



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Tese de Doutorado

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS POROSOS À BASE
DE SÍLICA E QUITOSANA OBTIDOS ATRAVÉS DO PROCESSO
SOL-GEL PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Autor: Emmerson Moisés Reis
Orientadora: Prof^a. Marivalda de Magalhães Pereira, Ph.D

Julho/2007

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Emmerson Moisés Reis

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS POROSOS À BASE
DE SÍLICA E QUITOSANA OBTIDOS ATRAVÉS DO PROCESSO
SOL-GEL PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Minas.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais
Orientadora: Prof^ª. Marivalda de Magalhães Pereira, Ph.D

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
Julho de 2007

À Ana Paula,

companheira de todas as horas, pela motivação, dedicação,

carinho e compreensão durante todo este tempo.

Nos momentos mais difíceis você sempre esteve lá.

AGRADECIMENTOS

À professora Marivalda de Magalhães Pereira pela competência com que conduziu a orientação deste trabalho, pela disponibilidade, dedicação e exemplo de profissionalismo mostrados durante todo este tempo. Que a amizade adquirida ao longo destes 6 anos de convivência continue presente em nossas vidas. Muito obrigado.

Aos professores Rodrigo Oréfice e Herman Mansur, que estiveram sempre presentes e participaram da minha formação multidisciplinar.

Ao professor Wander Luiz Vasconcelos por disponibilizar o seu laboratório para realização de experimentos.

Aos técnicos de laboratório Patrícia, Hilda, Paulo, Isabel, Andréia e Denise pela dedicação e carinho, sem os quais este trabalho seria inviável.

Ao aluno de iniciação científica Daniel, grande amigo, pelo auxílio prestado na execução dos experimentos. Muito obrigado.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelos quais tenho gratidão e amizade. Em especial, à Agda pelo grande apoio prestado durante a realização dos meus experimentos. A sua ajuda foi muito importante.

À Patrícia Valério e Viviane Gomide pela dedicação e presteza na realização dos testes de citotoxicidade no ICB-UFMG.

À CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

À minha família querida, sempre ao meu lado nas minhas decisões, o meu amor incondicional.

A Deus, por tudo...

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	III
	LISTA DE TABELAS	VII
	LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
	RESUMO	X
	ABSTRACT	XI
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
3	REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1	Matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos	6
3.2	Biomateriais utilizados como substratos para crescimento ósseo	12
3.2.1	Biocerâmicas	12
3.2.2	Biopolímeros	17
3.2.3	Quitosana	21
3.2.4	Híbridos organo-inorgânicos	36
3.2.5	Híbridos organo-inorgânicos à base de sílica e quitosana	40
3.3	Processamento sol-gel	47
3.4	Estrutura de poros em matrizes teciduais	56
3.5	Cultura de células	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1	Reagentes	68
4.2	Síntese dos híbridos de quitosana / sílica (H100S) e sílica-cálcia (H70S)	69
4.3	Envelhecimento e secagem dos híbridos	72
4.4	Neutralização dos híbridos	73
4.5	Caracterização dos híbridos	75
4.6	Teste de biodegradação in vitro	76
4.7	Teste de citotoxicidade	77
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1	Teste preliminar de citotoxicidade da quitosana Herbarium	80
5.2	Solubilização da quitosana	82

5.3	Síntese sol-gel de híbridos de quitosana/sílica (H100S) e sílica-cálcia (H 70S)	83
5.3.1	Formação e estabilidade de espumas	83
5.3.2	Geleificação dos híbridos de quitosana e sílica	93
5.3.3	Secagem das amostras	95
5.3.4	Neutralização	98
5.4	Caracterização das amostras	101
5.4.1	Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	101
5.4.2	Difração de Raios-X (DRX)	105
5.4.3	Microscopia Ótica	109
5.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	110
5.4.5	Avaliação da porosidade - Técnica da Balança de Arquimedes	118
5.4.6	Espectroscopia por infravermelho (FTIR)	119
5.4.7	Ensaio Mecânico de Compressão	127
5.5	Teste de Biodegradação <i>in vitro</i>	140
5.6	Testes de Citotoxicidade	143
5.6.1	Viabilidade Celular (MTT)	143
5.6.2	Fosfatase Alcalina (ALP)	146
5.6.3	Produção de Colágeno	147
6	CONCLUSÕES	149
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Representação esquemática da engenharia de tecido (Fonte: Coelho, 2003).....	8
Figura 3.2	Representação das estruturas químicas da celulose, quitina e quitosana (Fonte: Kumar & Hudson, 2004).....	22
Figura 3.3	Grupos reativos no monômero de quitosana (Adaptado de Lavertu et al., 2003).....	25
Figura 3.4	Estrutura molecular do copolímero de quitosana contendo grupos acetamidos e aminos no carbono 2 (Madihally & Matthew, 1999).....	28
Figura 3.5	(a) Representação esquemática das membranas sintetizadas a partir do TEOS com e sem a presença de quitosana; (b) Comportamento das membranas de TEOS/Quitosana frente às variações de pH (Adaptado de Park et al., 2001).....	46
Figura 3.6	Esquema de transição sol-gel: a) formação de gel particulado e b) formação de gel polimérico (Adaptado de Alfaya & Kubota, 2002).....	49
Figura 3.7	Representação esquemática de má distribuição de células ao longo de um substrato poroso (Fonte: Sittinger, Hutmacher & Risbud, 2004).....	62
Figura 3.8	O processo mesengênico (Fonte: Caplan & Bruder, 1997).....	63
Figura 4.1	Síntese via sol-gel de híbridos de vidro bioativo e quitosana. A) Hidrólise (TEOS, água e HCl); B) CaCl ₂ .2H ₂ O (somente para híbridos 70S); C) Solução de quitosana + Surfactante + HF; D) Agitação mecânica; E) Vazamento do gel em moldes cilíndricos de polietileno.....	69
Figura 4.2	Fluxograma de atividades para a síntese dos híbridos de sílica e sílica-cálcia com quitosana através do processo sol-gel.....	74
Figura 5.1	Teste preliminar de citotoxicidade da quitosana Herbarium - Ensaio MTT: a) Grupo 1 (controle): Células em meio de cultura (20x1,5); b) Grupo 2: Células em meio de cultura + solução de quitosana em ácido acético (20 x 1,5); c) Grupo 3: Células em meio de cultura + quitosana <i>in natura</i> (4 x 1,5).....	81
Figura 5.2	Viabilidade celular. 1,7 x 10 ⁴ células Sho de ovários de camundongos por poço. A proliferação celular foi avaliada para os grupos 1, 2 e 3 através do ensaio MTT.....	81
Figura 5.3	Decaimento do volume das espumas produzidas pela mistura da solução sol-gel com o detergente Teepol®(a) e os surfactantes LESS (b) e Renex® (c).....	85
Figura 5.4	Decaimento da espuma produzida com a solução sol-gel.....	87

Figura 5.5	Decaimento do volume das espumas produzidas pela mistura da solução sol-gel e quitosana (H20) com o detergente Teepol®(a) e os surfactantes LESS (b) e Renex® (c).....	89
Figura 5.6	Drenagem da espuma ao longo do tempo.....	91
Figura 5.7	Imagens obtidas por MEV (100x) de híbridos H20 Aldrich sintetizados com os surfactantes: a) Renex e b) LESS.....	92
Figura 5.8	Análise comparativa do tempo de geleificação de híbridos de sílica e quitosana Aldrich em diversas composições por peso para uma alíquota da solução sol-gel fixa (20ml).....	94
Figura 5.9	Geleificação solução de híbridos H20 em função do tempo.....	95
Figura 5.10	Envelhecimento e secagem das amostras.....	96
Figura 5.11	Perda de massa (%) x tempo de secagem (h) de acordo com o método de secagem..	97
Figura 5.12	Espectro FTIR para amostras H20 Herbarium antes e depois da neutralização com NH ₄ OH 0,5M por 4 horas.....	100
Figura 5.13	Curvas TGA dos híbridos de sílica 100S e quitosana Aldrich nas diversas composições.....	102
Figura 5.14	Curvas TGA dos híbridos H20 submetidos ou não à neutralização.....	104
Figura 5.15	Curvas DTA da quitosana Aldrich, do híbrido H20 e do vidro 100S.....	105
Figura 5.16	Difratogramas comparativos do vidro bioativo 100S e das quitosanas Aldrich e Herbarium.....	106
Figura 5.17	Difratogramas dos híbridos com fase inorgânica 100S e quitosanas Aldrich (a) e Herbarium (b).....	108
Figura 5.18	Imagens obtidas por microscopia ótica (aumento de 9x) dos híbridos H10 (a), H20 (b) e H30 (c).....	109
Figura 5.19	Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica e quitosana Herbarium nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 100x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 100x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 100x).....	111
Figura 5.20	Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica e quitosana Aldrich nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 100x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 100x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 100x).....	113

Figura 5.21	Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica-cálcia (70S) e quitosana Aldrich nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 50x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 50x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 50x).....	115
Figura 5.22	Imagens obtidas por MEV de vidro bioativo 100S: a) aumento de 25x e b) aumento de 50x.....	116
.Figura 5.23	Imagens obtidas por MEV de vidro bioativo 70S: a) aumento de 25x e b) aumento de 100x.....	116
Figura 5.24	Espectro FTIR das quitosanas utilizadas como fase orgânica dos híbridos.....	122
Figura 5.25	Espectro FTIR dos híbridos H10, H20 e H30 Aldrich.....	123
Figura 5.26	Espectro FTIR dos híbridos H10, H20 e H30 Herbarium.....	123
Figura 5.27	Esquema hipotético da interação entre a sílica e a quitosana. (Adaptado de RASHIDOVA ET AL., 2004).....	125
Figura 5.28	Espectro FTIR comparativo dos híbridos H30 Aldrich com fase inorgânica 100S e 70S.....	126
Figura 5.29	Curvas tensão x deformação de híbridos não-porosos da quitosana Herbarium e sílica.....	128
Figura 5.30	Curvas tensão x deformação de híbridos não-porosos da quitosana Aldrich e sílica.....	129
Figura 5.31	Curvas tensão x deformação de híbridos H20 não-porosos das quitosanas Herbarium, Aldrich APM e Aldrich MPM com a sílica.....	131
Figura 5.32	Curvas tensão x deformação de híbridos H20 não-porosos de quitosana Aldrich com o aditivo glicerol e sílica.....	132
Figura 5.33	Curvas tensão x deformação de híbridos H20 não-porosos de quitosana Aldrich com sílica e sílica-cálcia (70S).....	133
Figura 5.34	Curvas tensão x deformação de híbridos porosos da quitosana Herbarium e sílica.....	135
Figura 5.35	Curvas tensão x deformação de híbridos porosos da quitosana Aldrich e sílica.....	135
Figura 5.36	Curva força x deformação típica de ensaio de compressão pelo método de pratos paralelos de vidros bioativos porosos. (Adaptado de Jones, Ehrenfried & Hench, 2006).....	136
Figura 5.37	Curvas tensão x deformação de híbridos H20 porosos de quitosana Aldrich antes e depois da neutralização e Herbarium com sílica e sílica-cálcia.....	138

Figura 5.38	Teste de biodegradação de híbridos H20 Herbarium. Percentual de perda de massa em função do tempo de imersão em PBS a 37 ⁰ C.....	141
Figura 5.39	Viabilidade celular de osteoblastos no grupo controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5x10 ⁴ células por poço.....	144
Figura 5.40	Imagem obtida por microscopia ótica do ensaio de viabilidade celular (MMT) em amostras H10.....	146
Figura 5.41	Produção de fosfatase alcalina por osteoblastos nos grupos controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5x10 ⁴ células por poço.....	146
Figura 5.42	Produção de colágeno por osteoblastos nos grupos controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5x10 ⁴ células por poço.....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Polímeros utilizados nas diversas aplicações biomédicas.....	17
Tabela 3.2	Formas e aplicações da quitosana (Fonte: Aimoli & Beppu, 2004).....	24
Tabela 4.1	Híbridos sintetizados à base de sílica 100S (100% SiO ₂) e sílica-cálcia 70S (70% SiO ₂ /30%CaO) com as quitosanas Herbarium e Aldrich nas formas porosas (P) e não-porosas (NP).....	71
Tabela 4.2	Soluções usadas na espumação da solução sol-gel.....	72
Tabela 4.3	Soluções usadas na espumação da solução sol-gel e solução de quitosana H2O.....	72
Tabela 5.1	Volume inicial e tempo de decaimento para as espumas produzidas com a solução sol-gel.....	86
Tabela 5.2	Volume inicial e tempo de decaimento para as espumas produzidas com solução sol-gel e quitosana (H2O) e os três surfactantes. D: drenagem / NA:não avaliado.....	90
Tabela 5.3	Medidas de pH em água deionizada de híbridos H2O 100S após neutralização em diferentes intervalos de tempo.....	99
Tabela 5.4	Porcentagem de perda de peso dos híbridos através do TGA.....	103
Tabela 5.5	Composição estimada de híbridos de sílica e quitosana.....	103
Tabela 5.6	Valores obtidos para as densidades verdadeira e volumétrica e porosidades aparente e total para os híbridos H10, H20 e H30 da quitosana Herbarium.....	118
Tabela 5.7	Principais bandas identificadas na literatura no espectro de FTIR para amostra de quitosana e vidro bioativo à base de sílica.....	120
Tabela 5.8	Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos não porosos em diversas composições.....	128
Tabela 5.9	Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos porosos em diversas composições.....	134
Tabela 5.10	Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos H20 com ou sem procedimento de neutralização.....	138
Tabela 5.11	Tabela 5.11 Propriedades mecânicas de tecidos humanos. N/A: não avaliado (Adaptado de Yang et al., 2001).....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Ensaio Mitocondrial do Sal de Tetrazólio (“ <i>Mosmann Toxicity Test</i> ”)
TEOS	Tetraetilortossilicato
LESS	Lauril éter sulfato de sódio
GD	Grau de desacetilização da quitosana
PBS	Solução-tampão (“ <i>phosphate-buffered saline</i> ”)
SBF	Soro fetal bovino
DTA	Análise Térmica Diferencial
TGA	Análise Termogravimétrica
PVA	Álcool polivinílico
DRX	Difração de raios -X
ALP	Ensaio de fosfatase alcalina
H-NMR	Ressonância magnética nuclear no estado líquido
HCA	Hidroxiapatita carbonatada
ECM	Matriz extracelular
TCP	Tricálcio fosfato
PLA	ácido polilático
PGA	Ácido poliglicólico
PLGA	Copolímero de ácido glicólico e polilático
PCL	Policaprolactona
PEO	Óxido de polietileno
GAGs	Glicosaminoglicanas
UV	Espectroscopia de ultravioleta
TMOS	Tetrametilortossilicato
GPTMS	γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
THEOS	Tetrahidroxietilortossilicato
MSC	Células mesenquimais indiferenciadas

ESC	Células-tronco embriogênicas
FSC	Células-tronco fetais
BMSCs	Células-tronco originadas da medula óssea
BMPs	Proteínas morfogenéticas
TGF-β	Fatores de crescimento beta
kD	QuiloDálon

RESUMO

A produção de híbridos organo-inorgânicos sintetizados em escala nanométrica tem crescido nos últimos tempos devido às suas propriedades favoráveis e às varias possibilidades de aplicação na engenharia de tecidos. A quitosana é um polissacarídeo natural caracterizado pela baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e por suas propriedades bacteriostáticas. Tendo em vista que a quitosana possui dois grupos hidroxilas e um grupo amina por unidade de glucosamina, derivados de quitosana e interações com outros materiais podem ser obtidos. Estudos na literatura têm associado aos vidros bioativos baseados na sílica a capacidade de formar uma forte ligação superficial com o tecido ósseo. Neste trabalho, o processo sol-gel foi utilizado para a síntese de matrizes híbridas macroporosas compostas por sílica e quitosana em várias proporções (10, 20 e 30% em peso). Os resultados mostraram que a produção dos híbridos foi satisfatória através do método sol-gel. A utilização da quitosana numa proporção de 10 e 20% resultou em matrizes macroporosas com ampla distribuição de tamanho de poros (100 a 500 μ m). Os híbridos com 30% de quitosana apresentaram distribuição de poros de 50 a 250 μ m. As porosidades obtidas através do método da balança de Arquimedes foram 90%, 86% e 78% para os híbridos H10, H20 e H30, respectivamente. A análise por difração de raios-X mostrou o caráter amorfo dos híbridos sintetizados, enquanto que a quitosana foi caracterizada por um pico cristalino a 20° em 2θ . O comportamento mecânico dos híbridos foi avaliado através do ensaio de compressão e os resultados mostraram valores de tensão máxima à fratura significativamente superiores aos apresentados pelos vidros puros. A espectroscopia por infravermelho mostrou bandas relativas aos componentes envolvidos na síntese e um banda associada ao grupamento Si-O-C que se tornou mais acentuada à medida que a quantidade de quitosana aumentou no híbrido, o que poderia sugerir uma interação entre as fases orgânicas e inorgânicas presentes nos híbridos. Os testes de citotoxicidade realizados com osteoblastos mostraram adequadas viabilidade celular e produção de fosfatase alcalina, confirmando os baixos níveis de toxicidade apresentados pelos híbridos sintetizados, apesar da baixa produção de colágeno quando comparados com o grupo controle.

Palavras-Chave: Híbridos, Vidros bioativos, Quitosana, Matrizes, Engenharia de tecidos, Processo sol-gel.

ABSTRACT

The fabrication of biomaterials based on inorganic and organic species combined at a nanoscale level has increased in the last years due to their varied characteristics and application possibilities. Chitosan is a natural polysaccharide and has attracted much interest because of their non-toxicity, biodegradability, biocompatibility, bacteriostatic properties. Since chitosan has two hydroxyl groups and one amino group per glucoseamine unit, new chitosan derivatives and interactions with other materials can be produced. On the other hand, silica based bioactive glasses have been widely studied since they have the capacity to promote bone-tissue formation at their surface. In this work the sol-gel method was used for preparation of macroporous 3D hybrid scaffolds based on silica and chitosan in various compositions (10, 20 and 30% wt). The results showed that porous hybrids were successfully synthesized by the sol-gel method at low temperature. The drying methods using oven at 50°C and low vacuum were suitable to obtain dry and intact hybrid foams. The use of 10 and 20% of chitosan in weight to produce the hybrids resulted in macroporous scaffolds with larger pore size range (100-500µm). The hybrids H30 showed pore sizes from 50 to 250µm. The estimated porosity by Archimedes method was around 90%, 86% and 78% for hybrids H10, H20 and H30, respectively. XRD patterns of the samples showed the amorphous character of the hybrids, while chitosan, a semi-crystalline polymer, was characterized by a clear peak at 2θ equal 20°. The mechanical behavior of the hybrids was evaluated in compression and showed higher strength than silica glasses. The FTIR spectroscopy showed a band relative to Si-O-C bond that was also found to increase with the increasing the amounts of chitosan in the hybrid. This fact can suggest an interaction between the organic-inorganic phases in the material. The cytotoxicity evaluation exhibited successful viability of osteoblasts and the hybrids presents in the culture does not interfered with alkaline phosphatase production, confirming the low toxicity level of the hybrids prepared, despite the collagen secretion was decreased in the presence of the samples when compared to control group.

keywords: Hybrids, Bioactive Glass, Chitosan, Scaffolds, Tissue Engineering, Sol-gel Method.

1. INTRODUÇÃO

A lesão de tecidos como resultado de doenças ou acidentes, associada à idade avançada, pode levar a uma acentuada perda da qualidade de vida por parte da população acometida, além de um custo elevado de tratamento para os cofres públicos. As próteses artificiais, que não se integram biologicamente aos tecidos vizinhos, são freqüentemente sujeitas a desgastes por fadiga e corrosão ou a fraturas que levam à necessidade de outros procedimentos cirúrgicos que geram aumento de custos e desconforto para os pacientes. Quando se consegue um favorável aporte sanguíneo para a região enxertada, os enxertos ósseos autógenos constituem uma excelente alternativa para reconstrução de tecidos perdidos ou lesionados. Infelizmente, para a maioria dos casos, uma quantidade muito limitada de material para enxerto autógeno está disponível devido à carência de sítios doadores. Uma outra opção para estes casos seria o tratamento com aloenxertos de tecido ósseo, ou seja, utilização de tecido ósseo colhido de outro organismo de mesma espécie para a realização dos enxertos. O osso alógeno traz como principais desvantagens a maior possibilidade de rejeição dos tecidos enxertados pelo organismo receptor e um risco aumentado de transmissão de doenças.

Uma excelente alternativa para tais tratamentos surgiu com a engenharia de tecidos. Esta área do conhecimento tem sido definida como a aplicação de princípios científicos para o projeto, a construção, a modificação e o crescimento de tecidos vivos. Essa nova abordagem envolve a mimetização da matriz extracelular através da produção de matrizes reabsorvíveis e a utilização de moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento capazes de estimularem a adsorção, migração, multiplicação e diferenciação celulares de forma específica, com o objetivo principal de promoverem a regeneração do tecido lesionado (Orban, Marra & Hollinger, 2002; Tsang & Bhatia, 2004).

De uma forma geral, um material adequado para servir como matriz para guiar o crescimento tecidual deve reunir as seguintes características: (1) possuir uma estrutura tridimensional altamente porosa e com uma rede de poros interconectados que permita a migração e o crescimento celular, bem como o transporte de nutrientes para as células; (2) possuir biocompatibilidade e biodegradabilidade controlada e compatível com a formação do novo tecido *in vivo* e *in vitro*; (3) possuir uma superfície quimicamente adequada para a adsorção, proliferação e diferenciação celular; e (4) propriedades mecânicas compatíveis

com o local de implantação (Boccaccini & Maquet, 2003). A produção de matrizes sintéticas pode ser vantajosa do ponto de vista da possibilidade de controle da composição do biomaterial e da sua estrutura, incluindo porosidade e morfologia dos poros, fatores considerados essenciais para o desempenho dos mesmos como matrizes (Lin *et al.* 2003).

Nos últimos anos, diversos biomateriais à base de polímeros e cerâmicas têm sido propostos como matrizes para crescimento de tecido ósseo, embora apenas alguns deles tenham obtido realmente um desempenho satisfatório. Entre os biomateriais cerâmicos, os vidros bioativos porosos têm surgido como opções interessantes devido às suas reconhecidas propriedades de osteocondução e à possibilidade de controle da sua taxa de degradação. Quando implantados no corpo, estes materiais suscitam uma resposta biológica específica na interface do material que resulta numa ligação entre o tecido e o material. A formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) biologicamente ativa sobre a superfície do vidro após a sua implantação tecidual equivale quimicamente e estruturalmente à fase mineral do osso (Pereira & Hench, 1996). Além disso, uma descoberta recente mostra que os produtos de dissolução de vidros bioativos podem exercer um controle genético sobre o ciclo celular de osteoblastos e uma rápida expressão de genes que regulam a osteogênese e a produção de fatores de crescimento (Hench & Polak, 2002).

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis têm larga utilização em engenharia de tecidos e envolvem uma série de materiais sintéticos ou naturais com diversas aplicações na área biomédica. Uma vantagem da utilização destes materiais é que eles podem ser quimicamente modificados de modo a permitirem um controle do padrão de degradação. A adequada tenacidade à fratura de grande parte dos polímeros também é uma propriedade importante, pois fornece maior capacidade de deformação, muitas vezes necessária para aplicação em tecidos humanos, embora o módulo de elasticidade muito inferior àquele do osso possa impedir a sua utilização de forma isolada em locais com alta sollicitação mecânica.

Uma nova classe de biomateriais à base de compostos orgânicos e inorgânicos, combinados numa escala nanométrica, tem obtido atenção especial nos últimos anos. Esses novos materiais, denominados nanocompósitos ou híbridos organo-inorgânicos, têm possibilitado a obtenção de um produto que reúne as vantagens dos materiais orgânicos (baixo peso, tenacidade à fratura e moldabilidade) e dos materiais inorgânicos (alta dureza, estabilidade

térmica e resistência química). Este tipo de organização estrutural assemelha-se à do osso natural, onde uma fase inorgânica (hidroxicarbonato-apatita) e uma fase orgânica (colágeno) interagem numa escala molecular com ligações químicas primárias. Para a obtenção de materiais híbridos porosos de vidro bioativo e polímeros, o método de processamento sol-gel é bastante vantajoso, pois possibilita a combinação de polímeros e materiais cerâmicos em escalas moleculares, permitindo a preparação de materiais cerâmicos em temperaturas compatíveis com as do processamento de polímeros e possibilitando a obtenção de uma estrutura hierárquica de poros nos mesmos (Pereira *et al.*, 2004).

Tomando como inspiração os muitos compósitos organo-inorgânicos baseados em biopolímeros naturais, um número crescente de estudos tem focado a utilização da quitosana, um derivado da quitina, em conjugação com biomateriais inorgânicos à base de carbonatos de cálcio, fosfatos de cálcio e sílica (Ayers & Hunt, 2001; Hu *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Muzzarelli & Muzzarelli, 2002; Rashidova *et al.*, 2004; Shirotsaki *et al.*, 2005). Características favoráveis da quitosana, um polímero natural obtido a partir do exoesqueleto de crustáceos, incluem: baixo custo, fácil obtenção, hemocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, além de propriedades antibacterianas (Tonoli, Leal & Beppu, 2004). A incorporação de uma fase inorgânica à quitosana poderia evitar a degradação rápida que geralmente ocorre neste polímero na sua forma isolada, o que poderia melhorar o processo de cultivo celular de maneira a favorecer os processos de migração e diferenciação celulares. Da mesma forma, a incorporação da quitosana à sílica poderia melhorar as suas propriedades mecânicas, caracterizadas pela grande fragilidade. Desta forma, híbridos de sílica e quitosana têm sido produzidos e utilizados como biomateriais em diversas aplicações, como géis carreadores de enzimas (Yang, Wang & Tan, 2004), membranas para utilização em enxertos de pele (Suzuki & Mizushima, 1997; Deriu *et al.*, 2005) e membranas para liberação controlada de drogas (Park *et al.*, 2001), mostrando resultados promissores.

Uma análise mais detalhada da interação das fases presentes nestes híbridos poderia ser de grande utilidade para o avanço dos estudos com este material para utilização em engenharia de tecidos. Até o momento, não temos registros de trabalhos na literatura sobre a produção e caracterização de matrizes híbridas macroporosas à base de sílica ou sílica-cálcio e quitosana através do processamento sol-gel. Portanto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar

e caracterizar estruturalmente híbridos organo-inorgânicos porosos à base de sílica e quitosana através do processo sol-gel para utilização como matrizes em engenharia de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é sintetizar e caracterizar estruturalmente híbridos organo-inorgânicos porosos à base de sílica e quitosana através do processo sol-gel para utilização como matrizes em engenharia de tecidos.

2.1 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de síntese pelo processo sol-gel via alcóxido para síntese de híbridos porosos de sílica e quitosana através do controle de parâmetros como: concentração do polímero no híbrido, quantidade e tipo de agente surfactante, concentração do agente catalisador da geleificação, condições de secagem e neutralização.
- Caracterizar estruturalmente os híbridos obtidos de acordo com a composição das fases orgânica e inorgânica presentes, avaliando-os através de métodos físico-químicos, tais como: microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, análises térmicas, espectroscopia por infravermelho e avaliação da porosidade pela técnica da balança de Arquimedes.
- Avaliar as propriedades mecânicas dos híbridos sintetizados de acordo com a composição da fase inorgânica (sílica e sílica-cálcia) e da quantidade de fase polimérica adicionada à composição do material.
- Realizar um estudo do padrão de biodegradação *in vitro* dos híbridos sintetizados em relação à perda de massa dos mesmos em função do tempo.
- Avaliar a citotoxicidade dos materiais produzidos através de ensaios do tipo MTT e fosfatase alcalina, bem como realizar uma análise da produção de colágeno pelas células osteoblásticas cultivadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos tem se mostrado uma grande promessa como alternativa de tratamento nos casos de pacientes que necessitam de implantes ou próteses para recompor tecidos danificados. O conceito básico da engenharia de tecidos é o fato de que células de um tecido podem ser isoladas de um paciente e a sua população expandida em uma cultura de células semeadas em um material condutor. O tecido resultante deste procedimento poderia ser, posteriormente, reimplantado no paciente para funcionar como o tecido sadio anterior (Yang *et al.*, 2001).

A criação de tecidos para uso biomédico já é aplicada em grande número de laboratórios e as aplicações envolvem a produção de pele, pâncreas, fígado, intestino, uretra, esôfago, tecido nervoso, cartilagem, tecido ósseo, ligamentos e tendões. Nos EUA aproximadamente 25% dos pacientes que necessitam de transplantes de órgãos morrem enquanto aguardam por um doador disponível. A demanda atual por transplantes de órgãos e tecidos é alta e muito superior àquela da oferta dos mesmos e, infelizmente, as projeções indicam que essa discrepância continuará grande nos próximos anos. O transplante celular tem sido proposto como um tratamento alternativo para esses casos. Para a criação de um implante autógeno, o tecido danificado é colhido e dissociado em células individuais; em seguida, as células são fixadas e cultivadas sobre um substrato apropriado que, posteriormente, é implantado no lugar do tecido danificado desejado. Por outro lado, sabe-se que células por si só não são capazes de formar tecidos. A grande maioria das células é dependente de ambientes específicos que incluem a presença de um material de suporte para agir como espécie de ancoragem e guia para seu crescimento. Portanto, o sucesso de qualquer terapia de transplante celular depende do desenvolvimento de substratos apropriados, também denominados *scaffolds*, para permitirem o crescimento de células *in vitro* e *in vivo* (Yang *et al.*, 2001; Rose & Oreffo, 2002).

Para aplicação como biomateriais, além de outras exigências, os materiais devem apresentar certos requisitos essenciais, como biocompatibilidade local, biocompatibilidade sistêmica e biofuncionalidade. Atualmente, entende-se como biocompatibilidade a característica do material que, usado em aplicações específicas, induza o desenvolvimento de respostas teciduais adequadas nos sistemas hospedeiros. Este conceito evolui a cada dia e, atualmente,

não mais se supõe que materiais biocompatíveis devam ser absolutamente inertes e inócuos, mas sim que as respostas induzidas ao organismo sejam controláveis pelo sistema. A concepção inicial de que os materiais usados para substitutos ósseos nas próteses deveriam, tanto quanto possível, ser bioinertes provou ao longo do tempo ser equivocado. A vida útil de próteses feitas de materiais bioinertes gira em torno de 15 anos. Desde que a média de idade da população que necessita de tais próteses é de 55 anos e a expectativa de vida da população tem aumentado significativamente, é de se esperar que este tipo de tratamento tenha que ser refeito em grande parte dos pacientes. Além disso, é de se esperar um dano aos tecidos do paciente pela tensão de cisalhamento que ocorre entre o implante e o tecido, devido às diferenças entre os seus módulos de elasticidade. O desenvolvimento dos biomateriais tem focado no conceito de bioatividade, buscando a regeneração tecidual ao invés da sua simples substituição. O objetivo é o desenvolvimento de novos tipos de materiais que estimulem uma resposta biomecânica dos tecidos hospedeiros com o objetivo de se obter uma forte ligação entre o implante e o tecido, a chamada “fixação biológica” (Notingher *et al.*, 2003).

Pode-se presumir que a estratégia básica na engenharia de tecidos seja o isolamento de células específicas através de uma pequena biópsia do paciente a fim de fazê-las desenvolver em uma matriz tridimensional biomimética, natural ou sintética, sob condições de cultura precisamente controladas, como na presença de fatores de crescimento e diferenciação, de forma que possa ser alocada na região desejada de implantação e possa direcionar o crescimento de um novo tecido, ao mesmo tempo em que a matriz se degrade e seja eliminada do organismo sem causar efeitos tóxicos ao mesmo (Shin, Jo & Mikos, 2003; Zhang & Zhang, 2004; Barbanti, Zavaglia & Duek, 2005). Outra alternativa seria a produção de um novo tecido através do cultivo celular em matrizes tridimensionais fora do corpo do paciente e posterior implantação do mesmo como tecido substituto no sítio defeituoso do paciente (Fig. 3.1).

