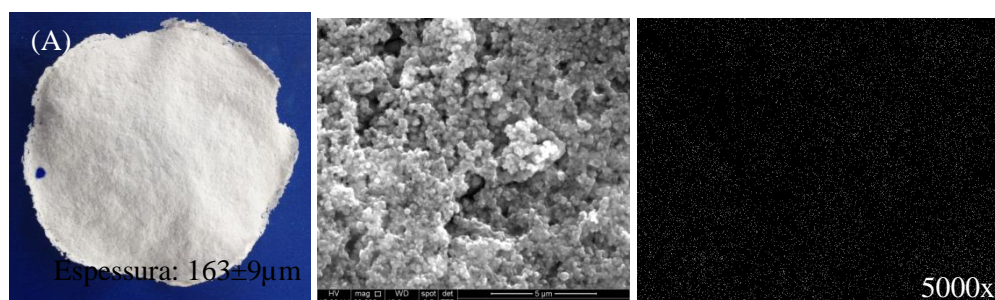


Figura 3.25 – (A) Imagem digital (Detalhe: espessura ( $\mu\text{m}$ )), (B) Imagem de MEV (Detalhe: Razão Ca/P) e (C) Mapeamento de imagem do elemento Ca-K $\alpha$  nos biocompósitos de QUI/ECH (1:0,2). Fonte: Elaborado pelo autor.

Para melhor avaliar o efeito do reticulante sobre a formação das partículas nHA, imagens de MEV foram analisados usando o programa de processamento de imagem (*ImageJ*, versão 1.44, domínio público, *National Institutes of Health*), e as distribuições de



tamanho das partículas foram calculadas sobre 100 medições das partículas selecionadas aleatoriamente. Diferenças estatisticamente significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ) na distribuição de tamanho das nHA produzidas foram observadas (Figura 3.26), com os tamanhos médios de  $212 \pm 8$  nm (sem reticulante),  $185 \pm 20$  nm (ECH (1:0,1)) e  $167 \pm 13$  nm (ECH (1:0,2)). Estes resultados demonstram o efeito o agente reticulante dificultou o processo de formação das nanopartículas de HA possivelmente devido à pequena mobilidade da cadeia polimérica impossibilitando o crescimento das mesmas. Observa-se que a adição de ECH (1:0,1) causou uma redução relativa de 12%, a ECH (1:0,2) causou uma redução de 21% em comparação as partículas precipitadas sem o reticulante.

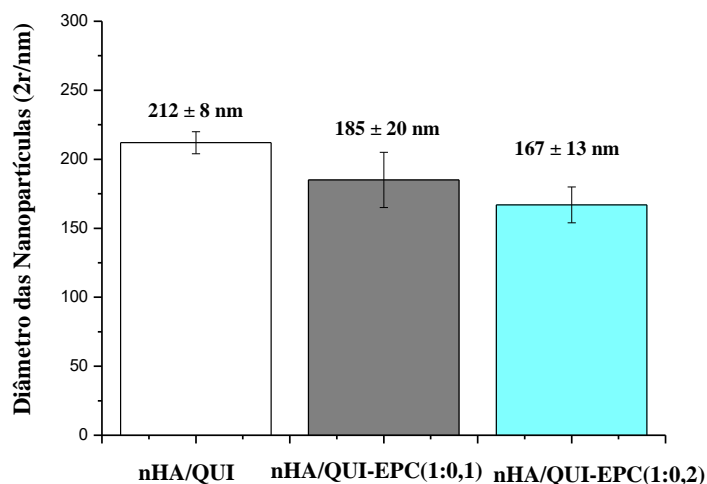


Figura 3.26 – Histograma do tamanho médio das partículas de HA nos sistemas. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raio-X das amostras de nHA/QUI, nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) sintetizados em valores de  $\text{pH}=10$  apresentam picos bem definidos com perfis semelhantes (FIGURA 3.27). As partículas CaP sintetizadas apresentaram os picos característicos principais de HA em  $2\theta$  iguais a  $31,7^\circ$  (211),  $32,8^\circ$  (300),  $32,2^\circ$  (112), e  $25,9^\circ$  (002), entre outros picos de menores intensidades (*International Centre for Diffraction Data, JCPDS 86- 1203*). Foram observados também, três picos associados a fase do  $\beta$  fosfato de tricálcio ( $\beta$ -TCP) foram detectados em  $2\theta$  iguais a  $28,0^\circ$ ,  $31,2^\circ$  e  $34,5^\circ$ .

Os padrões de DRX dos biocompósitos apresentaram picos mais largos devido à presença dos polímeros amorfos, e um pico característico da fase hidroxiapatita em 2 teta em aproximadamente 28,0°. A presença de fases secundárias, tais como  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP, CaO, e outros, não foram detectadas nos biocompósitos.

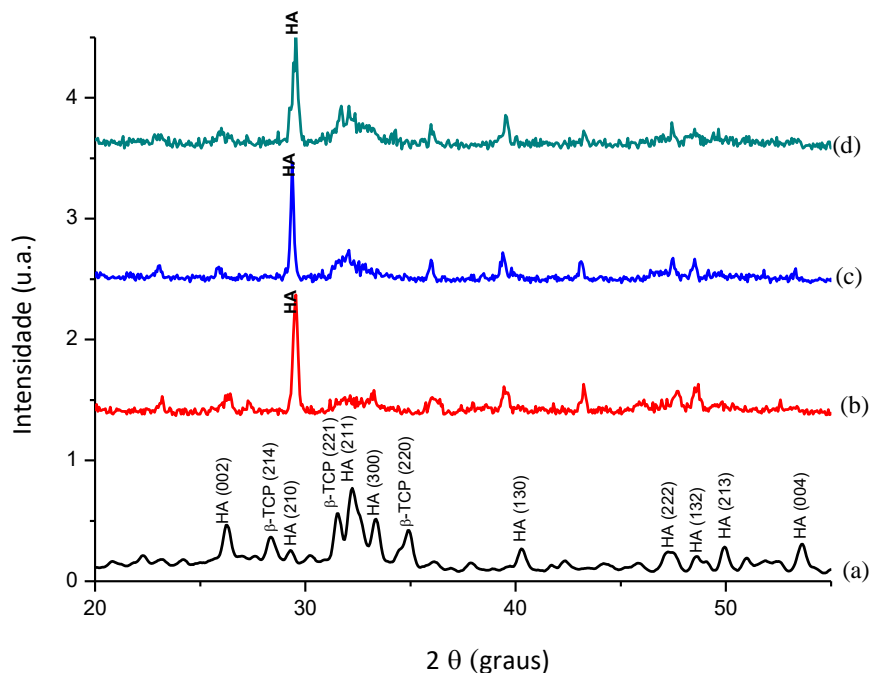


Figura 3.27 – Difratoograma das nanopartículas de fosfato de cálcio (A), nHA/QUI (B), nHA/QUI-ECH (1:0,1)(C) e nHA/QUI-ECH(1:0,2) (D) sintetizados em valores de pH=10. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho dos biocompósitos são em grande parte dominados por absorções associadas com a fase de fosfato de cálcio (Figura 3.28). Eles revelaram a banda assimétrica do  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  entre  $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$  e a banda de vibração associada ao  $\nu_1$   $\text{PO}_4^{3-}$  em  $962\text{cm}^{-1}$ , compatível com a formação de hidroxiapatita nos biocompósitos (UYSAL *et al.*, 2014).

Os espectros dos biocompósitos, também revelaram bandas correspondentes a grupos típicos de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) em  $1400\text{-}1470\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) e  $870\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ), indicando a formação de hidroxiapatita carbonatada com íons  $\text{CO}_3^{2-}$  incorporados nos locais de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

(HA carbonatadas tipo B) (DEMIRTAŞ *et al.*, 2015) independentes do ligante. A ocorrência de HA carbonatada está essencialmente relacionada com o gás dióxido de carbono incorporado por na reação de via aquosa durante a síntese (DOROZHKIN *et al.*, 2002).

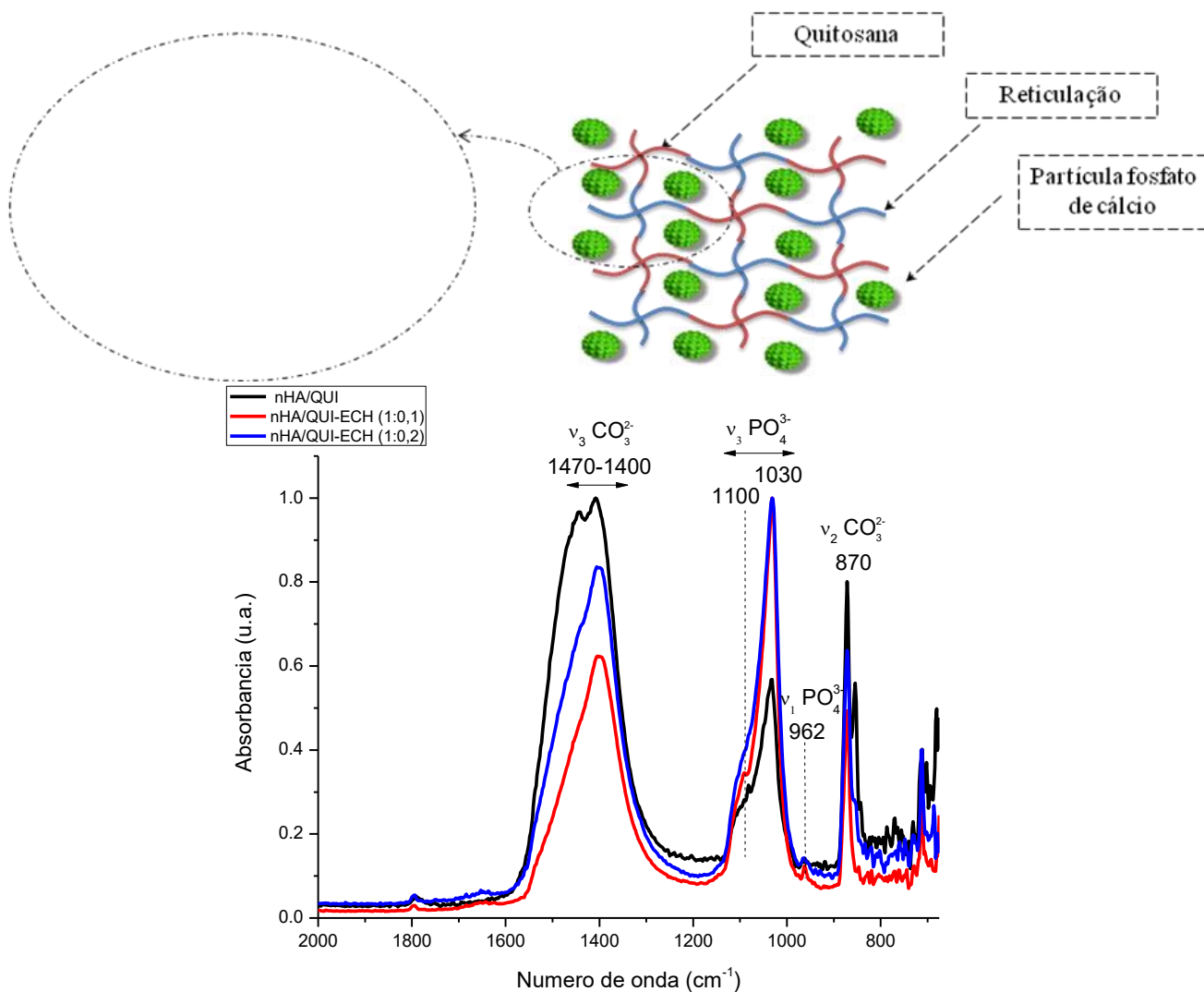


Figura 3.28 – Espectro de FTIR das amostras de nHA/QUI (a), nHA/QUI-ECH (1:0,1)(b) e nHA/QUI-ECH (1:0,2)(c) em pH 10 à  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . Detalhe: Esquema ilustrativo do biocompósito modificado com epícloridrina. Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes resultados são significativos, uma vez que demonstram que os ligantes poliméricos não afetam apenas a precipitação dos fosfatos de cálcio durante a síntese, mas também desempenham um papel importante na formação dos bionanocompósitos orgânico-inorgânicos estabilizados por interações físico-químicas.

### 3.3.2.4 Intumescimento e degradação.

Após análise estatística, observou-se diferença significativa (teste Tukey,  $p < 0,05$ ) associada a capacidade dos biocompósitos de retenção de fluidos nos intervalos de tempo estudados. A Figura 3.29 ilustra um comportamento de intumescimento dos biocompósitos semelhante aos filmes de quitosana, no qual observa-se uma maior retenção de fluidos na primeira hora e um posterior declínio desta capacidade de adsorção nos tempos subsequentes. Os valores de intumescimento, em 1h, para a nHA/QUI chegaram a aproximadamente  $284 \pm 11\%$  enquanto os nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) a  $179 \pm 8\%$  e  $146 \pm 6\%$ , respectivamente. Observa-se que os biocompósitos atingiram estabilidade de intumescimento em 3h. Após 24h, os valores médios de intumescimento foi de  $213 \pm 12\%$ ,  $163 \pm 10\%$  e  $130 \pm 5\%$  para os biocompósitos quitosana, quitosana com epícloridrina (1:0,1) e (1:0,2), respectivamente.

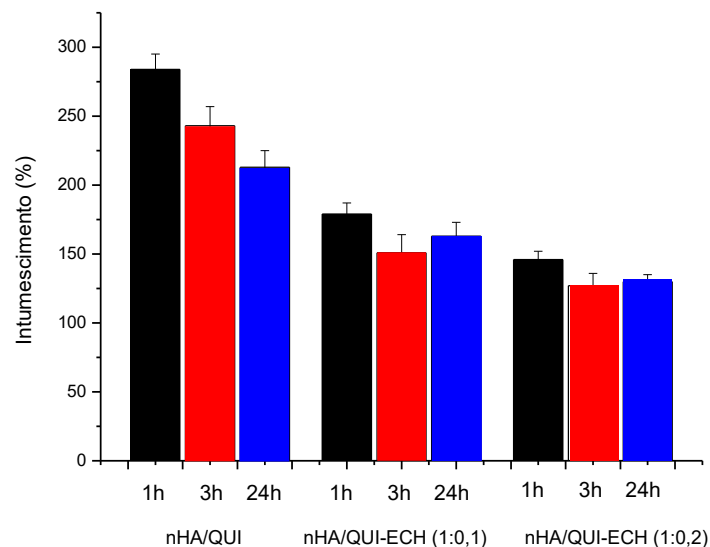


Figura 3.29 – Histograma de Intumescimento (%) das amostras de nHA/QUI, nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h, 3h e 24h) à  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 3.30 apresenta o comportamento de degradação correspondente aos biocompósitos não reticulados e reticulados. Comportamento semelhante foi observado em relação aos resultados encontrados nos filmes sintetizados anteriormente, observa-se

que a epícloridrina diminuiu significativamente (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ) a degradação dos biocompósitos em PBS após 96h de imersão.

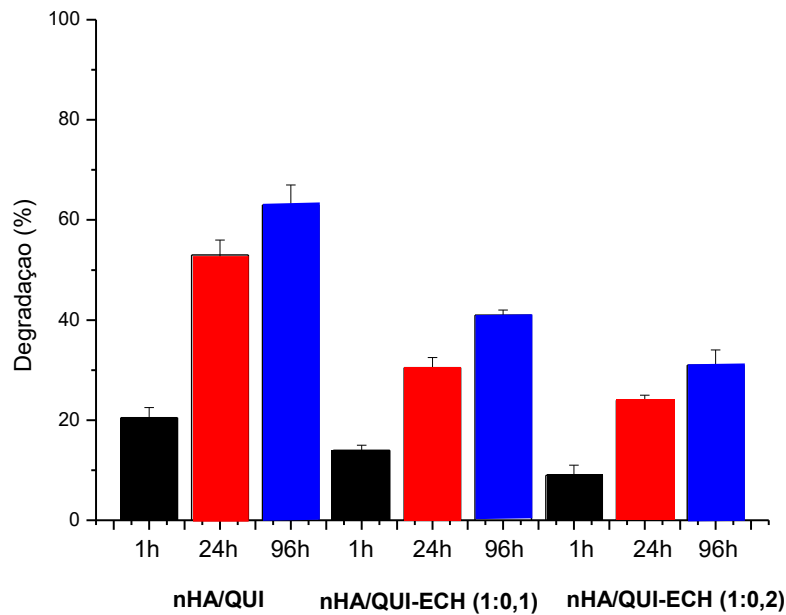


Figura 3.30 – Histograma de Degradação (%) das amostras de nHA/QUI, nHA/QUI-ECH (1:0,1) e nHA/QUI-ECH (1:0,2) em PBS em diferentes intervalos de tempo (1h, 24h e 96h) à  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes resultados se mostram satisfatórios visto que as membranas biológicas acompanham a utilização de enxertos ósseos que serve como material de proteção; ou seja, a permanência desta estrutura na região danificada favorece o confinamento das células ósseas e impede o contato das células epiteliais circunvizinhas permitindo adequada cicatrização óssea (NAGEN-FILHO *et al.*, 2009).

## CONCLUSÃO

O efeito da reticulação com epícloridrina foi observado através da alteração de propriedades físico-químicas do nanocompósito, onde houve uma redução importante do intumescimento e da degradação com o aumento da reticulação da rede polimérica. Além disso, as propriedades mecânicas foram alteradas devido a formação de reticulação cruzada entre cadeias poliméricas reduzindo sua mobilidade e com aumento relativo da rigidez da estrutura do biocompósito. Morfologicamente, as partículas de nanoHA

sofreram redução de tamanho médio atribuído ao relativo enrijecimento da matriz reticulada restringindo o processo de nucleação e crescimento durante a síntese do nanocompósito. Através da espectroscopia de infravermelho, pode-se verificar a participação predominante dos grupos hidroxila da quitosana no processo de reticulação com a epícloridrina conforme proposto pelos mecanismos relatados da literatura.

## CAPÍTULO IV

### “ESTUDO DO EFEITO DA DOPAGEM COM ZINCO EM BIOCOMPÓSITOS POLÍMEROS/CERÂMICA RETICULADOS POR EPICLORIDRINA”

#### 4.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Atualmente, a utilização de metais como agente bactericida vem ganhando espaço na área biomédica, sendo que a manipulação físico-química de compostos metálicos apresentam-se mais rentáveis do ponto de vista econômico em comparação aos custos de produção e incorporação de antibióticos nos biocompósitos.

Segundo SANTOS (2011), se o material apresentar maior rigidez em relação ao tecido ósseo, este acaba absorvendo a maior parte do carregamento mecânico, fazendo com que o tecido ósseo seja pouco solicitado interferindo na circulação sanguínea local, culminando com um enfraquecimento do osso, podendo levar a uma nova fratura (JAYABALAN *et al.*, 2010; STARES, 2010).

Com o intuito de contornar as limitações, o uso de biopolímeros associados aos materiais metálicos tornou-se uma alternativa relevante utilizada para o preenchimento e reparo de tecidos duros (DOROZHKIN, 2009; WILBERFORCE *et al.*, 2011).

Neste contexto, a Figura 4.1 ilustra a utilização do  $Zn^{2+}$  na dopagem de membranas quitosana/hidroxiapatita/epicloridrina, visto que a presença deste íon inibe a diferenciação das células osteoclásticas, ao mesmo tempo induz o aumento da atividade das células osteoblásticas, estimulando a síntese de proteínas (TANG *et al.*, 2009; BOANINI *et al.*, 2010).

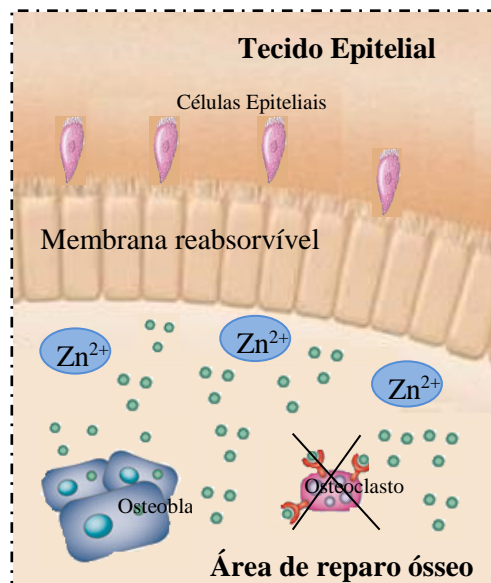


Figura 4.1 – Ilustra um sistema de estimulação a ação osteoblástica pelos biocompósitos doados com  $Zn^{2+}$  (sem escala). Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento desta etapa, foram realizadas a síntese e caracterização dos biocompósitos polímeros/cerâmica/reticulados com e sem dopagem com  $Zn^{2+}$ . A Figura 4.2 apresenta as etapas desenvolvidas neste capítulo.



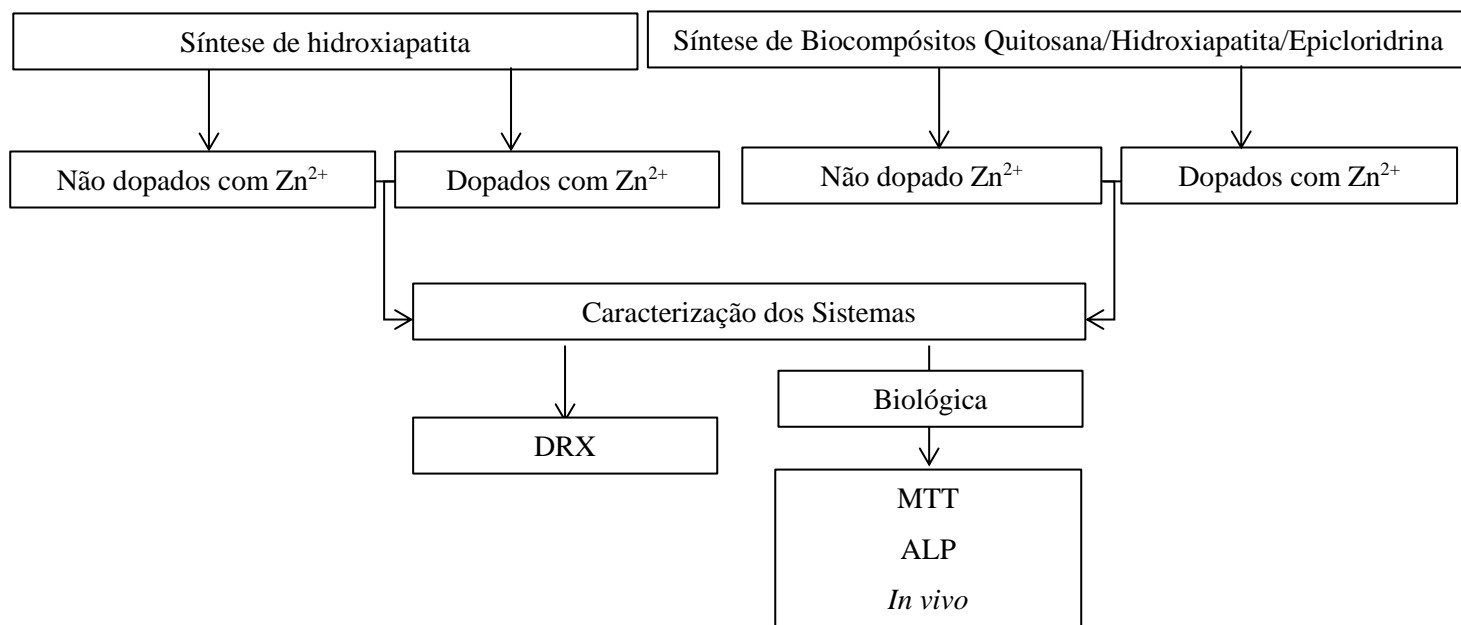


Figura 4.2 – Fluxograma do procedimento experimental. Fonte: Elaborado pelo autor.

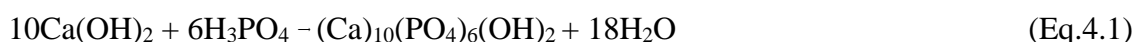
#### 4.2.1 Materiais

Todos os reagentes e precursores, ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EUA, 85%,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hidróxido de cálcio (Sigma-Aldrich, EUA,  $\geq 96\%$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), nitrato de zinco (Synth, Brasil,  $\geq 96\%$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) e hidróxido de amônio (Synth, Brasil, 30%,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) foram utilizados tal como recebidos. A epicloridrina (ECH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA,  $\geq 99\%$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$ , E1055,  $1.183\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{PM}=92,52\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foi utilizada para a modificação dos biocompósitos. A quitosana (QUI) em pó (Aldrich, EUA,  $\text{PM}=310.000$  para  $375.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{DD}\geq 75\%$ , e viscosidade 800-2000 cP) foi usada como ligante polimérico. Água deionizada (Millipore Simplicidade™) com uma resistividade de  $18\text{M}\Omega\text{ cm}$  foi utilizada na preparação de todas as soluções.

#### 4.2.2 Preparação das partículas de fosfato de cálcio (CaP)

Soluções de 90 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,56% v/v) (“SOL\_1”) foi sintetizada e mantida sob agitação magnética constante durante 15min à temperatura ambiente ( $25\pm 2$ ) $^\circ\text{C}$ .

O pH da SOL\_1 foi corrigido e ajustado para  $7,0\pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e a temperatura elevada para  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ . Aproximadamente 1,1 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em pó foi adicionado a 10 ml de água deionizada e sob agitação vigorosa durante 15 min. Esta suspensão de cálcio foi referida como "SUS\_1". Em seguida, "SUS\_1" foi adicionada lentamente à "SOL\_1" para a reação de síntese e esta mistura ("SUS\_2") foi agitada magneticamente durante 15min. O pH foi novamente corrigido para  $10,0\pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e mantida sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ . A Equação 4.1 representa a reação que ocorre a formação de fosfato de cálcio.



A SUS\_2 foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanta, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10 mL da SUS\_2 filtradas foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$  por 24h. As partículas de fosfato de cálcio resultantes foram referidos como CaP (Figura 4.3).