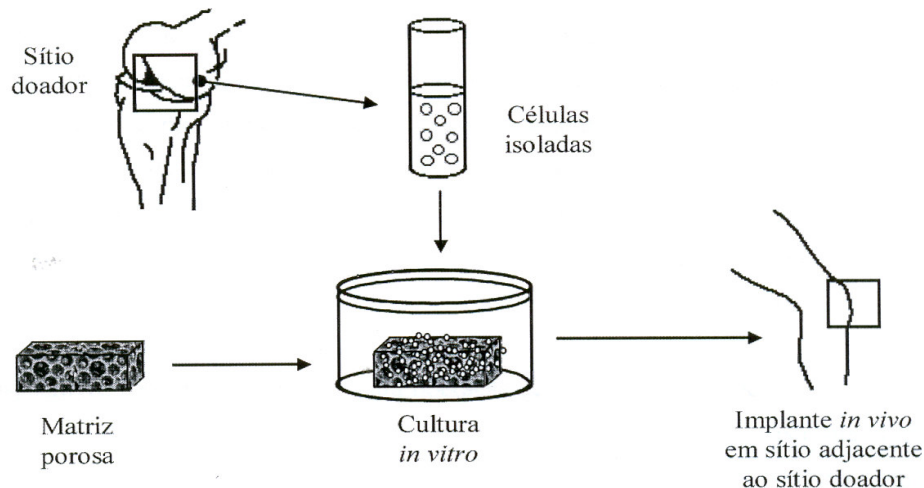


Figura 3.1. Representação esquemática da engenharia de tecido.
(Fonte: Coelho, 2003)

Dentro do grupo dos biomateriais, uma área que tem sido muito pesquisada é a que envolve métodos para o desenvolvimento de matrizes para o crescimento e regeneração de tecidos ósseos. Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, o número de problemas envolvendo tais tecidos tem aumentado assustadoramente. Somente nos EUA, 280.000 fraturas de bacias e 700.000 fraturas de colunas vertebrais ocorrem a cada ano com um custo estimado de 10 bilhões de dólares. Na Inglaterra, os custos alcançam 250 milhões de libras. Além disto, 30 a 50% destes procedimentos vão resultar em cirurgias de revisão, muitas delas com necessidade de colocação de enxertos, o que aumenta ainda mais os gastos públicos, além do grande desconforto causado nos pacientes, visto que a maioria dos implantes hoje disponíveis têm uma vida útil limitada. Os implantes ortopédicos carecem de três características básicas dos tecidos vivos: a) capacidade de auto-reparo; b) capacidade de manter um adequado suprimento sanguíneo; e c) capacidade de modificar a sua estrutura e propriedades em resposta a fatores ambientais como, por exemplo, cargas mecânicas. Desta maneira, os procedimentos que têm por filosofia estimularem e proporcionarem a neoformação de tecido ósseo ganham importância a cada dia. Pesquisas são realizadas no intuito de se desenvolverem novas terapias que envolvam regeneração óssea e a construção de dispositivos que se integrem adequadamente aos tecidos vivos do paciente. O desenvolvimento da engenharia de tecido ósseo oferece uma solução alternativa importante com grande potencial de crescimento. Um programa que vise alcançar sucesso no campo da

engenharia de tecido ósseo deve ser dividido e executado em seis fases principais (Hutmacher, 2000):

1. Fabricação de um adequado substrato bioreabsorvível;
2. Semeadura de populações celulares de osteoblastos no interior do substrato num meio de cultura estático;
3. Crescimento de tecido imaturo num meio dinâmico, através do uso de bioreatores;
4. Crescimento de tecido maduro num ambiente mais próximo ao do meio biológico;
5. Transplante cirúrgico;
6. Integração do tecido transplantado ao tecido hospedeiro.

Além da utilização direta de células especializadas, os experimentos podem também envolver a combinação de células progenitoras de tecidos ósseos ou células-tronco mesenquimais do paciente com matrizes apropriadas capazes de suportarem e guiarem a regeneração de tais tecidos. Existem protocolos para se extrair células-tronco mesenquimais viáveis da medula óssea com capacidade para diferenciação em osteoblastos (Agrawal & Ray, 2001; Rose & Oreffo, 2002; Green *et al.* 2002).

Mesmo com todas as pesquisas e avanços nesta área do conhecimento, até o presente momento as matrizes para engenharia de tecidos têm sido consideradas aquém das ideais para tais aplicações, não só devido às insatisfatórias propriedades mecânicas, que são pré-requisitos fundamentais para implantação, mas também pela ausência de canais interconectados que permitam a vascularização e a penetração de células para crescerem de maneira tridimensional. Existem muitos requisitos que devem ser considerados durante a preparação de uma matriz para utilização na engenharia de tecidos. Muitos desses requisitos são complexos e não completamente entendidos. Além da biocompatibilidade da matriz como um todo, é necessário também que haja biocompatibilidade da mesma de forma degradada. Estas matrizes devem possuir propriedades mecânicas adequadas para resistirem às tensões sofridas pelo tecido no qual serão implantadas, porosidade e permeabilidade adequadas para permitirem o ingresso de células, além de superfícies que facilitem a adesão química e física das mesmas (Yang *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de biomateriais tem sido focado no projeto de materiais biomiméticos que sejam capazes de interagir com tecidos vizinhos através de reconhecimento celular. Quando biomateriais são expostos ao meio biológico, proteínas da matriz extracelular

(ECM) são adsorvidas de forma não-específica sobre a superfície dos mesmos; desta forma, as células interagem indiretamente com a superfície do biomaterial através destas proteínas da ECM. O desafio no desenvolvimento de materiais biomiméticos é a obtenção de materiais que sejam capazes de promover respostas celulares específicas e direcionar uma formação tecidual mediada por reconhecimento biomolecular, o que poderia ser alcançado através da modificação da matriz. A incorporação de longas cadeias de proteínas presentes na ECM e pequenas seqüências de peptídeos derivados de proteínas da ECM à superfície do biomaterial podem facilitar a interação do mesmo com células receptoras. Fatores relacionados à superfície do material como carga, composição química e energia superficial têm sido considerados importantes e determinantes no sucesso dessa interação (Shin, Jo & Mikos, 2003; Tsang & Bhatia, 2004).

O mecanismo de união do tecido vizinho ao biomaterial é diretamente relacionado ao tipo de resposta tecidual que ocorre na interface tecido/biomaterial. Nenhum material implantado em tecidos vivos pode ser considerado inerte, porque todos os materiais provocam algum tipo de resposta dos tecidos por mínima que possa ser. Há quatro tipos de respostas teciduais quando da presença de um material:

1. se o material é tóxico, o tecido vizinho morre;
2. se o material é não-tóxico e dissolve ou é decomposto, o tecido vizinho o substitui;
3. se o material é não-tóxico e biologicamente inativo, uma cápsula fibrosa se forma em torno do material implantado; e
4. se o material é não-tóxico e biologicamente ativo, há a formação de uma interface contínua entre o tecido e o material implantado. Neste caso, o material poderia ser considerado bioativo, o que significa que ele é capaz de formar uma ligação interfacial entre os tecidos vivos e o material sem a presença de uma cápsula fibrosa entre eles (Ratner *et al.*, 1996).

Um substrato ideal é aquele que mimetiza a matriz extracelular do tecido hospedeiro de forma que ele possa agir como um guia tridimensional para promover ataque, multiplicação, migração e função por parte das células. De uma maneira geral, as propriedades desejáveis em um substrato para crescimento ósseo poderiam ser resumidas da seguinte forma (Agrawal & Ray, 2001):

1. o substrato deve ser biocompatível e bioativo;

2. deve ser biodegradado à medida que o processo de reparação ou regeneração acontece;
3. deve ser poroso e permeável para permitir uma difusão apropriada;
4. deve possuir um tamanho de poro adequado para o crescimento do tipo celular a que se destina;
5. deve possuir adequada propriedade mecânica para o meio a que se destina;
6. deve oferecer uma superfície condutiva para a aderência celular;
7. deve facilitar ou, se possível, induzir a formação de matriz extracelular pelas células semeadas;
8. deve possuir a habilidade de conduzir sinais biomoleculares tais como fatores de crescimento;
9. deve ser produzido por uma técnica de processamento que possibilite a formação de substratos com formas variadas e irregulares que se igualem às formas dos defeitos ósseos do paciente.

Do ponto de vista da biodegradação, esse substrato deveria, idealmente, preencher alguns requisitos (Wang, 2003):

1. ser degradado no corpo humano a uma taxa que possa ser controlada;
2. os produtos da degradação deveriam ser não-tóxicos;
3. os produtos da degradação deveriam ser biocompatíveis; e
4. os produtos da degradação deveriam ser facilmente excretados do corpo.

Os materiais reabsorvíveis são projetados para se degradarem gradualmente com o tempo e serem substituídos pelo tecido do hospedeiro. Este fato leva, em geral, à formação de uma interface muito fina ou inexistente entre o tecido recém-formado e a matriz. Por isso, o uso de materiais porosos e reabsorvíveis é a melhor abordagem em termos de uso de biomateriais, pois se baseia no conceito de regeneração tecidual. A grande dificuldade de uso destes materiais é a combinação de requisitos que muitas vezes se opõe, como é o caso da manutenção da resistência e da estabilidade na interface à medida que o material se degrada e o tecido se forma, e a compatibilização da taxa de degradação do biomaterial com a taxa de reparo dos tecidos (Ratner *et al.*, 1996). Outros fatores importantes a serem considerados dizem respeito à seleção do biomaterial e tipo de tecido que se pretende regenerar, pois os produtos de degradação influenciam fortemente a diferenciação celular e o seu crescimento. Desta forma, o conhecimento dos produtos de degradação é essencial na

seleção de um determinado biomaterial para aplicação como matriz (Gross & Rodríguez-Lorenzo, 2004).

Cabe aqui salientar que o significado e a definição de termos em engenharia de tecidos como biodegradáveis e bioreabsorvíveis são freqüentemente utilizados de forma inadequada e normalmente confundidos. O material biodegradável é um material sólido que se quebra devido à degradação das suas macromoléculas por agentes biológicos (enzimas, por exemplo), com a dispersão das mesmas pelo local de implantação ou pelo corpo sem evidências de eliminação pelo organismo. O termo bioreabsorvível relaciona-se a um material com o mesmo comportamento do anterior, exceto pelo fato de apresentar total eliminação pelas rotas metabólicas do organismo (Hutmacher, 2000; Barbanti, Zavaglia & Duek, 2005).

Pode-se presumir que a escolha de uma matriz porosa adequada para uma dada aplicação em engenharia de tecidos necessita de um amplo conhecimento que envolva o relacionamento entre a microestrutura do material que compõe a matriz e a função biológica e mecânica que ela deverá cumprir quando implantada (Lin *et al.*, 2003). Apesar de estarmos um pouco distantes de um material que atenda a todos estes requisitos, os materiais mais pesquisados e que mais têm se aproximado de tais características incluem principalmente os polímeros biodegradáveis, as cerâmicas biodegradáveis e os compósitos e híbridos biodegradáveis.

3.2 Biomateriais utilizados como substratos para crescimento ósseo

3.2.1 Biocerâmicas

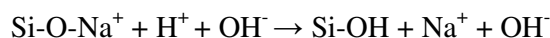
Nos últimos 30 anos, as cerâmicas e os vidros têm sido utilizados na área biomédica, principalmente devido à sua elevada estabilidade química, tanto em meios aquosos quanto em meios ácidos, e à sua elevada biocompatibilidade. Esta propriedade poderia ser explicada pela sua composição química, composta por íons encontrados normalmente no meio fisiológico, tais como Ca^{2+} , K^+ , Mg^{+2} , Na^+ e outros íons com baixas toxicidades ao meio biológico, como o Al^{+3} e o Ti^{+2} . Entre as cerâmicas bioativas, a hidroxiapatita sintética (HA) e o tricálcio fosfato (TCP) têm sido utilizados como agentes de preenchimento, espaçadores e substitutos ósseos em uma ampla variedade de aplicações na ortopedia. São

materiais que possuem como principais características a bioatividade, a biocompatibilidade e a osteocondução. Os vidros bioativos são materiais baseados na sílica amorfa e considerados não só como biocompatíveis, mas também como bioativos e osteocondutores. Certas composições de vidros e vitrocerâmicas podem formar uma ligação mecanicamente forte com o osso. A composição básica dos vidros bioativos é SiO₂, Na₂O, CaO e P₂O₅. Uma característica comum a vidros e cerâmicas bioativas é a modificação cinética da superfície, a qual é dependente do tempo ocorrido após a implantação. A superfície forma uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) biologicamente ativa que promove uma interface de ligação com os tecidos vizinhos. A fase HCA formada é equivalente quimicamente e estruturalmente à fase mineral do osso, de modo que uma forte ligação pode ser formada (Hench, 1993; Lee *et al.*, 2006). Os osteoblastos podem proliferar sobre a camada de apatita formada diferenciando-se e formando matriz extracelular composta de apatita biológica e colágeno. Como consequência, o tecido ósseo hospedeiro entra em contato com esta camada superficial de apatita e uma ligação química pode ser formada entre o biomaterial e o osso natural (Kokubo, Kim & Kawashita, 2003; Kim, 2003).

Basicamente, há dois tipos de vidros bioativos: os vidros tradicionais, obtidos através do processo de sinterização em altas temperaturas, tais como o Bioglass[®], e aqueles produzidos pelo processo sol-gel. Os vidros obtidos pelo processo sol-gel tendem a possuir maior bioatividade e um padrão de reabsorção mais rápido que os obtidos na forma tradicional. Isso é explicado pelo fato do processo sol-gel possibilitar a produção de vidros com alta porosidade e com aumento substancial da área superficial, o que não só facilita os processos de troca iônica e dissolução da rede de sílica, mas também expõe grupos silanol e locais de nucleação de minerais (Sepúlveda, Jones & Hench, 2002; Notingher *et al.*, 2003; Gough, Jones & Hench, 2004).

O fluido corporal intersticial é o primeiro meio que uma cerâmica bioativa entra em contato quando implantada no tecido ósseo. Este meio contém várias proteínas que estão envolvidas com a biomineralização e com grande potencial para induzir a nucleação e crescimento de cristais de fosfato de cálcio. Em relação aos vidros bioativos, as reações que ocorrem após a imersão dos mesmos nos fluidos corpóreos até a formação da camada HCA podem ser enumeradas da seguinte forma (Hench, 1997):

1. Trocas iônicas entre o biovidro e o meio corpóreo com formação de grupos silanol:



2. Perda da sílica solúvel $\text{Si}(\text{OH})_4$ e formação de grupos silanol:
$$\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Si-OH} + \text{OH-Si}$$
3. Policondensação dos grupos silanol para formar um gel de sílica (SiO_2) hidratada sobre a superfície;
4. Migração de íons Ca^{2+} e grupos PO_4 para a superfície, formando uma camada de fosfato de cálcio ($\text{CaO-P}_2\text{O}_5$) amorfa;
5. Cristalização da camada de fosfato de cálcio amorfa através da incorporação de OH^- e CO_3 , formando a camada de HCA sobre a superfície;
6. Adsorção de fatores de crescimento na camada de HCA formada;
7. Ação de macrófagos;
8. Adesão de células-tronco;
9. Diferenciação de células-tronco;
10. Geração de matriz óssea;
11. Cristalização da matriz;
12. Proliferação e crescimento ósseo.

Os estudos *in vitro* têm mostrado que os padrões de nucleação e cristalização da HCA dependem de muitos fatores que podem variar grandemente dependendo da composição do vidro bioativo utilizado, das suas propriedades superficiais, como área superficial e porosidade, e do meio utilizado para o ensaio (Notingher *et al.*, 2003; Olmo *et al.*, 2003; Vallet-Regí *et al.*, 2005). Deve ser salientado que a formação da camada de HCA ocorre não somente sobre a superfície do vidro bioativo, mas também no interior dos seus poros, levando à diminuição do número e tamanho dos mesmos, embora esta formação não ocorra de maneira uniforme, pois a superfície externa mais exposta à solução reage mais rapidamente que as paredes dos poros (Rámila & Vallet-Regí, 2001; Notingher *et al.*, 2003).

A formação da camada de HCA não ocorre somente no interior do corpo e pode ser simulada e quantificada *in vitro*, quando o vidro bioativo é imerso em soluções que simulam o plasma humano (SBF). Estudos *in vitro* utilizam um fluido corporal simulado acelular e livre de proteínas, contendo pH 7,4 e composição iônica igual àquela do plasma sanguíneo (Lee *et al.*, 2006). A espectroscopia do tipo Raman tem sido utilizada com sucesso para caracterizar essas superfícies e a camada de HCA formada *in vitro* (Notingher *et al.*, 2003).

Em um trabalho, três tipos de vidros bioativos ternários à base de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ foram sintetizados via sol-gel com diferentes proporções entre seus componentes com o objetivo de se estudar o efeito da composição do vidro sobre parâmetros como a cristalinidade e a bioatividade. Vidros contendo 80% de SiO_2 , 16% de CaO e 4% de P_2O_5 (S2), 60% de SiO_2 , 36% de CaO e 4% de P_2O_5 (T2) e 40% de SiO_2 , 54% de CaO e 6% de P_2O_5 (A2) foram sinterizados e avaliados em relação à composição de fases por difração de raios-X. Os vidros S2 mostraram-se completamente amorfos, enquanto que nos vidros T2 um início de cristalização pôde ser observado. Este padrão, entretanto, sofreu uma modificação após a imersão desses vidros em SBF após 24 horas, com a formação de uma camada de hidroxiapatita cristalina sobre a superfície de todos os materiais. Os íons Ca^{2+} originaram-se do vidro, enquanto que os íons HPO_4^{2-} poderiam ser derivados do plasma simulado (SBF) ou do próprio material, trocas estas que poderiam ser facilitadas pela estrutura porosa dos vidros produzidos via sol-gel. Nos vidros A2, as formas cristalinas da hidroxiapatita ficaram mais evidenciadas mesmo antes da imersão em SBF. Após este procedimento foi notada uma menor liberação de íons Ca^{2+} no SBF devido à presença de uma fase cristalina mais pronunciada que impede a sua saída do vidro e diminui a sua bioatividade (Laczka, Cholewa & Osyczka, 1997).

A nanoestrutura de vidros bioativos sintetizados via sol-gel à base de $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), uma técnica que possibilita a medição das distâncias entre as moléculas de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ tetraedros. Sabe-se que estas distâncias são significativamente menores em materiais sem cálcio, o que poderia explicar o papel deste elemento na bioatividade dos vidros. O espectro FTIR para o vidro sem fosfato mostrou bandas de absorção a 1085, 802 e 472 cm^{-1} atribuídas aos modos de vibração do Si-O, ao passo que o vidro com o fosfato apresentou bandas também a 597 e 565 cm^{-1} , correspondente à ligação P-O. A análise por EDS mostrou, após a imersão dos materiais em SBF por 7 dias, uma grande mudança nos mesmos com a formação de uma camada de agregados de partículas compostas de Ca, P e O, com pequenas proporções de Cl e Na oriundas da solução de SBF. O FTIR mostrou bandas de absorção a 604 e 567 cm^{-1} relacionadas ao grupo fosfato na rede cristalina e a 1035 cm^{-1} , também relacionada ao fosfato, o que permitiu concluir que uma fase semelhante à apatita foi formada sobre as superfícies dos materiais, embora algumas diferenças tenham sido detectadas entre os vidros. A caracterização nanoestrutural indicou que a adição do P_2O_5 ao vidro levou à cristalização

de fosfato de cálcio dopado com silício, enquanto que no vidro binário $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ o cálcio estava localizado na rede de sílica amorfa. O vidro bioativo sem fosfato mostrou uma reatividade mais alta durante as primeiras 24 horas, embora a cristalização da camada HCA tenha sido mais lenta que a do vidro com fosfato. Isto poderia ser explicado pelo fato da bioatividade *in vitro* dos vidros $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ ser controlada pela rápida troca do cálcio na rede de vidro por prótons presentes no SBF, formando grupos silanol (SiOH), que atraem o cálcio e o fósforo para formar um fosfato de cálcio amorfo. Posteriormente, um período mais longo foi necessário para se cristalizar a camada de HCA formada. Para o vidro $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, inversamente, a concentração dos grupos silanol foi mais baixa, o que retardou a formação do fosfato de cálcio amorfo (Vallet-Regí *et al.*, 2005).

Uma importante descoberta para o desenvolvimento da medicina regenerativa é que os produtos de dissolução dos vidros bioativos podem exercer um controle genético sobre o ciclo celular de osteoblastos, que são as células osteoprogenitoras, e também proporcionar a expressão genética que pode regular a osteogênese e a produção de fatores de crescimento. Sete famílias de genes são reguladas quando osteoblastos humanos primários são expostos à dissolução iônica de produtos de vidros bioativos. Neste sentido, o silício tem sido considerado como elemento químico contribuinte da maior importância para a mineralização do tecido ósseo, através do estímulo à síntese de colágeno tipo 1 em osteoblastos e para a ativação genética envolvida no processo (Jones & Hench, 2003; Pereira *et al.*, 2004).

A biocompatibilidade de três vidros bioativos sintetizados via sol-gel com diferentes conteúdos de SiO_2 (75, 72.5 e 70%), 25% de CaO e presença de P_2O_5 (0, 2.5 e 5%) foi analisada após cultura de osteoblastos extraídos da calvária de ratos sobre as superfícies dos vidros tratadas e não tratadas em SBF por 7 dias para a formação da camada de HCA *in vitro*. Foi observado que os vidros bioativos não tratados previamente em SBF mostraram-se capazes de promover a adesão celular, sendo que o vidro que possuía o maior conteúdo de P_2O_5 mostrou o melhor desempenho. Um resultado bem mais satisfatório, entretanto, foi observado nos vidros submetidos ao tratamento prévio em SBF e apresentavam uma camada de HCA sobre a sua superfície. Essa camada de HCA sobre a superfície aumentou significativamente a adesão e a atividade mitótica dos osteoblastos, pois além dos osteoblastos a reconhecerem como substrato natural, a união

de proteínas séricas e fatores de crescimento foi maior nessa superfície (Olmo *et al.*, 2003).

Apesar de todas as vantagens acima mencionadas, o comportamento mecânico dos vidros bioativos tem limitado muito a sua utilização em engenharia de tecido devido, principalmente, à sua natureza frágil (Wang, 2003). Um caminho promissor para minimizar tais problemas seria promover a combinação de outros materiais com as biocerâmicas, de forma a melhorar o comportamento mecânico do compósito formado, mantendo as características bioativas da superfície (Kokubo, Kim & Kawashita, 2003).

3.2.2 Biopolímeros

A utilização de polímeros sintéticos na área biomédica é ampla e envolve diversos materiais considerados biocompatíveis: polietileno, polipropileno, poliuretano, policloreto de vinila, poliamidas, polimetilmetacrilato, poliacetato, policarbonato, politereftalato de etila e polissulfona são alguns exemplos (Tab.3.1). As propriedades dos polímeros podem variar grandemente através da mudança da sua estrutura. Esta facilidade de modificação através, por exemplo, da formação de blendas com outros polímeros pode proporcionar a obtenção de materiais com propriedades as mais variáveis possíveis e de grande utilidade nas diversas áreas (kellomaki *et al.*, 2000).

Tabela 3.1 Polímeros utilizados nas diversas aplicações biomédicas

Polímeros	Aplicações
Polietileno	Recipientes, tecidos, tubos, seringas, implantes ortopédicos
Poliestireno	Seringas, suturas, tubos, membranas, vasos artificiais
Polimetilmetacrilato	Lentes, cimento ósseo, tubos, vasos artificiais
Policloreto de vinila	Recipientes para sangue, tubos, membranas
Politereftalato de etila	Suturas, tecidos, vasos artificiais, válvulas
Poliamidas	Filmes, tubos, suturas
Poliuretanos	Componentes de válvulas, tubos, filmes
Poliuretanos	Componentes de válvulas, tubos, filmes

Os polímeros são compostos por longas cadeias de pequenas moléculas dispostas em série por unidades repetitivas, os monômeros. Os átomos de carbono no interior das cadeias são unidos por fortes ligações covalentes, enquanto ligações secundárias mais fracas unem as cadeias umas às outras. De uma forma geral, os polímeros podem ser degradados por meio

de uma série de mecanismos que incluem a oxidação, a hidrólise, a radiação, a degradação química ou a pirólise. Quando os carbonos das cadeias são unidos a grupos que são hidroliticamente instáveis, essas longas cadeias se degradam quando são colocadas em contato com o meio aquoso. A escolha de um determinado polímero biodegradável deve levar em conta o tipo de degradação ao qual o mesmo é mais susceptível. No meio biológico, os meios de degradação mais comuns são a hidrólise e a degradação enzimática. A degradação enzimática pode ser altamente variável de indivíduo para indivíduo, pois os níveis enzimáticos podem diferir bastante entre as pessoas. Na escolha de um determinado polímero, o mecanismo degradativo de escolha deveria ser preferencialmente a hidrólise, já que todos os indivíduos possuem água em excesso no organismo (Langer, 1995).

Sendo o mecanismo de degradação em meios biológicos a hidrólise, a mesma poderá ocorrer de duas formas: erosão superficial ou erosão do volume como um todo. A erosão superficial ocorre sobre a superfície do material quando a água é incapaz de penetrar no corpo do material em grandes proporções, o que faz com que o polímero se contraia. Esse tipo de erosão ocorre em todos os casos de degradação, mas de forma mais intensa nos polímeros que apresentam baixa porosidade e alta hidrofobicidade. No outro tipo de degradação a água penetra no interior do polímero e quebra as suas ligações internas. Esse tipo de erosão é mais comum em polímeros com alta porosidade e hidrofiliabilidade. Inicialmente os polímeros que apresentavam este comportamento foram considerados inadequados para qualquer aplicação. No entanto, com a necessidade crescente de dispositivos para a aplicação biomédica com capacidade de se degradar no organismo, uma grande variedade de aplicações surgiu nos últimos anos para estes materiais, principalmente como matrizes para guiar o crescimento ósseo e em sistemas para liberação controlada de drogas (Wright, 2004). Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis e biodegradáveis: a localização do implante, a solitação mecânica na área que receberá o implante, a massa molar, a composição química, o grau de cristalinidade, a morfologia (tamanho e a geometria da matriz), a porosidade, a rugosidade de superfície, a energia livre de superfície, a carga da superfície, o pH e a presença de aditivos (Middleton & Tripton, 2000).

Atualmente, os maiores representantes desta classe de polímeros são o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), os copolímeros de PLA e PGA (PLGA), a policaprolactona (PCL), os polianidridos, os policarbonatos e os polifumaratos (Ma & Choi,

2001; Lin *et al.*, 2003). Todos estes polímeros são considerados biocompatíveis, apesar de não haver garantias de que os mesmos não possam, sob determinadas condições, provocar reações adversas no organismo. Por exemplo, grandes quantidades de produtos de degradação de polímeros em locais pouco vascularizados podem dificultar a eliminação destes pelo organismo, gerando respostas inflamatórias indesejáveis (Hutmacher, 2000; Wright, 2004). Dependendo da aplicação de um determinado biomaterial, necessita-se que o mesmo possua maior ou menor rigidez, assim como grande ou baixo padrão de degradação (Tomihata & Ikada, 1996).

A molhabilidade de um polímero é considerada muito importante para uma semeadura homogênea do substrato de maneira tridimensional. Grande parte dos polímeros sintéticos biodegradáveis é relativamente hidrofóbica, o que dificulta a distribuição de células uniformemente pelos poros do substrato. Algumas técnicas com o objetivo de melhorar esta propriedade em polímeros biodegradáveis porosos têm surgido e incluem, dentre outras coisas, um pré-molhamento do substrato com solução à base de etanol ou mesmo hibridização com polímeros naturais hidrofílicos como o colágeno (Chen, Ushida & Tateishi, 2001). Outra alternativa inclui o uso de hidrogéis, uma classe de polímeros altamente hidratados (acima de 30% de água em peso), como materiais de matrizes para crescimento tecidual. Estes polímeros são compostos por cadeias poliméricas hidrofílicas de origem sintética ou natural. O interesse aumentado por esses materiais deve-se, principalmente, à combinação única de propriedades como biocompatibilidade, permeabilidade e hidrofiliidade, que os têm indicados para uma ampla gama de aplicações biomédicas que incluem mecanismos de liberação lenta de drogas, lentes de contato, substitutos de pele, tendões, ligamentos e cartilagens (Stammen *et al.*, 2001).

A integridade estrutural dos hidrogéis depende das ligações cruzadas formadas entre as cadeias poliméricas, sendo polímeros tipicamente degradáveis e processados em condições pouco severas. As propriedades mecânicas são parecidas com aquelas apresentadas pelos tecidos e matriz extracelular. Os principais hidrogéis sintéticos constituem o óxido de polietileno (PEO) e o polivinilálcool (PVA), e os principais hidrogéis naturais constituem o alginato, o colágeno e a quitosana. Os hidrogéis sintéticos têm a vantagem de possibilitar o controle e a reprodutibilidade das suas propriedades físicas e químicas. Por exemplo, polímeros sintéticos podem ser produzidos com pesos moleculares específicos, ligações cruzadas e ligações degradáveis, os quais podem influenciar significativamente as suas

propriedades mecânicas. Os hidrogéis sintéticos à base de PVA têm sido propostos como biomateriais promissores para substituição de tecido cartilaginoso. Isso se deve, em parte, ao fato de que a cartilagem no ser humano ser constituída, basicamente, por um hidrogel natural reforçado com fibras e composta de proteoglicanas, colágeno tipo II e água em grande quantidade (75% em peso). Nesse sentido, hidrogéis podem ser sintetizados de modo a mimetizarem o conteúdo de água da cartilagem natural e por possuírem um baixo coeficiente de fricção, que são características importantes para a lubrificação de articulações. O alto conteúdo de água facilita a troca de nutrientes e metabólitos entre o composto substrato/células e os tecidos vizinhos (Nuttelman *et al.*, 2001). Embora a elasticidade apresentada por estes materiais seja muitas vezes benéfica no campo da engenharia de tecidos, dependendo do local de implantação, uma barreira à sua utilização é a ausência de propriedades mecânicas adequadas para resistirem às condições impostas pelo meio biológico, visto que as articulações, por exemplo, são estruturas sujeitas a altas tensões compressivas e de cisalhamento. Tentativas para se melhorarem esta deficiência incluem a incorporação de vidros aos hidrogéis (formação de compósitos e híbridos), incorporação de agentes de ligação cruzada (glutaraldeído, principalmente) e procedimentos especiais de resfriamento para induzir um aumento da cristalinidade no material (Stammen *et al.*, 2001).

Todas estas conquistas, no entanto, não diminuem o interesse pelos hidrogéis naturais, hoje amplamente estudados no campo da engenharia de tecidos pela facilidade de obtenção e baixo custo. O colágeno, por exemplo, é de grande interesse para aplicações biomédicas, pois é a proteína mais abundante dos tecidos de mamíferos e o principal componente da matriz extracelular natural. É um hidrogel naturalmente degradado por metaloproteases, especialmente a colagenase e proteases séricas, o que faz com que a sua degradação seja controlada localmente por células presentes nos tecidos (Drury & Mooney, 2003). O colágeno pode ser preparado em solução ou na forma de membranas, espirais, esponjas. Embora seja derivado de fontes xenogênicas (mais comumente de pele de porco ou de bovinos), as técnicas de purificação do colágeno podem eliminar o potencial imunogênico dos peptídeos, a maior causa de respostas do tipo corpo-estranho à sua implantação. Ainda sim, existe a possibilidade de ocorrência de zoonoses em decorrência de transmissão microbiana dos tecidos animais para o hospedeiro, o que constitui um obstáculo à sua utilização em transplantes teciduais (Cancedda *et al.*, 2003).

Quando selecionamos um determinado polímero entre os diversos disponíveis no mercado devemos levar em consideração algumas propriedades. As mais importantes características estruturais que afetam o comportamento mecânico e o padrão de degradação dos polímeros são o percentual de cristalinidade e o peso molecular. Um polímero mais cristalino é mais resistente e possui um padrão mais lento de degradação, visto que apresenta ligações secundárias mais resistentes entre as cadeias poliméricas. Por outro lado, à medida que o peso molecular de um polímero aumenta, a resistência deste polímero também aumenta devido à atuação das ligações covalentes presentes dentro das cadeias. Neste caso, o processo de degradação também será mais lento, pois maiores quantidades de ligações covalentes deverão ser quebradas no processo (Wright, 2004). Desta forma, o padrão de degradação de um polímero é fortemente influenciado pela sua fase amorfa, devido à dificuldade de entrada de moléculas de água na fase cristalina do material (Stankus, Guan & Wagner, 2004).

Um dos grandes desafios a serem superados no desenvolvimento de polímeros como substratos para crescimento ósseo é a obtenção de um material que possua ligações inter e intramoleculares que proporcionem adequadas propriedades mecânicas, ao mesmo tempo em que sua estrutura física e química seja susceptível a ataques hidrolíticos que permitam a sua degradação em meios biológicos (Hutmacher, 2000).

3.2.3 Quitosana

A quitosana tem sido investigada para uma variedade de aplicações na engenharia de tecidos devido à sua estrutura similar à das glicosaminoglicanas e à sua degradabilidade por enzimas humanas, como a lisozima. Este material é derivado da quitina (do grego *Khitón* = caixa de proteção), que é o segundo biopolímero mais abundante da Terra após a celulose, sendo o componente fibroso da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes tais como insetos, caranguejos, lagostas e camarões. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada a glucanas, carbonatos de cálcio, pigmentos como os carotenóides e às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutículas de insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos (Chen; Wang & Ho, 1998). A quitosana é raramente encontrada como material natural, ocorrendo de forma muito dispersa em alguns microorganismos. Entretanto, a quitina também pode ser obtida artificialmente a partir da

abertura do anel do grupo exazolina de um derivado de açúcar ou por biosíntese a partir da glicose, que é convertida inicialmente em aminoaçúcares por via enzimática, sendo em seguida acetilada e finalmente polimerizada por enzima (Lima, 2005).

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formada por unidades de N-acetil-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose, formando um polissacarídeo semicristalino representado pela fórmula geral $(C_8H_{13}O_5N)_n$ e denominado muitas vezes como N-acetilglucosamina. A estrutura química da quitina é bastante parecida com aquela da celulose, exceto pela substituição do grupo hidroxila (-OH) na posição C-2 por um grupo acetamida (NHCOCH₃). A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina neste mesmo carbono, apresentando um grupo amina (NH₂) nesta posição (Fig. 3.2).