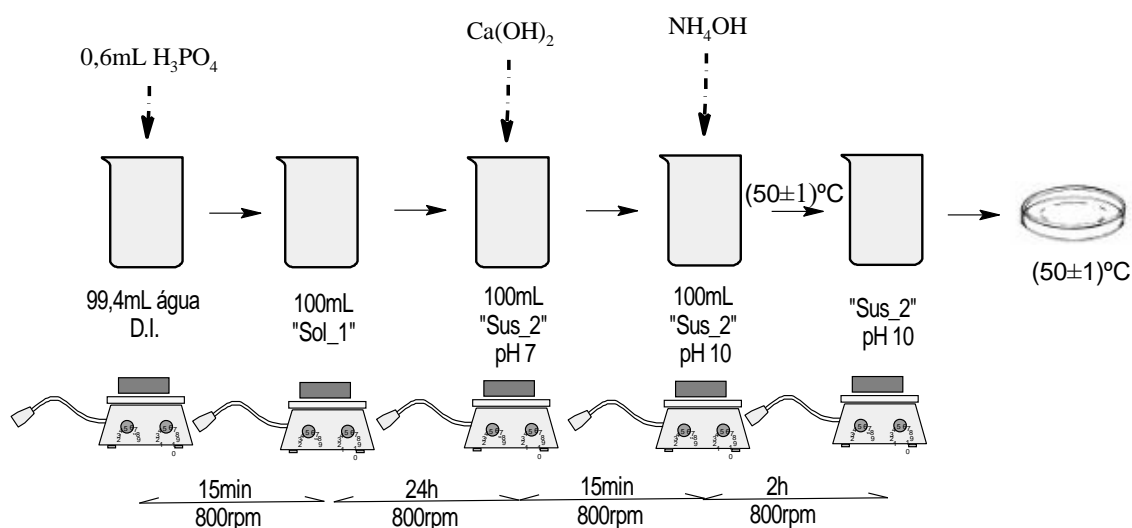
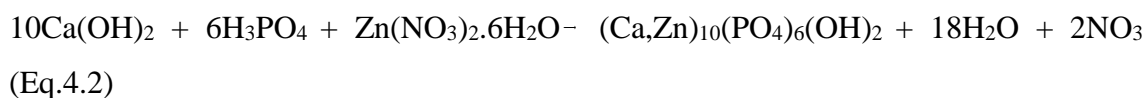


Figura 4.3 - Representação esquemática do processo de síntese das partículas de fosfato de cálcio. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.3 Preparação das partículas de fosfato de cálcio dopadas com $Zn^{2+}$ (CaP/ $Zn^{2+}$ )

Nesta etapa, logo após SUS\_1" ser adicionada lentamente à "SOL\_1" para a reação de síntese e mistura ("SUS\_2"), 0,351g of  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  foi adicionado à SUS\_2 e mantida sob agitada magneticamente durante 15min. Esta suspensão de cálcio dopada com zinco foi referida como "SUS\_3". O pH foi novamente corrigido para  $10,0 \pm 0,01$  com adição de  $NH_4OH$  ( $1,0 mol.L^{-1}$ ) e mantida sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50 \pm 1)^\circ C$ . A Equação 4.2 representa a reação que ocorre a formação de fosfato de cálcio dopada com zinco.



A SUS\_3 foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanta, com porosidade de  $25\mu m$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10 mL da SUS\_3 filtradas foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50 \pm 1)^\circ C$  por 24h. As partículas de fosfato de cálcio dopadas com zinco resultantes foram referidos como CaP/ $Zn^{2+}$  (Figura 4.4).

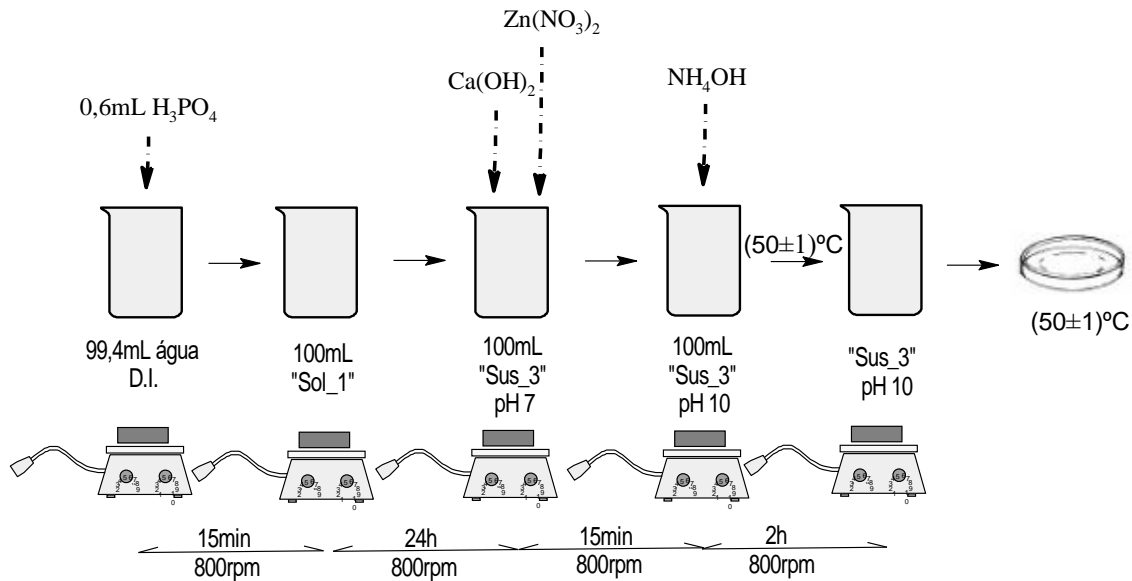


Figura 4.4 - Representação esquemática do processo de síntese das partículas de fosfato de cálcio dopadas com  $Zn^{2+}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.4 Preparação dos bicompostos de fosfato de cálcio dopados com Zinco (nHA/QUI/ $Zn^{2+}$ )

Soluções de 1% (em massa) de quitosana (QUI) foram preparadas pela dissolução de 1g de QUI em 90 mL de solução de  $H_3PO_4$  (0,56% v/v) ("SOL\_2"). Para a solubilização e homogeneização, as soluções foram mantidas sob agitação magnética constante durante 24h à temperatura ambiente ( $25\pm 2$ )°C.

O pH da SOL\_2 foi corrigido e ajustado para  $7,0\pm 0,01$  com adição de  $NH_4OH$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e a temperatura elevada para ( $50\pm 1$ )°C. Aproximadamente 1,1 g de  $Ca(OH)_2$  em pó foi adicionado a 10 ml de água deionizada e sob agitação vigorosa durante 15 min. Esta suspensão de cálcio foi referida como "SUS\_1". Em seguida, "SUS\_1" e 0,351g of  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  foram adicionados lentamente à "SOL\_2" para a reação de síntese e esta mistura ("SUS\_4") foi agitada magneticamente durante 15min. O pH foi novamente corrigido para  $10,0\pm 0,01$  com adição de  $NH_4OH$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e mantida sob agitação constante por 2h à temperatura de ( $50\pm 1$ )°C.

A SUS\_4 foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10mL da SUS\_4 filtrada foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$  por 24h (HOSSEIN *et al.*, 2016) Os biocompósitos de quitosana resultantes foram referidos como nHA/QUI/Zn (Figura 4.5).

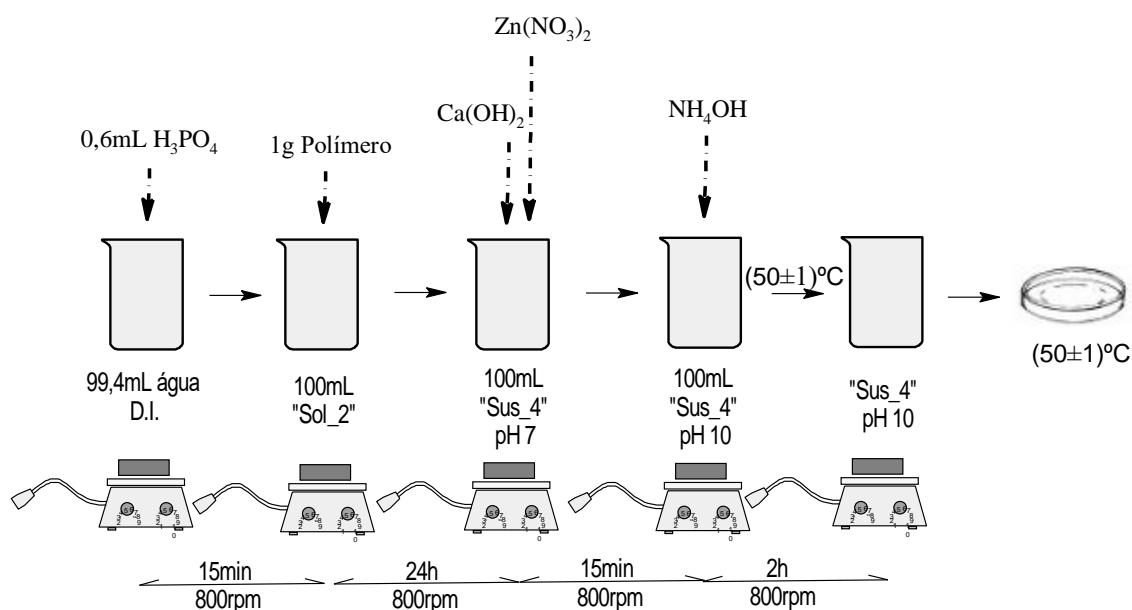


Figura 4.5 - Representação esquemática do processo de síntese do biocompósito de fosfato de cálcio dopado com zinco. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.5 Preparação dos bicompósitos de fosfato de cálcio reticulados com epiclorigrina e dopados com Zinco (nHA/QUI-ECH/ $\text{Zn}^{2+}$ )

Após a correção do pH das misturas ("SUS\_4") para  $10,0\pm 0,01$  com adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $1,0\text{mol.L}^{-1}$ ) e sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$ . Foram lentamente adicionados, 0,08mL e 0,16mL de epiclorigrina (ECH) a solução SUS\_4 para obter razões em massa de QUI/ECH de (1:0,1) e (1:0,2) ("SOL\_3"), respectivamente, sob agitação constante por 2h à temperatura de  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$  (TORRES *et al.*, 2005; TIRTOM *et al.*, 2012).

A SUS\_5 foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (filtros de papel Quanty, com porosidade de  $25\mu\text{m}$ ), adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

Posteriormente, 10mL da SUS\_5 filtrada foram vertidas em placas de petri de polipropileno com 6,5cm de diâmetro e secas à temperatura  $(50\pm 1)^\circ\text{C}$  por 24h (HOSSEIN *et al.*, 2016) Os filmes de quitosana reticulados resultantes foram referidos como QUI-ECH (Figura 4.6).

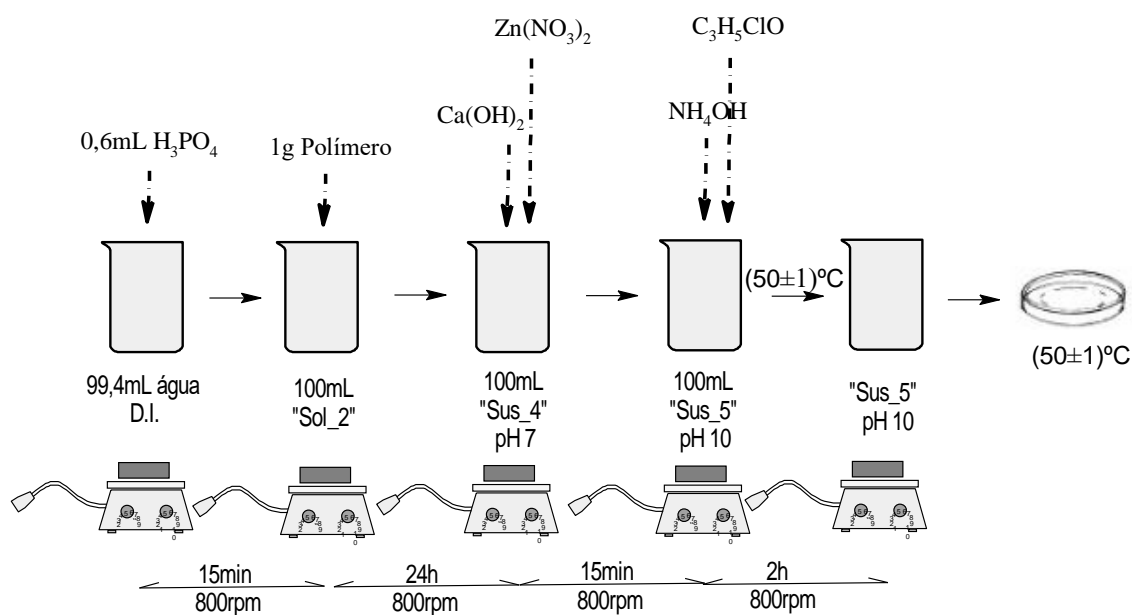


Figura 4.6 - Representação esquemática do processo de síntese do biocompósito de fosfato de cálcio reticulado com epícloridrina e dopado com  $\text{Zn}^{2+}$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.6 Caracterizações das partículas e dos biocompósitos

##### 4.2.6.1 Difração de Raios-X (DRX)

Padrões de difração de raios-X (DRX) foram obtidos utilizando um difratômetro Philips-PANalytical modelo EMPYREAN, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  com  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$  e cristal monocromado de grafita, velocidade de varredura de  $0,06^\circ \cdot \text{s}^{-1}$  e intervalo  $4^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$ .

O tamanho de cristalito ( $D_{hkl}$ ) foi determinado pela Equação 4.3 de *Scherrer*, partir da medida da largura de um pico de difração no ponto onde a intensidade cai pela metade de seu valor máximo, FWHM chamada de largura a meia altura ( $\beta$ ) (AZAROFF *et al.*, 1958).

$$D_{hkl} = k\lambda / \beta \cos \theta \quad (\text{Eq. 4.3})$$

sendo:

k: coeficiente de forma com valores entre 0,9 e 1;

$\lambda$ : comprimento de onda da radiação  $\text{CuK}\alpha$ ;

$\beta$ : largura da meia altura (FWHM);

$\theta$ : ângulo de difração de Bragg.