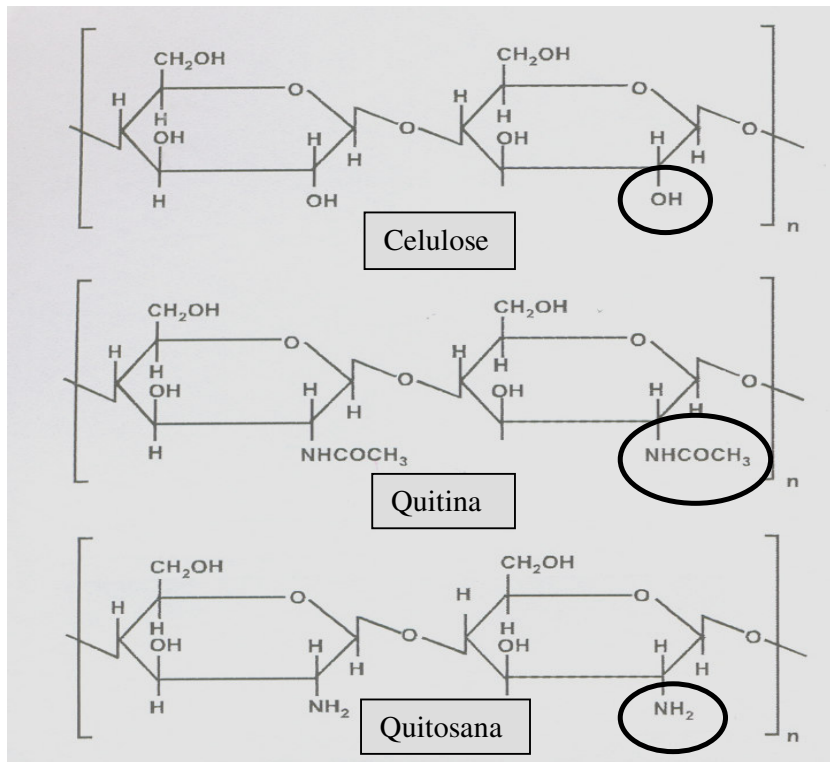


Figura 3.2 Representação das estruturas químicas da celulose, quitina e quitosana (Fonte: Kumar & Hudson, 2004)

Essa diferença faz com que a quitosana tenha algumas características químicas e físicas diferentes da quitina e celulose, que, na maioria dos casos, são consideradas bem mais interessantes como, por exemplo, o fato de ser um polieletrólito, possuir melhor

solubilidade e reatividade (Hirano, 1996). A presença de grande número de grupos hidroxilas confere ao polímero outra propriedade importante, a hidrofiliçidade (Monteiro Júnior, 1999; Kumar & Hudson, 2004).

Devido à grande similaridade entre elas, uma enorme confusão estabeleceu-se entre a celulose, a quitina e a quitosana que se manteve até o início do século XX, quando as pesquisas demonstraram que se tratavam de substâncias diferentes. A celulose, na época, já era bem explorada nas indústrias de papel e têxtil, sendo alvo de grande investimento científico e tecnológico. Por outro lado, a quitina e a quitosana ficaram restritas a pesquisas básicas com poucos incentivos financeiros. Até a algum tempo, a quitosana era utilizada como agente floculante para tratamento de águas de abastecimento no Japão. No entanto, durante os últimos trinta anos, estes polímeros têm despertado grande interesse da comunidade científica mundial, devido ao grande potencial de aplicação dos mesmos em diversas áreas. A confirmação da presença de glucosamina na estrutura desses polissacarídeos, caracterizados basicamente pelo grupo amino no carbono 2, tornaram-nos especiais do ponto de vista químico, físico e biológico. Outros fatores também contribuíram para o aumento do interesse da comunidade científica pelas quitosanas e quitinas: a) grande abundância na natureza; b) obtenção por síntese natural; c) custo baixo, pois são os principais componentes das cascas de crustáceos, geralmente descartados como resíduos do processamento industrial; d) biodegradabilidade; e) baixa toxicidade; e f) possibilidade de processamento em diversas formas como flocos, pós, grãos, membranas, esponjas, algodões, fibras, fios, microesferas e géis (Hirano, 1996; Monteiro Junior, 1999; Torres *et al.*, 2004).

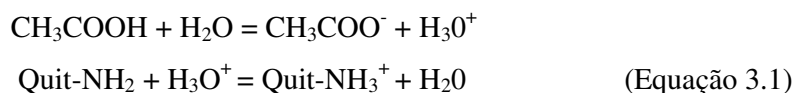
As propriedades biológicas da quitosana são muito promissoras, devido a características favoráveis em relação aos outros polímeros. O fato de serem biocompatíveis, não-antigênicas, não-tóxicas e hidrofílicas pode facilitar a união e a proliferação celular. Atualmente, a utilização das quitosanas na área biomédica tem se voltado para aplicações como agentes de liberação controlada de drogas e de liberação de genes, devido à capacidade de formar complexos estáveis com plasmídeos, e como materiais constituintes de matrizes para crescimento ósseo, devido à alta biocompatibilidade e capacidade de processamento em estruturas porosas. Outro aspecto refere-se à utilização da quitosana para o controle do colesterol LDL (*low density lipoprotein*) através de diversos produtos comerciais e de diversas outras aplicações (Tab. 3.2) (Aimoli & Beppu, 2004; Lima, 2005).

Tabela 3.2 Formas e aplicações da quitosana

Formas	Aplicações
Gel e pasta	Veículo para liberação de drogas, agente de imobilização e encapsulamento de células e enzimas.
Microesferas	Veículo para liberação de drogas, adsorção de proteínas e metais pesados.
Filmes e membranas	Bandagens, tratamento de queimaduras, cicatrização de lesões, hemodiálise, membrana artificial de rim, adsorção de proteínas e metais pesados.
Solução	Tratamento contra infecções bacterianas e agente hemostático.
Espumas	Agente hemostático e sistema de liberação de drogas.
Fibras	Suturas e bandagens.

(Fonte: Aimoli & Beppu, 2004)

A grande limitação deste polímero como material degradável é a sua baixa solubilidade em pH neutro e em solventes orgânicos, embora possa ser contornado através da produção de derivados, onde pequenas modificações das suas cadeias são realizadas para torná-lo um polímero mais solúvel (Kumar & Hudson, 2004; Tonoli, Leal & Beppu, 2004). A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes, mas também às propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas. Este comportamento pode ser de grande utilidade quando da fabricação de híbridos de quitosana através do processo sol-gel, que utiliza meio ácido para a sua realização (Aimoli & Beppu, 2004). A mistura de soluções aquosas de ácido acético com as quitosanas faz com que os íons hidrogênio liberados acidifiquem o meio e protonem facilmente os grupos amins das quitosanas, tornando-as solúveis e catiônicas, conforme a equação abaixo (Rinaudo, Pavlov & Desbrieres, 1999):



Dependendo da sua origem e processamento, a quitosana pode ter o seu peso molecular variando de 50 a 2000kD e o grau de desacetilação variando de 30 a 95% (Madhally & Matthew, 1999, Rege & Block, 1999, Di Maritno, Sittinger & Risbud, 2005). Com o aumento da disponibilidade comercial dos produtos à base de quitosana nas suas diversas formas de apresentação, e devido às várias fontes naturais disponíveis para a sua obtenção, as propriedades destes materiais podem variar grandemente entre eles. A heterogeneidade das quitosanas presentes no mercado e a falta de especificação técnica das mesmas é o resultado de parâmetros de processamento não controlados da quitina natural que envolvem inevitavelmente o seu grau de desacetilação ou percentual de grupos amins livres (Rege &

Block, 1999). De fato, uma grande dificuldade com a utilização das quitosanas como fontes de pesquisas é que elas se apresentam com uma ampla variação de pesos moleculares e graus de desacetilação, características estruturais que são muito importantes para suas propriedades físicas e biológicas (Alsarra *et al.*, 2002). Embora alguns autores afirmem que, à medida que se aumenta o grau de desacetilação diminui-se a massa molecular da quitosana (Kubota *et al.*, 2000), essas propriedades não podem ser obrigatoriamente associadas, pois outros fatores têm um papel importante: origem da quitina desacetilada, métodos de desacetilação, tempo e temperatura da reação de desacetilação (Kofuji *et al.*, 2005).

Outra característica importante deste material é que o grupo amina possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0, o que torna a quitosana um dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais, diferentes de outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados. Esta característica estrutural constitui uma vantagem, pois a reação dos grupos aminos livres é facilitada, fazendo com que a quitosana seja mais reativa e solúvel e permitindo a obtenção de muitos compostos e derivados com a mesma (Monteiro Júnior, 1999; Liu, Su & Lai, 2004; Sashiwa & Aiba, 2004). Outros grupos reativos da quitosana são as hidroxilas presentes nos carbonos 3 e 6 conforme mostrado (Fig. 3.3) (Lavertu *et al.*, 2003).

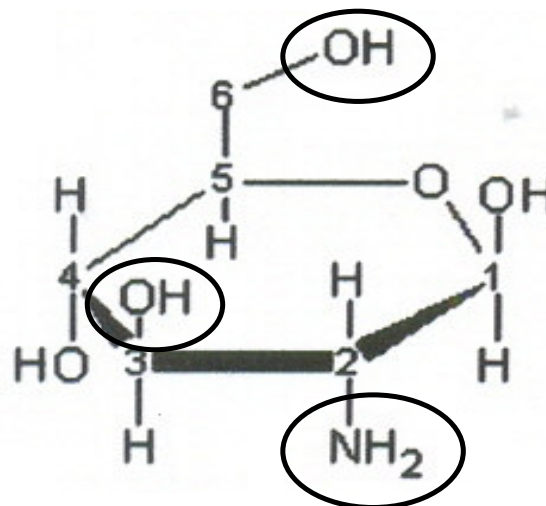


Figura 3.3 Grupos reativos no monômero de quitosana.

Na área médica essa característica pode ser favorável na regeneração de tecidos cartilagosos, uma vez que a natureza catiônica da quitosana é a responsável pelas

interações eletrostáticas com as glicosaminoglicanas (GAGs) aniônicas, proteoglicanas e outras moléculas carregadas negativamente (Sashiwa & Aiba, 2004). Experimentos *in vitro* utilizando-se substratos à base de quitosana cultivados com condrócitos mostraram satisfatória adesão e proliferação celular, bem como produção de matriz extracelular (Di Martino, Sittinger & Risbud, 2005). Essas interações entre a quitosana e as GAGs podem ser úteis como mecanismo para reter estas moléculas no interior da matriz durante a colonização celular *in vitro* ou após a implantação *in vivo*. Desde que uma grande família de fatores de crescimento e citocinas são moduladas pelas GAGs (por exemplo as heparinas), uma matriz que contenha um complexo quitosana/GAGs incorporado poderia ser altamente favorável para a colonização celular, pois teria grande potencial para recrutar fatores de crescimento dos tecidos vizinhos (Madihally & Matthew, 1999).

A natureza catiônica da quitosana pode ser também a responsável pela sua atividade antibacteriana devido à associação dos grupos aminos catiônicos com os ânions presentes na parede celular das bactérias. Esta associação é maléfica para a sobrevivência bacteriana, pois há uma supressão do transporte de nutrientes para a célula através da parede celular (Di Martino, Sittinger & Risbud, 2005). A atividade antibacteriana de quitosanas com diferentes pesos moleculares foi examinada contra bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* e *L. bulgaricus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio parahaemolyticus*). O peso molecular da quitosana mostrou ter influência significativa, sendo que mais altos pesos moleculares apresentaram maior potencial antibacteriano que oligômeros de quitosanas (No *et al.*, 2002).

Um estudo avaliou *in vitro* e *in vivo* o potencial de polissacarídeos à base de quitosana e complexos formados por quitosana/GAGs (heparinas), quitosana/sulfato-dextrano em favorecer a adesão e proliferação de células endoteliais sobre as suas superfícies. O procedimento *in vitro* envolveu a síntese do biomaterial e a semeadura celular do mesmo por 9 dias, ao passo que o experimento *in vivo* se deu pela incorporação do mesmo na região subcutânea de ratos. Os resultados do procedimento *in vitro* indicaram que o substrato composto apenas por quitosana suportou adequadamente a adesão e o crescimento celulares, enquanto que o substrato quitosana/GAGs inibiu a difusão e proliferação celulares. Este comportamento negativo poderia estar relacionado com a pobre adesão celular sobre a superfície destes biomateriais ocasionada pela perda gradual das GAGs do complexo

formado com a quitosana ao longo do experimento. Como se sabe, as GAGs são reconhecidas pela capacidade de se ligarem a uma variedade de proteínas séricas, como a fibronectina, e fatores de crescimento importantes nos processos de adesão e crescimento celulares; portanto, a desorção das GAGs poderia evitar ou diminuir esta adesão. Tal comportamento não foi observado *in vivo*, uma vez que todos os substratos testados mostraram efetividade na estimulação e proliferação celulares, além de proporcionarem a formação de uma fina camada de tecido de granulação denso sobre a superfície do biomaterial que se mostrou altamente vascularizada. O estudo concluiu que substratos à base de quitosana, quitosana/GAGs e quitosana/sulfato dextrano possuem um grande potencial para utilização em engenharia de tecidos (Chupa *et al.*, 2000).

Outro estudo avaliou o efeito de filmes de polissacarídeos aniônicos de diversas formulações (quitina, quitina sulfatada, quitina carboximetilada, quitina fosfatada, ácido hialurônico e ácido hialurônico sulfatado) e da quitosana sobre a adesão, morfologia, proliferação e diferenciação celulares utilizando-se osteoblastos para a cultura *in vitro*. Foi observado que a morfologia e adesão celulares variaram de acordo com a composição do filme utilizado. A adesão celular e atividade celular foram menores nos grupos contendo grupos carboxilas (quitina carboximetilada e ácido hialurônico), embora a deposição de cálcio tenha sido constatada nestas amostras. Os substratos à base de quitosana e quitina fosfatada mostraram baixa atividade celular e deposição de cálcio. Os autores, contradizendo a maioria dos estudos disponíveis na literatura, não indicaram a utilização destes materiais para a confecção de substratos em engenharia de tecido ósseo e recomendaram a realização de estudos *in vivo* para melhor elucidar esta questão. A adesão e proliferação celulares foram satisfatórias apenas nos substratos sintetizados a partir dos polissacarídeos aniônicos sulfatados (ácido hialurônico sulfatado e quitina sulfatados) (Nagahata *et al.*, 2005).

A obtenção da quitosana a partir da quitina envolve um tratamento hidrolítico com álcalis concentrados para remover os grupos acetil. Entretanto, esse processamento não elimina completamente esses grupos; portanto, as quitosanas disponíveis comercialmente não se apresentam completamente desacetiladas, devido à presença de grupos acetil remanescentes, o que pode variar bastante entre as diversas marcas (Fig. 3.4). Portanto, trata-se de um copolímero formado por unidades contendo os grupos acetamidas e aminas (Senso, Oliveros & Minguillón, 1999; Madihally & Matthew, 1999). Pode-se dizer que os

termos *quitina* e *quitosana* referem-se atualmente a uma família de polímeros que se apresentam com organização estrutural muito parecida, diferindo uns dos outros pelo conteúdo de grupos acetil medidos pelo grau de acetilação ou desacetilação (Rege & Block, 1999; Monteiro Júnior, 1999; Duarte *et al.*, 2002).

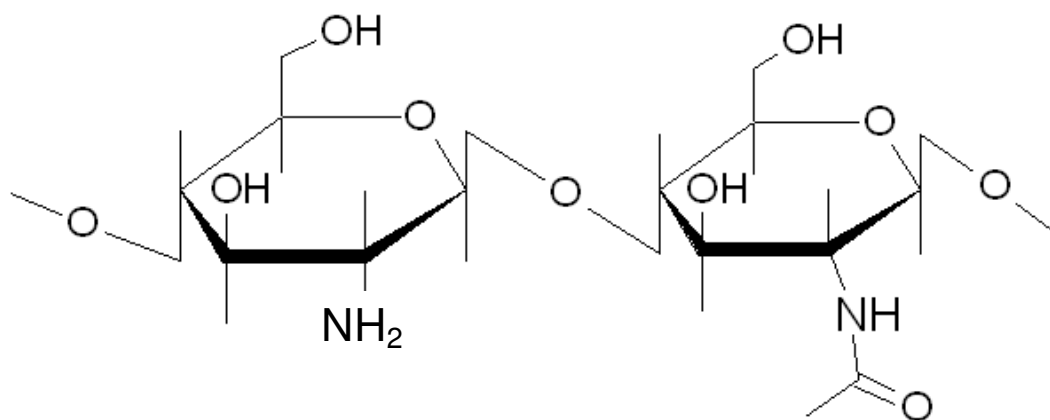


Figura 3.4 Estrutura molecular do copolímero de quitosana contendo grupos acetamida e amina no carbono 2 (Madihally & Matthew, 1999).

Inúmeros métodos são propostos na literatura para a realização da medição do grau de acetilação ou desacetilação das quitosanas, tais como: espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectroscopia de ultravioleta (UV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e análises térmicas. Entretanto, os resultados obtidos por eles são discrepantes e duvidosos, de modo que a sua determinação tem sido motivo de controvérsia no meio científico dado à complexidade do sistema. As técnicas mais amplamente difundidas e que têm trazido resultados mais promissores são as que utilizam a espectroscopia de infravermelho e a ressonância magnética nuclear (Shigemasa *et al.*, 1996; Lavertu *et al.*, 2003).

Na espectroscopia de infravermelho os dados podem ser ajustados em equações que relacionam as bandas associadas aos grupos N-acetil e hidroxilas presentes na quitina, tais como:

$$GD = [1 - (A_{1655}/A_{3450})^{1/1,33}] 100 \text{ e}$$

$$GD = 97,67 - [26,486 (A_{1655}/A_{3450})] \quad \text{(Equação 3.2).}$$

Nestas equações os valores de absorvância das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} são associados à carbonila (C=O) dos grupos N-acetil (amida I) e hidroxila (OH), respectivamente, e o fator 1,33 representa a proporção A_{1655}/A_{3450} para as quitosanas completamente N-acetiladas. A primeira banda varia conforme o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para a quitosana e a segunda está presente tanto no espectro da quitina e quitosana e não sofre variação (Monteiro Júnior, 1999). Em um estudo avaliando quitosanas de diferentes graus de desacetilação (48, 62 e 75%), a banda referente à amida I (1655 cm^{-1}) mostrou aumento da intensidade da transmitância para maiores graus de desacetilação (31,1% para GD 48%; 40,2% para GD 62% e 46,5% para GD 75%) (Gupta & Jabrail, 2006). Todavia, a escolha das referências baseadas nas amidas I e II no FTIR para a aferição do GD das quitosanas é dificultada porque a banda referente ao OH (inclusive a ligada a água) aparece próximo a 1640 cm^{-1} , o que pode gerar imprecisão na interpretação das bandas referentes à amida I e II, já que um aumento na quantidade de água absorvida pela quitosana, que é higroscópica, poderia causar um aumento de intensidade nas bandas 1640 e 3450 cm^{-1} . Uma outra possível variável é o fato de que a presença da banda referente à NH_2 localizada a 1590 cm^{-1} pode-se tornar larga o suficiente para causar interferências nas bandas das amidas I e II (Shigemasa *et al.*, 1996).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido (^{13}C NMR) tem se mostrado um método bastante promissor na medição do GD das quitosanas, pois se trata de uma técnica mais simples e menos sensível à umidade, além de não necessitar de uma curva de calibração como no caso do FTIR. Esta técnica baseia-se na observação do comportamento de dois picos, um em torno de 173 ppm relacionado ao carbono da carbonila C=O e o outro em torno de 22 ppm relacionado ao carbono da metila CH_3 , o qual corresponde à parte acetilada do biopolímero. De acordo com a eficiência do processo de desacetilação da quitina, as intensidades destes picos tendem a diminuir, pois as mesmas estão associadas ao GD (Monteiro Júnior, 1999; Duarte *et al.*, 2001). A ressonância magnética nuclear no líquido (^1H NMR) que avalia quitosanas na forma de soluções também tem sido utilizada com sucesso e tem sido considerada a técnica mais apropriada para a medição dos grupamentos acetil ao longo das cadeias de quitosana (Lavertu *et al.*, 2003; Rinaudo, 2006).

Um critério para distinguirmos a quitosana da quitina é o comportamento destes materiais quando da dissolução dos mesmos em soluções aquosas de ácidos diluídos. Quando o

polímero apresenta alto teor de grupos N-acetil (>40%) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando os mesmos grupos são menores que 40% ele passa a ser solúvel em soluções ácidas diluídas, como as dos ácidos clorídrico, acético e fórmico e denominado quitosana. Desta forma, o percentual de grupos aminos deve ser superior à metade dos grupamentos acetamidas presentes no carbono 2. A solubilização ocorre através da protonação dos grupos NH₂ na posição C2 da unidade de repetição da quitosana, onde o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito catiônico (Rinaudo, 2006). Por exemplo, se uma quitosana apresenta 75% de grau de desacetilação implica dizer que esta tem 25% de grupos acetilados no substituinte do carbono 2 ou 25% de grau de acetilação (Montembault, Viton & Domard, 2005b; Lima, 2005). O GD da quitosana e a sua massa molecular são considerados os principais parâmetros para a caracterização destes materiais, pois relata de forma direta ou indireta a quantidade de grupos NH₂ presentes (Peter, 1995). Sabe-se, por exemplo, que a quitina no seu estado natural não é passível de utilização no processo sol-gel, devido à sua pobre solubilidade. Outros fatores relacionados com a solubilidade da quitosana são, além da quantidade de grupos N-acetil e grupos amina, a distribuição destes grupos ao longo da cadeia polimérica e o pH da solução. Condições mais favoráveis para a solubilização da quitosana constituem meios com pH menor que 3 (principalmente com os ácidos nítrico, fluorídrico e acético) e grau de desacetilação acima de 85% (Monteiro Júnior, 1999; Lima, 2005).

Dependendo da origem do polímero e do processamento utilizado para a sua obtenção a partir da quitina, a cristalinidade do material pode variar consideravelmente. O grau de cristalinidade controla a hidratação do polímero que, por sua vez, determina a acessibilidade a locais mais internos do material. Este parâmetro influencia fortemente a cinética de hidratação e sorção do polímero, bem como o seu comportamento frente à degradação, já que o aumento do grau de cristalinidade de um polímero está relacionado a baixas taxas de degradação. A degradação *in vivo* da quitosana está associada, também, à hidrólise dos grupamentos acetilados presentes na sua cadeia. Em algumas aplicações específicas, o fato da quitosana ser biodegradável pode tornar-se um sério obstáculo à sua utilização a longo prazo. Um exemplo é a degradação da quitosana resultante da contaminação bacteriana e fúngica ou por hidrólise ácida que poderia levar a uma perda de massa do polímero que, por sua vez, limita o seu uso como membranas para filtração, por exemplo. Para tais aplicações é possível melhorar a estabilidade da quitosana contra a degradação através da incorporação de ligações cruzadas, embora as mesmas levem a uma perda de flexibilidade do material

(Guibal, 2005). Sabe-se também que a degradação da quitosana no corpo ocorre por ação de lisozimas e tende a aumentar com o aumento do seu grau de desacetilação (Ratajska & Boryniec, 1998), embora esta relação não seja muito forte, já que outros fatores podem influenciar este comportamento, como a origem e as condições de desacetilação da quitina e a distribuição dos grupos acetamidas ao longo da molécula de quitosana (Kofuji *et al.*, 2005). Por exemplo, quitosanas derivadas de camarão mostraram comportamento mais estável frente à degradação do que quitosanas derivadas de caranguejo e lagosta (Ratajska & Boryniec, 1998).

Em um estudo *in vitro*, o comportamento de degradação de quitosanas com diversos GDs (69, 74, 84 e 94%) foi avaliado utilizando-se solução de lisozima (4 mgml^{-1}) em PBS 0,1 M e pH 7,4 a 37°C , levando-se em conta a porcentagem de perda de peso durante o procedimento. As quitosanas com GD de 84 e 94% foram as mais resistentes à degradação, enquanto a quitosana com GD de 69% sofreu degradação acelerada. Esperava-se um aumento do grau de hidratação e inchamento em quitosanas com altos GDs, pois, teoricamente, a desacetilação da quitina converte os grupos acetamidas em grupos aminas primárias que são mais hidrofílicos. Todavia, este comportamento não pôde ser observado. Os autores justificaram tal comportamento, afirmando que a introdução de defeitos na estrutura cristalina da quitina durante o processo de desacetilação seria a responsável pela diminuição da sua cristalinidade e capacidade de inchamento (Tomihata & Ikada, 1996).

A cristalinidade de filmes de quitosanas submetidas a secagem no meio ambiente, em estufa e em infravermelho foi avaliada, já que altas temperaturas podem causar um aumento da cristalinidade devido a interações hidrofóbicas. Todas as quitosanas avaliadas apresentaram forte reflexão a 2θ por volta de $10-12^{\circ}$ e $20-22^{\circ}$. Um pequeno pico foi observado a 15° nos filmes de quitosana secos em estufa, que pode ser atribuído à presença de cristais anidros; o índice de cristalinidade foi maior nas amostras secas por infravermelho (43,31%), em relação às secas na estufa (38,5%) e em meio ambiente (25%). As diferenças de cristalinidade apresentadas pelas quitosanas não tiveram influência nas propriedades mecânicas das mesmas, embora o método de secagem com infravermelho tenha mostrado a maior eficácia (Srinivasa *et al.*, 2004).

As propriedades térmicas da quitosana foram avaliadas através de análise termogravimétrica (TGA). O mecanismo de degradação da quitosana foi observado em quatro estágios

principais levando-se em conta a sua perda de peso com o aumento da temperatura. O primeiro estágio ocorreu a uma temperatura de 140⁰C e mostrou um percentual de perda de peso de 10% atribuído à perda de água do material. O segundo estágio iniciou-se a 275⁰C e alcançou os 335⁰C, com perda de peso de 30% e o terceiro estágio ocorreu a 450⁰C com perda de peso de 10%; estes dois estágios foram relacionados à degradação da quitosana. O quarto estágio ocorreu a 550⁰C, com perda de peso adicional de 15% e foi relacionado à degradação total do polímero. Os resultados mostraram que estes biomateriais podem ser submetidos à esterilização e secagem por calor, o que poderia ser de grande interesse para aplicações na engenharia de tecidos (Khalid *et al.*, 2002).

O comportamento de geleificação das quitosanas em relação à influência de diferentes parâmetros como o grau de acetilação, concentração do polímero e a composição inicial do solvente foi estudado. A geleificação foi avaliada em soluções de quitosana em ácido acético, água e propanodiol, um álcool adicionado após a completa dissolução da quitosana na solução aquosa de ácido acético. O estudo mostrou uma diminuição do tempo necessário para se alcançar o ponto de geleificação nas amostras produzidas com maior grau de acetilação, mostrando que os grupos acetil desempenham um importante papel na formação de interações hidrofóbicas, que são as responsáveis pela geleificação do sistema. A composição do solvente também influenciou o comportamento reológico do material produzido. Houve um aumento do tempo de geleificação à medida que o conteúdo inicial de água na mistura também aumentou, mostrando que a água desfavorece a formação de junções através de interações hidrofóbicas. O estudo mostrou também que quanto maior a concentração do polímero na solução inicial, até um valor de 1,5%, mais rápida foi a geleificação do material, pois a quantidade de cadeias poliméricas emaranhadas seria maior, favorecendo a formação de junções físicas que levariam a uma geleificação mais rápida. Uma concentração do polímero acima de 1,5% permitiu um tempo de geleificação baixo e constante (Montembault, Viton & Domard, 2005a). A temperatura mostrou ter influência também no ponto de geleificação. O aumento da temperatura diminuiu significativamente o tempo de geleificação do material e, para temperaturas de 50⁰C tornou-se constante, o que poderia ser explicado pelo aumento da mobilidade das cadeias poliméricas em altas temperaturas, facilitando a formação de junções físicas entre as cadeias (Montembault, Viton & Domard, 2005b).

Um estudo avaliou a capacidade de quitosanas com diferentes graus de desacetilação em proporcionar a adesão e proliferação celulares. Amostras de quitosanas com 3 diferentes graus de desacetilação (60%, 70% e 80%) foram sintetizadas e seus pesos moleculares mensurados através das medidas de viscosidade intrínseca. O grau de inchamento das quitosanas em uma solução tampão (pH=7,4) foi avaliado para se determinar a influência do pH alcalino no comportamento de inchamento dos materiais sintetizados. Os valores obtidos mostraram que o peso molecular foi maior para as amostras com menor grau de desacetilação, sendo, portanto, propriedades inversamente proporcionais. O grau de inchamento mostrou-se diretamente proporcional ao grau de desacetilação. A capacidade do biomaterial em se expandir desempenha um importante papel durante a cultura celular *in vitro*. O aumento dos poros do material quando o material incha facilita não só a adesão celular como também a sua difusão para o interior do mesmo, possibilitando o crescimento tridimensional do tecido. Além disso, o aumento do grau de inchamento permite que o biomaterial tenha maior acesso a nutrientes presentes no meio de cultura. Os testes realizados com cultura celular *in vitro* mostraram que o grau de desacetilação também influenciou a adesão e a cinética de crescimento celular. A biocompatibilidade das 3 formulações de quitosana mostrou-se excelente, resultando num estímulo do crescimento celular. A exposição prolongada das células com a quitosana não resultou em morte celular ou em mudanças na morfologia das células. Estes resultados mostraram que o grau de desacetilação teve pouca influência sobre a biocompatibilidade das quitosanas. Entretanto, em relação à cinética de adesão e crescimento celular, a quitosana com menor grau de desacetilação mostrou as mais baixas propriedades de adesão celular. Isso poderia ser explicado pelo fato de que quitosanas com alto grau de desacetilação possuem mais locais catiônicos sobre a superfície, que constituem características favoráveis para a interação eletrostática com as superfícies celulares carregadas negativamente (Dhiman, Ray & Panda, 2004).

Uma outra alternativa para se viabilizar e facilitar a utilização de quitosanas nas diversas áreas é a modificação química destes polímeros, que visam introduzir grupamentos a fim de melhorar as propriedades físico-químicas, como a solubilidade, a hidrofiliabilidade, a energia superficial e a cristalinidade. A forma de purificação das quitosanas pode ser uma abordagem eficaz para se proporcionar essas modificações. Em um estudo, quitosanas no estado bruto e nas formas neutra, acetato e cloridrato foram avaliadas. A forma neutra foi obtida após a dissolução do polímero em solução aquosa diluída de ácido acético a 1%,

filtração e adição de NH_4OH concentrado até a ocorrência da precipitação. O acetato de quitosana foi obtido por um processamento parecido com o anterior, com a adição de acetato de sódio 0,2 mol/L e uso de etanol para a obtenção do precipitado. O cloridrato de quitosana foi obtido pela adição de NaCl (0,2 mol/L) na solução de quitosana em ácido acético diluído a 1%. O estudo com os 3 tipos de quitosana mostrou que todos eles apresentavam solubilidade em ácido acético, mas as quitosanas na forma de cloridratos também apresentavam completa solubilidade em água, enquanto que os acetatos de quitosana eram parcialmente diluídos neste meio. O comportamento da quitosana salina foi relacionado à sua alta hidrofiliçidade. A difração de raio-X mostrou semelhanças na cristalinidade entre as quitosanas brutas, purificadas na forma neutra e na forma de acetato, diferentemente do padrão exibido pelos cloridratos. A comparação entre as diferentes formas purificadas de quitosana mostrou, nos caso dos cloridratos de quitosana, a presença de cargas e íons que alterou drasticamente as interações inter e intracadeias, modificando o seu arranjo no estado sólido, aumentando a sua hidrofiliçidade e conferindo solubilidade em água sem a necessidade de adição do ácido acético para promover a sua completa solubilização (Signini & Campana Filho, 2001).

Quitosanas acetiladas com cloretos de hexanoil, decanoil e lauroil foram produzidas e apresentaram excelente solubilidade em solventes orgânicos como hidrocarbonetos halogenados e solventes aromáticos. Testes mecânicos nas quitosanas sintetizadas mostraram maior rigidez para as membranas de quitosana pura e maior flexibilidade para as membranas acetiladas com aumento do comprimento das cadeias proporcionado pelos substitutos acetil incorporados. A análise térmica das quitosanas mostrou menor estabilidade térmica nas quitosanas modificadas em relação ao grupo controle, o que poderia ser explicado pela desestruturação da rede cristalina da quitosana provocada pelas cadeias laterais e ramificações flexíveis das modificações introduzidas (Zong *et al.*, 2000). A adição de glicerina como agente plastificador aumentou também a proteção da quitosana contra a deterioração em condições severas de envelhecimento (Larena & Cáceres, 2004).

A incorporação de peptídeos RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) à superfície de filmes porosos de quitosana foi demonstrada através de FTIR pela presença de ligações entre as entidades envolvidas, que foram associadas aos grupos amino da quitosana e grupos carboxila dos peptídeos RGDS, formando ligações covalentes. Além disso, o condicionamento prévio das membranas com os peptídeos melhorou a adesão celular sobre as superfícies das quitosanas

e aumentou a densidade celular nas mesmas, quando comparadas com as membranas porosas sem os peptídeos (Ho *et al.*, 2005). A associação de quitosana com colágeno tipo I também tem sido utilizada com o objetivo de se obter membranas com capacidade osteogênica. Blendas fabricadas destes biopolímeros na forma densa e porosa foram capazes de induzir a deposição de cálcio sobre as suas superfícies, o que poderia ser interessante do ponto de vista da osteogênese. O colágeno, como se sabe, é um polímero natural totalizando aproximadamente 1/3 das proteínas corpóreas, presentes na pele, tendões, ossos, dentes, intestinos e cartilagens, sendo o mais abundante do organismo e representa 6% em massa do corpo humano. As interações entre estes dois biopolímeros podem ocorrer através da via eletrostática envolvendo os grupos amino (NH_3^+) da quitosana e a carboxila do colágeno (COO^-). Apesar disto, a blenda quitosana-colágeno mostrou-se mais hidrofílica que a quitosana natural e também menos resistente a altas temperaturas (Pacheco & Beppu, 2004).

A quitosana pode ser também associada a polímeros biodegradáveis com o objetivo de atenuar os efeitos citotóxicos dos produtos gerados pela biodegradação destes, pois os produtos de degradação da quitosana são considerados neutros. Além disso, este biomaterial tem sido considerado uma ferramenta útil para ser utilizado como cobertura superficial de outros biomateriais com o objetivo de modificar suas características superficiais e otimizar a sua utilização na engenharia de tecidos. A modificação superficial do PLA (ácido polilático), predominantemente hidrofóbico, pela quitosana melhorou a hidrofiliabilidade, a molhabilidade e a afinidade celular do biomaterial, comprovado pelo alto índice de adesão e proliferação de osteoblastos avaliados *in vitro* quando comparados com as superfícies de PLA sem a cobertura com a quitosana. A interação iônica entre os grupos aminos da quitosana e os grupos carboxilatos do PLA hidrolisados foi observado através do FTIR, mostrando a formação de uma ligação estável entre os dois materiais (Lee *et al.*, 2002).