#### 4.2.6.2 Ensaio Biológicos

Os ensaios de (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(MTT) e atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) foram realizados conforme as seções 2.2.8.1 e 2.2.8.2, respectivamente.

#### 4.2.6.3 Ensaio *in vivo* de reparo ósseo

##### 4.2.6.3.1 Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos em 36 ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus albinu* (machos, 2 a 3 meses de idade), pesando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O projeto foi submetido e aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo n° 161/2015. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e luminosidade claro e escuro alterando de 12 em 12h, acondicionados em gaiolas plásticas e com acesso *ad libitum* a água e ração.

##### 4.2.6.3.2 Procedimento cirúrgico de perfuração da tibia

Para a realização da cirurgia de perfuração da tíbia, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100g) e cloridrato de quetamina 10% (0,1 mL/100g). Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos ao procedimento de tricotomia, seguido de assepsia da região cirúrgica com iodopovidona. Na sequência, foi feita uma incisão na região anterior da pata; afastamento da musculatura ântero-lateral da pata expondo, dessa forma, o terço médio da margem lateral da tíbia.

Nessa região, foi realizado um defeito ósseo ao longo do eixo látero-lateral (Figura 5.7), com perfurações de ambas as corticais, utilizando-se uma broca helicoidal odontológica de 1,6mm, com irrigação constante usando solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%.



Figura 4.7 – Defeito ósseo confeccionado na tíbia dos animais. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, a região do defeito foi abundantemente irrigada com NaCl 0,9%, para retirar pequenos fragmentos ósseos resultantes do procedimento de perfuração óssea. A partir desse momento, os defeitos ósseos foram obliterados de ambos os lados pelas diferentes membranas. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos experimentais (n=6): (I) grupo controle (sem inserção de membranas, preenchido apenas pelo coágulo); (II) membrana de quitosana e hidroxiapatita (nHA/QUI); (III) membrana de quitosana e hidroxiapatita, reticulada com epicloridrina 10% (nHA/QUI-ECH 10%); (IV) membrana de quitosana e hidroxiapatita, reticulada com epicloridrina 20% (nHA/QUI-ECH 20%); (V) membrana de quitosana e hidroxiapatita, reticulada com epicloridrina 10% e dopada com  $Zn^{2+}$  (nHA/QUI-ECH-Zn 10%) e (VI) membrana de quitosana e hidroxiapatita, reticulada com epicloridrina 20% e dopada com  $Zn^{2+}$  (nHA/QUI-ECH-Zn 20%). Foi realizada a sutura da fáscia muscular e da pele e, ao final do procedimento cirúrgico, os



animais receberam uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84mg/100g de peso corporal) e uma outra de flunixinina meglumina (0,22mg/100g de peso corporal), ambas via intramuscular. Os animais foram eutanasiados após 7 dias da produção dos defeitos e inserção das membranas, com subsequente dissecação das patas e retirada das tíbias, que foram fixadas em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à  $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48h, para, posteriormente, serem submetidas ao processamento histológico. O modelo experimental utilizado foi previamente descrito na literatura (ANDRADE *et al.*, 2017).

#### 4.2.6.1.3.3 Processamento histológico

Após a fixação, as tíbias foram lavadas em água deionizada, para remoção do excesso de fixador, através de três banhos de 15min. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de *Planck Rychlo* por um período de 48h. Após a desmineralização, as tíbias foram novamente lavadas em água deionizada, para a remoção do excesso de descalcificador, através de 3 banhos de 15min. Na sequência, as amostras foram submetidas ao procedimento histológico de rotina, passando por desidratação em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Foram obtidos de cada amostra cerca de 30 cortes semi-seriados de  $6\mu\text{m}$  de espessura no plano sagital, que foram estabilizados em lâminas histológicas previamente silanizadas. As lâminas de cada amostra foram coradas pelo Tricrômico de Masson. Foram então selecionados 4 cortes de cada amostra, em diferentes profundidades de corte, para serem posteriormente analisados (ANDRADE *et al.*, 2017).

#### 4.2.6.1.3.4 Análise histológica e morfométrica

Para a realização das análises histológica e morfométrica, 10 imagens de cada uma das amostras foram digitalizadas (Figura 4.8), usando-se uma microcâmera (Q-Color5, Olympus), acoplada ao microscópio BX53 (Olympus), com o auxílio do *software* Q-Capture Pro 7.0. Posteriormente, o *software* Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) foi utilizado para quantificar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas.

As imagens foram digitalizadas utilizando-se a objetiva de 10X. A metodologia empregada para o imageamento microscópico e análise morfométrica foram adaptadas a

partir de metodologias previamente descritas na literatura (POLETI, 2009; SÁ *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017).

Para a análise morfométrica, foram avaliados, em cada imagem, os diferentes tons de pixels. A partir do número total de pixels, o programa Image-Pro Plus detalha o valor percentual de cada um dos tons de pixels selecionados. As áreas ocupadas por tons de pixels na cor azul representam as trabéculas ósseas neoformadas. Dessa forma, foram considerados os valores percentuais dos pixels em tons de azul nas 10 imagens obtidas de cada amostra, sendo calculada a média dos valores percentuais dessas amostras.

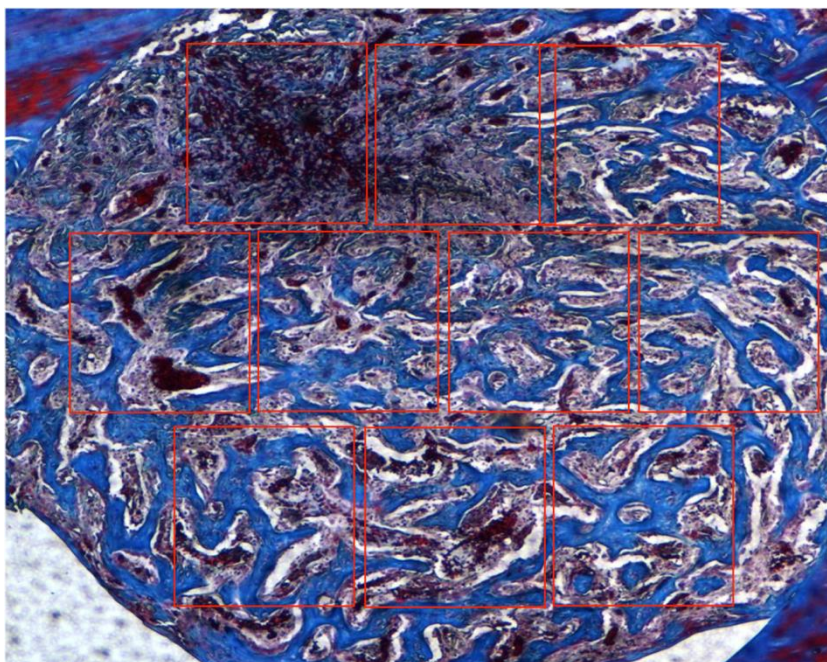


Figura 4.8 - Imagem representativa de um defeito ósseo de tíbia de rato. Cada um dos quadrados vermelhos representa uma foto digitalizada no interior do defeito que será quantificado o percentual de trabéculas ósseas neoformadas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram excluídas as amostras que apresentaram colorações inadequadas; ausência de integridade dos cortes histológicos, bem como aquelas amostras que, à análise macroscópica ou microscópica, apresentavam fratura na região do defeito ósseo.

#### 4.2.6.1.3.5 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Primeiramente foi aplicado um teste de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk), para verificar se a distribuição dos dados era normal. Diante da confirmação da distribuição normal dos dados, foram realizadas análises estatísticas utilizando o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização físico-química das nanopartículas de HA e biocompósitos de quitosana.

#### 4.3.1.1 Difração de Raios-X

Os padrões de difração de raio-X das amostras de nHA e nHA/Zn apresentam picos definidos com perfis semelhantes (Figura 4.9). As partículas nHA sintetizadas apresentaram os picos em 2 teta iguais a  $31,9^\circ$  (211),  $29,3^\circ$  (210) e  $25,9^\circ$  (002) (*International Centre for Diffraction Data, JCPDS 86- 1203*). Observa-se um aumento no pico em 2 teta igual a  $39,6^\circ$  (130), e uma diminuição da intensidade do pico em 2 teta igual a  $29,3^\circ$  (210) na amostra nHA/Zn em comparação a amostra nHA, provavelmente devido à substituição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{Zn}^{2+}$  na rede cristalina da nHA (Detalhes da Figura 4.9). Um resultado similar foi encontrado no trabalho de REN *et al.* (2009), segundo os autores, a redução nos parâmetros de rede foi observada em amostras contendo a substituição de cálcio pelo zinco numa razão de até 10% em mol de  $\text{Zn}^{2+}$ . Este resultado poderia ser explicado devido ao menor raio iônico do  $\text{Zn}^{2+}$  em comparação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (MAVROPOULOS *et al.*, 2013).

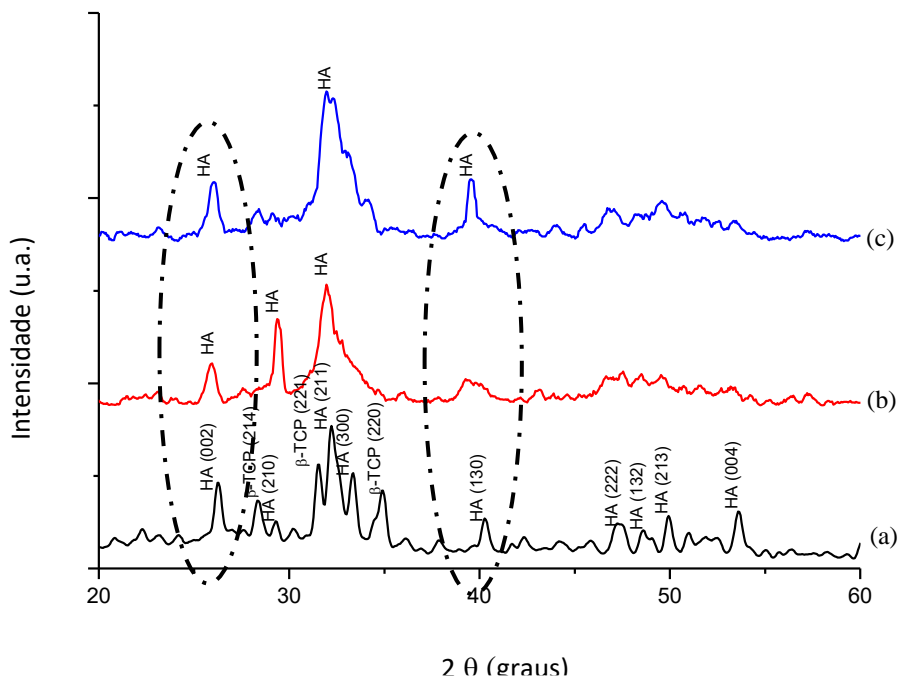


Figura 4.9 – Difratoograma das partículas de fosfato de cálcio (A), nHA (B) e nHA/Zn (C).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química é vantajosa, devido ao seu baixo custo e simplicidade; no entanto, a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases, o que se deve à presença de vacâncias e substituições iônicas na rede, tais como carbonatos, hidrogeno-fosfatos, potássio, sódio, nitrato e cloreto (KOUTSOPOULOS, 2002).

A técnica DRX também pode ser empregada para determinar o teor de diferentes fases nas amostras ou para identificar certas características de uma fase, como estrutura cristalina ou dimensão e forma de cristalitos (CONNOLLY, 2010). A partir dos resultados da difração de raio-x também foram calculados os tamanhos dos cristalitos utilizando a Equação de *Scherrer* (Equação 4.3) (ARAÚJO *et al.*, 2005). A Figura 4.10 apresenta os valores do tamanho dos cristalitos das amostras, evidenciando que a dopagem com  $Zn^{2+}$  favoreceu a diminuição do tamanho dos cristalitos (ANOVA,  $p < 0,05$ ). A seletividade da HA por cátions metálicos foi explicada considerando-se o raio iônico e a eletronegatividade dos íons. Conforme LeGeros e LeGeros (1984), cátions com raio

iônico maior que o do cálcio, poderiam ser incorporados na estrutura da apatita mais facilmente dos que os de menor raio iônico. Isto resulta em uma expansão dos parâmetros de rede a e c e num maior volume da célula unitária. A substituição do  $\text{Ca}^{2+}$  (raio iônico igual a  $0.99\text{\AA}$ ), por um cátion menor, por exemplo, o  $\text{Zn}^{2+}$  (raio iônico igual a  $0.74\text{\AA}$ ), resulta na contração dos parâmetros a e c e redução no volume da célula unitária ( $V_c$ ).

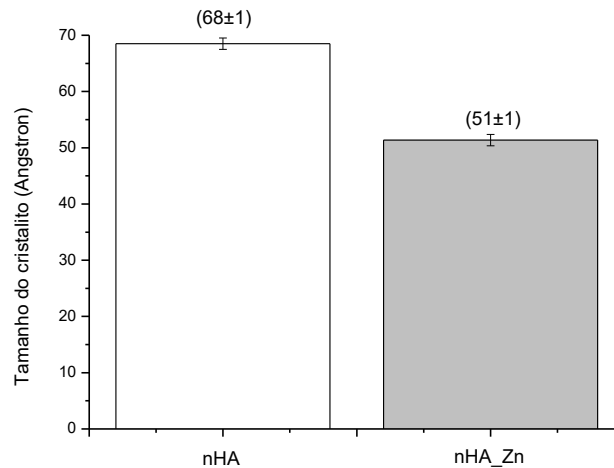


Figura 4.10 - Tamanho de cristalitos das amostras de nHA e nHA/Zn. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3.1.2 Ensaio Biológicos

##### 4.3.1.2.1 Ensaio de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(MTT)

Os resultados mostram não existir diferença estatisticamente significativa entre todos os sistemas (ANOVA,  $p > 0,05$ ), não apresentando efeitos citotóxicos uma vez que as respostas de viabilidade celular foram semelhantes em comparação com a condição controle (Figura 4.11).