O que ainda limita a utilização de quitosanas na engenharia de tecido ósseo é a ausência de propriedades físicas adequadas para implantação em locais de alta solitação mecânica, ausência de bioatividade e dúvidas quanto ao potencial de toxicidade *in vivo* dos seus produtos de degradação. Uma diminuição do pH do meio decorrente da liberação de subprodutos ácidos resultantes de sua degradação pode resultar em resposta inflamatória indesejável, perda de biocompatibilidade e dificuldade de diferenciação das células osteoblásticas (Zhang & Zhang, 2004). Alguns aditivos como o glutaraldeído e o formaldeído têm sido utilizados com as quitosanas com o objetivo de funcionarem como

agentes de ligação cruzada (Shirosaki *et al.*, 2005). Acredita-se que a matriz orgânica formada pela quitosana é capaz de agir sobre a nucleação, o crescimento, a orientação e o tamanho de depósitos inorgânicos, o que poderia conferir interessantes propriedades ao produto final, como, por exemplo, estimular a regeneração de tecidos ósseos (Aimoli & Beppu, 2004).

Híbridos organo-inorgânicos

Do ponto de vista da engenharia de materiais, os tecidos humanos podem ser considerados basicamente materiais compósitos com a presença de três componentes principais: (1) células, que são organizadas dentro de unidades funcionais, (2) matriz extracelular e (3) um substrato cuja arquitetura tridimensional contribui significativamente para o desenvolvimento de funções biológicas específicas em tecidos e possibilitam condições apropriadas para a nutrição e organização espacial das células (Gross & Rodríguez-Lorenzo, 2004). O osso humano é composto de uma fase orgânica (30% em peso), constituída principalmente por colágeno, e uma fase inorgânica (60% em peso) composta pela apatita. O restante é constituído basicamente por água. *In vivo*, os cristais de apatita crescem sobre as fibras colágenas com uma orientação preferencialmente paralela umas sobre as outras e no sentido longitudinal ao osso. Esta configuração peculiar dos cristais de apatita é responsável por proporcionar resistência ao osso enquanto permite alguma flexibilidade. Da mesma forma, a resistência e rigidez do tecido ósseo são sempre maiores no sentido do seu longo eixo (Athanasίου *et al.*, 2000). Portanto, pode-se presumir que a substituição de tecidos vivos por materiais sintéticos pode estar ligada ao desenvolvimento de biomateriais compósitos especiais capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos vivos (Pereira, Vasconcelos & Oréfice, 1999).

As matrizes poliméricas têm sido desenvolvidas de forma a apresentarem estruturas porosas similares às do osso trabecular. Entretanto, esses materiais não têm mostrado capacidade de união ao tecido ósseo, além de possuírem um módulo de elasticidade muito menor do que o do osso, não permitindo a sua utilização em locais onde a solicitação mecânica é grande. Há também receios quanto à utilização como matriz biodegradável, devido à maior toxicidade dos seus produtos de degradação (Holy *et al.*, 2003). Por esse motivo, o uso de materiais poliméricos e cerâmicos na área biomédica tem sido alvo de vários estudos e alcançado sucesso em diversas áreas, embora ainda persistam alguns

inconvenientes que precisam ser contornados, principalmente no que diz respeito à engenharia de tecido ósseo. As cerâmicas, por exemplo, apresentam uma dureza muito superior àquela do osso, ao passo que a maioria dos polímeros apresenta um comportamento contrário (Wang, 2003). Para tentar resolver o problema da diferença entre os módulos de elasticidade exibidos pelo osso e o material de implante e promover uma forte união entre as duas entidades, o conceito de “biomateriais análogos” tem sido cada vez mais utilizado quando pensamos em um biomaterial para regeneração óssea.

O termo “biomimetismo” também tem ganhado força nos dias atuais e reflete a utilização de características e informações de um dado sistema biológico em um material não-biológico, com o intuito de favorecer a integração dos mesmos, o que poderia significar, em termos práticos, na melhoria de propriedades mecânicas, em modificações superficiais ou mesmo em sinalizações específicas para facilitar a integração material/células para regeneração (Gopferich & Tessmar, 2003). Desde então, uma variedade de materiais híbridos tentando alcançar as propriedades similares às do tecido ósseo tem sido alvo de pesquisas na área de biomateriais. Os termos compósitos e híbridos orgâno-inorgânicos têm sido, inadvertidamente, empregados como sinônimos na literatura. Compósitos são materiais constituídos pela mistura de duas ou mais fases distintas, usualmente combinadas em escala microscópica, as quais devem estar presentes em proporções razoáveis (> 5%). Híbridos são materiais homogêneos devido à mistura dos componentes em escala nanométrica ou submicrométrica. Deste modo, compósitos e híbridos diferem entre si nas dimensões e na dispersão de seus componentes; além disso, um compósito não é, necessariamente, constituído por componentes orgânicos e inorgânicos (Mamede & Prado, 2005).

A produção de materiais híbridos é motivada por uma série de razões específicas para cada caso em particular. No geral, propriedades inúmeras podem ser obtidas dependendo dos parâmetros do sistema escolhido, como tipo, forma e concentração dos componentes: aumento da rigidez, resistência e estabilidade, aumento da tenacidade, aumento da resistência à deformação, aumento da resiliência, redução da permeabilidade, aumento da degradabilidade, dentre outros. Os materiais utilizados na regeneração de tecidos ósseos devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimularem uma resposta adequada dos mesmos (Coelho, 2003).

A ciência relacionada aos híbridos organo-inorgânicos pode possibilitar o surgimento de uma classe de biomateriais com propriedades complementares e características únicas e altamente vantajosas para aplicação na regeneração de tecidos ósseos. Esses materiais são homogêneos devido à mistura dos componentes em nível molecular e suas propriedades refletem a natureza química dos blocos pelos quais foram formados. Há que se dizer, entretanto, que as propriedades de um material híbrido não são apenas a soma das contribuições individuais de seus constituintes; existe um sinergismo que também depende da natureza química dos segmentos orgânicos e inorgânicos e do tamanho e morfologia dos correspondentes domínios (Mamede & Prado, 2005). Do ponto de vista das propriedades mecânicas, a simples combinação do alto módulo elástico das cerâmicas com a elevada tenacidade dos polímeros poderia levar à obtenção de uma rede cerâmica mais flexível, com algum grau de rigidez. Outra vantagem decorrente da combinação de polímeros e cerâmicas está associada à inércia química de ambos, o que favorece o seu uso em meios quimicamente agressivos como é o meio biológico. O desafio científico e tecnológico está em encontrar parâmetros adequados e rotas de processamento que permitam desenvolver um material híbrido que flexibilize um determinado material cerâmico sem comprometer demasiadamente o seu módulo elástico. Uma possível restrição de aplicação de materiais híbridos estaria relacionada à natureza termicamente sensível dos materiais orgânicos. Entretanto, a estabilidade térmica desses materiais pode ser otimizada, pois depende da forma como a fase orgânica encontra-se ligada à rede cerâmica, ou seja, da concentração das ligações primárias e do grau de interação entre os componentes (Costa, 2001).

O controle das características da interface entre os dois componentes de um híbrido é de grande importância, pois o comportamento mecânico do material e a longevidade do mesmo são dependentes da forma como os constituintes estão unidos. Em boa parte dos compósitos bioativos, ligações químicas entre os dois materiais não são encontradas e a resistência de união entre os dois é totalmente dependente da interpenetração mecânica entre os constituintes dos dois materiais. Desta forma, quando uma determinada tensão aplicada ao material compósito excede a resistência de união na interface do mesmo, um descolamento entre os dois constituintes toma lugar e uma fratura do material ocorre (Wang, 2003).

Na engenharia de tecidos, os materiais híbridos porosos têm sido desenvolvidos através do uso de uma rota de processamento sol-gel, o que tem conferido a eles bioatividade, embora uma taxa de degradação satisfatória ainda não tenha sido alcançada (Yoo & Rhee, 2004). O

ponto fraco do processamento sol-gel para a produção de vidros é a grande fragilidade apresentada pelas matrizes obtidas que poderia ser contornada pela adição de polímeros à fase inorgânica. Portanto, este método tem mostrado bastante utilidade na produção de híbridos, pois possibilita a combinação de polímeros com materiais cerâmicos em escalas moleculares e nanométricas, permitindo a preparação de materiais cerâmicos em temperaturas compatíveis com o processamento de polímeros e um maior controle da composição dos híbridos (Deriu *et al.*, 2005). Diferentemente dos vidros derivados do processo sol-gel, a última etapa do processamento de híbridos é a etapa de secagem em baixas temperaturas, uma vez que eles não podem ser tratados em altas temperaturas que poderiam levar à decomposição do componente polimérico. Uma consequência é a presença de resíduos orgânicos no material híbrido após a etapa de secagem, proporcionando ao material um alto caráter ácido devido à presença de catalisadores adicionados durante o processamento (por exemplo, os ácidos fluorídrico e clorídrico). Desta forma, uma etapa adicional de limpeza e neutralização dos biomateriais é necessária para produzir espumas híbridas mais biocompatíveis.

Um estudo com híbridos de PVA e vidros bioativos foi realizado utilizando-se vários métodos de neutralização após a síntese e posterior avaliação da citotoxicidade celular *in vitro* dos materiais em culturas de osteoblastos (Pereira *et al.*, 2005a). Híbridos à base de PVA, SiO₂ e CaO foram submetidos a três procedimentos de limpeza: a. imersão em água em 6 vezes por 30 minutos; b. imersão em solução alcoólica de 0, 30,60,90 e 100%; e c. imersão em NH₄OH, a uma razão de 10ml/g por 3 horas. Embora todos os procedimentos de limpeza tenham aumentado a viabilidade celular em relação ao grupo controle não submetido a nenhum método de limpeza, o procedimento mais efetivo foi a imersão das espumas em solução de NH₄OH, mostrando níveis de viabilidade celular comparáveis àqueles exibidos por vidros. No entanto, o produto utilizado alterou ligeiramente a estrutura de poros do material e levou a uma diminuição do teor de cálcio nos híbridos cuja fase inorgânica era sílica-cálcia. A resistência à deformação dos materiais após a limpeza diminuiu um pouco, o que poderia ser associado à mudança composicional e à mudança na estrutura de poros. Foi proposto que um ajuste dos níveis de NH₄OH, em quantidade e concentração, deve ser realizado com o intuito de ser reduzir a perda do cálcio do material.

A adição de uma cerâmica ou fase vítrea a um polímero biodegradável pode ser utilizada para alterar favoravelmente o comportamento de degradação *in vivo* e *in vitro* quando o

mesmo apresenta potencial citotóxico. Partículas de vidro bioativo usadas como inclusões ou coberturas em polímeros degradáveis podem levar a uma rápida troca iônica de prótons na água por íons álcalis do vidro que proporcionaria um efeito tampão na superfície do polímero, amenizando a degradação do mesmo. Esse mesmo componente inorgânico pode aumentar a bioatividade do híbrido, através da rápida formação de cristais de HCA sobre a superfície do material. Desta forma, a combinação de polímeros porosos biodegradáveis e cerâmicas bioativas pode trazer os seguintes benefícios na construção de matrizes: (1) melhor ambiente para adsorção e crescimento de células devido à osteocondutividade proporcionada pela fase vítrea; (2) os produtos ácidos resultantes da degradação do polímero podem ser tamponados e neutralizados; e (3) as propriedades mecânicas do substrato podem ser melhoradas, tornando-as mais próximas das propriedades do tecido ósseo (Hutmacher, 2000; Boccaccini & Maquet, 2003).

A utilização de polímeros com alto peso molecular é sempre preferível do ponto de vista da melhora das propriedades mecânicas do híbrido; entretanto, alguns polímeros como o PVA, quando utilizados com alto peso molecular, dificultam a eliminação de seus produtos de degradação pelos rins, devido à ausência de degradabilidade deste polímero. A simples união de um material orgânico com um inorgânico pode causar alterações estruturais significativas nos materiais envolvidos na mistura e mudanças nas propriedades dos mesmos. A união de um polímero à base de PVA com a sílica influenciou severamente a cristalinidade do polímero. O PVA no seu estado puro é um material essencialmente semicristalino devido à presença de grupos hidroxilas nas cadeias. Quando a sílica foi incorporada a este material, entretanto, os grupos hidroxilas reagiram com os grupamentos de sílica, o que diminuiu a quantidade de hidroxilas livres e a cristalinidade do polímero. Quando o conteúdo de sílica na mistura alcançou aproximadamente 59%, o PVA foi considerado como polímero amorfo. Neste mesmo estudo, foi observada uma diminuição drástica da solubilidade em água do PVA à medida que a sílica foi incorporada ao polímero, especialmente quando a concentração desta alcançou níveis acima de 34% na mistura (Shao *et al.*, 2003).

Híbridos organo-inorgânicos à base de sílica e quitosana

Tomando como inspiração os vários compósitos e híbridos presentes na natureza constituídos de quitina e compostos inorgânicos, uma série de recentes estudos sobre a

produção de materiais constituídos de quitina ou quitosana com carbonatos de cálcio, fosfato de cálcio e sílica têm sido realizados. Como se sabe, ossos, dentes, carapaças de animais e conchas são constituídos de materiais organo-inorgânicos, nos quais proteínas e lipídios formam uma matriz estrutural para a deposição de compostos inorgânicos como cristais de hidroxiapatita, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e sílica. A produção de híbridos à base de quitosana e sílica tem sido realizada de forma a aproveitar as características estruturais da quitosana, que possui uma estrutura de cadeia regular e pode formar soluções verdadeiras em meios ácidos, o que facilita o seu uso no processo sol-gel. Os derivados da quitosana e a própria quitosana podem apresentar interações específicas com a superfície de gel de sílica, como ligações químicas ou adsorção específica (Muzzarelli & Muzzarelli, 2002).

Um estudo foi realizado com o objetivo de se caracterizar e produzir um híbrido na forma de pó através da inclusão da quitosana na cadeia de polisiloxana durante a formação da sílica-gel na policondensação hidrolítica do TEOS, através do processo sol-gel (Rashidova *et al.*, 2004). Os difratogramas realizados nos híbridos obtidos evidenciaram o caráter amorfo desses materiais, com uma diminuição significativa da cristalinidade inicial apresentada pela quitosana. A espectroscopia de infravermelho revelou bandas de absorção a 1090, 1020 e 3400 cm^{-1} , relacionadas à presença de ligações químicas do tipo Si-O-Si, Si-O-C e NH_2 livres e grupos OH, respectivamente. Não foram observadas bandas de absorção dos grupos amidas da quitosana, no campo de 1650 cm^{-1} , nem de grupos silanol no campo de 960 cm^{-1} . Este resultado foi considerado um forte indício de que houve a formação das seguintes interações: a) ligações de hidrogênio entre os grupos silanol da sílica e grupos amidos e hidroxilas da quitosana; b) ligações iônicas entre os grupos silanol da sílica e os grupos aminos da quitosana.

Em outro estudo, géis porosos de quitosana e sílica foram preparados através da mistura do TMOS (tetrametilortossilicato), precursor da sílica, com a quitosana em solução aquosa de ácido acético a 1% utilizando-se o processo sol-gel. A proposta do estudo foi avaliar a capacidade do gel formado em servir como material carreador para enzimas, no caso a glicose-oxidase. As características do gel formado foram avaliadas através da espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pela capacidade de inchamento do material em água destilada. Após a mistura vigorosa das duas soluções, percebeu-se a formação do gel em 30

minutos. A proporção ideal em massa do TMOS/Quitosana para a obtenção do gel foi de 3,5 a 4. O exame das amostras através da microscopia eletrônica de varredura mostrou uma diferença na microestrutura do gel de quitosana e do gel de quitosana-SiO₂. O gel de quitosana-SiO₂ exibiu uma estrutura altamente porosa, ao passo que o gel de quitosana apresentou uma estrutura mais compactada. O inchamento do gel de quitosana foi muito superior ao do gel híbrido (45%) em água destilada, chegando a ficar totalmente disperso após 72 h em temperatura ambiente. O espectro do FTIR do gel de quitosana mostrou picos característicos nas bandas 1656 cm⁻¹ e 1598 cm⁻¹, correspondentes, respectivamente, aos grupos amidas I e II, que não apareceram no gel híbrido. A banda correspondente ao grupo hidroxila do gel de quitosana a 3426,2 cm⁻¹ não apareceu no gel híbrido, que apresentou uma banda de absorção de 3438 cm⁻¹ representado pelos grupos OH oriundos da hidrólise incompleta do TMOS (Yang, Wang & Tan, 2004).

A quitosana pode formar hidrogéis resistentes com agentes de ligações cruzadas, como o glutaraldeído. Entretanto, todo o esforço para realizar a secagem do hidrogel para a obtenção do aerogel não tem trazido bons resultados, devido à alta deformação e contração do gel de quitosana. Esse comportamento é esperado já que a quitosana possui um caráter altamente polar com afinidade para formar ligações de hidrogênio com cadeias adjacentes. Portanto, a adição de um material inorgânico como a sílica poderia tornar o gel mais resistente a deformações. Em um estudo, hidrogéis contendo uma fase sólida de quitosana e sílica foram sintetizados através do uso de uma solução aquosa de quitosana em ácido acético a 1 % para catalisar a hidrólise e a condensação do TEOS, alcóxido precursor da sílica. As amostras variaram na proporção quitosana/sílica de 0,1 a 1,1 e o tempo de geleificação variou de 1 a 4 horas para as várias amostras sintetizadas. As propriedades físicas dos materiais mostraram uma forte dependência da proporção quitosana/sílica. Quando a quantidade de quitosana aumentou, a contração do material diminuiu significativamente. Isto mostrou que a quitosana inibiu a contração de geleificação a despeito do fato de que a quitosana possui alto caráter polar e capacidade de formar ligações de hidrogênio entre as partículas de sílica adjacentes. Estas ligações poderiam explicar tal comportamento, já que elas podem reduzir as reações de condensação dos grupos hidroxilas superficiais com as partículas de sílica vizinhas, desta forma, inibindo a contração do gel. Portanto, amostras com alto conteúdo de quitosana podem reduzir o empacotamento da estrutura do gel, trazendo como consequência uma maior capacidade de absorver água quando em contato com soluções-tampão. A quantidade de quitosana presente também

afetou a área superficial dos aerogéis secos, que diminuiu com o aumento da quantidade de quitosana. Isto poderia ser explicado pela presença de impurezas na quitosana ou pequenas porções do polímero que não se dissolveram completamente no processo sol-gel (Ayers & Hunt, 2001).

Membranas de quitosana pura e híbridas de quitosana com sílica, utilizando-se o GPTMS (γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane) como precursor alcóxido da fase inorgânica, foram analisadas por FTIR e comparadas em relação à capacidade de inchamento e propriedades mecânicas. A sílica foi incorporada à quitosana em diversas proporções por peso (5, 10, 20, 30, 40 e 50%) com o intuito de melhorar as suas propriedades mecânicas e biológicas. A reação da quitosana com a sílica foi evidenciada pela diminuição de intensidade da banda 1550 cm^{-1} referente ao dobramento do grupo NH e pelo aparecimento da banda a 920 cm^{-1} referente à ligação Si-OH estiramento. A banda de absorção a $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, referente ao grupo Si-O-C, mostrou intensidade aumentada. O grau de inchamento da quitosana em água foi diminuído significativamente com a incorporação de sílica, o que poderia ser favorável para a sua utilização em meios úmidos. Os testes mecânicos mostraram que a quitosana híbrida mostrou-se mais frágil e com menor resistência à tração e percentual de alongamento quando comparada à membrana de quitosana pura (Liu, Su & Lai, 2004).

O GPTMS também foi utilizado como precursor inorgânico da sílica incorporada em membranas de quitosana para a melhora das suas propriedades biológicas como biodegradabilidade e bioatividade. Membranas de quitosana puras e híbridas de quitosana e sílica com e sem a adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) foram analisadas em relação à capacidade de estimularem a adesão e proliferação de células MG63 osteoblásticas. Os melhores resultados foram obtidos com as membranas híbridas de quitosana sílica sem a adição de CaCl_2 , o que poderia ser explicado pelo fato do silício, presente nos grupos Si-OH e Si-O-Si, possuir um efeito positivo na proliferação de células osteoblásticas. A adição do CaCl_2 não mostrou bons resultados, provavelmente devido à presença de uma quantidade desproporcional de cálcio na mistura que favoreceu a condensação dos grupos silanol da membrana híbrida, levando a uma menor liberação de íons silício. Embora o cálcio tenha um importante papel na mineralização óssea, em quantidades não controladas pode ter efeito citotóxico na cultura celular (Shirosaki *et al.*, 2005).

A caracterização de membranas não porosas de híbridos organo-inorgânicos à base de sílica modificada por íons cálcio, potássio e quitosana em diversas proporções sintetizadas pelo processo sol-gel foi realizada através de FTIR e pela capacidade de inchamento dos materiais, a fim de se avaliar a interação entre os componentes presentes e a influência da quantidade de quitosana nos materiais produzidos. Um vidro bioativo como grupo controle e três híbridos com diferentes proporções quitosana/vidro bioativo (2:3; 1:1 e 2:1) foram utilizadas para comparação. Para a avaliação da capacidade de inchamento, os biomateriais foram imersos em solução tampão Tris-HCl por 6, 24, 48 e 54 h e pesados antes e após o procedimento. Foi observado, como esperado, um grau maior de inchamento à medida que o conteúdo de quitosana aumentou no híbrido, embora as condições de equilíbrio tenham sido alcançadas num tempo mais longo (48 horas para a proporção 1:1 e 54 h para a proporção 2:1). Os espectros de infravermelho mostraram uma diminuição das intensidades das bandas relativas às ligações Si-OH (950 cm^{-1}) em relação ao grupo controle devido ao menor conteúdo de sílica nos híbridos formados e uma nova banda de absorção nos híbridos foi observada em 1400 cm^{-1} e relacionada à modificação da matriz de sílica e presença de ligações Si-C. Quando comparado com os espectros da quitosana pura, também avaliada para efeito comparativo, uma outra alteração observada foi a ausência da banda característica da amida II presente nas quitosanas a 1570 cm^{-1} do modo de dobramento do grupamento NH, que é reduzido em géis de quitosana e sílica (Deriu *et al.*, 2005).

O relacionamento entre as características físicas e químicas de uma membrana de quitosana/sílica sobre o crescimento e a adesão de fibroblastos sobre a sua superfície foram avaliados com o objetivo de se obter um biomaterial para enxerto de pele e no tratamento de feridas crônicas. Diferentes proporções de sílica foram utilizadas para a síntese das amostras híbridas (0 %, 20 %, 33 %, 43 % e 50 %). As características superficiais das membranas híbridas produzidas mostraram-se dependentes do conteúdo de sílica das mesmas. O conteúdo de sílica reduziu a flexibilidade das membranas, tornando-as frágeis e rígidas; no entanto, a adição de sílica foi importante para aumentar a permeabilidade ao oxigênio, característica essencial para possibilitar a cultura de células no biomaterial. A proporção de sílica em 50 % na membrana foi considerada neste estudo como a mais satisfatória para promover a adesão celular e também para suportar o crescimento celular sobre ela (Suzuki & Mizushima, 1997).

As estruturas de aerogéis de sílica são freqüentemente caracterizadas como sendo redes tridimensionais compostas de partículas de sílica conectadas umas às outras, de maneira a formarem uma estrutura semelhante a um colar de pérolas, constituindo-se a unidade primária. Por sua vez, estas correntes unem-se umas às outras formando uma estrutura tridimensional porosa, onde o tamanho das partículas e o tamanho do poro dependem das condições de processamento do aerogel. Quando a transformação sol-gel acontece em condições de pH básico, as partículas são relativamente maiores (10-100 nm), ao passo que, sob condições de pH ácido, as partículas são menores (< 10 nm). Aerogéis contendo 0, 2.5, 5, 10 e 15% em massa de quitosana foram sintetizados em forma de filmes através da mistura com TEOS. O método de análise através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) permitiu a obtenção de resultados que comprovaram que a introdução de quitosana foi positiva na obtenção de um aerogel com estrutura de poros mais abertos e trouxe nova luz sobre a disposição das partículas de sílica nos aerogéis formados, demonstrando a existência de uma unidade estrutural secundária composta por aglomerados de correntes de partículas de sílica. No começo do processo sol-gel, as partículas de sílica de pequenas dimensões são formadas devido às condições ácidas do processamento. Em seguida estas partículas agregam-se para formar os aglomerados. Quando a quitosana está presente na solução, ela pode interagir com as partículas de sílica através de uma variedade de interações, incluindo as ligações Si-O-C e ligações de hidrogênio, que, por sua vez, mantém as partículas de sílica relativamente próximas umas das outras, facilitando a formação dos aglomerados. Desta forma, as partículas de quitosana serviriam como conexão entre as partículas de sílica (unidade primária) e os aglomerados de partículas (unidade secundária) (Hu *et al.*, 2001).

Membranas híbridas permeáveis de quitosana e TEOS, sensíveis a variações de pH, foram produzidas para serem utilizadas em sistemas de liberação de drogas e nos processos de separação de proteínas. Nas membranas produzidas, o TEOS foi hidrolisado e condensado para formar uma rede interpenetrável, enquanto a quitosana incorporada à membrana forneceu sensibilidade às variações de pH. A quitosana é indicada para tal composição pois é carregada positivamente, expandindo-se em condições ácidas e contraíndo-se em soluções básicas, devido à ionização dos grupos aminos. Desta forma, pode ser utilizada no controle da passagem de um soluto de acordo com o ajuste das condições ambientais, pois o comportamento desta membrana será dependente destas condições (Fig. 3.5a e b) (Park *et al.*, 2001).

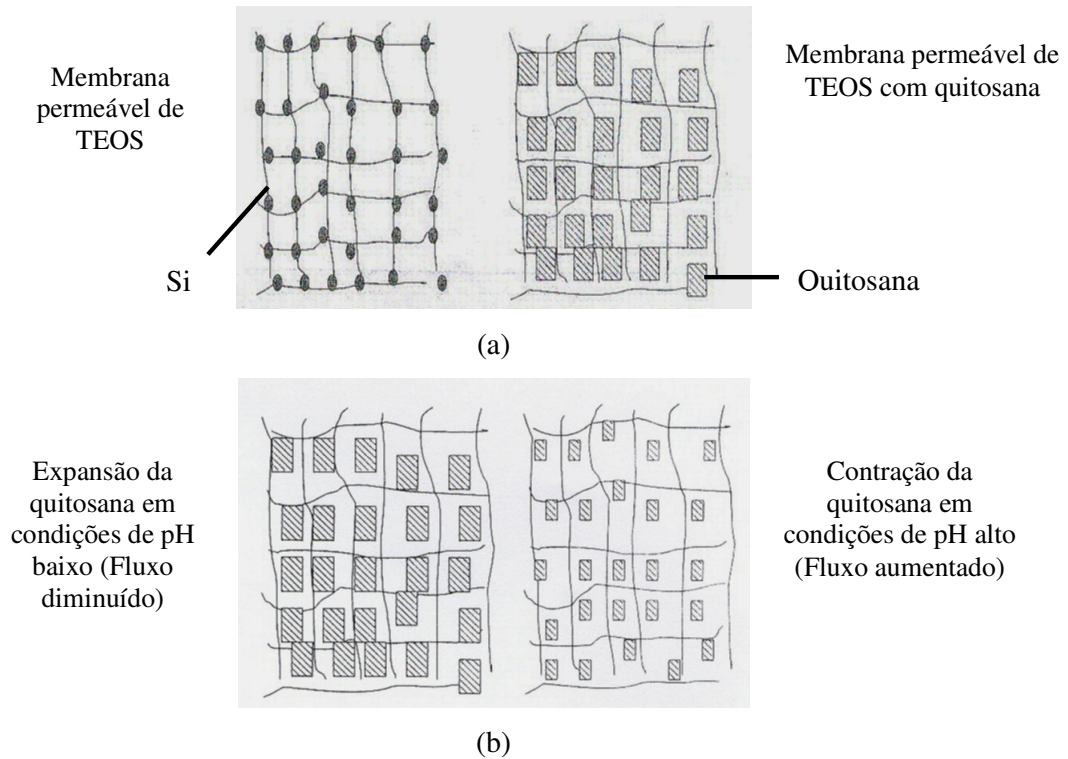


Figura 3.5 (a) Representação esquemática das membranas sintetizadas a partir do TEOS com e sem a presença de quitosana; (b) Comportamento das membranas de TEOS/Quitosana frente às variações de pH (Adaptado de Park *et al.*, 2001).

Híbridos ternários organo-inorgânicos à base de sílica e dos polímeros quitosana e polimonometil itaconato (PMMI) foram sintetizados na forma de filmes através do processo sol-gel, para se avaliar a compatibilidade dos componentes utilizados e o comportamento em relação à capacidade de inchamento. A adição do PMMI justificou-se pelo fato que este polímero pode melhorar as propriedades mecânicas do material, pela criação de novas interações químicas. Os resultados do estudo mostraram que, embora o PMMI e a sílica não formem um híbrido organo-inorgânico, a interação favorável existente entre a quitosana e sílica, através da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amido residuais e os grupos silanol da sílica, favorece a compatibilidade entre o PMMI e a sílica, gerando dispersão em nível molecular. Desta forma, a quitosana agiria como um agente de ligação entre o PMMI e a sílica, e também teria uma forte interação com PMMI, através de ligações dos seus grupos aminos com os grupos carboxilas do PMMI (Martinez *et al.*, 2004).

A união da hidroxiapatita com a quitosana mostrou também ser promissora. As vantagens de tal associação incluem, dentre outras coisas, a melhora do potencial osteogênico promovido pela hidroxiapatita bioativa e também a manutenção da integridade do material produzido pelo efeito ligante que a matriz polimérica possui, impedindo dispersão da hidroxiapatita pelo local de implantação. Outra alternativa promissora é a utilização da quitosana com fosfato de cálcio para a produção de cimentos de preenchimento utilizados em cirurgias para reparação de defeitos ósseos. Neste caso, a quitosana poderia ser usada como um aditivo do cimento, com o objetivo de melhorar o tempo de trabalho de tal material, a sua injetabilidade e moldabilidade, além funcionar como agente ligante para os compostos inorgânicos, minimizando a sua desintegração no meio aquoso (Muzzarelli & Muzzarelli, 2002).

Processamento sol-gel

Por possibilitar a produção de cerâmicas de alta pureza em temperaturas bastante inferiores às utilizadas nos processos convencionais, o processo sol-gel viabilizou a incorporação de uma fase orgânica no material cerâmico com baixo risco de degradação térmica e com extrema integração entre os constituintes, o que poderia significar a existência de ligações químicas primárias ou secundárias específicas entre os mesmos (Costa, 2001). A possibilidade de se produzir vidros a partir de uma solução homogênea à temperatura ambiente traz como principais benefícios um maior controle da sua composição, inclusive com a possibilidade de incorporação de reagentes e modificadores que, de outra maneira, não poderiam ser incorporados devido às altas temperaturas de processamento utilizadas em outros métodos (Hench, 1997; Wonorahardjo, Hook & Moran, 1998). Um outro fator favorável deste processo é a possibilidade de produção de matrizes de vidros bioativos com adequada bioatividade, além de permitir a formação de íons residuais hidroxilas, que são importantes grupos funcionais. Portanto, embora o processo sol-gel originalmente tenha sido destinado à produção de cerâmicas e vidros homogêneos, esta técnica de processamento tem provado ser versátil o bastante para permitir a incorporação de reagentes orgânicos e polímeros, possibilitando a produção de híbridos organo-inorgânicos (Park *et al.*, 2001; Balamurugan *et al.*, 2006).

Como se sabe, características estruturais bem definidas são algumas das exigências que devem ser atendidas quando matrizes para crescimento ósseo são confeccionadas. Uma alta

porosidade (70 a 90%) com alta área superficial, bem como tamanhos de poros maiores que 150 μm , contribuem para permitir migração, adesão e proliferação celulares no interior das matrizes. Uma forma de se obter uma estrutura com essas características é produzir espumas durante o processamento sol-gel, através da incorporação de um gás no interior do material cerâmico juntamente com agitação mecânica, formando bolhas na solução antes da formação do gel (Coelho *et al.*, 2003). A adição de um surfactante estabiliza as bolhas formadas na fase líquida, antes da geleificação do sistema, através da redução da tensão superficial existente na interface gás-líquido. Um surfactante é uma macromolécula composta de duas partes, uma hidrofóbica e outra hidrofílica. Desta forma, os surfactantes tendem a adsorver sobre a interface gás-líquido com a parte hidrofóbica sendo expelida do solvente e a parte hidrofílica permanecendo em contato com o líquido. Este comportamento proporciona a formação de bolhas termodinamicamente estáveis que, de outra maneira, se colapsariam na ausência de um agente surfactante (Ortega *et al.*, 2001). As espumas formadas são permanentemente estabilizadas quando ocorre a polimerização ou geleificação do sistema. Desta forma, o gel formado apresentará no seu interior espaços vazios correspondentes às espumas estabilizadas que constituirão os poros do biovidro após as demais etapas do processamento (Coelho, 2003; Pereira, Jones & Hensch, 2005). Desta forma, o volume de espuma produzido por este método está diretamente relacionado ao tamanho de poros e porosidade final do material. Os fatores que influenciam o volume de espuma do material são: concentração do surfactante, tempo de agitação, composição da mistura e temperatura de manipulação.

O processo sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois se trata de qualquer rota de síntese de materiais onde, num determinado momento, ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O sol é constituído de uma suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 1000nm) em um líquido e o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou por cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios (Alfaya & Kubota, 2002; Mamede & Prado, 2005). Desta forma, os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias que só podem ocorrer através da alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão (Figura 3.6). Por outro lado, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização, onde a geleificação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares. O processo sol-gel pode ser dividido em duas classes, dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: a dos sais (cloretos, nitratos,

sulfetos, etc.) e a dos alcóxidos, a mais versátil e utilizada atualmente (Alfaya & Kubota, 2002).

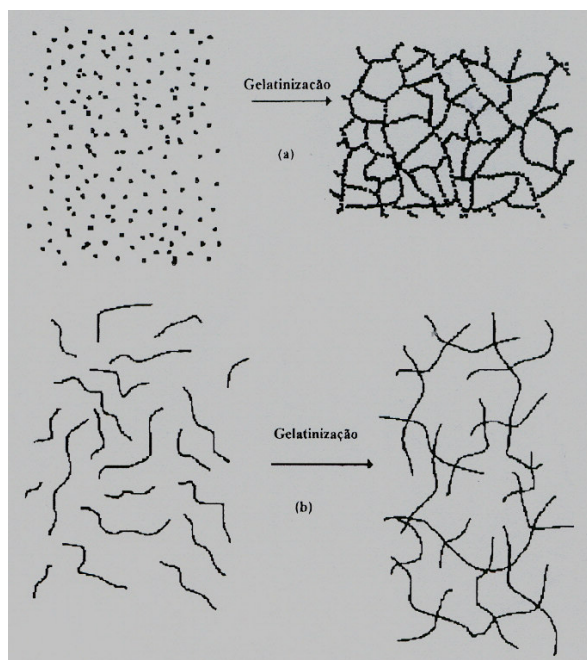


Figura 3.6 Esquema de transição sol-gel: a) formação de gel particulado e b) formação de gel polimérico (Adaptado de Alfaya & Kubota, 2002).

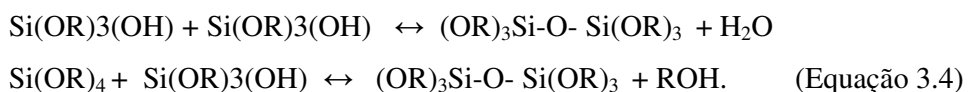
Dentre os compostos alcóxidos utilizados para a preparação de materiais via sol-gel, destacam-se os dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio, largamente utilizados. Os alcóxidos de silício são os mais comuns, pois são os utilizados na síntese da sílica. O processo sol-gel via alcóxido é uma técnica de síntese relativamente simples usada para o preparo de vidros e cerâmicas de alta pureza, a temperaturas bastante reduzidas e com grande flexibilidade na preparação de sistemas com composição e formas variadas (Airoldi & Farias, 2004). O processo consiste na preparação de um sol a partir da reação de um alcóxido metálico com água. Em seguida, o sol transforma-se em gel que é transformado em sólido após a eliminação do solvente. Um alcóxido metálico é um composto metalorgânico, ou seja, possui grupos orgânicos ligados a um metal ou semimetal por intermédio de átomos de oxigênio, sendo representado por uma fórmula molecular do tipo $M(OR)_4$, onde: M é um metal ou semi-metal; O é o oxigênio; e R é o grupo alquil ou orgânico.

Os alcóxidos metálicos à base de silício mais utilizados na preparação de biovidros são o TEOS (tetraetilortossilicato ou tetraetóxido de silício) - $Si(OC_2H_5)_4$, e o TMOS (tetrametil

ortossilicato ou tetrametóxido de silício) - $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$. A reação do alcóxido com a água, chamada de hidrólise, resulta na formação de um álcool (ROH) e um grupo silanol ($\equiv \text{Si-OH}$), conforme ilustra a fórmula a seguir:



Na próxima etapa do processamento ocorrerá a reação entre as duas moléculas de silanol parcial ou totalmente hidrolisadas, chamada de condensação, formando uma ligação entre elas com liberação de água ou álcool, conforme mostram, respectivamente, as reações:

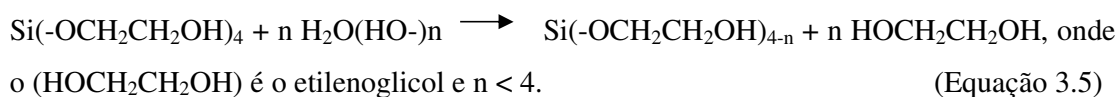


A formação dos grupos siloxanos (Si-O-Si) vai conduzir à formação da sílica amorfa. Nesta rota, o precursor alcóxido passa pela seqüência de oligômero, polímero, colóide, sol e termina finalmente no sólido (Airoidi & Farias, 2004). A rota de formação destes polissilicatos depende, fundamentalmente, dos parâmetros de síntese, cuja variação pode levar à formação de estruturas bastante diferentes. A obtenção da sílica pelo processo sol-gel via alcóxidos de silício envolve parâmetros como concentrações de reagentes, presença de catalisadores, temperaturas de reação, tipos de interações secundárias, etc. São parâmetros que, por determinarem a cinética e até mesmo o mecanismo das reações, influenciam diretamente as características finais do produto (Costa, 2001; Mamede & Prado, 2005). Deve-se ainda destacar que no caso de alcóxidos do tipo $\text{Si}(\text{OR})_n$, o tamanho da cadeia (determinada pela natureza do radical R) é de fundamental importância para a cinética do processo de hidrólise do alcóxido. Neste caso, quanto maior a cadeia, mais lento é o processo de hidrólise, o que, por sua vez, influenciará as propriedades do material produzido, como porosidade e tamanho de grão (Airoidi & Farias, 2004). Por outro lado, visto que a hidrólise e a condensação são reações químicas, as taxas relativas destas reações são funções de diversos parâmetros como o pH, a temperatura, a natureza e a concentração do precursor organo-metálico e a concentração de água. Por exemplo, a hidrólise inicial progride mais rapidamente em condições de pH ácido enquanto a condensação é mais acelerada em pH alcalino. Preparações com baixos valores de pH e baixos teores de água produzem materiais densos com tamanhos de poros pequenos, enquanto preparações com valores altos de pH e altos teores de água produzem materiais mais porosos. Os aspectos mais importantes do processo sol-gel são a formação de uma solução homogênea antes da polimerização (policondensação) e o fato do processamento ocorrer em temperaturas mais baixas do que em métodos convencionais. Conseqüentemente, não só a melhoria da

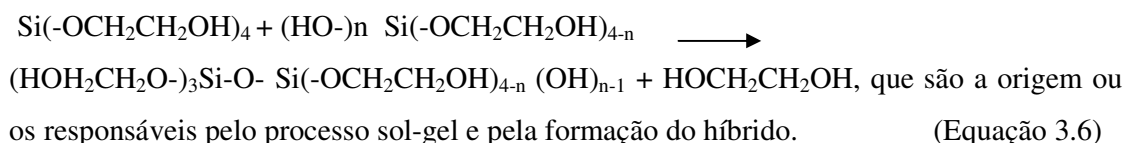
homogeneidade química poderá ser conseguida, como também o adequado controle da composição final do produto (Coelho, 2003).

Mudanças estruturais em amostras de vidro bioativo à base de sílica (100S) sintetizadas pelo método sol-gel e utilizando diferentes razões molares de R (H₂O/TEOS) foram evidentes também ao FTIR. No processo sol-gel, a hidrólise acontece quando o TEOS e água são misturados e a condensação ocorre quando dois grupos silanol ou um grupo silanol e um grupo hidroxila reagem formando ligações Si-O-Si, com eliminação de molécula de água ou etanol. Em meios com pH baixos, a sílica tende a formar moléculas lineares que podem se interligar eventualmente e formar ligações cruzadas. No processo sol-gel a quantidade de água influencia fortemente a estrutura do material final. Variando-se a proporção H₂O/TEOS é possível produzirmos modificações estruturais na rede de sílica formada sem modificações significantes na sua estequiometria. Em um estudo, diferentes valores de R (3,33; 5; 7,5 e 11,66) utilizados no preparo de vidros promoveram modificações no espectro das sílicas especialmente evidentes na região do estiramento Si-O-Si, embora mostrando basicamente as mesmas bandas de absorção. As bandas referentes aos valores de R=11,66 foram semelhantes às de valor de R=7,5 e mostraram picos mais acentuados que dos outros materiais (Martínez *et al.*, 1998).

A utilização de um novo precursor da sílica para o processo sol-gel foi avaliada na produção de híbridos à base de sílica e de biopolímeros à base de polissacarídeos como a quitosana. O THEOS (tetrahidroxietil ortossilicato) é um precursor sintetizado a partir do TEOS e considerado como reagente ideal para ser utilizado com biopolímeros devido à alta compatibilidade com estes materiais e à sua alta solubilidade em água, quando comparado aos outros precursores comumente empregados, o TEOS e o TMOS. O THEOS poderia ser hidrolisado segundo a seguinte reação (Shchipunov *et al.*, 2005):



Os grupos silanol formados (Si-OH) nas moléculas hidrolisadas são as responsáveis pelas reações de condensação:



A utilização do THEOS poderia induzir a geleificação de biopolímeros em baixas concentrações (1-10%) e dispensar o uso de catalisadores para a reação, já que os polissacarídeos poderiam exercer tal função. A separação de fases não foi observada após a mistura dos reagentes, e as soluções geleificadas mostraram-se homogêneas.

Os precursores TEOS e TMOS não podem ser considerados suficientemente compatíveis com os biopolímeros. Isto poderia ser causado pela introdução de um ácido ou álcool para catalisar o processo e o uso de um solvente orgânico, usualmente um álcool, para proporcionar a solubilidade do TEOS e TMOS, o que poderia afetar a solubilidade dos polissacarídeos, precipitando-os muitas vezes (Shchipunov *et al.*, 2005). O processo sol-gel utilizado para sintetizar os aerogéis de quitosana/sílica difere dos aerogéis de sílica obtidos de forma convencional, nos quais o sol é primariamente aquoso. A bem conhecida insolubilidade do TEOS com água é superada quando o monômero torna-se parcialmente hidrolisado e uma fase mais límpida e homogênea é formada. Neste caso, a solução ácida que é necessária para solubilizar a quitosana auxilia nesta homogeneização, pois o meio ácido favorece a hidrólise do TEOS. Entretanto, para se alcançar um gel com razoável tempo de mistura, outros ácidos são necessários. A sílica mostra longos tempos de mistura até alcançar a geleificação com todos os ácidos, exceto o HF (ácido fluorídrico). Quando a quantidade de HF para dissolver a quitosana é suficiente, a reação pode ser mais rápida, mas há uma grande dificuldade em se obter uma solução mais homogênea. Em um estudo (Ayers & Hunt, 2001), a proporção de HCl/HF utilizada e que possibilitou a obtenção de uma solução homogênea com tempo adequado de geleificação foi a de 3:1.

De uma maneira geral, as etapas do processo sol-gel para a produção de vidros podem ser divididas da seguinte maneira:

1. Dissolução e mistura dos precursores
2. Moldagem
3. Transição sol-gel ou gelação
4. Envelhecimento
5. Secagem
6. Estabilização
7. Transição gel-sólido ou sinterização.

1. Dissolução e mistura de precursores

Como dito anteriormente, os reagentes mais utilizados são os alcóxidos metálicos, especialmente aqueles à base de silício, o TEOS e o TMOS. A reação com a água (hidrólise) resultará na formação de grupos silanol e álcool, formando um sol com baixa viscosidade.

2. Moldagem

O sol é um líquido de baixa viscosidade e pode ser vertido em moldes de formas variadas. Desta maneira, a forma do gel e do biomaterial produzido poderá ser determinado pela forma do molde de vazão. Inúmeras formas poderão ser obtidas, o que aumenta muito a aplicabilidade do biomaterial na engenharia de tecidos ósseo, visto que defeitos ósseos podem apresentar diversas configurações.

3. Transição sol-gel ou geleificação

Após a dimerização, ocorre a incorporação sucessiva de novas moléculas, chamadas de policondensação resultando num crescimento do composto, sempre no sentido de maximizar o número de ligações Si-O-Si e minimizar o número de grupos hidroxilas terminais. As reações de hidrólise e condensação ocorrem via substituição nucleofílica no átomo de silício. Como os alcóxidos de silício possuem baixa reatividade, catalisadores ácidos (H_3O^+), básicos (OH) ou nucleofílicos (N-metilimidazol, HMPA) são adicionados ao processo para promoverem um aumento das reações de hidrólise e condensação (Alfaya & Kubota, 2002). Durante a transição sol-gel, a viscosidade da solução gradualmente aumenta à medida que o sol torna-se uma rede tridimensional interconectada rígida e porosa, que se denomina gel. O tamanho e o grau de ramificação do polímero inorgânico e a extensão das ligações cruzadas exercem uma forte influência sobre a porosidade do gel, sobre a área superficial e sobre o volume, distribuição e tamanho dos poros. De uma forma geral, se o gel contém cadeias poliméricas com ramificações significativas e ligações cruzadas, o gel apresentará grandes regiões de vazios, sendo estruturalmente rígido com a presença de macroporos e mesoporos. Se o gel contém cadeias poliméricas com poucas ramificações e ligações cruzadas, o gel apresentará pequenas regiões de vazios e microporos. As taxas relativas das reações de hidrólise e condensação determinam a extensão da ramificação do polímero inorgânico. Se a hidrólise é lenta em relação à condensação, são formadas cadeias poliméricas longas, altamente ramificadas e com ligações cruzadas, sendo o material resultante macroporoso (Coelho, 2003).

Experimentalmente, o aparecimento do gel está associado a uma drástica mudança nas propriedades viscoelásticas do sistema. O sol se torna um gel quando este pode suportar uma tensão do tipo elástica. Abaixo do ponto de geleificação, na fase sol, o sistema é uma solução de ramificações de polímeros com uma viscosidade finita que possui fluidez; acima do ponto de geleificação, o sistema apresenta um módulo de cisalhamento e não flui. Cabe aqui salientar que, no mecanismo sol-gel, apenas a primeira etapa, a hidrólise, é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminarem, tornando o mecanismo muito complexo (Alfaya & Kubota, 2002).

4. Envelhecimento

Após a geleificação do sistema, as reações de condensação e de hidrólise continuam a ocorrer, porém em taxas muito menores devido às baixas mobilidades das espécies envolvidas. Com o objetivo de finalizar mais rapidamente as reações, a temperatura do sistema é aumentada, podendo variar de 25 a 80°C, processo conhecido como envelhecimento. À medida que as reações se processam, há uma tendência de contração da estrutura e conseqüente expulsão do solvente dos poros do gel, fenômeno conhecido como sinérese. Durante o envelhecimento, ocorre uma melhora significativa das propriedades mecânicas do material que é imprescindível para a manutenção da integridade do mesmo durante as demais etapas do processamento.

5. Secagem

Um gel está seco quando o solvente adsorvido é eliminado completamente dos poros. Para tal, o aquecimento deve ser realizado a taxas controladas em temperaturas de 120 a 180°C no caso dos vidros. Durante a etapa de secagem, a evaporação do solvente de dentro dos poros pode levar à formação de gradientes de pressão capilar, gerando contração diferencial e conseqüentes danos ao material. O uso racional de co-solventes e uma proporção de água adequada durante a síntese do gel podem diminuir os riscos de fratura do material durante a secagem. O gel resultante é um sólido viscoelástico que é progressivamente transformado em um sólido poroso ou xerogel.

Os principais parâmetros de controle para uma secagem adequada visando a integridade do material são a temperatura e o tempo. As taxas de aquecimento e resfriamento devem ser baixas o suficiente a fim de se evitar choques térmicos. A taxa de secagem deve ser baixa o suficiente para permitir a difusão do líquido do interior dos poros até a superfície do

material sem a ocorrência de formação de regiões prematuramente secas, o que poderia levar a contrações diferenciadas e trincas no material. A presença de vários líquidos diferentes como a água não-reagida, o álcool proveniente da reação e co-solventes sugerem como melhor opção a secagem em etapas com diferentes temperaturas que possibilitem um menor risco de fratura do material (Costa, 2001).

6. Estabilização

Para os géis preparados a partir de alcóxidos metálicos com taxas de hidrólise e condensação relativamente baixas, um número considerável de grupos hidroxilas podem permanecer no gel após a secagem. A estabilização química do gel seco é necessária para controlar a estabilidade ambiental do material. Faixas de temperatura relevantes no tratamento térmico da estabilização são:

- (a) 100-200°C, desorção de água fisicamente adsorvida nas paredes dos microporos (secam mais lentamente que os macro e mesoporos);
- (b) 300-500°C, decomposição de compostos orgânicos;
- (c) 400-500°C, colapso de poros pequenos;

7. Transição do gel para vidro ou sinterização

A conversão do gel poroso seco para vidro denso pode ser conseguida com tratamentos a temperaturas elevadas, mas ainda menores que as utilizadas na fusão convencional. Aquecendo-se o gel a temperaturas cada vez mais elevadas (700-900°C) produz-se a densificação generalizada da estrutura. O principal processo envolvido na densificação é a sinterização onde os poros do gel seco são diminuídos e até eliminados.

Em relação aos materiais híbridos, a ligação entre a fase orgânica e a rede inorgânica pode ocorrer pela formação de uma ligação primária estável entre o carbono e um metal ou semi-metal ligado à rede. Geralmente, os elementos da mesma família do carbono como o silício, o estanho e o chumbo formam ligações covalentes estáveis com este. Outros constituintes de importantes óxidos cerâmicos como o alumínio, o titânio e o zircônio, cujas ligações com o carbono são mais polares e, portanto, instáveis à hidrólise nas condições do processo sol-gel, necessitam de outros meios de acoplamento com a fração orgânica. A ligação do tipo Si-O-C entre a fase orgânica e inorgânica (rede de sílica) pode ser instável à hidrólise nas condições do processo sol-gel. Por isso, os materiais híbridos em cujo projeto exista a possibilidade de formação de ligações primárias entre os componentes orgânicos e

inorgânicos somente por intermédio do oxigênio, podem assemelhar-se mais aos híbridos sem agentes de ligação primária. As características particulares da ligação carbono-silício e o conhecimento do processamento da sílica via sol-gel, aliadas às suas inúmeras aplicações, têm favorecido o desenvolvimento de materiais híbridos à base de sílica.

Estrutura de poros em matrizes teciduais

As propriedades biológicas de matrizes são influenciadas por características estruturais importantes como porosidade, tamanho de poros, área superficial e interconectividade. O transporte molecular em matrizes é dependente do crescimento vascular e difusão. Nos locais de implantação, a vascularização consiste no principal meio de transporte, enquanto que na cultura *in vitro* a difusão é a estratégia principal. O transporte molecular deveria incluir a troca de oxigênio, nutrientes e restos metabólicos. Quando o transporte molecular é dificultado devido à pobre difusão, o conjunto matriz-célula exibe um crescimento celular periférico enquanto que o interior da matriz sofre necrose. O transporte de nutrição para o interior de matrizes é um dos maiores desafios da engenharia de tecidos e transplantes celulares em grande escala não são realizados no presente momento devido à dificuldade deste transporte. Este é um dos motivos pelos quais as células cartilaginosas, que possuem uma baixa atividade metabólica, têm sido dos poucos tipos celulares a alcançarem sucesso com esta tecnologia.

Portanto, para possibilitar a sobrevivência celular, a rede de poros deve ser otimizada. Alta porosidade, alta razão área superficial/volume e a interconectividade entre os poros de uma matriz são necessários para uma melhor distribuição celular e crescimento tecidual. Uma matriz altamente porosa pode não possuir poros interconectados, o que pode prejudicar a eficiência da difusão celular. A permeabilidade, que é o tamanho da interconectividade entre poros, constitui outra característica importante e determina a facilidade com que os fluidos penetram na rede de poros. Entretanto, matrizes altamente porosas podem exibir baixas propriedades mecânicas que podem comprometer a sua utilização em locais de alta solicitação mecânica (Ho & Hutmacher, 2006). Apesar disso, a existência de poros com dimensões adequadas no interior de uma matriz pode favorecer o crescimento de tecido através dela, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido neoformado e haja um aumento conseqüente da resistência do material *in vivo* (Kawachi *et al.*, 2000).

Como visto anteriormente, o osso é uma estrutura composta de cristais de hidroxiapatita depositados no interior de uma matriz orgânica composta essencialmente de colágeno tipo I. Morfologicamente, o osso trabecular é composto por estruturas com porosidade de 50 a 90% e tamanho de poros da ordem de 1mm de diâmetro. O osso cortical, mais denso, possui 3 a 12% de porosidade (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Estruturas porosas como o osso trabecular podem ser reproduzidas em matrizes. Uma diferença entre eles, entretanto, é que a matriz produzida via sol-gel possui poros mais esféricos com forma e tamanho homogêneos, ao passo que no osso trabecular os poros são mais irregulares na forma e tamanho. As matrizes possuem poros esféricos porque elas são obtidas a partir da produção de bolhas em uma solução que possui em sua composição um agente surfactante que reduz a tensão superficial e estabiliza as bolhas antes da geleificação. A conectividade acontece quando as bolhas esféricas entram em contato umas com as outras antes da geleificação e ficam separadas apenas por uma fina camada de sol. Após a geleificação e processos térmicos, o filme drena e uma contração ocorre, levando à interconectividade (Jones *et al.*, 2007).

Dependendo da aplicação desejada, o tamanho dos poros deve ser cuidadosamente controlado. O efeito do tamanho dos poros do biomaterial é mostrado em experimentos que demonstram um tamanho de poro ideal de 5 μ m para permitir revascularização, 5 a 15 μ m para crescimento de fibroblastos, aproximadamente 20 μ m para crescimento de hepatócitos, 20 a 125 μ m para regeneração de tecido epitelial, 40 a 100 μ m para crescimento de osteócitos (Whang, Joseph & Bonfield, 1998). O tamanho mínimo de poros necessário para possibilitar o crescimento de tecido ósseo mineralizado é 100 μ m. Grandes poros (100 a 200 μ m) permitem crescimento ósseo substancial, ao passo que poros menores (75 a 100 μ m) permitem crescimento de tecido não mineralizado (Karageorgiou & Kaplan, 2005). A interconectividade entre poros deve situar-se em 100 μ m de diâmetro para permitir a angiogênese (Atwood *et al.*, 2004). Na literatura, é postulado que existe uma correlação entre o tamanho de poros de uma matriz e o crescimento de tecido ósseo no seu interior. Tamanhos de poros maiores que 300 μ m permitiram grande penetração de tecido mineralizado, ao passo que matrizes com poros menores que 75 μ m este crescimento não foi observado (Jones *et al.*, 2004). Apesar disso, matrizes porosas com diferentes tamanhos de poros (50, 75, 100 e 125 μ m) foram testadas em defeitos ósseos de ratos e permitiram crescimento de tecido ósseo mineralizado, sugerindo que 100 μ m pode não ser o tamanho crítico para crescimento ósseo (Itala *et al.*, 2001).

Várias técnicas podem ser usadas para se avaliar as características estruturais das matrizes. As mais comumente utilizadas são o método de Arquimedes, a microscopia eletrônica de varredura, a porosimetria de mercúrio, a adsorção de nitrogênio e a microtomografia computadorizada.

O método de Arquimedes baseia-se no princípio de que um sólido com certo volume V , quando mergulhado num fluido, recebe uma reação do fluido igual ao peso de igual volume de fluido. Nesta técnica, são medidas a massa da amostra da matriz seca (M seca), a massa da amostra saturada com líquido (M saturada) e a massa da amostra submersa no líquido (M submersa) (Ho & Hutmacher, 2006). Utilizam-se as seguintes equações para o cálculo da porosidade aparente (poros abertos), isto é, aquela que representa o volume dos poros que foram acessíveis ao fluido utilizado no teste, e a porosidade total, que representa o volume de poros abertos e fechados no material:

$$\text{Porosidade}_{\text{aparente}}(\%) = (M \text{ sat} - M \text{ se}) / (M \text{ sat} - M \text{ sub}) \times 100 \quad (\text{Equação 3.7});$$

$$\text{Porosidade}_{\text{total}}(\%) = (\rho \text{ ver} - \rho \text{ vol} / \rho \text{ ver}) \times 100 \quad (\text{Equação 3.8}),$$

onde $\rho \text{ ver}$ é a densidade verdadeira e $\rho \text{ vol}$ é a densidade volumétrica do material.

A densidade volumétrica do material pode ser obtida através da seguinte equação:

$$P \text{ vol} = (M \text{ se} / M \text{ sat} - M \text{ sub}) \times \rho \quad (\text{Equação 3.9}),$$

onde ρ é densidade do fluido utilizado para o ensaio (Oliveira, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de análise que permite uma avaliação mais qualitativa do que quantitativa da porosidade, mas pode permitir uma mensuração estimada do tamanho de poros seccionados e da espessura da parede dos mesmos (Ho & Hutmacher, 2006). Através das imagens obtidas pelo MEV é possível visualizar detalhes limitados a imagens bidimensionais em campos de visão mais limitados (Gupta *et al.*, 2005). As imagens obtidas por MEV podem estar alteradas, pois são imagens de superfícies fraturadas, onde há uma compressão do material na área analisada durante a secção do mesmo dificultando a visualização dos poros e da sua interconectividade (Jones *et al.*, 2007). Outras desvantagens constituem a falta de capacidade de se avaliar a interconectividade e a permeabilidade das amostras (Ho & Hutmacher, 2006):

A porosimetria de intrusão de mercúrio é um método usado para medir porosidade e tamanho de poros. As matrizes são colocadas em um penetrômetro e o mercúrio é injetado sob pressão crescente. Quando a pressão aumenta, o raio dos poros que podem ser

preenchidos diminui. A porosidade aberta, que é a porosidade acessível à intrusão de mercúrio, é dada como a relação entre o volume total de intrusão de mercúrio pelo volume da matriz. A porosidade fechada é dada pela subtração da porosidade total pela porosidade aberta. As pressões exercidas pelos porosímetros variam de 0,5 a 60000psi. (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Quando a pressão do mercúrio aumenta, os poros maiores são preenchidos primeiramente. O tamanho de poros e a distribuição de volume dos poros são calculados quando a pressão de mercúrio aumenta. Em pressões maiores o mercúrio entra nos poros menores e quando ela atinge o máximo, o volume total de poros abertos e a porosidade do material são calculados. Os poros fechados são negligenciados neste método, pois o mercúrio não intrui nos mesmos. Esta técnica também não traz informações sobre interconectividade, espessura de paredes de poros da matriz e anisotropia. Poros variando de 0,0018 a 400µm podem ser medidos. Em matrizes muito frágeis, a pressão exercida pelo mercúrio pode comprimir e colapsar a amostra levando a resultados imprecisos. Além disso, a ação tóxica do mercúrio exige um ambiente apropriado (Ho & Hutmacher, 2006).

A adsorção de nitrogênio é uma técnica na qual moléculas de gás são atraídas para a superfície dos poros formando uma monocamada de moléculas. A formação da monocamada permite o cálculo da área superficial. À medida que o processo continua, múltiplas camadas de moléculas são adsorvidas e o tamanho de poros pode ser calculado. O volume total de poros pode ser calculado quando os poros são completamente preenchidos com as moléculas. Apesar de ser uma técnica útil na determinação de nanoporos na faixa de 0,3 a 300nm, não é eficaz na análise de matrizes com pequena área superficial e não mede interconectividade, anisotropia, permeabilidade e poros fechados. Além disso, para a realização da análise é necessário que as amostras sejam resfriadas a baixíssimas temperaturas (-196°C) que podem causar danos às mesmas (Ho & Hutmacher, 2006).

Para a avaliação das matrizes teciduais *in vivo* e *in vitro* é imperativo conhecer exatamente a estrutura de poros das mesmas antes e após a implantação, por isso uma técnica não destrutiva é necessária (Jones *et al.*, 2007). A microtomografia computadorizada é uma técnica com capacidade de fornecer informações precisas qualitativamente e quantitativamente sobre a morfologia tridimensional das matrizes. Através da microtomografia computadorizada cada poro do material pode ser separado de seus vizinhos e calculado separadamente. As outras técnicas de avaliação como a porosimetria de mercúrio fornecem um resultado geral do material que integra a influência de todas as

características do material em um valor simplificado (Atwood *et al.*, 2004). O interior da amostra pode ser estudado em detalhes sem necessidade de seccionamento da mesma, permanecendo intactas. Dentro da imagem digitalizada, o volume da matriz e a área superficial por volume podem ser estudadas. A imagem 3D permite a visualização de qualquer região da matriz, inclusive a da forma dos poros e das paredes dos mesmos com suas medidas correspondentes. É possível obter informações sobre a anisotropia, morfologia de poros e interconectividade entre eles, inclusive de poros isolados (Ho & Hutmacher, 2006). Uma grande vantagem desta técnica é que ela permite avaliar o crescimento tecidual para dentro dos poros, pois é um método não destrutivo; mede ainda as mudanças de conformação da matriz à medida que o tecido é formado e a matriz é reabsorvida, ou seja, é capaz de permitir a avaliação da cinética de degradação da matriz (Gupta *et al.*, 2005; Lenthe *et al.*, 2007). Os métodos tradicionais para avaliação da osseointegração de matrizes conjugadas com células são baseados em técnicas radiográficas e histológicas bidimensionais. A microtomografia computadorizada fornece informações tridimensionais das mesmas. É uma técnica que tem sido muito utilizada para o estudo do osso esponjoso e da interface tecido hospedeiro e matriz ou implante (Jones *et al.*, 2004).

3.5 Cultura de células

A avaliação dos biomateriais produzidos em modelos biológicos é necessária para testar a efetividade dos mesmos em ambientes *in vitro* e *in vivo*. A cultura *in vitro* de dispositivos que envolvam substratos e células de forma tridimensional sob condições que permitam eficiente nutrição celular é um importante passo em direção ao desenvolvimento de enxertos funcionais para o tratamento de partes do corpo perdidos ou debilitados. A geração de tais tecidos não necessita somente do desenvolvimento de novos modelos biológicos, preferencialmente àqueles tradicionalmente estabelecidos para cultura de células em monocamadas, mas também propor novas técnicas que possibilitem o transporte de grandes quantidades de massa para o interior do substrato. A estrutura e função das células, tecidos e órgãos no corpo humano são determinados, em grande parte, por fatores ambientais. É provável que os mesmos fatores que afetam a manutenção, a remodelação e o desenvolvimento tecidual *in vivo*, sejam também importantes durante a cultura de comunidades celulares *in vitro*. Os fatores específicos necessários para a cultura celular são fortemente dependentes do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento deste (Darling & Athanasiou, 2003).

A cultura de células para engenharia de tecidos pode ser abordada de duas formas: (a) através do cultivo *in vitro* de células em um substrato para posterior implantação no organismo, ou (b) através da implantação *in vivo* diretamente a partir de células isoladas e biomateriais. A obtenção de uma comunidade celular organizada *in vitro* que exiba características estruturais e funcionais de um determinado tecido natural deve ser o objetivo da engenharia de tecidos quando da utilização do primeiro tipo de abordagem. Além de servir como equivalente tecidual para situações de implantação clínica, a comunidade celular organizada pode ser utilizada como um modelo para avaliações *in vitro* de funções teciduais fisiológicas ou patológicas, bem como para o estudo de diferenciação celular e formação tecidual sob condições bem controladas, como na presença de estímulos bioquímicos e mecânicos. Muitos fatores e parâmetros estão relacionados à forma de cultura para a obtenção de uma comunidade celular organizada: (1) origem das células (cartilagem articular, medula óssea, músculo cardíaco, etc.); (2) idade do doador das células (embrião, neonato ou adulto); (3) material do substrato (polímero, biocerâmica, híbrido, naturais ou sintéticos); (4) método de cultivo celular (estático ou dinâmico); (5) tempo de cultura *in vitro* (uma semana a sete meses, etc.); e (6) métodos utilizados para avaliar o tecido resultante (histológico, bioquímico, molecular, funcional, etc.) (Freed & Vunjak-Novakovic, 1998).

A semeadura celular, que é a disseminação de células isoladas no interior do substrato, é o primeiro passo no estabelecimento de uma cultura tridimensional, e desempenha um papel crucial na determinação da progressão da formação tecidual. A distribuição das células no interior do substrato de maneira uniforme pode estabelecer a base de uma formação tecidual também uniforme (Holy *et al.*, 2000; Anselme, 2000). Um problema comum encontrado quando usamos substratos na engenharia de tecidos é a rápida formação de tecido no lado externo do mesmo, ao contrário da formação de tecido no centro, que se torna necrótico devido às limitações de penetração celular e aporte de nutrientes e metabólitos (Silva *et al.*, 2006). Mudanças na macroarquitetura de tais substratos como, por exemplo, a incorporação de canais alinhados no interior dos mesmos para facilitar a difusão celular e de nutrientes para o centro, têm sido sugeridas e alcançado algum sucesso. Entretanto, á medida em que o número e o diâmetro de tais canais aumentam, a resistência do material decresce, o que muitas vezes inviabiliza a utilização deste recurso (Rose *et al.*, 2004).

Nas condições naturais, as células do tecido ósseo são distribuídas no interior de uma matriz extracelular composta de colágenos, proteoglicanas e de uma complexa mistura de fosfoproteínas e outros materiais inorgânicos. Para a regeneração desses tecidos, uma distribuição uniforme das células por toda a área a ser reparada é sempre desejável. Desta forma, apesar da semeadura de células sobre a superfície do substrato ser mais facilmente obtida *in vitro*, a preparação de um substrato tridimensional com colonização de células por todo o seu volume deve ser sempre o objetivo quando se realiza este procedimento. A utilização de um substrato poroso, nem sempre é garantia de uma semeadura efetiva de células para o interior do substrato. Além de um tamanho de poro adequado, é necessário que uma interconectividade efetiva exista entre os poros internos. Caso a interconectividade não exista, durante a semeadura celular, poderá haver a formação de uma camada multilaminar de células sobre a superfície do substrato, com penetração mínima de células para os poros mais próximos da superfície, resultando em má distribuição das mesmas pelo seu interior (Fig. 3.7) (Sittinger, Hutmacher & Risbud, 2004).