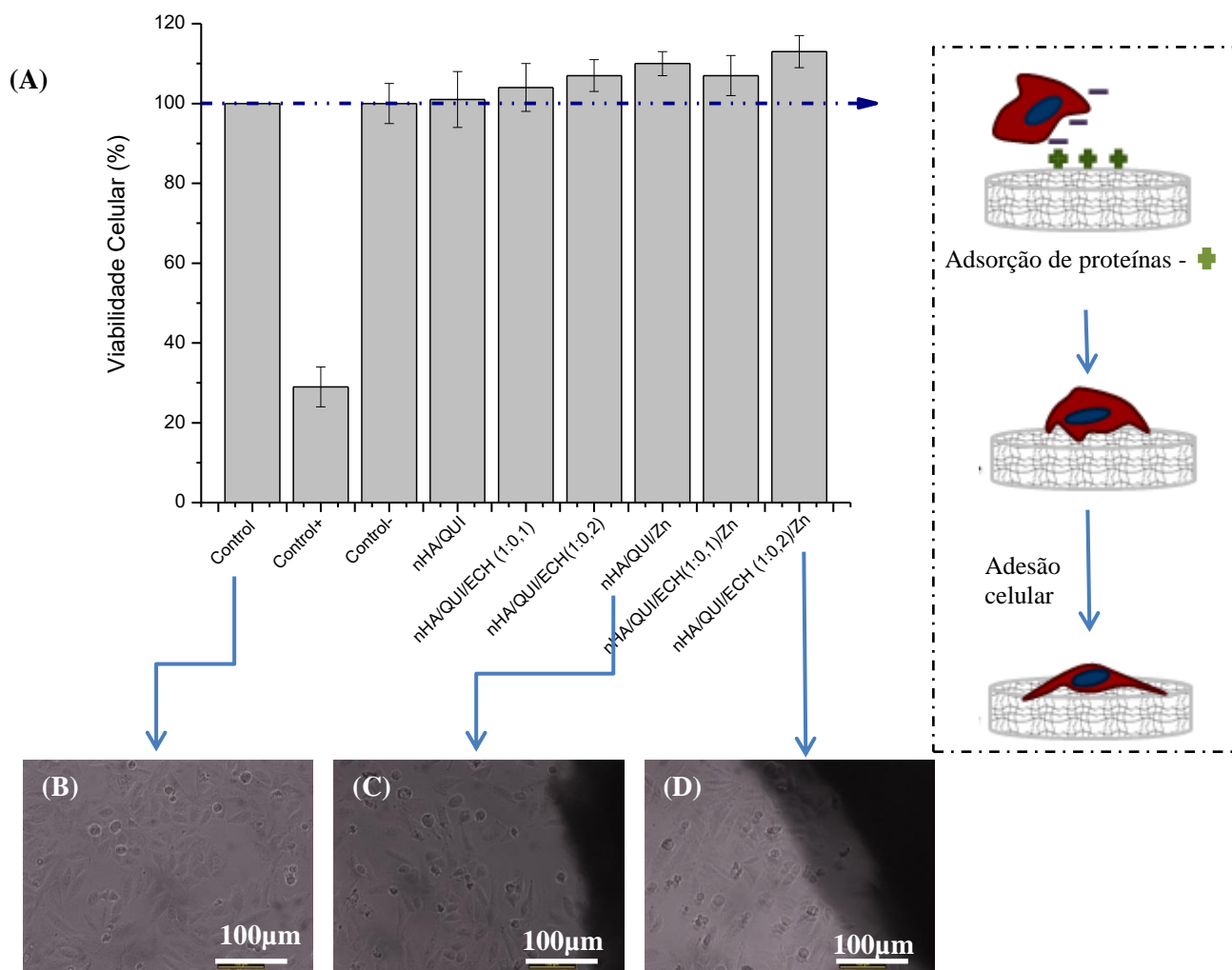


Figura 4.11- Resultados do ensaio de viabilidade celular, utilizando MTT(SAOS) após 24 h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B), nHA/QUI/Zn (C) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (D). Detalhe: Adesão celular. Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar de muitos estudos apontarem para a toxicidade da epícloridrina em aplicações biológicas, estes resultados comprovam que em baixas concentrações este agente reticulante não promoveu efeito tóxico no meio de cultura. Observa-se um aumento não significativo (ANOVA,  $p > 0,05$ ) nos sistemas reticulados que pode estar associado à diminuição do diâmetro das partículas de hidroxiapatita em aproximadamente 13% em relação aos sistemas não reticulados, promovendo um aumento na área superficial favorecendo a interação com a cultura celular (Detalhe da Figura 4.11).

Estudos tem reportado o importante papel que o  $Zn^{2+}$  desempenha na proliferação celular, na produção do colágeno, estimula a atividade dos osteoblastos e inibe a diferenciação de osteoclastos (CHEN *et al.*, 1999; WE e MA, 2004; KIM *et al.*, 2005; SANTOS, 2005; NAGATA e LONNERDAL, 2011). No entanto, os resultados dos ensaios por MTT sugerem que a incorporação de  $Zn^{2+}$  nos sistemas avaliado não influenciou significativamente o crescimento e a proliferação celular. O processo de reticulação pode ter influenciado as substituições iônicas do  $Ca^{2+}$  pelo  $Zn^{2+}$  limitando a ação deste elemento, assim o  $Zn^{2+}$  disponível no meio pode ter promovido apenas a diminuição da necrose celular devido a sua elevada atividade antimicrobiana, corroborando com estudo de SAHITHI e colaboradores (2010).

#### 4.3.1.2.2 Fosfatase alcalina (ALP)

Na Figura 4.12 pode-se observar que os sistemas não promoveram aumento significativo da atividade da ALP em 24h tendo em vista que as respostas celulares se mostraram semelhantes em comparação com a condição de controle (ANOVA,  $p>0,05$ ). As células SAOS em contato com o controle estimulado com o meio osteogênico apresentaram um aumento de  $4,4\pm 0,6\%$  da atividade da ALP em relação ao grupo controle sem tratamento. Entretanto, quando comparamos a atividade da ALP nas células tratadas com as amostras desenvolvidas em relação à atividade da ALP nas células SAO tratadas com o controle osteogênico não houve diferença estatisticamente significativa.

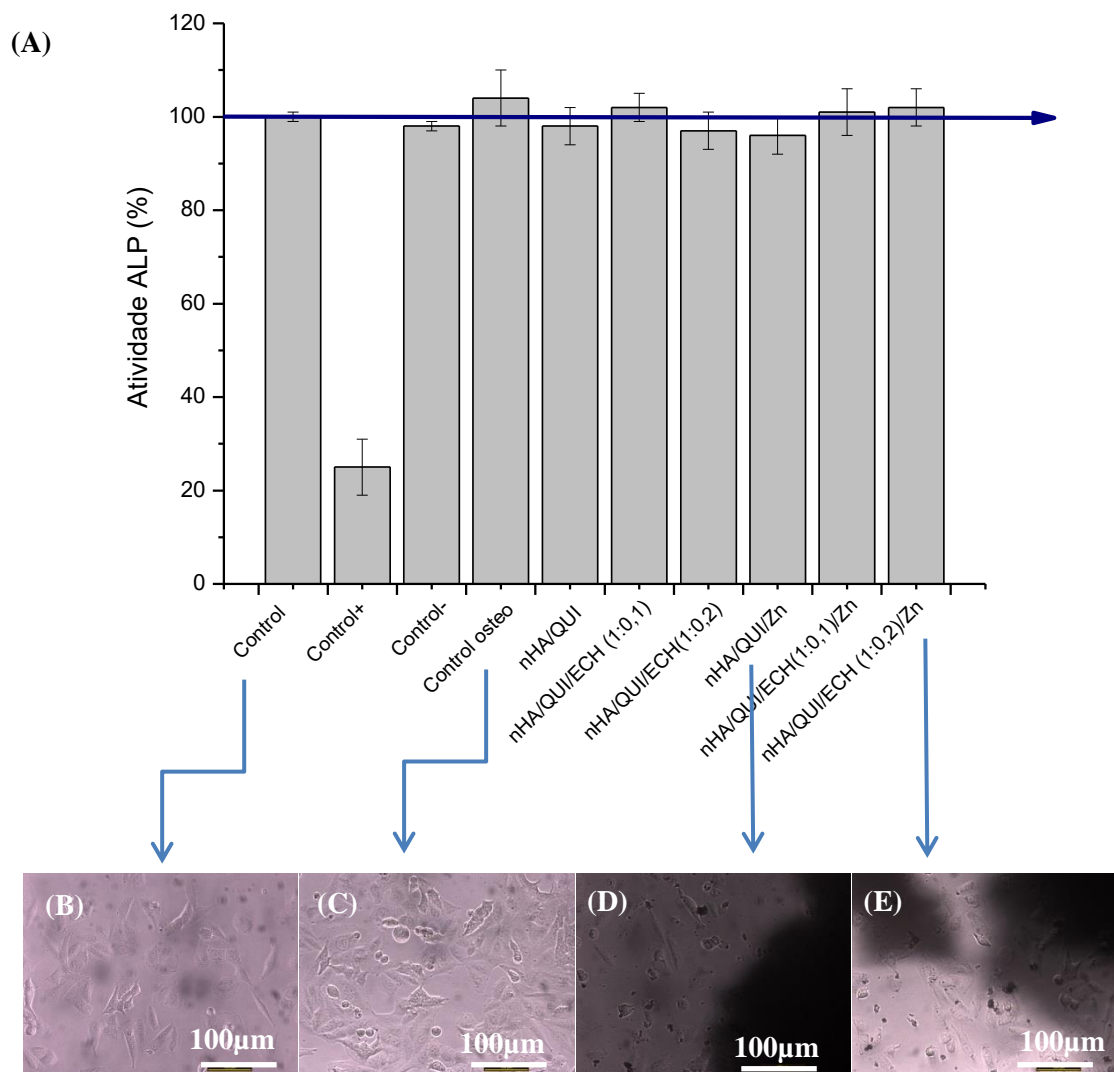


Figura 4.12 - Resultados do ensaio de proliferação celular(SAOS), utilizando fosfatase alcalina (ALP) após 24 h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B),Controle osteo (C), nHA/QUI/Zn (D) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (E). Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelos resultados ilustrados na Figura 4.13, pode se sugerir que após 7 dias as células SAOS tratadas com as amostras nHA/QUI/ECH (1:0,1)/Zn e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn apresentaram aumento na atividade de atividade da ALP de  $8,0 \pm 2,0\%$  e  $9,0 \pm 2,0\%$  respectivamente em relação ao grupo controle. Como esperado, o controle com estímulo osteogênico apresentou aumento de  $9,0 \pm 2,5\%$  da atividade da ALP em relação à condição controle não tratada. Quando comparamos os resultados da atividade da ALP nas células SAOS tratadas com os sistemas reticulados e dopados com  $Zn^{2+}$  em relação ao grupo de células estimuladas com meio osteogênico observamos que não houve diferença



significativa entre os tratamentos. Esses resultados sugerem que esses sistemas foram capazes de estimular a atividade da ALP de maneira semelhante ao meio osteogênico.