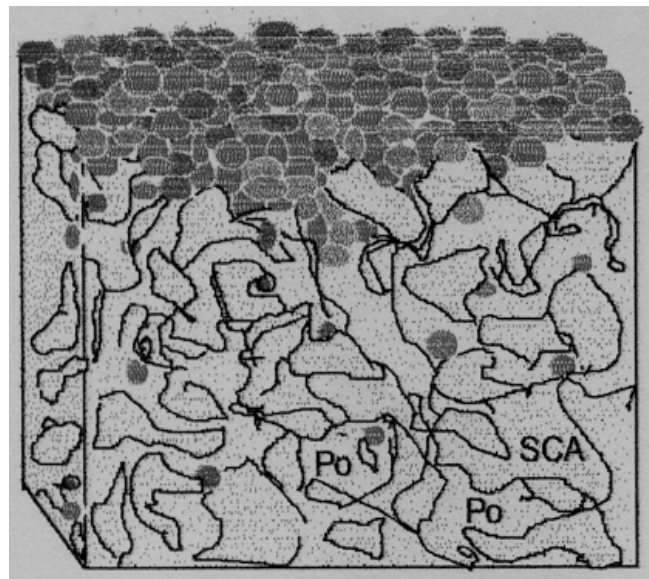


Figura 3.7 Representação esquemática de má distribuição de células ao longo de um substrato poroso (Fonte: Sittinger, Hutmacher & Risbud, 2004).

Para qualquer método baseado em cultura de células autógenas em engenharia de tecidos, a fonte e a origem das mesmas representam um fator crítico no sucesso deste procedimento. Na maioria dos casos, as células já diferenciadas disponibilizadas nos tecidos adultos exibem uma capacidade de proliferação mais limitada. Isso faz com que estas células tenham uma indicação mais restrita no uso em reconstruções de tecidos em pacientes. As

células indiferenciadas (células-tronco/progenitoras), por sua vez, possuem uma capacidade proliferativa muito maior. A diferenciação destas células pode ser obtida *in vitro* através do monitoramento das condições de cultura após a expansão das mesmas, ou *in vivo* como consequência do ambiente fisiológico na área transplantada. As células-tronco são células que podem ser obtidas do embrião, feto ou de adultos que, sob certas condições, podem se reproduzir por longos períodos e originarem células especializadas de tecidos do organismo (Caplan & Bruder, 1997; Cancedda *et al.*, 2003) (Fig.3.8).

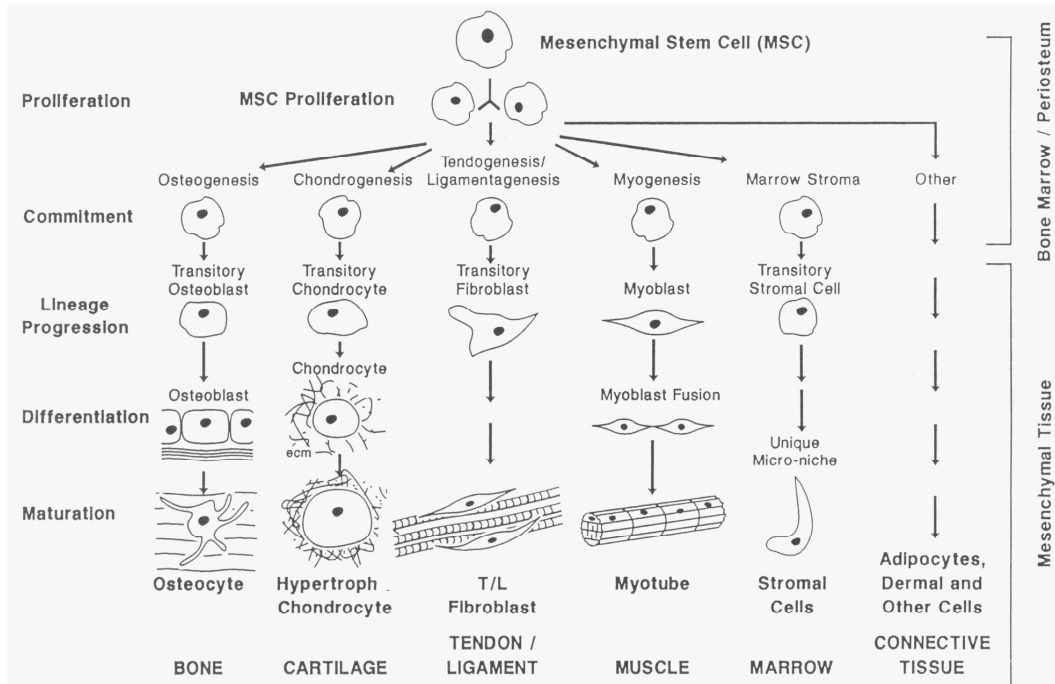


Figura 3.8 O processo mesengênico. As MSC (células-tronco mesenquimais) têm potencial para se diferenciar em uma variedade de tecidos. (Fonte: Caplan & Bruder, 1997)

As células-tronco embrionárias (ESC) são células pluripotentes derivadas do interior da massa celular de blastocistos antes da implantação, possuindo um grande potencial de proliferação e diferenciação em qualquer tipo de célula madura. As células-tronco fetais (FSC) podem ser isoladas de uma ampla gama de órgãos em desenvolvimento e possuem, também, grande potencial para proliferação e diferenciação. Entretanto, o uso de tais células tem sofrido duras críticas da sociedade por questões éticas, o que tem incentivado o uso de células-tronco adultas (Olivier, Fauchoux & Hardouin, 2004).

Uma célula-tronco adulta é uma célula indiferenciada (não-especializada) mesenquimal e pluripotente (MSCs) com capacidade para se diferenciar em condrócitos (células cartilaginosas), osteócitos (células ósseas) e mioblastos (células musculares) de acordo com condições de cultura e fatores de crescimento utilizados. Essas células estão presentes em diversos tecidos mesenquimais de adultos, como no líquido sinovial, na medula óssea, no tecido adiposo e nos músculos (Jorgensen, Gordeladze & Noel, 2004). As células-tronco adultas originadas da medula óssea (BMSCs) são as mais frequentemente utilizadas e as responsáveis pela manutenção do *turnover* (remodelação) do tecido ósseo ao longo da vida. Como se sabe, ao contrário das células cartilaginosas, o tecido ósseo é remodelado durante toda a vida, resultante do balanceamento entre as atividades de duas diferentes populações de células, os osteoclastos e os osteoblastos, responsáveis pela reabsorção e formação ósseas, respectivamente. As células BMSCs podem ser cultivadas e estimuladas para se diferenciarem em osso, cartilagem, tendão músculos e uma variedade de tecidos conectivos. Logicamente, as propriedades destas células são influenciadas fortemente pelas condições ambientais. As condições de cultura celular de forma a permitirem uma adequada expansão de células sem perda do poder de diferenciação são difíceis de se estabelecer e constituem um dos grandes desafios a serem vencidos na engenharia de tecidos (Cancedda *et al.*, 2003).

A cultura celular convencional envolve o crescimento de células em um ambiente artificial aonde elas podem se desenvolver e replicar para formar grandes colônias de células para as diversas aplicações em engenharia de tecidos. Essas colônias, entretanto, não se tornam organizadas em tecidos ou órgãos que possam ser implantados no organismo. As colônias de células necessitam de sinais ou estímulos para o crescimento de forma tridimensional, pois no corpo humano as células também são constantemente bombardeadas com estímulos mecânicos, elétricos e químicos que sinalizam a sua sobrevivência e função. Se esses sinais não são apropriadamente recebidos e assimilados pelas células, a morte das mesmas poderá ocorrer. No meio biológico, as células continuamente trocam informações com a matriz extracelular (ECM), que é uma rede complexa, altamente hidratada e composta basicamente de glicoproteínas, fatores de crescimento e outros componentes que assumem o papel de substrato físico e incubadores bioquímicos para a função celular *in vivo*. A matriz extracelular proporciona um ambiente tridimensional para as células constituírem os diversos tipos de tecidos. Os fatores de crescimento no osso possuem um papel regulatório na função de células ósseas, incluindo principalmente o padrão de migração celular,

morfogênese de um tipo celular para outro, mitogênese e proliferação celulares (Nagahata *et al.*, 2005).

As trocas de informações com a ECM podem influenciar fortemente a morfologia celular, a estrutura e formação de complexos de adesão que podem promover o crescimento ou a morte celular. A interface adesiva da célula com a ECM ocorre através de receptores presentes na superfície celular, especialmente as integrinas, uma família de proteínas que se unem a proteínas presentes na ECM como as fibronectinas, vitronectinas, lamininas e colágenos. É necessário, portanto, que o substrato utilizado em engenharia de tecidos funcione o mais próximo possível como a ECM, possuindo esses elementos, de modo a facilitar a adsorção celular e estimular o seu crescimento. As integrinas são receptores presentes na parede celular e formam uma “ponte” entre as proteínas de adesão e o citoesqueleto celular, formando uma ancoragem efetiva entre as células e o biomaterial ou a matriz extracelular (Zajackowski *et al.*, 2003; Dhiman, Ray & Panda, 2004).

Os maiores componentes estruturais da ECM são proteínas glicosadas alongadas e hidrofílicas que podem ser conformadas na forma de um hidrogel. Desta forma, materiais poliméricos naturais e artificiais à base de hidrogéis têm sido estudados extensamente no campo da engenharia de tecidos. Um grande problema enfrentado pelos hidrogéis (e por todos os outros biomateriais de uma maneira geral) é que, apesar de possuírem propriedades estruturais semelhantes ou parecidas com as da ECM, eles não promovem o reconhecimento da seqüência dos peptídeos necessários para a promoção de adesão celular via receptores de superfície como as integrinas, já que as proteínas só podem ser adsorvidas espontaneamente a superfícies hidrofóbicas, ao contrário das superfícies hidrofílicas apresentadas pelos hidrogéis. É necessário, portanto, que no processo de semente celular, proteínas da ECM e seqüências de peptídeos sejam unidas através de ligações primárias aos hidrogéis (Nuttelman, Henry & Anseth, 2002; Zajackowski *et al.*, 2003).

A dinâmica do metabolismo ósseo, um processo de contínua remodelação ao longo da vida dos vertebrados, reside primariamente na ação de 3 tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos sintetizam e regulam a deposição da matriz extracelular do osso. Sistemicamente e localmente ativam hormônios, fatores de crescimento e íons. Fatores de crescimento da família beta, particularmente o TGF- β , e proteínas morfogenéticas (BMPs) são importantes na homeostasia do tecido ósseo. Estes

fatores modulam a proliferação e a diferenciação de osteoblastos. Os osteócitos originam-se da mesma família dos osteoblastos. O microambiente da matriz óssea orgânica-inorgânica necessita de osteoblastos especializados. Os osteócitos são formados pela incorporação de osteoblastos no interior da matriz extracelular, constituindo-se de células altamente diferenciadas com atividade de fosfatase alcalina, receptores e sensores para estímulos mecânicos. A rede de osteócitos proporciona organização celular no tecido ósseo e regula a resposta deste diante de uma solitação mecânica, através do aumento ou redução da aposição óssea. Os osteoclastos são células multinucleares originadas de células hematopoiéticas que estão envolvidas na reabsorção óssea (Meyer, Joos & Wiesmann, 2004).

Um estudo *in vivo* avaliou o potencial de vidros bioativos à base de $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ e $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$ processados via sol-gel em regenerar defeitos ósseos no fêmur de coelhos. Após o 4º mês de implantação, o estudo radiográfico mostrou imagens sugestivas de boa estabilidade do implante e remodelação em volta e sobre o defeito ósseo. O estudo macroscópico realizado após o sacrifício dos animais mostrou cicatrização dos defeitos ósseos, com a formação de um tecido ósseo fortemente integrado e cobrindo os implantes constituídos pelos dois materiais utilizados. O grupo controle, constituído pelos defeitos ósseos que não receberam qualquer implantação, mostrou algum grau de cicatrização e neoformação de osso, porém significativamente menor quando comparado aos outros grupos estudados (Gil-Albarova *et al.*, 2004).

A capacidade de induzir a diferenciação osteogênica de 3 diferentes vidros bioativos (45S Bioglass®, 58S e 77S) foi estudada quando os materiais foram cultivados *in vitro* com células precursoras osteogênicas extraídas da medula óssea de ratos, com capacidade de diferenciação em osteoblastos e osteoclastos. A diferenciação das células mesenquimais da medula óssea em células como osteoblastos foi marcadamente observado com os vidros bioativos 45S e 77S, ao passo que o vidro bioativo 58S mostrou-se inerte em relação a este estímulo. O efeito do 45S Bioglass® sobre a diferenciação em células osteoblásticas pode ser proporcionada pela alcalinização do meio de cultura, provavelmente causada pela liberação de Na^+ ou pela rápida liberação de silício solúvel para o meio, que é conhecido por facilitar e estimular a atividade osteoblástica e a síntese de colágenos. O comportamento diferenciado dos vidros 58S e 77S no que diz respeito à diferenciação osteoblástica deve-se às diferenças nas suas composições químicas e estruturais. Neste aspecto, o vidro 77S

possui um conteúdo maior de SiO_2 , o que poderia levar a uma maior liberação de silício para o meio de cultura, e uma área superficial de poros maior, o que facilitaria o ataque e a diferenciação celular (Bosetti & Cannas, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As sínteses dos híbridos de quitosana e sílica foram realizadas através do uso dos seguintes reagentes:

- a) TEOS (tetraetilortossilicato): $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (98%) e $\rho=0,93\text{g/ml}$ (*Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI*): precursor da sílica (SiO_2);
- b) Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): precursor do CaO ;
- c) Solução aquosa de HCl (ácido clorídrico) a 1M : catalisador da hidrólise;
- d) Solução aquosa de HF (ácido fluorídrico) a 10% (v/v): catalisador da geleificação;
- e) Solução aquosa de ácido acético (CH_3COOH) a 2%: solvente para quitosana;
- f) LESS - lauril éter sulfato de sódio $-\text{[CH}_3(\text{CH}_2)_{10}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+]$ - (*Sulfal, Ind. Quim.®, Minas Gerais, Brasil*): surfactante aniônico;
- g) RENEX® – nonifenol etoxilado – $[\text{C}_9\text{H}_{19}(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n]$, onde n é o grau de etoxilação - (*Oxitenol®, São Paulo, Brasil*): surfactante não-iônico;
- h) Teepol® (Shell Chemical Company, UK): detergente contendo uma mistura de surfactantes aniônicos;
- i) Quitosana Herbarium (*Herbarium®, Paraná, Brasil*);
- j) Quitosana com alto peso molecular Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI*): grau de desacetilação (GD) 75% e viscosidade de 800 a 2000 cps;
- k) Quitosana com médio peso molecular Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI*): grau de desacetilação (GD) 75-85% e viscosidade maior que 200 cps;
- l) Glicerol, agente plastificante;
- m) Solução aquosa a 0,5M de hidróxido de amônia (NH_4OH): solução neutralizadora;
- n) Óleo mineral farmacêutico ($\rho=0,84\text{g/cm}^3$ a 20°C);
- o) Solução PBS (“*phosphate-buffered saline*”, pH= 7,4).

4.2 Síntese dos híbridos de quitosana / sílica (H100S) e sílica-cálcia (H70S)

O processo sol-gel via alcóxido foi o método de escolha para a síntese dos híbridos (Fig. 4.1). A solução precursora, doravante denominada solução sol-gel, foi preparada a partir da reação do alcóxido metálico de silício, o TEOS, com a água deionizada e o HCl (1M), catalisador da hidrólise, sendo a mistura realizada por 1 hora. Esta solução foi utilizada para a síntese de híbridos 100S, com a fase vítrea composta exclusivamente por SiO₂. Para os híbridos 70S, que continham uma fase inorgânica binária (70%SiO₂/30%CaO), o cloreto de cálcio foi adicionado à solução sol-gel e a mistura mantida em agitação por mais 30 minutos. A razão molar água/TEOS (R) utilizada neste trabalho foi igual a 12 e a quantidade de HCl foi calculada pela equação $V_{HCl} = 1/6V_{H_2O}$, que se mostraram satisfatórias para a obtenção da hidrólise do TEOS e a formação de volumes adequados de espumas de vidro bioativo e de espumas híbridas de sílica e PVA (polivinilálcool) em outros estudos na literatura (Pereira *et al.*, 2004; Coelho & Pereira, 2004; Pereira, Jones & Hench, 2005).

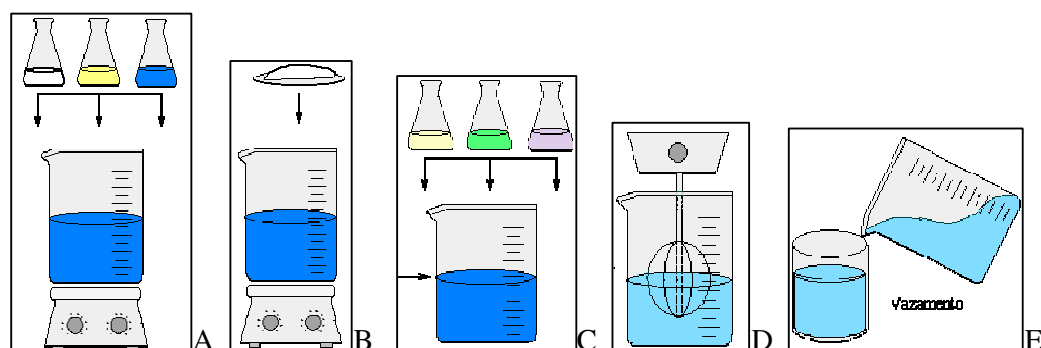


Figura 4.1 Síntese via sol-gel de híbridos de sílica/sílica-cálcia e quitosana.
A) Hidrólise (TEOS, água e HCl); B) Adição de CaCl₂.2H₂O (somente para híbridos 70S);
C) Adição de solução de quitosana + Surfactante + HF; D) Agitação mecânica;
E) Vazamento da espuma em moldes cilíndricos de polietileno.

Foram produzidas soluções de quitosanas Herbarium e Aldrich numa concentração de 2% em solução aquosa de ácido acético a 2% utilizando-se agitação mecânica durante 24 horas. Após filtração a vácuo através do sistema Millipore, especialmente para a quitosana Herbarium, que continha maior número de partículas insolúveis, as soluções de quitosana foram adicionadas à solução sol-gel e misturadas vigorosamente durante 20 minutos até a homogeneização do sistema em temperatura ambiente. Híbridos com 10, 20 e 30% de

quitosana em peso foram produzidos através da adição de solução aquosa de ácido fluorídrico a 10% para catalisar o processo de geleificação. A quantidade de HF utilizada foi baseada no estudo do comportamento apresentado pelos híbridos em relação ao tempo de geleificação. A quantidade de HF foi dependente do tipo de híbrido sintetizado. À mistura adicionou-se o agente surfactante LESS que, sob agitação mecânica vigorosa, proporcionou a formação das espumas. Em algumas sínteses foi também utilizado o surfactante Renex para efeito comparativo. Momentos antes da geleificação do material, as espumas foram vertidas sobre recipientes cilíndricos de polietileno onde ocorreu a geleificação. Amostras não-porosas foram sintetizadas da mesma forma, com exceção da adição do agente surfactante e da realização de agitação mecânica para formar as espumas. Nesta síntese, a mistura foi realizada com a adição de HF e o material vertido dentro dos moldes, onde a geleificação ocorreu. Um agente plastificante, o glicerol (Molinari *et al.*, 2002; Tanabe, Okitsu & Yamauchi, 2004; Choi *et al.*, 2006), foi adicionado à solução de quitosana Aldrich nas proporções de 10, 20 e 30% por volume para a síntese de híbridos não-porosos com 20% de quitosana em peso. As amostras foram submetidas ao ensaio de compressão com o objetivo de se avaliar o efeito da adição do plastificante nas propriedades mecânicas dos híbridos. As amostras sintetizadas neste trabalho podem ser visualizadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Híbridos sintetizados à base de sílica 100S e sílica-cálcia 70S com as quitosanas Herbarium e Aldrich nas formas porosas (P) e não-porosas (NP).

Amostras	Forma	Sigla
Vidro bioativo com 100% de sílica	P / NP	Vidro 100S
Vidro bioativo com 70% de sílica e 30% de CaO	P / NP	Vidro 70S
Híbrido com 100% de sílica e 10% de quitosana Herbarium (w/w)	P / NP	H10 Herbarium
Híbrido com 100% de sílica e 20% de quitosana Herbarium (w/w)	P / NP	H20 Herbarium
Híbrido com 100% de sílica e 30% de quitosana Herbarium (w/w)	P / NP	H30 Herbarium
Híbrido com 100% de sílica e 20% de quitosana Aldrich (w/w) com 10% de glicerol (v/v)	NP	H20 Aldrich 10G
Híbrido com 100% de sílica e 20% de quitosana Aldrich (w/w) com 20% de glicerol (v/v)	NP	H20 Aldrich 20G
Híbrido com 100% de sílica e 20% de quitosana Aldrich (w/w) com 30% de glicerol (v/v)	NP	H20 Aldrich 30G
Híbrido com 100% de sílica e 20% de quitosana Aldrich de alto peso molecular (w/w)	P / NP	H20 Aldrich APM
Híbrido 100% de sílica e 10% de quitosana Aldrich de médio peso molecular	P / NP	H10 Aldrich
Híbrido 100% de sílica e 20% de quitosana Aldrich de médio peso molecular	P / NP	H20 Aldrich
Híbrido 100% de sílica e 30% de quitosana Aldrich de médio peso molecular	P / NP	H30 Aldrich
Híbrido 70% de sílica e 30% de CaO e 10% de quitosana Aldrich de médio peso molecular	P	H10 Aldrich 70S
Híbrido 70% de sílica e 30% de CaO e 20% de quitosana Aldrich de médio peso molecular	P / NP	H20 Aldrich 70S

A quantidade de surfactante utilizada na síntese dos híbridos foi determinada pela avaliação do volume de espuma inicialmente formada e pela estabilidade da mesma ao longo do tempo. Para esta avaliação, utilizou-se o surfactante aniônico LESS, o detergente Teepol® e o surfactante não-iônico Renex®, os quais foram adicionados a uma mistura de solução sol-gel e solução de quitosana para a síntese de um híbrido H20. Foram utilizadas alíquotas padronizadas de 15ml das soluções, as quais foram adicionadas quantidades variáveis de surfactantes (0,1 a 3ml), conforme tabelas 4.2 e 4.3. O tempo de agitação mecânica foi padronizado em 2 minutos e as espumas vertidas em provetas de 100ml.

Tabela 4.2 Soluções usadas na espumação da solução sol-gel

Surfactante	Solução	V surfactante (ml)
LESS	L1	0,5
	L2	1
	L3	2
	L4	3
Teepol®	T1	0,5
	T2	1
	T3	2
	T4	3
Renex®	R1	0,5
	R2	1
	R3	2
	R4	3

Tabela 4.3 Soluções usadas na espumação da solução sol-gel e solução de quitosana H2O

Surfactante	Solução	V surfactante (ml)
LESS	L1Q	0,1
	L2Q	0,3
	L3Q	0,5
	L4Q	0,7
	L5Q	1
	L6Q	1,5
Teepol®	T1Q	0,1
	T2Q	0,3
	T3Q	0,5
	T4Q	0,7
	T5Q	1
	T6Q	1,5
Renex®	R1Q	0,1
	R2Q	0,3
	R3Q	0,5
	R4Q	0,7
	R5Q	1

4.3 Envelhecimento e secagem dos híbridos

Após 24 horas da síntese, as amostras obtidas foram envelhecidas em uma estufa devidamente calibrada a uma temperatura de 50⁰C e mantidas com as tampas dos recipientes fechados por 48 horas. A etapa de secagem foi testada através do monitoramento da perda de peso das amostras ao longo do tempo, bem como da integridade estrutural das mesmas, utilizando-se quatro métodos:

- secagem em estufa convencional a 50⁰C;
- secagem em dessecador, utilizando baixo vácuo;
- secagem em dessecador, utilizando alto vácuo;
- liofilização utilizando alto vácuo com pré-secagem em estufa a 50⁰C por 48 horas.

Após a avaliação dos métodos de secagem, optou-se por realizar o envelhecimento das amostras em estufa devidamente calibrada a 50°C por 48 horas, deixando as tampas dos recipientes completamente vedadas. Já a secagem foi realizada da mesma maneira, mas deixando as tampas dos recipientes parcialmente abertas. As amostras foram consideradas secas quando não apresentavam variação significativa de peso entre uma pesagem e outra.

4.4 Neutralização dos híbridos

Uma etapa de neutralização foi realizada através da imersão dos híbridos em uma solução de NH₄OH (hidróxido de amônia) numa concentração de 0,5M. A relação quantidade de solução neutralizadora/peso da amostra foi de 7,5mLg⁻¹, valor estimado com base na acidez inicial da amostra e na concentração da solução neutralizadora. O protocolo de neutralização foi avaliado em amostras H2O Herbarium 100S da seguinte forma:

- a) 4 banhos de 1 hora cada em água deionizada (grupo controle);
- b) 3 banhos de 1 hora cada em solução aquosa de NH₄OH 0,5M;
- c) 2 banhos de 1 hora e 1 banho de 1 hora e meia em solução aquosa de NH₄OH 0,5M;
- d) 4 banhos de 1 hora cada em solução aquosa de NH₄OH 0,5M.

Entre um banho e outro, as amostras foram secas com papel absorvente e a solução neutralizadora trocada. O tempo necessário de imersão foi controlado através do monitoramento do pH da solução de imersão. As amostras foram consideradas neutralizadas quando, após a remoção da solução neutralizadora, secagem em temperatura ambiente com papel absorvente durante 30 minutos e imersão em água deionizada por 30 minutos, o pH medido situava-se entre 6,5 e 7,5.

O efeito do procedimento de neutralização foi avaliado através da espectroscopia de infravermelho (FTIR), perda de peso, propriedades mecânicas (ensaio de compressão) e da análise térmica TGA. Após a neutralização, uma secagem adicional foi realizada em estufa a 50°C, para que os materiais pudessem ser caracterizados.

As etapas para a síntese dos híbridos podem ser resumidas e visualizadas no fluxograma a seguir (Fig. 4.2).

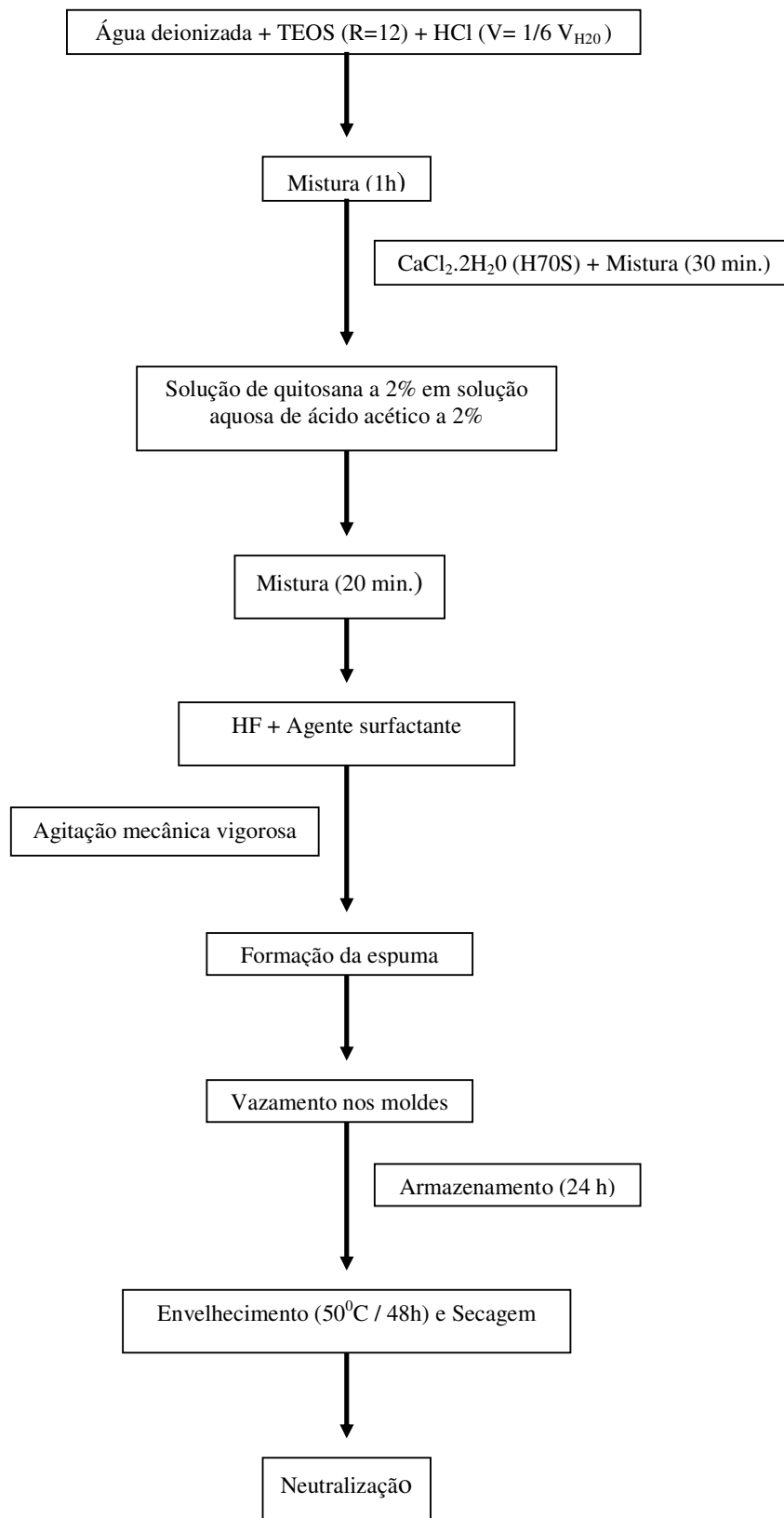


Figura 4.2. Fluxograma de atividades para a síntese dos híbridos de sílica e sílica-cálcia com quitosana através do processo sol-gel.

4.5 Caracterização dos híbridos

A estrutura de poros dos híbridos sintetizados foi analisada utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e balança de Arquimedes. A composição de fases e a constituição dos híbridos foram analisadas através de difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A avaliação das propriedades mecânicas foi feita por ensaios de compressão e as análises térmicas através da análise termogravimétrica (TGA) e da análise térmica diferencial (DTA).

Amostras de cada grupo dos híbridos sintetizados foram analisadas por MEV para avaliação qualitativa da presença e faixa de tamanho de poros nos mesmos. A técnica de escolha para o trabalho foi a de difração de elétrons retroespalhados utilizando-se ouro ou carbono como recobrimento (equipamento Jeol, modelo JSM 6330).

A técnica da Balança de Arquimedes foi utilizada para a avaliação quantitativa da porosidade dos híbridos H10, H20 e H30 sintetizados com a quitosana Herbarium. Para cada uma das composições, 5 amostras foram utilizadas para o teste, cada uma delas medida 6 vezes. Foram realizadas medidas da massa seca (M_{seca}), massa saturada ($M_{saturada}$), massa submersa ($M_{submersa}$), densidade volumétrica ($\rho_{volumétrica}$) e da densidade verdadeira ($\rho_{verdadeira}$) das amostras. A densidade verdadeira para cada uma das amostras foi obtida pelo método de Picnometria do Gás Hélio. Na técnica de Arquimedes o fluido utilizado foi um óleo mineral farmacêutico com densidade igual a $0,84\text{g/cm}^3$ (ρ), segundo o fabricante. Desta maneira, calculou-se a porosidade aparente ($P_{aparente}$) e a porosidade total (P_{total}) dos híbridos, através das seguintes equações:

$$\rho_{volumétrica} = (M_{seca} / M_{saturada} - M_{submersa}) \times \rho \quad (\text{Equação 4.1})$$

$$P_{aparente} (\%) = (M_{saturada} - M_{seca} / M_{saturada} - M_{submersa}) \times 100 \quad (\text{Equação 4.2})$$

$$P_{total} (\%) = (\rho_{verdadeira} - \rho_{volumétrica} / \rho_{verdadeira}) \times 100 \quad (\text{Equação 4.3}).$$

A avaliação da cristalinidade foi feita por meio de DRX (Philips, PW1770) em amostras de todos os grupos de híbridos, além das quitosanas Aldrich e Herbarium *in natura*, fornecidas na forma de pó pelo fabricante. As amostras de híbridos foram completamente secas e moídas até a formação de um pó fino.

A espectroscopia de infravermelho foi conduzida utilizando-se um equipamento Spectrum 1000, Perkin-Elmer e análise de *pellets* confeccionados a partir do material híbrido na forma de pó e KBr, ambos com pesos padronizados e semelhantes para todas as amostras. Este procedimento permitiu uma comparação mais precisa entre os híbridos produzidos com a mesma matéria-prima, mas em proporções diferentes. Além dos híbridos, para efeito comparativo, as quitosanas utilizadas neste estudo também foram analisadas por FTIR.

Os ensaios mecânicos foram realizados em corpos de prova cilíndricos resultantes da forma dos recipientes de polietileno utilizados como moldes para vazamento. As amostras com dimensões de aproximadamente 10mm de diâmetro por 17mm de altura foram submetidas à compressão utilizando-se o método compressão uniaxial em uma máquina de ensaio universal Emic DL 3000, utilizando-se uma célula de carga de 200N e uma velocidade de carga de 0,5mm/min. O ensaio de compressão foi interrompido quando se detectava uma deformação de 50% após a ocorrência da tensão máxima à fratura do material. Além da compressão dos híbridos porosos, amostras densas (não-porosas) foram submetidas ao ensaio como forma de se avaliar com mais exatidão o comportamento mecânico do material dependente da sua composição. Foram utilizadas 5 amostras de híbridos para cada grupo de análise, originando as respectivas curvas de tensão x deformação. Os valores de tensão máxima à fratura e de deformação à tensão máxima foram obtidos e os valores médios utilizados para um estudo comparativo.