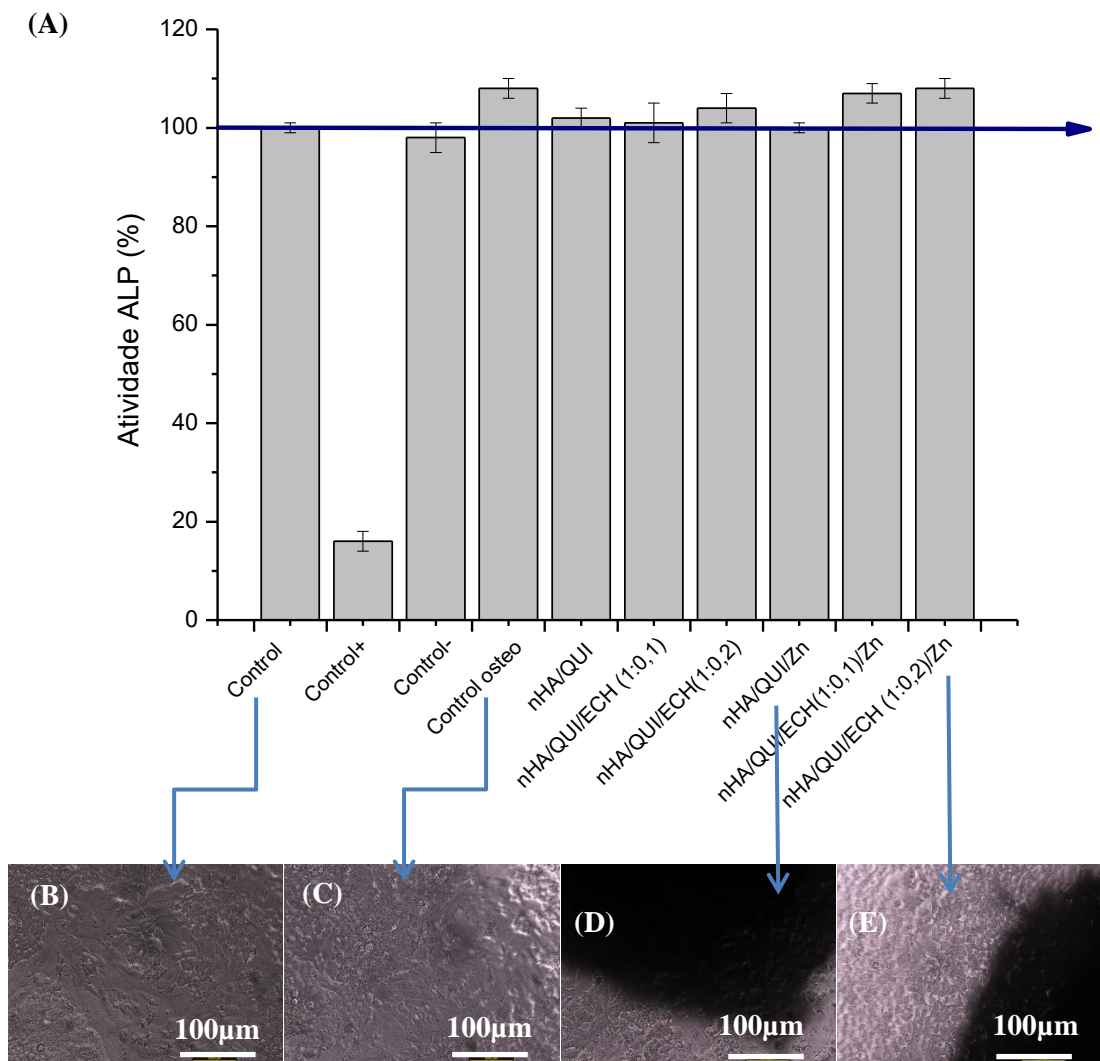


Figura 4.13 - Resultados do ensaio de proliferação celular (SAOS), utilizando fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias h de incubação com as amostras (A). Morfologia das células SAOS nos Grupos Controle (B), Controle osteo (C), nHA/QUI/Zn (D) e nHA/QUI/ECH (1:0,2)/Zn (E). Fonte: Elaborado pelo autor.

A ALP é um marcador precoce de diferenciação osteogênica, além disso, é indicadora de formação de tecidos mineralizados (BAKEINE *et al.*,2010). Desde que, existem altos níveis e acúmulo de ALP em regiões de ossificação Várias hipóteses tentam explicar o papel da ALP na mineralização, uma delas é que ela é necessária para gerar fosfato inorgânico, a partir da hidrólise de pirofosfato inorgânico extracelular que é necessário para a cristalização de hidroxiapatita. Estudos recentes sugerem que a principal função da ALP óssea é manter a concentração adequada de um inibidor de mineralização para com

isso equilibrar a mineralização óssea. (WERNER *et al.*, 2011). Nesse estudo a atividade de ALP foi medida durante o primeiro e o sétimo dia de contato direto.

#### 4.3.1.2.3 Ensaios *in vivo* de reparo ósseo

##### 4.3.1.2.3.1 Análise histológica e morfométrica de osteoblastos

A análise histológica das amostras demonstrou que as tíbias controle (coágulo) apresentaram formação óssea da periferia do defeito ósseo para o centro, sendo que, na região central, havia a presença de grande quantidade de células sanguíneas, que caracterizam a reabsorção do coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório significativo (Figura 4.14a). As tíbias cujos defeitos foram revestidos pelas membranas nHA/QUI (Figura 4.14b), membranas nHA/QUI-ECH 20% (Figura 4.14d) e pelas membranas nHA/QUI-ECH-Zn 20% (Figura 4.14f) apresentaram um padrão histológico semelhante, com maior número de trabéculas ósseas neoformadas e reabsorção de grande parte do coágulo sanguíneo central, sugerindo que o processo de reparo ósseo encontra-se mais avançado nesses grupos quando comparados ao grupo controle (Figura 4.14a). Já as tíbias cujos defeitos foram revestidos pelas membranas nHA/QUI-ECH 10% (Figura 4.14c) e as membranas nHA/QUI-ECH-Zn 10% (Figura 4.14e) apresentaram total reabsorção do coágulo sanguíneo central, além de maior deposição de trabéculas ósseas, quando comparados aos demais grupos. Observa-se nesses dois grupos, que o defeito ósseo está completamente preenchido por trabéculas ósseas neoformadas, sugerindo que o reparo ósseo encontra-se significativamente mais avançado nas tíbias revestidas por essas membranas.

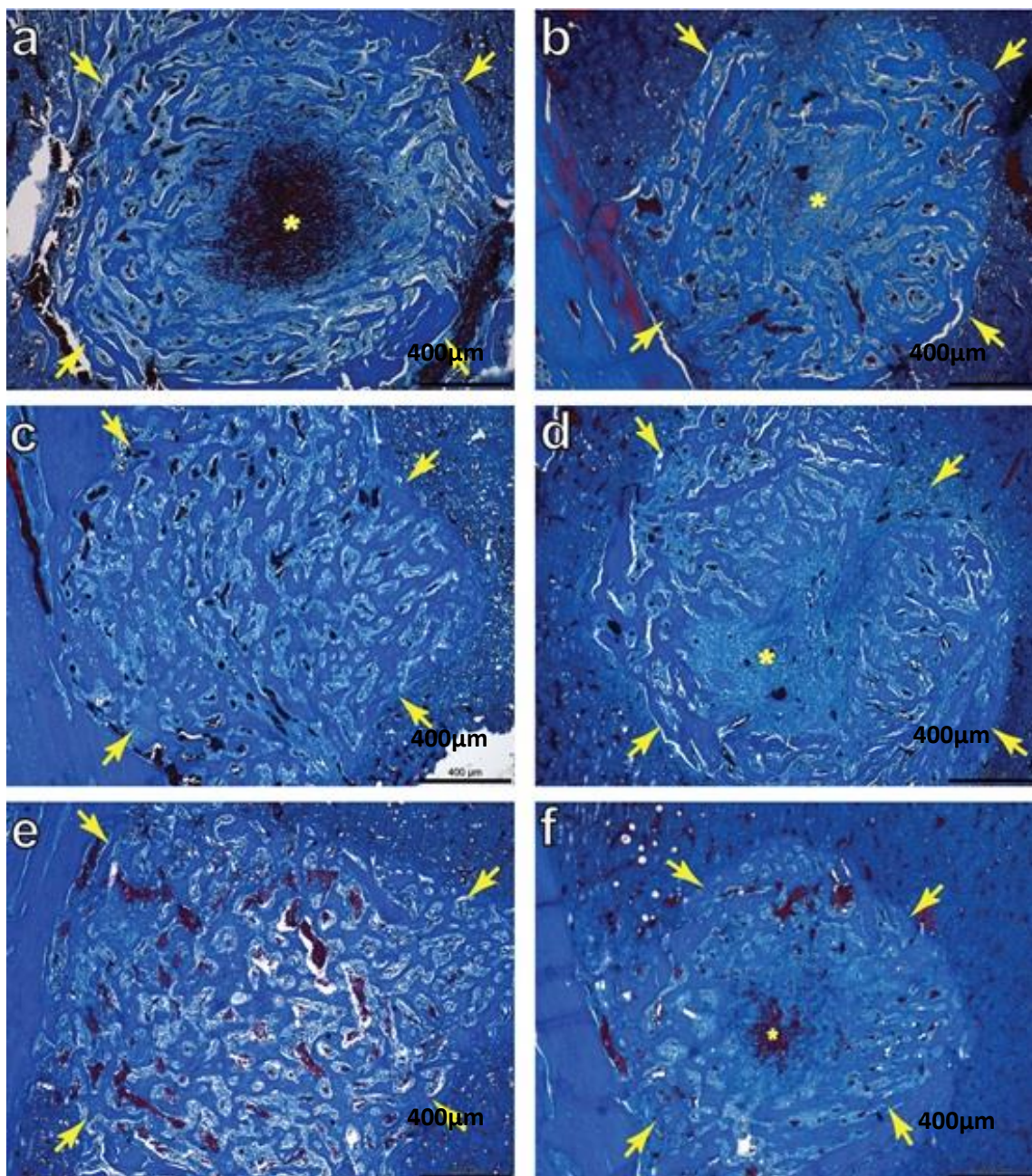


Figura 4.14 - Fotomicrografias representativas de secções histológicas de defeitos ósseo de tíbias 7 dias após as cirurgias. Tíbias controles – coágulo (a); Tíbias cujos defeitos foram revestidos com membranas nHA/QUI (b); membranas nHA/QUI-ECH 10% (c); membranas nHA/QUI-ECH 20% (d); membranas membranas nHA/QUI-ECH-Zn 10% (e) e membranas membranas nHA/QUI-ECH-Zn 20% (f). O defeito ósseo foi delimitado pelas setas amarelas ao seu redor e os asteriscos amarelos destacam uma menor formação óssea no centro do defeito. Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise morfométrica confirma as observações realizadas na avaliação histológica (Figura 4.15). Observou-se que, após 7 dias da realização dos defeitos ósseos nas tíbias, o grupo controle apresenta uma menor formação de trabéculas ósseas ( $26\pm 4$ )%. As tíbias cujos defeitos foram revestidos com as membranas nHA/QUI apresentaram uma maior formação de trabéculas ósseas ( $35\pm 3$ )% quando comparadas às tíbias controle, embora não haja diferença estatística entre estes grupos. As membranas nHA/QUI-ECH 20% e nHA/QUI-ECH-Zn 20% apresentaram semelhante padrão de neoformação óssea, apresentando formação óssea de ( $37\pm 4$ )% e ( $34\pm 2$ )%, respectivamente, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre si, observa-se uma maior indução quando comparadas às tíbias controle. Entretanto, as tíbias cujos defeitos foram revestidos com as membranas nHA/QUI-ECH 10% e nHA/QUI-ECH-Zn 10% apresentaram uma formação óssea significativamente maior quando comparadas às tíbias controle, ( $41\pm 2$ )% e ( $41\pm 3$ )%, respectivamente.

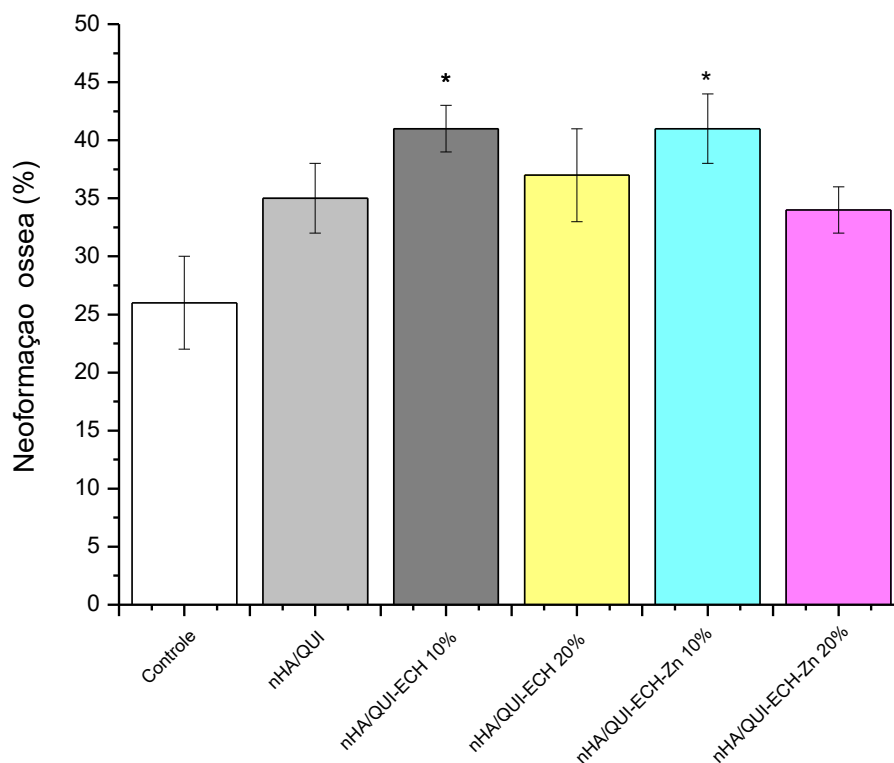


Figura 4.15 – Gráfico da análise morfométrica. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  vs grupo controle (coágulo). Fonte: elaborado pelo autor.

Durante o processo de cicatrização, ocorre a desintegração das membranas concomitante ao processo de formação e reparação do tecido ósseo. Os resultados mostraram que o agente reticulante epicloridrina, bem como a sua concentração, desempenharam um papel importante no reparo dos defeitos ósseos nas tíbias dos ratos.

Após 7 dias observa-se uma maior integridade das membranas reticuladas corroborando com os resultados encontrados no ensaio de degradação anteriores, cujos biocompósitos reticulados apresentaram menor degradação. Este fato pode ter favorecido uma maior diferenciação das células osteoblásticas visto que a membrana funciona como uma barreira impedindo a interferência das células epiteliais. Outro quesito relevante, é o fato do biocompósito com 10% de epicloridrina apresentar uma reticulação mais homogênea, ou seja, a degradação deste sistema ocorre de forma gradual e mais uniforme permitindo uma interação maior da nano hidroxiapatita com o meio, favorecendo a maturação do tecido ósseo neoformado. Além disso, favorece a substituição do biocompósito pela matriz óssea de maneira uniforme em toda a região do defeito ósseo.

A adição da epicloridrina durante a síntese diminuiu a mobilidade da cadeia polimérica favorecendo a precipitação de partículas de hidroxiapatita com diâmetros menores quando comparado aos sistemas não reticulados (seção 3.3.2.1). Neste contexto, podemos associar que a produção das partículas em escala nanométrica tenha possibilitado uma maior interação das células osteogênicas com as membranas devido ao aumento da área superficial, melhorando o processo de reparação óssea.

Os resultados mostram que o  $Zn^{2+}$  não influenciou de forma significativa no processo de formação de tecido ósseo ( $p < 0,05$ ). Isso porque, o  $Zn^{2+}$  influencia de forma significativa na quantidade absoluta de linfócitos B e T CD8+ e CD73+ em decorrência deste íon participar da maturação dessas células, assim, sugere-se que as baixas concentrações de  $Zn^{2+}$  pode ter modulado este processo de diferenciação além de alterar a liberação de citocinas pelas células mononucleares comprometendo assim o reparo tecidual. (FERNANDES; MAFRA, 2005).

## CONCLUSÃO

Os resultados biológicos de MTT e ALP indicaram comportamento atóxico dos sistemas produzidos, com valores estatisticamente equivalentes. Contudo, a adição de epícloridrina como agente reticulador da matriz polimérica em conjunto com a incorporação de  $Zn^{2+}$  como agente substituinte da fase biocerâmica sugere o processo multifatorial promovendo o relativo aumento da viabilidade celular e da expressão da fosfatase alcalina. Estes resultados podem ser atribuídos aos efeitos combinados de alteração da estrutura polimérica pela formação de ligações cruzadas, redução da dimensão das nanopartículas de nanoHA produzidas e com a incorporação de  $Zn^{2+}$  no seu reticulado cristalino. Os resultados dos ensaios *in vivo* revelaram diferenças importantes entre os sistemas utilizados. Os sistemas propiciaram melhoria no processo de reparo ósseo após 7 dias, entretanto cada sistema produziu um diferente padrão de reparo ósseo. A porcentagem de neoformação óssea no período de 7 dias foi superior nos grupos reticulados com epícloridrina na concentração de 10%.

## **TRABALHOS FUTUROS**

- Síntese de biocompósitos de nHA com os ligantes carboximetilquitosana ou glicolquitosana reticulados e dopados de  $Zn^{2+}$  no intuito de ampliar a aplicação dos híbridos, visto que os ligantes poliméricos apresentam comportamento diferente em distintas faixas de pH.
- Produzir biocompósitos de nanohidroxiapatita com blendas poliméricas de quitosana e carboximetilquitosana ou glicolquitosana reticuladas com epícloridrina verificando a influência das blendas no processo de nucleação e crescimento das partículas de fosfato de cálcio, bem como avaliar os aspectos morfológicos, químicos, estruturais e funcionais desses biocompósitos.
- Adicionar aos biocompósitos uma sequência de peptídeos RGD (R-arginina, G-glicina e D- ácido aspártico) melhorando a adesão celular na superfície do material.
- Realizar ensaio mecânico dos biocompósitos dentro de meio fisiológico para simular o comportamento em situação mais próxima da real.

## **REFERÊNCIAS**



AKCELRUD, L. (2007). Fundamentos da ciência dos polímeros 1. ed. Barueri, São Paulo. Manole.

ALTOMARE, L.; GUGLIELMO, E.; VARONI, E.M.; BERTOLDI, S.; COCHIS, A.; RIMONDINI, L.; DE NARDO, L. Design of 2D chitosan scaffolds via electrochemical structuring. *Biomatter*, 2014.

ANDRADE, S.M.B. Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

ANDRADE, V.B.; SÁ, M.A.; MENDES, R.M.; MARTINS-JÚNIOR, P.A.; SILVA, G.A.B.; SOUZA, B.R.; CALIARI, M.V.; ÁVILA, E.S.; LADEIRA, L.O.; RESENDE, R.R.; FERREIRA, A.J. Enhancement of bone healing by local administration of carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate in rat tibia. *Cells Tissues Organs*. 2017.

ARAI, Y.; SPARKS, D.L. ATR–FTIR spectroscopic investigation on phosphate adsorption mechanisms at the ferrihydrite–water interface *J. Colloid Interface Sci.*, v.241, p.317–26, 2001.

BAMGBOSE, J.T.; ADEWUYI, S.; BAMGBOSE, O.; ADETOYE, A.A. Adsorption kinetics of cadmium and lead by chitosan *Afr. J. Biotechnol.*, v.9, p.2560–5, 2010.

BENAVENTE, M. (2008) *Adsorption of metallic ions onto chitosan: Equilibrium and kinetic studies* Licentiate Thesis. (Stockholm:Royal Institute of Technology) p.55.

BORSAGLI, F.G.L.M.; MANSUR, A.A.P.; CHAGAS, P.; OLIVEIRA, L.C.A.; MANSUR, H. S. O-Carboxymethyl functionalization of chitosan: Complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutant ions *React. Funct. Polym.*, v.97, p.37–47, 2015.

CAI, X.; TONG, H.; SHEN, X.; CHEN, W.; YAN, J.; HU, J. Preparation and characterization of homogeneous chitosan–polylactic acid/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties *Acta Biomater.* v. 5, p. 2693–703, 2009.

CAMPOS, M.G.N.; GROSSO, C.R.F.; CÁDENAS, G.; MEI, L.H.I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. *Macromolecular Symposian*, v.229, p.253-257, 2005.

CHEN, M.M.; HUANG, Y.Q.; CAO, H.; LIU, Y.; GUO, H.; CHEN, L.S.; WANG, J.H.; ZHANG, Q.Q. Collagen/chitosan film containing biotinylated glycol chitosan nanoparticles for localized drug delivery *Colloids Surf., B*, v.128, p.339–46, 2015.

COSTA JR., E. S.; 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, p. 1460-1466, 2008.

COSTA, H.S.; MANSUR, A.A.P.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Engineered Hybrid Scaffolds of Poly(vinyl alcohol)/Bioactive Glass for Potential Bone Engineering Applications: Synthesis, Characterization, Cytocompatibility, and Degradation *Journal of Nanomaterials*, v.12, 2012.

COSTA-JÚNIOR, E. S. ; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; MANSUR, A.A.P.; VASCONCELOS, W.L.; MANSUR, H.S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydr Polym*, v. 76, n. 3, p. 472-481, 2009.

DEMIRTAŞ, T.T.; KAYNAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation, *Mater. Sci. Eng. C*, v.49, p. 713–719, 2015. [Doi 10.1016/j.msec.2015.01.057](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.057)



DO, T.N.; LEE, W.H.; LOO, C.Y.; ZAVGORODNIY, A.V.; ROHANIZADEH, R.

Hydroxyapatite nanoparticles as vectors for gene delivery *Ther.Delivery* , v.3, p.623–32, 2012.

DOROZHKIN S.V., EPPLE M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.41, p.3130–3146, 2002.

DOROZHKIN, S.V. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine review. *Materials*, v.2, p.1975–2045, 2009.

DOROZHKIN, S.V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates *Acta Biomater.* v.6, p.715–34, 2010.

DUMONT, V.C.; MANSUR, A.A.P.; DE CARVALHO, S.M.; BORSAGLI, F.G.L.M.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Chitosan and carboxymethyl-chitosan capping ligands: Effects on the nucleation and growth of hydroxyapatite nanoparticles for producing biocomposite membranes. *Mater. Sci. Eng., C* , v.59, n.1, p. 265–277 2015. DOI:10.1016/j.msec.2015.10.018

ELLIOT, J.C. (1994) *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates* (Amsterdam: Elsevier) p 389.

FANG, C.; BHATTARAI, N.; SUN, C.; ZHANG, M. Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media *Small* v.5, p.1637–41, 2009.

FERNANDES, A.G.; MAFRA, D. Zinco e câncer: uma revisão. *Revista Saúde. Com.*, v.1, n.2, p. 144-156, 2005.

FLEET, M.E.; LIU, X. Coupled substitution of type A and B carbonate in sodium-bearing apatite *Biomaterials*, v.28 , p.916–26, 2007.

GOMEZ-ROMERO, P. Hybrid organic-inorganic materials-in search of synergic activity 2001 *Adv. Mater.*, v.13, p.163–74, 2001.

GONSALVES, A.D.; ARAUJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. Different strategies for crosslinking of chitosan. *Quim. Nova*, v.34, n.7, p.1215–1223, 2011. Doi: 10.1590/S0100-40422011000700021.

HOLMES, C.A.; TABRIZIAN, M. Substrate-mediated gene delivery from glycol-chitosan/hyaluronic acid polyelectrolyte multilayer films *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v.5, p.524–31, 2013.

HOSSEIN, B. M.; SHEMIRANI, F.; SHIRKHODAIE, M.; AQUEOUS. Co(II) adsorption using 8-hydroxyquinoline anchored  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@chitosan with Co(II) as imprinted ions. *Int J Biol Macromol.*, v. 87, p.375-84, 2016. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.077.

JAHANA, K.; TABRIZIAN, M. Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. *Biomater. Sci.*, v.4, n.1, p.25-39 2016. DOI: 10.1039/C5BM00163C

JAWAD, A.H.; NAWI, M.A. Oxidation of crosslinked chitosan-epichlorohydrine film and its application with TiO<sub>2</sub> for phenol removal. *Carbohydr Polym*, v.90, n.1, p.87-94, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.04.066. Epub 2012 May 5.

JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; CHRISTIE, G. B. Y.; LONERGAN, G. T. Preparation, surface modification and characterization of solution cast starch PVA blended films. *Polymer Testing*, v.23, p.17-27, 2004.

KALE, S.;BIERMANN, S.; EDWARDS, C.; TARNOWSKI, C. MORRIS, M.; LONG, M.W. Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone . *Nat. Biotechnol.*, v.18, p. 954-8, 2000. doi:10.1038/79439

KONG, L.; YUAN, G.; GUANGYUAN, L.; YANDAO, G.; NANMING, Z.; XIUFANG, Z. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering *Eur. Polym. J.*, v.42, p.3171–79, 2006.

KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr Res.*, v.10, n.4, p. 268-74, 2000. Doi:10.1016/S0008-6215(99)00263-3

LEE, S.J.; MIN, H.S.; KU, S.H.; SON, S.; KWON, I.C.; KIM, S.H.; KIM, K. Tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles as a platform delivery carrier in cancer diagnosis and therapy *Nanomedicine*, v.9, p.1697–713, 2014.

LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA, J.; FIEJDASZ, S.; RODZIK, L.; ŁATKIEWICZ, A.; NOWAKOWSKA, M. Novel hybrid materials for preparation of bone tissue engineering scaffolds *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.26, p.231, 2015.

LI, Z.; DU, Y.; ZHANG, Z.; PANG, D. Preparation and characterization of CdS quantum dots chitosan biocomposite *React. Funct. Polym.*, v.55, p.35–43, 2003.

LIAO, C.J.; LIN, F.H.; CHEN, K.S.; SUN, J.S. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere *Biomaterials*, v.20, p.1807–13, 1999.

LIMA, A.M.F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V.; BORSALI, R. Influence of plasticizer addition and crosslinking process on morphology, water absorption and mechanical properties of sodium alginate films. *Quím. Nova*, v.30, 2007. Doi: 10.1590/S0100-40422007000400014

LIU, H.; ADHIKARI, R.; GUO, Q.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films. *Journal of Food Engineering*, v.116, p.588- 597, 2013.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, v.17, n.1, p. 79-87, 2004.

MAIRE, E.; BUFFIÈRE, J.Y.; SALVO, L.; BLANDIN, J.J.; LUDWIG, W.; LÉTANG, J.M. On the application of X-ray microtomography in the field of materials science *Adv. Eng. Mater.*, v.3, p.539–46, 2001.

MALHOTRA, M.; LANE, C.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; PRAKASH, S. A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis *Int. J. Nanomedicine*, v.6, p.485–94, 2011.

MANSUR, A.A.P.; DE ALMEIDA, C.G.; DE CARVALHO, S.M.; DE FARIA, L.V.; DE ALMEIDA, M.V.; MANSUR, H.S. Cytocompatible fluorescent quantum dot/PEG-chitosan bioconjugates for nanomedicine applications *Eur. J. Inorg. Chem.*, v.27, p.4555–64, 2015.

MANSUR, A.A.P.; MANSUR, H.S. Quantum dot/glycol chitosan fluorescent nanoconjugates *Nanoscale Res. Lett.*, v.10, p.172, 2015.

MANSUR, H.S.; COSTA-JUNIOR, E.S.; MANSUR, A.A.P.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. *Mater Sci Eng C*, v. 29, p. 1574-1583, 2009.

MANSUR, H.S.; MANSUR, A.A.P.; CURTI, E.; DE ALMEIDA, M.V. Bioconjugation of quantum-dots with chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan *Carbohydr. Polym.* v.90, p. 189–96, 2012.

MANSUR, H.S.; MANSUR, A.A.P.; CURTI, E.; DE ALMEIDA, M.V. Functionalized-chitosan/quantum dot nano-hybrids for nanomedicine applications: towards biolabeling and biosorbing phosphate metabolites *J. Mater. Chem. B*, v.1, p.1696–711, 2013.

MEI, L.H.I.; LEITE, R.C.; FELISBERTI, M.I. Hidrogéis de poli(álcool vinílico): caracterização do grau de intumescimento e de reticulação para aplicação em liberação controlada de drogas. *III Congresso Brasileiro de Polímeros*, p.269-272, 1995.