Análises térmicas através do TGA e DTA foram realizadas em amostras H10, H20 e H30 da quitosana Aldrich para se avaliar a composição em peso dos híbridos sintetizados. Amostras de quitosana Aldrich *in natura* e de vidro 100S também foram analisadas para efeito comparativo. Foram utilizados equipamentos da marca Shimadzu com taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio até uma temperatura máxima de 1100°C.

4.6 Teste de biodegradação *in vitro*

A degradação *in vitro* dos híbridos foi realizada através da imersão dos mesmos em PBS (pH = 7.4) a uma temperatura de 37°C, conforme utilizado em outros estudos na literatura (Tomihata & Ikada, 1996; Boccaccini & Maquet, 2003; Wang *et al.*, 2003; Martin, Salinas & Regi, 2005; Freier *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Hsieh, Chang & Lin, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Amostras de híbridos H20 Herbarium obtidas na mesma síntese

foram utilizadas em triplicata e submetidas à degradação em tempos que variaram de 24 horas a 30 dias de imersão.

A proporção peso da amostra/volume da solução de PBS utilizada foi de $0,002\text{g}/\text{m}^3$ (Andrade *et al.*, 2006). A solução de PBS foi renovada a cada 7 dias de imersão e as amostras removidas do meio foram irrigadas com água destilada e submetidas à secagem em estufa a 50°C . A perda de massa foi medida para cada uma das amostras considerando-se a pesagem inicial das mesmas antes do ensaio, sendo o percentual médio de perda de massa para cada grupo calculado.

4.7 Teste de citotoxicidade

Antes da utilização da quitosana Herbarium para a síntese dos híbridos deste estudo, um teste preliminar de citotoxicidade foi realizado através do ensaio MTT (“*Mosmann Toxicity Test*”), utilizando-se o pó de quitosana proveniente do interior das cápsulas disponíveis na sua formulação comercial, na sua forma *in natura*, e também solubilizado em solução aquosa de ácido acético a 0,1M numa concentração de 1%. As células foram semeadas em placas de cultura contendo 24 poços (“*well*”) de 25 ml e mantidas para crescimento em um ambiente contendo 5% de CO_2 e 95% de umidade a uma temperatura de 37°C . Procedeu-se ao plaqueamento das células nos nichos em uma quantidade de $1,7 \times 10^4$ células por poço (utilização de células Sho de ovários de camundongos), aguardando a adesão das mesmas no fundo do poço. Em seguida, as amostras previamente imersas em meio de cultura foram colocadas sobre a monocamada de células depositada nos poços, seguido pela adição de MTT (5 mg/ml). As placas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C e 5% CO_2 , seguido pela colocação de dimetilformanamida 50%-SDS-23% e homogeneização. A medida de densidade ótica foi realizada a 595nm. Três grupos foram analisados:

Grupo 1 (controle): meio de cultura + células;

Grupo 2: meio de cultura + células + solução de quitosana;

Grupo 3: meio de cultura + células + quitosana *in natura*.

Os testes de citotoxicidade foram conduzidos *in vitro* nos híbridos H10 e H30 após esterilização dos mesmos com raios gama. Foram avaliadas a viabilidade celular de osteoblastos, através do ensaio MTT, e a produção de fosfatase alcalina e colágeno pelas células. O protocolo para a realização dos ensaios foi baseado em estudos já realizados na

literatura (Valério *et al.*, 2004; Agathopoulos *et al.*, 2005; Valério *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

Osteoblastos de cultura primária foram isolados da calvária de ratos neonatos Wistar com 1 a 5 dias. Após aplicação letal de lidocaína intra-abdominal, promoveu-se uma incisão coronal que expôs as calvárias, que foram dissecadas, cortadas e lavadas em uma solução de PBS tamponado sem cálcio e magnésio. Os fragmentos da calvária foram incubados em 1% tripsina-EDTA durante 5 minutos e submetidos a 4 banhos em 2% de colagenase a 37⁰C durante 20 minutos cada, com o objetivo de aumentar a desorção dos fibroblastos aderidos e facilitar a liberação dos osteoblastos. A centrifugação das soluções produziram uma suspensão de células com grande proporção de osteoblastos. A centrifugação a 1000rpm por 5 minutos proporcionou a obtenção do “*pellet*”, concentrado celular depositado no fundo do tubo. A parte líquida foi desprezada e somente o “*pellet*” foi utilizado no experimento, sendo adicionado meio de cultura celular (RPMI) com adição de antimicótico e antibiótico (1%) e suplementado com 10% de SBF (soro fetal bovino).

Seguindo o protocolo do ensaio MTT anterior, as células osteoblásticas foram semeadas em placas de cultura contendo 24 poços (“*well*”) de 25 ml e mantidas para crescimento em um ambiente contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade a uma temperatura de 37⁰C. Procedeu-se ao plaqueamento das células nos nichos em uma quantidade de 5x10⁴ células por poço, aguardando a adesão das mesmas no fundo do poço. Em seguida, as amostras previamente imersas em meio de cultura foram colocadas sobre a monocamada de células depositada nos poços. O meio foi trocado em intervalos de 48 horas através de aspiração e colocação de novo meio. Após 96 horas de incubação de cada amostra, a viabilidade dos osteoblastos foi avaliada através do ensaio MTT. Este ensaio é baseado na capacidade de células viáveis em metabolizar o sal de tetrazólium para a formação de cristais de formazan arroxeados, que são solúveis e passíveis de medição através de densidade ótica. Portanto, esta redução só acontece quando as mitocôndrias estão ativas e a conversão (absorbância) está diretamente relacionada ao número de células vivas.

O sobrenadante de cada poço foi removido até que somente 200µL do meio de cultura permanecesse no mesmo. Aproximadamente 60µL de MTT (5mg/mL) foi adicionado em cada poço. Após 2 horas, a morfologia celular foi analisada através do microscopia ótica invertida de fluorescência, sendo que os cristais de formazan foram solubilizados com

100µL de solução- tampão de SDS-HCl a 10%. Após 18 horas de incubação, a medida de densidade ótica foi realizada a 595nm. As análises foram feitas em triplicata em 3 ensaios independentes.

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT. Este ensaio (ALP) é baseado na reação cromatogênica iniciada através da clivagem do grupo fosfato do BCIP pela fosfatase alcalina presentes nas células. Esta reação libera um próton que reduz o NBT em um precipitado arroxeadado insolúvel (Valério *et al.*, 2005). A fosfatase alcalina é um marcador bioquímico do metabolismo ósseo, onde podemos definir substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação de osteoblastos, os marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea) medem produtos decorrentes da ação destas células.

Os sobrenadantes presentes nos poços de cultura foram rapidamente removidos e a camada de células foi lavada em PBS. Logo após, 200µL de solução de BCIP-NBT foi adicionada a cada poço. Após 2 horas de incubação as células foram observadas em microscópio ótico e os precipitados arroxeadados insolúveis foram solubilizados em 200µL de solução de 10% SDS-HCl e incubados por mais 18 horas. Da mesma forma que o teste anterior, a medida de densidade ótica foi realizada a 595nm e as análises foram feitas em triplicata em 3 ensaios independentes (Andrade *et al.*, 2006).

A produção de colágeno pelos osteoblastos foi avaliada pelo ensaio de SIRCOL no sobrenadante proveniente da cultura celular. Este método é baseado na propriedade de ligação seletiva do corante *syrius-red* à porção terminal [Gly-X-Y] tripeptídeo da molécula de colágeno de mamíferos. O colágeno solubilizado foi quantificado por análise de densidade ótica a 595nm. A quantidade de colágeno foi calculada baseada na regressão linear da medida de concentração de um padrão do colágeno tipo 1 previamente conhecido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste preliminar de citotoxicidade da quitosana Herbarium

Uma das quitosanas utilizadas neste trabalho foi a do fabricante *Herbarium® (Paraná, Brasil)*, disponibilizada na forma de cápsulas, cada uma contendo 0,35g de quitosana em pó e indicada, segundo o fabricante, como um medicamento natural para o combate aos altos níveis de colesterol. Antes dos procedimentos de solubilização, um teste de citotoxicidade preliminar foi realizado com o objetivo de observarmos a validade da utilização do produto para a fabricação de biomateriais, já que não se tem informações sobre ele documentadas na literatura. As quitosanas Aldrich (*Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI*), diferentemente, já foram utilizadas em outros estudos na literatura como biomateriais (Rege & Block, 1999; Khalid *et al.*, 2002; Rege, Garmise & Block, 2003; Larena & Cáceres, 2004; Liu, Su & Lai, 2004; Martinez *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Gupta & Jabrail, 2006).

O ensaio MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis em converter o substrato dimetiltiazol (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade do corante formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Caso a célula esteja morta, esse processo não ocorre (Mosmann, 1983). As fotografias obtidas pela microscopia ótica após o ensaio MTT e o estudo da viabilidade celular são apresentados a seguir para os 3 grupos estudados (Fig.5.1a, b, c e Fig. 5.2).

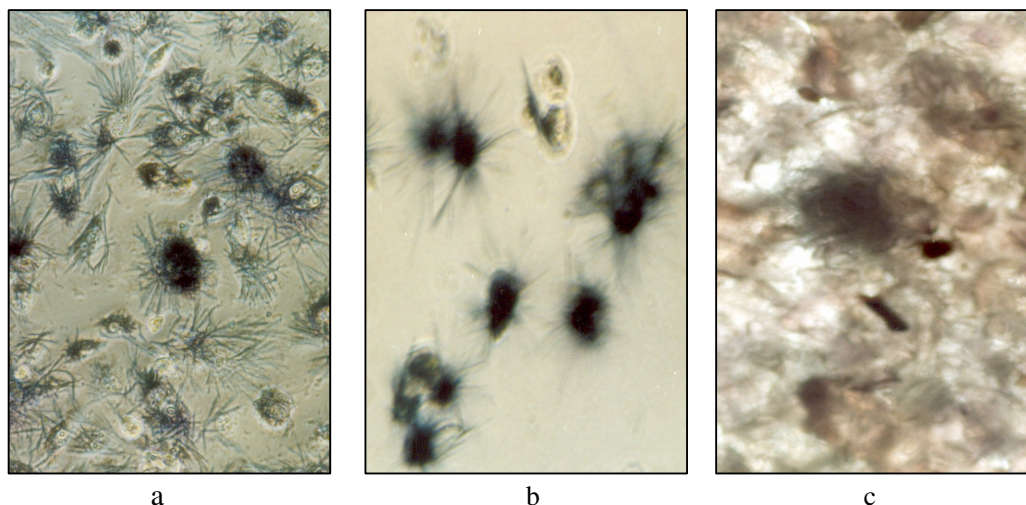


Figura 5.1 Teste preliminar de citotoxicidade da quitosana Herbarium - Ensaio MTT.
 a) Grupo 1 (controle): Células em meio de cultura (20x1,5);
 b) Grupo 2: Células em meio de cultura + solução de quitosana em ácido acético (20 x 1,5);
 c) Grupo 3: Células em meio de cultura + quitosana *in natura* (4 x 1,5).

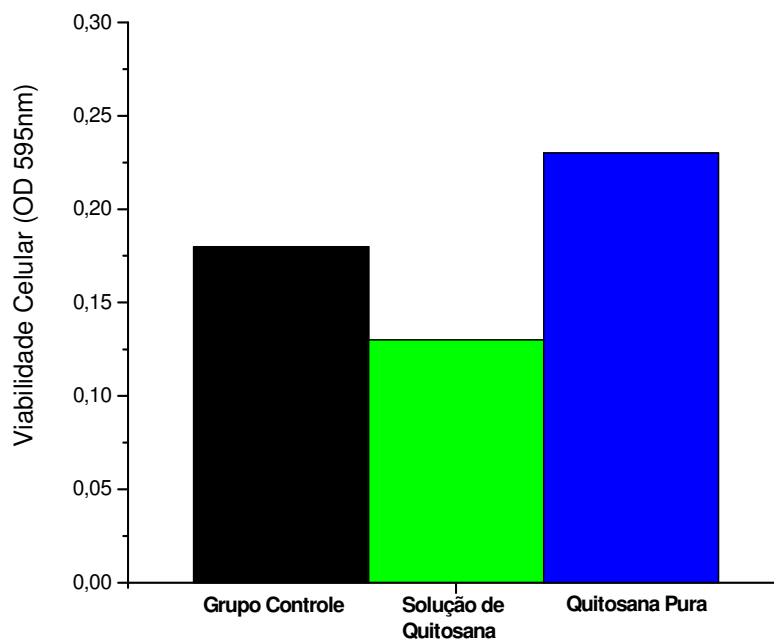


Figura 5.2 Viabilidade celular. $1,7 \times 10^4$ células Sho de ovários de camundongos por poço. A proliferação celular foi avaliada para os grupos 1, 2 e 3 através do ensaio MTT.

Como pôde ser observado nas fotografias e na figura acima, em relação ao grupo controle, os 2 grupos contendo a quitosana Herbarium possibilitaram a formação de cristais de formazan. Os melhores resultados foram obtidos no grupo 3, onde a quitosana *in natura* apresentou a maior viabilidade celular, inclusive superior àquela do grupo controle,

indicando que o produto, neste teste preliminar, mostrou-se satisfatório do ponto de vista da citotoxicidade. A menor viabilidade celular foi obtida no grupo 2, a qual poderia ser atribuída à presença do ácido acético que, mesmo considerado um ácido fraco, poderia ser suficiente para causar apoptose celular. Desta maneira, foi necessária uma etapa de neutralização de todos os biomateriais obtidos antes da cultura celular.

5.2 Solubilização da quitosana

A quitosana nas suas diversas aplicações e formas de apresentação tem sido solubilizada com eficiência em solução aquosa de ácido acético. A concentração da quitosana nestas soluções e a concentração do ácido acético utilizado têm variado nos diversos estudos da literatura de acordo com a sua utilização (Ayers & Hunt, 2001; Zhang & Zhang, 2001; Aimoli & Beppu, 2004; Torres *et al.*, 2004; Yang, Wang & Tan, 2004; Rashidova *et al.*, 2004). Portanto, para a síntese de um híbrido à base de quitosana/sílica, o comportamento da quitosana frente à sua solubilização em solução aquosa de ácido acético deve ser observado.

A solubilização da quitosana em ácido acético depende da concentração da quitosana e da concentração do ácido acético. Quanto maior a concentração do ácido, teoricamente, melhor a solubilização, ao contrário da concentração da quitosana (Rinaudo, 2006). Neste trabalho, foi feito um teste com soluções aquosas de ácido acético a 1, 2, 5% e com concentração de quitosanas Herbarium e Aldrich de alto e médio peso molecular variando de 1 a 7%. A mistura foi feita manualmente e sob agitação vigorosa em temperatura ambiente. Os resultados mostraram uma facilidade maior de solubilização da quitosana Herbarium em relação às quitosanas Aldrich de médio e alto peso molecular. Este comportamento poderia ser explicado pelas diferenças em relação aos graus de desacetilação e pesos moleculares das quitosanas utilizadas.

O grau de desacetilação da quitosana Herbarium não foi fornecido pelo fabricante, mas foi medido por ressonância magnética nuclear no estado líquido (H-NMR), no Departamento de Química da UFMG. Os cálculos utilizados permitiram aferir que o GD desta quitosana estabeleceu-se na faixa de 85%, portanto num patamar superior ao da quitosana Aldrich de médio peso molecular (entre 75-85%) e superior ao da quitosana de alto peso, na faixa de 75%, segundo o fabricante.

A utilização do ácido acético a 5% ou a 2% não trouxe diferenças significativas na solubilização das quitosanas testadas, ao contrário da solubilização na concentração de 1%, que se mostrou mais difícil. Desta maneira, utilizou-se a incorporação de quitosana ao ácido acético a 2%, que foi realizada gradualmente, a fim de avaliar a concentração máxima de quitosana que se poderia obter na solução, para possibilitar os procedimentos de filtração necessários para a síntese dos híbridos deste estudo. Após 72 horas de solubilização, a concentração máxima de quitosana Herbarium conseguida na solução de ácido acético foi de 7,27%; entretanto, esta solução apresentou-se altamente viscosa e com aspecto gelatinoso, portanto, inviável para procedimentos de mistura e filtração. Os resultados mostraram que a concentração máxima para a produção de uma solução viável para a síntese dos híbridos com a sílica foi de 5% para a quitosana Herbarium e de 3% para as quitosanas Aldrich utilizando-se ácido acético a 2%. As quitosanas Aldrich mostraram uma dificuldade um pouco maior frente à solubilização, especialmente as de alto peso molecular. Soluções com concentrações acima de 2% destas quitosanas mostraram-se altamente viscosas.

O grande problema encontrado quando se utiliza soluções de quitosana altamente concentradas, além da dificuldade de filtração, é que a viscosidade aumentada dificulta a mistura com a solução sol-gel e, conseqüentemente, a produção de espumas durante a síntese do híbrido poroso. Desta forma, baseado nas diversas sínteses realizadas ao longo do trabalho e na necessidade de obtermos espumas adequadas nos híbridos com menor acidez possível, optou-se por utilizar soluções de quitosanas Herbarium e Aldrich em concentrações máximas de 2% em solução aquosa de ácido acético a 2%. A colocação das soluções em banho-maria numa temperatura de aproximadamente 50°C também foi realizada e facilitou a solubilização da quitosana.

5.3 Síntese sol-gel de híbridos de quitosana/sílica (H100S) e sílica-cálcia (H 70S)

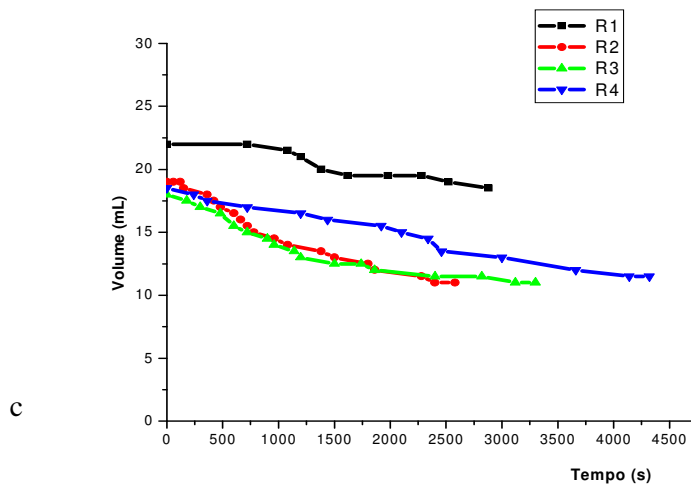
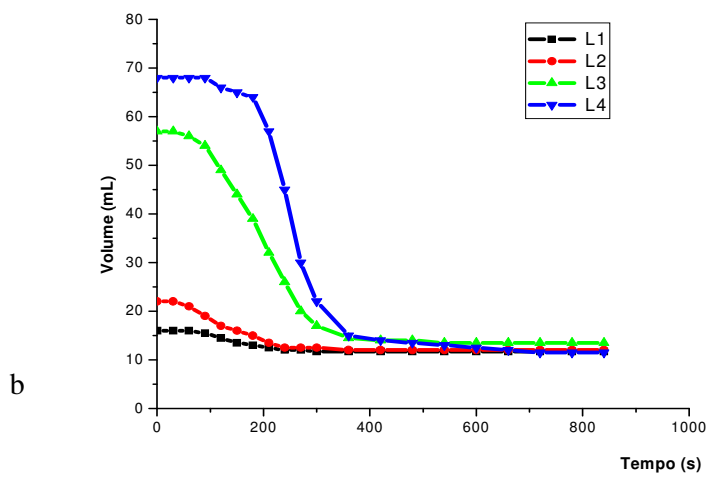
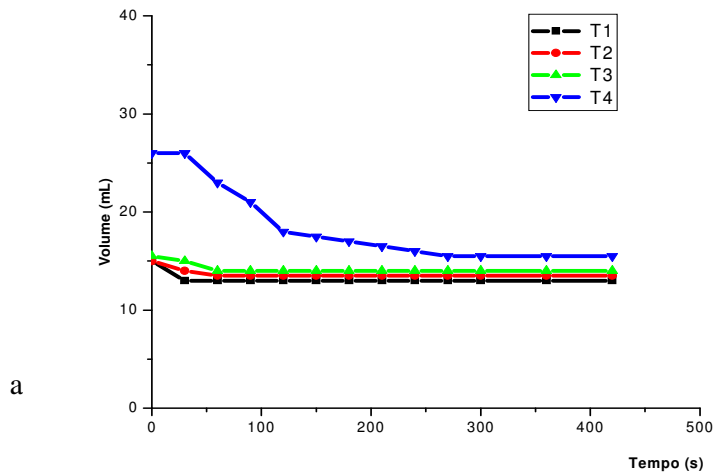
5.3.1 Formação e estabilidade de espumas

Os agentes surfactantes são responsáveis pela existência de espumas. Em um primeiro momento, a habilidade deste material em produzir um grande volume de espuma depende da sua eficiência em reduzir a tensão superficial da solução, bem como da natureza do solvente e das substâncias dissolvidas como eletrólitos e polímeros (Coelho, 2003). Outros

parâmetros de processamento também são importantes na produção de espumas e, conseqüentemente, influenciam a estrutura de poros formada no material. Na rota sol-gel utilizada neste trabalho, o valor de R (relação água/TEOS) define a quantidade de água disponível para a formação de espuma. A água não reagida na hidrólise é a responsável principal pela formação de espuma, pois é ela que se unirá com a porção polar do agente surfactante, permitindo a formação de bolhas. A quantidade de água adicionada ao TEOS é diretamente proporcional à formação de bolhas nas espumas. Entretanto, quando uma grande quantidade de água é adicionada, embora haja a formação de um grande volume de espuma com bolhas maiores e com grande interconectividade, as paredes entre os poros apresentam-se muito delgadas e podem entrar em colapso antes da geleificação (Jones & Hench, 2004). Neste trabalho utilizou-se um valor de R igual a 12, razão que foi utilizada em outro estudo com vidros bioativos, e proporcionou uma síntese com adequado tempo de geleificação e formação de espumas (Coelho, 2004).

Os agentes espumantes utilizados nesta avaliação foram o LESS, um surfactante aniônico, o surfactante não-iônico RENEX® e o detergente Teepol®, que contém em sua formulação surfactantes aniônicos. Uma molécula de surfactante tem duas partes funcionais: uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica). O surfactante LESS pertence à classe dos surfactantes aniônicos álcoois éter sulfato e sua fórmula química pode ser representada por $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$. Neste caso, em solução aquosa, a parte hidrofílica de sua molécula é aniônica, ou seja, tem carga negativa e o cátion é o sódio. O surfactante Renex® pertence à classe dos surfactantes não iônicos e sua fórmula química pode ser representada por $\text{C}_9\text{H}_{19}(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, onde n é o grau de etoxilação. O Renex® apresenta a parte hidrofóbica da molécula proveniente do nonifenol e a parte hidrofílica resultante da cadeia de óxido de eteno. O Teepol® é um detergente que contém em sua composição quantidades de surfactantes aniônicos do tipo alquilbenzeno-sulfonato de sódio - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ - (5 a 15%) e sulfato de sódio - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$ - em baixas concentrações (< 5%).

Os resultados da avaliação das espumas produzidas pelos três surfactantes quando da utilização da solução sol-gel (100S) são mostrados a seguir (Fig. 5.3a, b, c e Tab. 5.1).



Figuras 5.3 Decaimento do volume das espumas produzidas pela mistura da solução sol-gel 100S com o detergente Teepol®(a) e os surfactantes LESS (b) e Renex® (c).

Tabela 5.1 Volume inicial e tempo de decaimento para as espumas produzidas com a solução sol-gel 100S.

Surfactante	Solução	Volume inicial da espuma (ml)	Tempo total de decaimento (minutos)
Teepol®	T1	15	0,5
	T2	15	1
	T3	15,5	1
	T4	26	5
LESS	L1	16	5
	L2	22	6
	L3	57	9
	L4	68	12
Renex®	R1	22	38
	R2	19	40
	R3	18	52
	R4	18,5	69

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o decaimento do volume de espuma com o tempo variou grandemente de acordo o tipo e a quantidade de agente surfactante utilizado. O detergente Teepol® não mostrou efetividade na produção de espumas com a solução sol-gel quando comparado com os outros surfactantes, tanto em relação ao volume produzido, quanto na estabilidade da espuma. Apenas a solução T4 apresentou algum grau de estabilidade. O surfactante Renex® mostrou um comportamento diferente, pois o volume de espuma produzida foi inversamente proporcional à quantidade de agente na mistura. As formulações R1, R2, R3 e R4 apresentaram volumes de espumas significativamente menores em relação ao agente LESS, mas uma estabilidade de espuma muito superior. Uma dificuldade encontrada com o surfactante Renex foi o baixo escoamento das espumas na coluna de medição durante o vazamento das mesmas devido à alta viscosidade. Uma ilustração do padrão de decaimento das espumas obtidas a partir da solução sol-gel da maioria das formulações testadas está representada a seguir (Fig. 5.4).

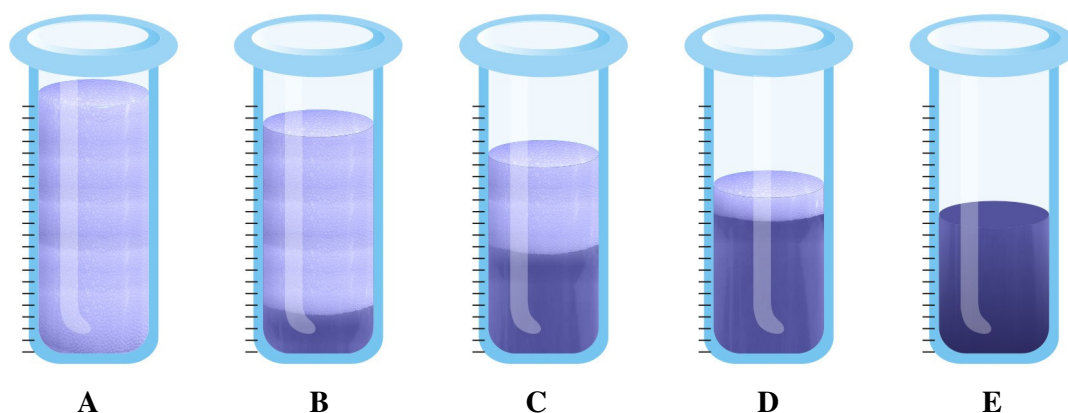


Figura 5.4 Decaimento da espuma produzida com a solução sol-gel. Nota-se um consumo total das espumas produzidas e um aumento significativo do volume da solução ao longo do tempo.

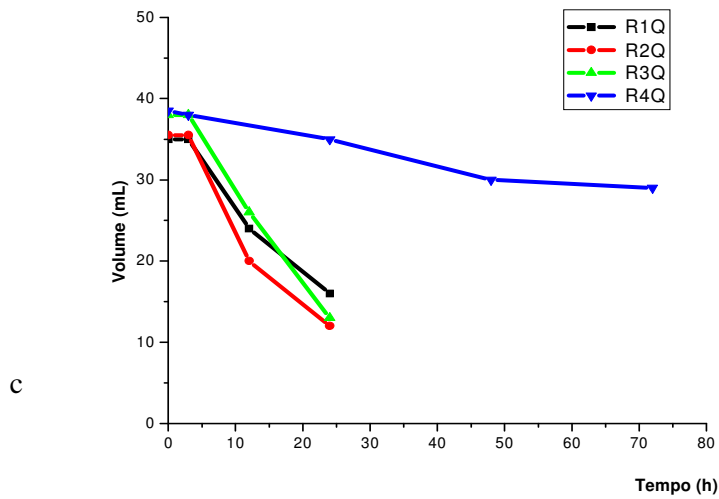
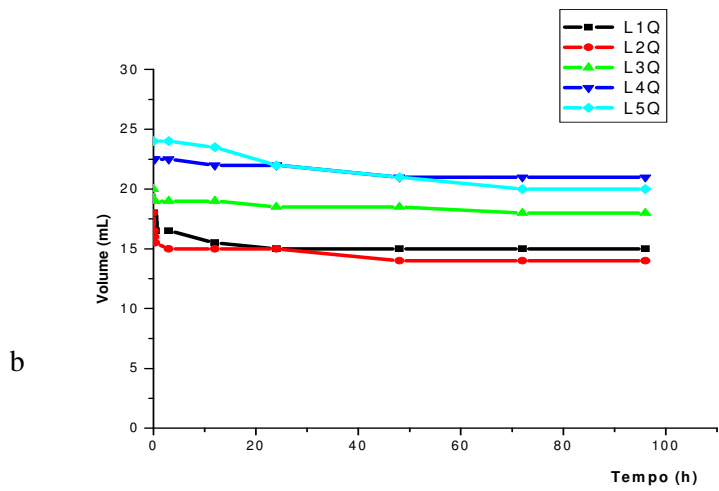
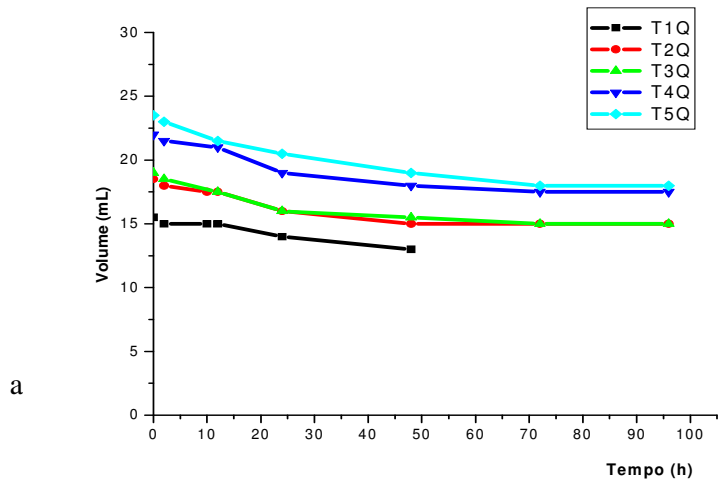
Nas condições do processo sol-gel, em pH ácido, a hidrólise do TEOS é rápida, enquanto que a condensação da sílica é mais lenta. A hidrólise mais rápida resulta na formação de oligômeros estáveis que originam um gel de baixa densidade, transformando-se em uma estrutura de sílica coloidal de rede aberta, ao invés de uma estrutura densa de sílica. Os surfactantes não-iônicos poderiam interagir com estes oligômeros de sílica formando verdadeiros híbridos de micelas do surfactante com a sílica, o que causaria grande diminuição da concentração do agente na solução e da sua atuação na estabilização das espumas (Coelho, 2003). Isto poderia explicar o baixo volume de espumas produzidas pelo surfactante Renex. A ausência quase completa de espumas produzidas quando da utilização do detergente Teepol® poderia ser explicada pelo fato de não se tratar especificamente de um agente surfactante, mas sim de um detergente que possui em sua composição uma quantidade mais limitada de surfactantes aniônicos.

O surfactante LESS mostrou os melhores resultados em relação à produção de um volume adequado de espuma, embora a espuma com alto volume produzido pela solução L4 (3ml de surfactante), tenha mostrado um escoamento muito baixo, o que dificultou os procedimentos de vazamento nos moldes durante a síntese dos híbridos. A solução L3 (2ml de surfactante) mostrou um comportamento mais favorável, produzindo um volume de espuma aproximadamente 4 vezes maior que o volume da solução antes da produção da espuma, ao mesmo tempo em que apresentou um decaimento suave ao longo do tempo e um

escoamento adequado para o vazamento de moldes durante a síntese do material. O tempo de decaimento e o volume da espuma produzida pelo surfactante LESS foram diretamente proporcionais à sua quantidade na mistura.

É de se esperar que a efetividade de agentes surfactantes em estabilizar espumas seja diferente de acordo com o sistema utilizado. Um estudo (Pereira *et al.*, 2004) avaliou híbridos porosos à base de vidros bioativo/PVA, variando a proporção da fase polimérica na mistura (10, 20 e 30% de PVA) e a composição da fase inorgânica (58, 70 e 100% de SiO₂). Para a mesma quantidade de surfactante utilizado, o volume inicial das espumas produzidas foi maior com a adição do polímero. A adição de polímeros diminuiu o escoamento da mistura, aumentando a estabilidade das espumas. A adição de substâncias que adsorvem na interface ar/água é a principal ferramenta para estabilizar espumas, e os polímeros têm sido utilizados para este fim. Eles aumentam a viscosidade da solução levando a uma redução da velocidade de escoamento e permeabilidade do gás aprisionado na espuma.

A adição da solução de quitosana à solução sol-gel para a produção de híbridos H20 da quitosana Aldrich foi testada com os três surfactantes. A quantidade de surfactante utilizada para a avaliação dos híbridos foi significativamente diminuída em relação à utilizada para a solução sol-gel, para possibilitar o vazamento das espumas produzidas na coluna de medição, o qual ficou inviável com a quantidade de surfactante utilizada anteriormente devido à alta viscosidade apresentada pelas espumas produzidas. Os resultados são apresentados nas figuras 5.5 *a*, *b* e *c*, bem como na tabela 5.2.



Figuras 5.5 Decaimento do volume das espumas produzidas pela mistura da solução sol-gel 100S e quitosana (H20) com o detergente Teepol®(a) e os surfactantes LESS (b) e Renex® (c).