MILAS, M. (1991) Polieletrólitos. São Carlos: Instituto de Química e Física de São Carlos, P.84.

MOREIRA, C.D.F.; CARVALHO, S.M.; MANSUR, H.S.; PEREIRA, M.M. Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering *Mater. Sci. Eng., C*, v.58, p.1207–16, 2016.

NAGEM-FILHO, H.; NAGEM, H.D.; D'AAZEVEDO, M.T.S.F.; FIUZZA, C.T. Bom tissue neoformation. *Dental Science*, v.3, n.9, p. 86-93, 2009.

NATH, S.; DEY, A.; MUKHOPADHYAY, A.K.; BASU, B. Nanoindentation response of novel hydroxyapatite-mullite composites *Mater. Sci. Eng. A* 513–514, p.97–201, 2009.

NOGUEIRA, F.T. Síntese e Caracterização de membranas de Filmes Finos composto de polissulfona/quitosana reticulada com glutaraldeído. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O'CONNOR, N.A.; ABUGHARBIEH, A.; YASMEEN, F.; BUABENG,E.; MATHEW, S.;SAMAROO,D.; CHENG,H.P.The crosslinking of polysaccharides with polyamines and dextran polyallylamine antibacterial hydrogels. *Int J Biol Macromol.*, v. 72, p. 88-93, 2015. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.003.

OLIVEIRA, A.P.R. Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.27-46, 2000.

PIGHINELLI, L.; KUCHARSKA, M. Chitosan–hydroxyapatite composites *Carbohydr. Polym.* v.93, p.256–62, 2013

PINA, S.; OLIVEIRA, J.M.; REIS, R.L. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review *Adv. Mater.*, v.27, p.1143–69, 2015.

POLETI, M.L. Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos Wistar. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

QI, X.N.; MOU, Z.L.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.Q. Preparation of chitosan/silk fibroin/hydroxyapatite porous scaffold and its characteristics in comparison to bi-component scaffolds *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, v.102, p.366–72, 2014.

RAMANERY, F.P.; MANSUR, A.A.P.; BORSAGLI, F.G.L.M.; MANSUR, H.S. Green and facile synthesis of water-soluble ZnS quantum dots nanohybrids using chitosan derivative ligands *J. Nanopart. Res.*, v.16, p.2504–19, 2014.

RANGEL-MENDEZA, R.; MONROY-ZEPEDAB, R.; LEYVA-RAMOSB, E.; DIAZ-FLORESA, P.E.; SHIRAI, K. Chitosan selectivity for removing cadmium (II), copper (II), and lead (II) from aqueous phase: pH and organic matter effect. *J. Hazard. Mater.* v.162, p.503–11, 2009.

RATNER, B.D.(1993) Characterization of biomaterial surfaces. *Cardiovasc. Pathol.*, v.2, p. 87s-100s.

REILLY, G.C.; RADIN, S.; CHEN, A.T.; DUCHEYNE, P. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass *Biomaterials*, v.28, p. 4091–7, 2007.

RIBEIRO NETO, W.A.; DE PAULA, A.C.C.; MARTINS, T.M.M.; GOES, A.M.; AVEROUS, L.; SCHLATTER, G.; BRETAS, R.E.S..Poly (butylene adipate-co-erephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polymer Degradation and Stability*, v.120, p.61-69, 2015.

RIVA, R; RAGELLE, H.; ANNE DES RIEUX, A.; DUHEM, N.; JÉRÔME, C.; PRÉAT, V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. *Advances in Polymer Science*, v. 244, p. 19-44, 2011.

SÁ, M.A.; RIBEIRO, H.J.; VALVERDE, T.M.; SOUSA, B.R.; MARTINS-JÚNIOR, P.A.; MENDES, R.M.; LADEIRA, L.O.; RESENDE, R.R.; KITTEN, G.T.; FERREIRA, A.J. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Braz J Med Biol Res.*, v.49, n.2, p.4888, 2016.

SANCHEZ, C.; ARRIBART, H.; GUILLE, M.M.G. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems *Nat. Mater.*, v.4, p.277–88, 2005.

SANTOS, J. C. C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. One-step biofunctionalization of quantum dots with chitosan and n-palmitoyl chitosan for potential biomedical applications. *Molecules*, v. 18, p. 6.550-6.572, 2013.

SANTOS, J.C.C.; MORENO, P.M.D.; MANSUR, A.A.P.; LEIRO, V.; MANSUR, H.S.; PÊGO, A.P. Functionalized chitosan derivatives as nonviral vectors: physicochemical properties of acylated N,N,N-trimethyl chitosan/oligonucleotide nanopolyplexes *Soft Matter*, v.11, p.8113–25, 2015.

SANTOS, M.H.; HENEINE, L.G.D.; MANSUR, H.S. Synthesis and characterization of calcium phosphate/collagen biocomposites doped with  $Zn^{2+}$  *Mater. Sci. Eng., C*, v.28, p.563–71, 2008.

SHORT, A.R.; KORALLA, D.; DESHMUKH, A.; WISSEL, B.; STOCKER, B.; CALHOUN, M.; DEAND, D.; WINTER, J.O. Hydrogels that allow and facilitate bone repair, remodeling, and regeneration *J. Mater. Chem. B*, v.3, p.7818–30, 2015.

SILVA, R. C.; ANDRADE JR., M. A. S.; CESTARI, A.R. Adsorption of Cr(VI) onto crosslinked chitosan microbeads - new kinetic and thermodynamic correlations using continuous isothermal microcalorimetry. *Quim. Nova*, v.33, n.4, p. 880-884, 2010. Doi 10.1590/S0100-40422010000400022

SOLIER, P.; DENUZIÈRE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between the Degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan *Biomacromolecules*, v.2, p.765–72, 2002.

SPERLING, R.A.; PARAK, W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles *Phil. Trans. R. Soc. A*, v.368, p.1333–83, 2010.

SUN, I.C.; NA, J.H.; JEONG, S.Y.; KIM, D.E.; KWON, I.C.; CHOI, K.; AHN, C.H.; KIM, K. Biocompatible glycol chitosan-coated gold nanoparticles for tumor-targeting CT Imaging *Pharm. Res*, v.31, p.1418–25, 2014.

SWETHA, M.; SAHITHI, K.; MOORTHY, A.; SRINIVASAN, N.; RAMASAMY, K.; SELVAMURUGAN, N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering *Int. J. Biol. Macromol.*, v.47, p.1–4, 2010.

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

TIRTOM, N. V., DINÇER, A., BECERİK, S., AYDEMİR, T., ÇELİK, A. Comparative adsorption of Ni(II) and Cd(II) ions on epichlorohydrin crosslinked chitosan–clay composite beads in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, v.197, p.379- 386, 2012.

TORRES, M.A.; VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 306-312, 2005.

TRINH, L.A.; MCCUTCHEN, M.D.; BONNER-FRASER, M.; FRASER, S.E.; BUMM, L.A.; MCCAULEY, D.W. Fluorescent in situ hybridization employing the conventional NBT/BCIP chromogenic stain *BioTechniques* 42 756–9, 2007.

UYSAL, I.; SEVERCAN, F.; EVIS, A.T.Z. Co-doping of hydroxyapatite with zinc and fluoride improves mechanical and biological properties of hydroxyapatite. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* , v.24, p.340–349, 2014. Doi 10.1016/j.pnsc.2014.06.004



VALLET-REGÍ, M.; NAVARRETE, D.A. Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications (Cambridge: The Royal Society of Chemistry), p.1–29, 2016.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S.V.; KENNEDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review *Carbohydr. Polym.*, v.55, p.77–93, 2004.

VENKATESAN, J.; KIM, S.K. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview *Mar. Drugs*, v.8, p.2252–66, 2010.

VERNÉ, E.; FERRARIS, S.; VITALE-BROVARONE, C.; SPRIANO, S.; BIANCHI, C.L.; NALDONI, A.; MORRA, M.; CASSINELLI, C. Alkaline phosphatase grafting on bioactive glasses and glass ceramics *Acta Biomater.*, v.6, p.229–40, 2010.

WALKER, J.; SHADANBAZ, S.; WOODFIELD, T.B.F.; STAIGER, M.P.; DIAS, G.J. The *in vitro* and *in vivo* evaluation of the biocompatibility of Mg alloys *Biomed. Mater.* v.9, p. 015006, 2014.

WANG, F.; ZHANG, Y.C.; ZHOU, H.; GUO, Y.C.; SU, X.X. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* osteogenic differentiation of nano-hydroxyapatite/chitosan/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds with human umbilical cord mesenchymal stem cells *J. Biomed. Mater. Res. Part A* v.102, p.760–68, 2014.

WANG, P.; ZHAO, L.; LIU, J.; WEIR, M.D.; ZHOU, X.; XU, H.H.K. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells *Bone Res.*, v.2, p.14017, 2014.

YOON, H.Y.; SON, S.; LEE, S.J.; YOU, D.G.; YHEE, J.Y.; PARK, J.H.; SWIERCZEWSKA, M.; LEE, S.; KWON, I.C.; KIM, S.H.; KIM, K.; POMPER, M.G. Glycol chitosan nanoparticles as specialized cancer therapeutic vehicles: Sequential delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA *Sci. Rep.* v.4, p.6878, 2014. doi: 10.1038/srep06878

ZHANG, W.; HALLASTROM, B. Membrane characterization using the contact angle technic. I Methodology of the captive bubble technique. *Desalination*, v.79, p.1-12, 1990. Doi 10.1016/0011-9164(90)80067-L

ZHANG, W.; WAHLGREN, M.; SIVIK, B. Membrane Characterization by the Contact Angle Technique: II. Characterization of UF-Membranes and Comparison between the Captive Bubble and Sessile Drop as Methods to obtain Water Contact Angles. *Desalination*, v.72, p. 263-273, 1989. Doi:10.1016/0011-9164(89)80011-6

ZHANG, Y.F.; CHENG, X.R.; CHEN, Y.; SHI, B.; CHEN, X.H.; XU, D.X.; KE, J. Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. *J Biomater Appl.*, v.21, n.4, p. 333-49, 2007. Doi 10.1177/0885328206063853

ZIVANOVIC, S.; LI, J.; DAVIDSON, P.M.; KIT, K. Physical mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomocromolecules*, v.8, p. 1505-1510, 2007.

## **Contribuições para a Literatura:**

### **Artigos publicados em periódicos:**

- DUMONT, VITOR C.; MANSUR, HERMAN S.; MANSUR, ALEXANDRA A.P.; CARVALHO, SANDHRA M.; CAPANEMA, NÁDIA S.V.; BARRIONI, BRENO R.. Glycol chitosan/Nanohydroxyapatite Biocomposites for Potential Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, p. 1465-1478, 2016. Doi 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.030.

- DUMONT, VITOR C.; MANSUR, ALEXANDRA A.P.; CARVALHO, SANDHRA M.; MEDEIROS BORSAGLI, FERNANDA G.L.; PEREIRA, MARIVALDA M.; MANSUR, HERMAN S.. Chitosan and carboxymethyl-chitosan capping ligands: Effects on the nucleation and growth of hydroxyapatite nanoparticles for producing biocomposite membranes. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print)*, v. 59, p. 265-277, 2016.

### **Resumos completos em anais de congresso:**

- DUMONT, V. C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA/HIDROXIAPATITA DOPADOS COM NÍÓBIO. In: 8º Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de tecidos, 2014, Rosário. 8º Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de tecidos.

- DUMONT, V.C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Efeito do processo de secagem nas propriedades dos filmes de quitosana. In: IV Latin American Symposium on

Polymers and XII Ibero American Congress on Polymers, 2014, Porto de Galinhas. IV Latin American Symposium on Polymers and XII Ibero American Congress on Polymers, 2014.

**Resumos expandidos em anais de congresso:**

- DUMONT, V. C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Synthesis and Characterization of Chitosan/Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Potential Bone Repair Applications. In: 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 2014, Liverpool. Full programmer, 2014.

**Resumos publicados em anais de congresso:**

- DUMONT, V. C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. . Bionanocomposites of chitosan and carboxymethyl chitosan with calcium phosphate particles for biomedical applications: swelling and cytocompatibility evaluation. In: XIV Brazilian MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazilian MRS Meeting, 2015.

- DUMONT, V. C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. . Polysaccharide ligands: effects on the properties of calcium phosphate-based bionanocomposites. In: XIV Brazilian MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazilian MRS Meeting, 2015.

- DUMONT, V. C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Synthesis and characterization of chitosan/ hydroxyapatite biocomposite doped with niobium. In: 8° Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de tecidos, 2014, Rosário. 8° Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de tecidos.

- DUMONT, V.C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Effect of molecular mass on the properties of chitosan/hydroxyapatite biocomposites incorporated with niobium. In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2014, João Pessoa. XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2014.

- DUMONT, V.C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. . Efeito do pH nas propriedades de hidrogéis de quitosana. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. CBECiMat, 2014, Cuiabá. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. CBECiMat, 2014. v. 208006. p. 3165-3165.

**Apresentação de trabalhos em congresso:**

- DUMONT, V. C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Polysaccharide ligands: effects on the properties of calcium phosphate-based bionanocomposites. 2015.

- DUMONT, V. C.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Bionanocomposites of chitosan and carboxymethyl chitosan with calcium phosphate particles for biomedical applications: swelling and cytocompatibility evaluation. 2015.

- DUMONT, V. C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Synthesis and characterization of chitosan/ hydroxyapatite biocomposite doped with niobium. 2014.

- DUMONT, V. C.; CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.. Synthesis and Characterization of Chitosan/Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Potential Bone Repair Applications. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).