Tabela 5.2 Volume inicial e tempo de decaimento para as espumas produzidas com solução sol-gel 100S e quitosana (H2O) e os três surfactantes. D: drenagem / NA: não avaliado

Surfactante	Solução	Volume inicial da espuma (ml)	Tempo total de decaimento (horas)
Teepol®	T1Q	15,5	48
	T2Q	18,5	D
	T3Q	19	D
	T4Q	22	D
	T5Q	23,5	D
	T6Q	NA	NA
LESS	L1Q	18	D
	L2Q	18	D
	L3Q	20	D
	L4Q	22,5	D
	L5Q	24	D
	L6Q	NA	D
Renex®	R1Q	35	24
	R2Q	35,5	24
	R3Q	38	24
	R4Q	38	72
	R5Q	NA	NA

As espumas produzidas quando da adição da solução de quitosana mostraram um padrão bem diferenciado das anteriores. Para os surfactantes Teepol e LESS foi observada uma diminuição do volume total das espumas formadas e um grande aumento da viscosidade, o que dificultou o vazamento das mesmas nas colunas de medição e inviabilizou a análise das amostras L6Q e T6Q. O padrão de decaimento das espumas híbridas seguiu um comportamento diferente das espumas de sol-gel. As espumas de sol-gel entravam em colapso e se desintegram ao longo do tempo diminuindo rapidamente a altura da solução na coluna de medição. A estabilidade das espumas híbridas foi significativamente superior para todos os agentes utilizados, mostrando um decaimento mais discreto. Das soluções avaliadas, somente a T1Q mostrou decaimento total da espuma após 48 horas do vazamento nas colunas de medição. As demais espumas sofreram pequeno decaimento até 48 horas do vazamento, após as quais não mais se alteraram, permanecendo estáveis. Em seguida, observou-se uma drenagem lenta das espumas sem variação significativa do volume formado, com ligeiro aumento do volume da solução sob as espumas e uma diminuição discreta do volume de espuma na coluna de medição (Fig. 5.6).

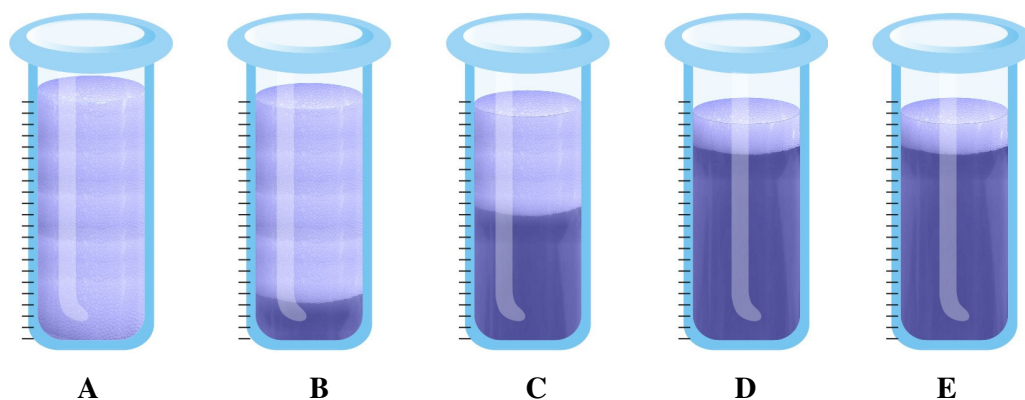


Figura 5.6 Drenagem da espuma ao longo do tempo. Nota-se um pequeno decaimento do volume das espumas produzidas ao longo do tempo. O aumento do volume da solução sob a espuma foi muito lento e ocorreu até certo ponto, onde se observou uma estabilização das espumas.

Este padrão de decaimento para o surfactante LESS e o detergente Teepol foi observado até 5 dias após o vazamento das espumas nas colunas de medição, onde houve uma estabilização das espumas formadas, sem variação perceptível da altura das mesmas nas colunas. O detergente Teepol foi o menos efetivo na produção de um volume adequado de espuma. Os melhores resultados com estes 2 agentes foram obtidos quando da adição de 0,7ml de surfactante à mistura (soluções T4Q e L4Q), pois possibilitou a produção de maior volume de espuma sem comprometer demasiadamente a viscosidade da mesma.

Para o surfactante Renex foi possível obter um volume maior de espuma, onde se observou maior homogeneidade sem a formação de aglomerados como no caso dos agentes utilizados anteriormente. Ainda sim, um grande aumento da viscosidade foi observado o que dificultou o vazamento das espumas nas colunas de medição. A exceção foi dada pela solução R1Q, menos viscosa e com melhor escoamento. A adição de 1ml de agente surfactante (solução R5Q) promoveu a formação de uma espuma sem qualquer escoamento e, por isso, não foi utilizada para esta avaliação. As espumas produzidas mostraram uma estabilidade mais acentuada que as obtidas com a solução sol-gel, mas menor que a obtida com os outros agentes surfactantes. Após 12 horas, as espumas produzidas sofreram um decaimento mais acentuado, com o consumo total das espumas das soluções R1Q, R2Q e R3Q ocorrendo em até 24 horas. As espumas da solução R4Q sofreram decaimento após 72 horas. As soluções T6Q, L6Q e R5Q mostraram formação de espuma com volume aumentado, mas sem qualquer tipo de escoamento; desta forma, não foram consideradas

para esta avaliação. Os pontos negativos da utilização deste surfactante foram o baixo escoamento apresentado pelas soluções R2Q, R3Q e R4Q e a impossibilidade de vazamento adequado das espumas nos moldes.

Apesar da grande estabilidade apresentada até as primeiras 12 horas, após este período as espumas produzidas pelo surfactante Renex apresentaram decaimento irregular, onde parte da espuma ficou aderida na parede da coluna de medição e a outra parte permaneceu em contato com a solução drenada. Esta dispersão das espumas permaneceu também durante o envelhecimento dos híbridos sintetizados com este surfactante, onde uma perda da integridade dos mesmos foi observada. Qualitativamente, a resistência final das amostras foi considerada insatisfatória e bem inferior ao do grupo sintetizado com o surfactante LESS, mostrando grande fragilidade após a secagem. As imagens obtidas por MEV das amostras H20 Aldrich são mostradas a seguir (Fig. 5.7a, b).

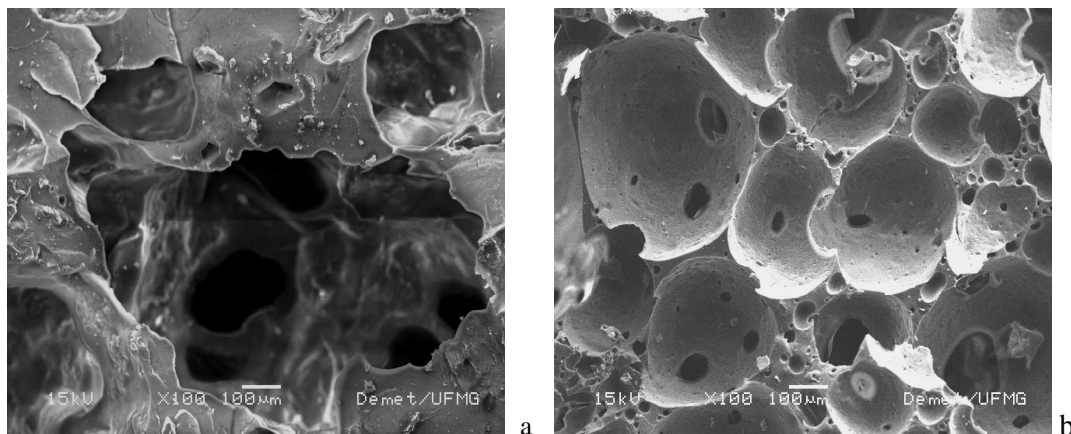


Figura 5.7 Imagens obtidas por MEV (100x) de híbridos H20 Aldrich sintetizados com os surfactantes: a) Renex e b) LESS.

Nota-se que as amostras sintetizadas com o surfactante LESS mostraram uma estrutura de poros mais arredondados e regulares que a do outro grupo. As paredes dos poros das amostras sintetizadas com o surfactante Renex mostraram-se mais delgadas e irregulares, o que poderia explicar a fragilidade destes materiais. Diante destes resultados, optou-se pela utilização do surfactante LESS na síntese dos híbridos deste estudo, uma vez que um estudo mais aprofundado deve ser realizado com os outros surfactantes, principalmente voltado para as suas dosagens.

De uma maneira geral, os híbridos H10 e H20 propiciaram facilidade de produção de espumas ao contrário dos híbridos H30, que apresentaram a formação de aglomerados na mistura que aumentaram a viscosidade da solução e dificultaram a formação de espumas com volume adequado. A relação volume de surfactante LESS *versus* volume da solução sol-gel + solução de quitosana utilizada na síntese dos híbridos deste trabalho foi baseada nos resultados obtidos anteriormente na avaliação das espumas, onde o grupo L4Q (0,7 ml de LESS para 15ml de sol-gel + solução de quitosana) apresentou os melhores resultados para os híbridos H20 Aldrich. Para a síntese de híbridos H10 e H20 esta relação foi mantida, ao passo que para a síntese dos híbridos H30 uma relação maior foi utilizada na tentativa de se produzir maior volume de espuma. Desta maneira, foi possível a obtenção de espumas adequadas mesmo com esta composição, já que a agitação mecânica vigorosa foi capaz de desfazer tais aglomerados e possibilitar a formação de espumas homogêneas para estes híbridos.

5.3.2 Geleificação dos híbridos de quitosana e sílica

Inicialmente, optou-se pela síntese de híbridos não-porosos com o objetivo de se avaliar a interação entre os materiais orgânicos e inorgânicos utilizados, o tempo de geleificação do híbrido e o aspecto final do material obtido. O tempo de geleificação é um parâmetro que deve ser controlado durante a síntese via sol-gel para facilitar os procedimentos de produção da espuma, bem como para otimizar o vazamento da espuma nos moldes no tempo correto. Este é um fator importante, pois a formação da espuma na síntese é que vai permitir a obtenção de poros no material sintetizado. Do mesmo modo, é necessário um controle adequado da quantidade de catalisador da geleificação (HF), com o objetivo de se diminuir a acidez no material final.

A geleificação do sistema quitosana/sílica pode ser influenciado por diversos fatores como a temperatura, o pH da solução e as quantidades relativas de solução de quitosana e da solução sol-gel envolvidas na mistura. Quando a temperatura da solução aumenta, a cinética da reação de condensação aumenta também e reduz o tempo de geleificação (Jones & Hench, 2004). Para a avaliação do comportamento de híbridos em relação à geleificação, soluções de vidros 100S foram associadas a soluções de quitosana Aldrich em ácido acético a 2% em proporções de 10, 20 e 30% (H10, H20 e H30), padronizando-se a quantidade de solução sol-gel (20 ml) e do catalisador da geleificação (1 ml de HF a 10%). As sínteses dos

híbridos foram realizadas no mesmo dia e nas mesmas condições de processamento. Os resultados podem ser visualizados na figura 5.8.

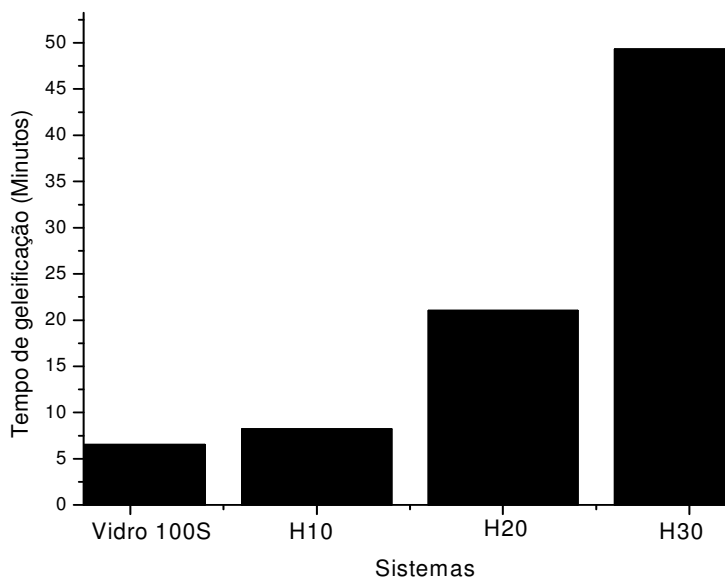


Figura 5.8 Análise comparativa do tempo de geleificação de híbridos de sílica e quitosana Aldrich em diversas composições por peso para uma alíquota da solução sol-gel fixa (20ml).

A quantidade de solução de quitosana envolvida na reação teve uma influência significativa na geleificação dos sistemas. A solução necessária para a síntese de híbridos com 10, 20 e 30% de quitosana aumentou o tempo de geleificação em 1.3, 3.3 e 7.7 vezes, respectivamente, em relação ao tempo necessário para geleificar a solução de vidro bioativo com a mesma quantidade de catalisador e condições ambientais. Como era de se esperar, a quantidade de água presente nas soluções de quitosana e a própria quitosana são fatores determinantes e responsáveis pelo controle do tempo de geleificação dos sistemas trabalhados. À medida que o conteúdo de quitosana e, conseqüentemente, a quantidade de água aumentou no sistema, a concentração de HF (relação volume de HF /volume total da solução em ml) diminuiu no mesmo (0.03 para H10, 0.02 para H20 e 0,013 para H30). Portanto, a concentração do agente catalisador deve ser adequada ao híbrido que se pretende sintetizar, pois um tempo de geleificação extenso dificulta os procedimentos de síntese. O comportamento de geleificação dos híbridos H20 em função da concentração do agente catalisador (HF) foi avaliado e pode ser visualizado na figura 5.9.

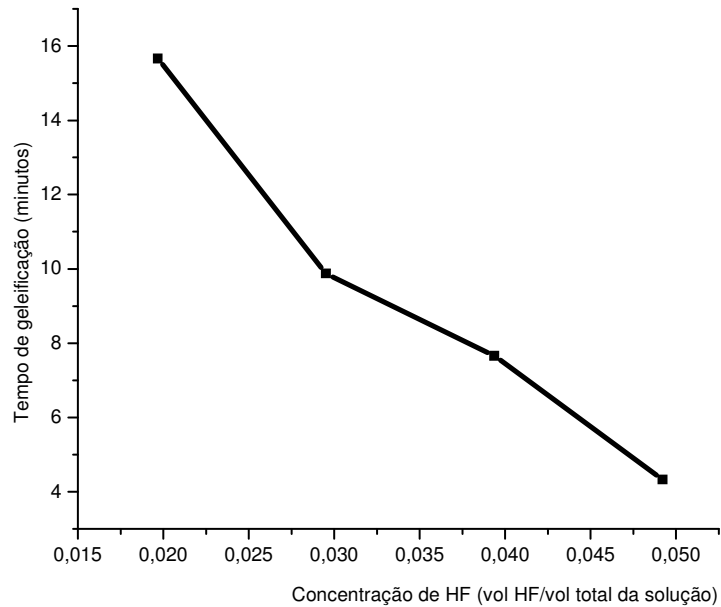


Figura 5.9 Tempo de geleificação de híbridos H2O em função da concentração do agente catalisador HF.

Tendo em vista as avaliações realizadas e baseado em um tempo de geleificação de 8 a 10 minutos para a síntese dos híbridos deste trabalho, foi estimada uma concentração de 0,03 a 0,04 ml de HF por ml de solução total (solução sol-gel + solução de quitosana).

5.3.3 Secagem das amostras

Como se sabe, após a geleificação dos híbridos as reações de condensação e hidrólise continuam a ocorrer, porém em taxas menores. Por este motivo, 24 horas após a síntese, as amostras foram submetidas a um envelhecimento com o objetivo de se acelerar essas reações, permanecendo por 48 horas em estufa a 50^oC, onde as tampas dos moldes vazados foram mantidas completamente fechadas. Este procedimento foi acompanhado por uma ligeira contração do material no interior do molde e pequena sinérese, que traz como consequência melhoras nas propriedades mecânicas dos materiais que são muito importantes para a manutenção da integridade estrutural durante a etapa de secagem (Fig.5.10).

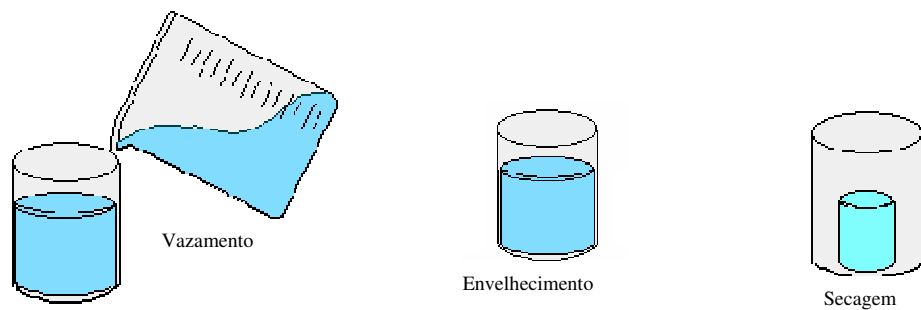


Figura 5.10 Envelhecimento e secagem das amostras

Um híbrido poroso está seco quando a fase líquida é completamente eliminada dos poros do material. O processo de evaporação do líquido de dentro dos poros pode gerar gradientes de pressão capilar que podem levar a contrações diferenciais no interior do material e danos à sua microestrutura. Outro problema resultante da secagem das amostras é a diminuição gradativa do tamanho de poros à medida que o líquido é eliminado dos mesmos. Na produção de matrizes para crescimento celular este fator pode ser determinante para o sucesso da sua utilização, visto que uma estrutura hierárquica de poros é necessária para a adesão, proliferação e difusão celular para o interior da matriz. Além disto, uma degradação do polímero presente no híbrido pode ocorrer se parâmetros de secagem como tempo e temperatura não são bem controlados. O método de secagem a ser utilizado em um determinado material deve, desta forma, ser muito bem escolhido. Este trabalho avaliou a utilização de estufa, do dessecador associado à bomba de baixo e alto vácuo e da liofilização como métodos de secagem para os híbridos H20 Herbarium, avaliando o percentual de perda de peso e a contração diametral das amostras. O término da secagem foi realizado por avaliação visual e pela ausência de variação significativa de massa entre um tempo de secagem e outro. Os resultados podem ser visualizados a seguir (Fig.5.11).

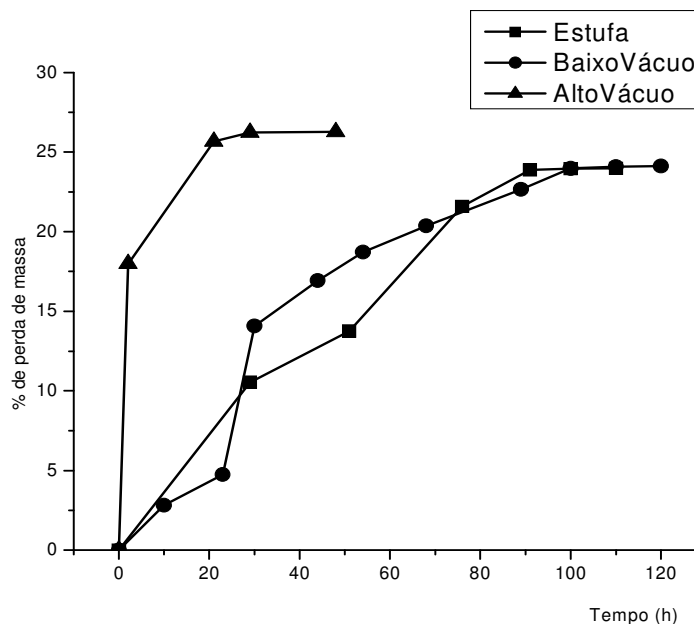


Figura 5.11 Perda de massa (%) x tempo de secagem (h) de acordo com o método de secagem.

A medida da perda de massa foi realizada a partir da etapa de envelhecimento das amostras em estufa a 50°C por 48 horas, realizada previamente a todos os métodos de secagem testados. Avaliando-se o percentual de perda de massa das amostras, podemos observar que não houve diferença significativa entre a utilização da estufa e do dessecador em baixo vácuo na secagem das amostras. A perda de peso para as amostras secas na estufa foi de 24% após 110 horas, percentual semelhante ao observado nas amostras secas no dessecador após 120 horas de secagem. A contração linear ou diametral das amostras após a secagem foi de aproximadamente 46% para ambas. As amostras submetidas à secagem com dessecador em bomba á vácuo de alta potência apresentaram trincas em várias partes após 2 horas de secagem e, em 21 horas, mostraram-se esfareladas, indicando que a alta pressão utilizada no equipamento não foi suportada pelas amostras. Apesar de se apresentar como inviável para ser utilizado nos híbridos sintetizados, este método de secagem foi útil por servir de parâmetro de comparação quanto à efetividade dos métodos anteriores. O percentual de perda de massa medido após 2, 21, 29 e 48 horas de secagem no alto vácuo, mostrou percentuais de perda de massa de 18%, 25%, 26% e 26,3%, respectivamente. Após 21 horas de secagem, a perda de massa da amostra não foi significativa. O percentual de perda de massa destas amostras foi próximo do percentual obtido nos 2 outros métodos de

secagem, estufa e dessecador convencional, mostrando a efetividade de ambos os métodos, já que as amostras mantiveram-se íntegras.

Um outro método de secagem foi realizado, a liofilização, com o objetivo de tentarmos uma secagem efetiva das amostras mantendo uma dimensão adequada de poros. Este procedimento consiste no congelamento das amostras em Nitrogênio líquido e submissão a baixas pressões em bomba de alto vácuo. A água da amostra, congelada, seria sublimada e o espaço ocupado pela mesma mantido, formando uma estrutura porosa. Para se avaliar este método de secagem, as amostras H2O foram submetidas a uma pré-secagem em estufa a 50°C por 48 horas antes da liofilização. O percentual de perda de massa na pré-secagem foi de 9,3%, enquanto que a liofilização posterior levou a uma perda adicional de 12,3%, totalizando, portanto, uma perda total de massa de 21,6%; após a completa secagem. A amostra, entretanto, desintegrou-se devido ao alto vácuo utilizado.

Diante dos resultados obtidos com a realização dos diversos métodos de secagem nos híbridos deste trabalho, optou-se por utilizar a secagem dos materiais em estufa devidamente calibrada numa temperatura de 50°C, pela sua facilidade de utilização e pela possibilidade de controle de parâmetros do processo como tempo e temperatura de secagem.

5.3.4 Neutralização

Para a síntese sol-gel de híbridos contendo fase orgânica em sua composição, uma etapa de neutralização é sempre necessária para reduzir a acidez das amostras decorrentes do método de processamento e torná-las mais biocompatíveis após os métodos de secagem. Na síntese de vidros bioativos, a sinterização realizada a altas temperaturas é favorável na eliminação dos catalisadores utilizados na sua produção. Possíveis desvantagens da etapa de neutralização em híbridos porosos referem-se à diminuição de suas propriedades mecânicas e do diâmetro de poros do material, advindos principalmente da lixiviação de produtos do material para a solução neutralizadora e das etapas de secagem adicionais a que são submetidas as amostras durante a neutralização. A própria imersão de um híbrido em uma solução neutralizadora essencialmente básica já pode ser suficiente para provocar uma dissolução da mesma se o tempo de imersão e a concentração e quantidade da solução não forem controlados. Em um estudo (Pereira *et al.*, 2005a), a neutralização de híbridos de PVA (20% em peso) e sílica-cálcia (70%SiO₂/30%CaO) realizada em água deionizada, em

soluções alcoólicas e em solução de hidróxido de amônia (NH_4OH) resultou em diminuição da acidez das amostras e aumentou os níveis de viabilidade celular de osteoblastos quando comparado com os híbridos não neutralizados. A utilização da solução de NH_4OH por 3 horas foi o método mais efetivo de neutralização, mas provocou alterações nas amostras como a diminuição dos teores de cálcio e dos tamanhos de poros das mesmas.

Neste trabalho, o teste de neutralização foi realizado nas amostras H20 utilizando-se a água deionizada como grupo controle e a solução aquosa de NH_4OH 0,5M em três tempos de imersão (3, 3,5 e 4 horas), com medições intermitentes do pH de hora em hora. O pH dos híbridos sintetizados foi medido antes e depois da neutralização após a imersão durante 30 minutos em água deionizada. Os resultados são apresentados a seguir (Tab.5.3).

Tabela 5.3 Medidas de pH em água deionizada de híbridos H20 Herbarium 100S após a neutralização em diferentes intervalos de tempo.

Soluções	Tempo Total de imersão	pH inicial	pH final
Água deionizada	4 horas	2,88	3,09
NH_4OH	3 horas	2,88	6,22
NH_4OH	3 horas e 30 minutos	2,88	6,84
NH_4OH	4 horas	2,88	7,12

Através dos resultados obtidos pode-se afirmar que a água deionizada, utilizada como grupo controle, não foi efetiva para a neutralização das amostras avaliadas, que apresentaram um caráter ácido em patamares próximos ao estado inicial. Resultados mais satisfatórios foram obtidos com a solução aquosa de NH_4OH 0,5M, após a imersão das amostras em banhos de 3 a 4 horas. Uma pequena diferença de efetividade pode ser esperada quando da neutralização de híbridos com maiores concentrações de quitosana. As amostras H30, como visto anteriormente, apresentaram um tempo de geleificação superior aos híbridos H10 e H20, que foi compensada durante a síntese pela utilização de maior quantidade de HF. Portanto, é de se esperar que estas espumas apresentem acidez um pouco maior, levando à necessidade de um maior tempo de neutralização. Desta forma, do ponto de vista da utilização de híbridos para culturas celulares é imprescindível o monitoramento do pH durante todo o procedimento de neutralização.

A lixiviação de íons e a dissolução do polímero do material híbrido podem acontecer após os procedimentos de neutralização. Inicialmente foi avaliada a perda de peso das amostras

com várias composições de polímero (H10, H20 e H30) após a neutralização. Percentuais de perda de 3.66% para os híbridos H10, 4.96% para os híbridos H20 e de 18.49% para os híbridos H30 foram observados. Neste caso, quanto maior a quantidade de quitosana da amostra maior foi a sua perda de peso, o que poderia sugerir que o procedimento de neutralização levou a uma perda mais acentuada do componente polimérico.

Os espectros FTIR evidenciam mudanças estruturais em amostras H20 Herbarium 100S após o procedimento de neutralização (Fig. 5.12). Houve uma grande diminuição de intensidade da banda a 2927cm^{-1} referente ao grupamento C-H (estiramento) e o desaparecimento da banda referente ao grupo amida II, a 1550cm^{-1} , nos materiais neutralizados. Ambas as bandas são referentes a grupamentos da fase polimérica dos híbridos, o que indica que o procedimento de neutralização provocou uma dissolução preferencial da fase orgânica, já que os grupamentos referentes à sílica não mostraram alteração no espectro antes e após a neutralização. Os espectros de FTIR dos outros híbridos sintetizados neste trabalho serão mostrados adiante. A lixiviação de produtos das fases orgânica e inorgânica durante os procedimentos de neutralização de materiais híbridos pode ser considerada um evento indesejável. Entretanto, estes materiais não podem ser sinterizados a altas temperaturas que, por exemplo, promovem em vidros bioativos a ocorrência de ligações químicas mais efetivas no material e eliminação de subprodutos não reagidos durante a sinterização.

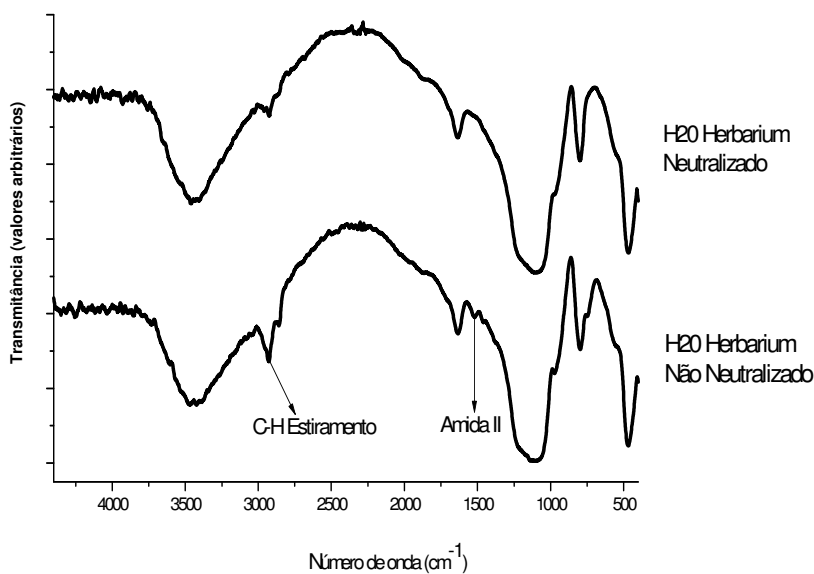


Figura 5.12 Espectro FTIR para amostras H20 Herbarium antes e depois da neutralização com NH_4OH 0,5M por 4 horas.

5.4 Caracterização das amostras

5.4.1 Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A TGA e a DTA consistem em técnicas onde uma propriedade física de um determinado material é medida em função da temperatura sob condições controladas. A TGA é um método que permite o acompanhamento da perda de massa de uma amostra durante um período de tempo, enquanto se varia a temperatura a uma velocidade constante. A maioria dos estudos na literatura identifica 3 fases de degradação das quitosanas quando da realização da análise termogravimétrica: a primeira fase situa-se entre 50 e 110⁰C (Paulino *et al.*, 2006) ou entre 30 e 150⁰C (Khalid *et al.*, 2002) com percentual de perda de peso de aproximadamente 10% e é associada à perda de água do material; a segunda fase situa-se entre 275 e 335⁰C (Khalid *et al.*, 2002), entre 250 e 300⁰C (Paulino *et al.*, 2006) ou entre 280 a 320⁰C (CHOI ET AL., 2006) com percentual de perda de peso de aproximadamente 30% e é correspondente à degradação da quitosana; a terceira fase, identificada a 450⁰C, com percentual de perda de 10%, refere-se também à degradação da quitosana (Khalid *et al.*, 2002). Uma quarta fase a 550⁰C já foi identificada em um estudo e relacionada à decomposição total do polímero (Khalid *et al.*, 2002).

Neste trabalho, foram realizadas análises térmicas das 3 composições de híbridos (H10, H20 e H30) com composição inorgânica composta apenas por sílica, bem como da quitosana no seu estado natural e do vidro bioativo como grupos controles (Fig. 5.13).

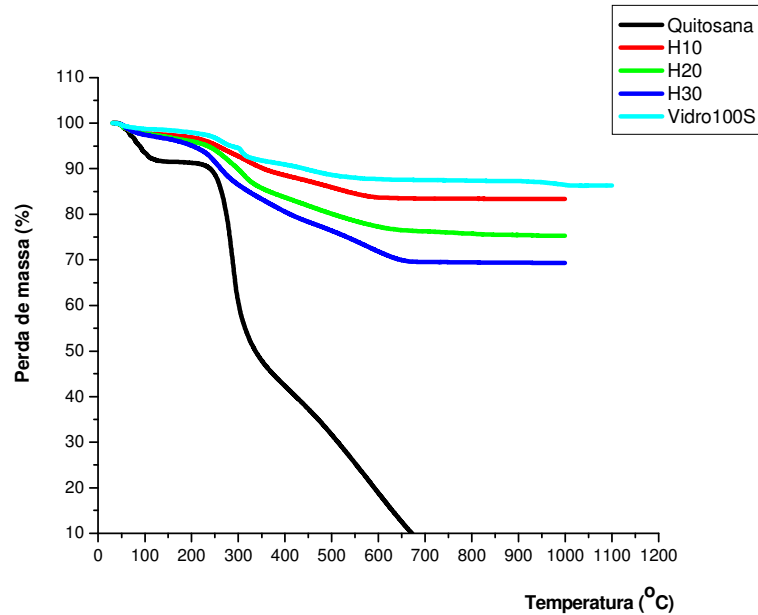


Figura 5.13 Curvas TGA dos híbridos de sílica 100S e quitosana Aldrich nas diversas composições.

Foram identificados 3 estágios principais relacionados à degradação da quitosana pura com o aumento da temperatura:

1º estágio: entre 40 e 120°C com percentual de perda de peso de 9% e relacionado à perda de água do material;

2º estágio: entre 230 e 335°C com percentual de perda de peso adicional de 41% relacionado à degradação da quitosana;

3º estágio: a partir dos 350°C com perda acentuada de peso pelo material correspondente à decomposição total da quitosana.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos estudos da literatura anteriormente mencionados. Para os híbridos com sílica, a perda de peso das amostras foi diretamente proporcional à quantidade do componente orgânico no híbrido e seguiu um padrão parecido para as três formulações (Tab. 5.4).

Tabela 5.4 Porcentagem de perda de peso dos híbridos através do TGA

Perda de peso (%)	Quitosana	H10	H20	H30	Vidro 100S
Até 200°C	9	3	4	5	2
200-550°C	66	13	18	20	10
550-1000°C	25	1	3	6	1
Total	100	17	25	31	13

A perda de peso associada às temperaturas abaixo de 200°C foi relacionada principalmente à perda de água dos materiais. Pôde ser notado que a perda de água foi maior na quitosana e nos híbridos com maior quantidade em peso da mesma. Isto poderia ser explicado pela grande afinidade que os grupos amina e hidroxila da quitosana possuem por água (Kittur *et al.*, 2002). Resultado semelhante foi obtido em outro estudo onde a análise termogravimétrica de híbridos de sílica e quitosana mostrou uma perda de água maior nos híbridos em relação à sílica isoladamente (Cestari *et al.*, 2005). A partir de 200°C a perda de peso foi mais acentuada na quitosana pura e nos híbridos à medida que o conteúdo de quitosana aumentou em sua composição. No vidro bioativo a perda de peso nessa faixa de temperatura pode estar relacionada com a eliminação de grupos silanol residuais não reagidos e de outros produtos utilizados durante o processo sol-gel, como agentes surfactantes. Perda de peso de até 14% em vidros bioativos ternários já foi observada utilizando-se TGA e relacionada a estes fatores (Jones, Ehrenfried & Hench, 2006).

Através do TGA foi possível também estimar a quantidade de quitosana presente nos híbridos e comparar com as proporções dos componentes utilizados para a síntese (Tab.5.5).

Tabela 5.5 Composição estimada de híbridos de sílica e quitosana

Composição	H10	H20	H30
% Quitosana	14	22	27
% Sílica	86	78	73

Em relação à composição nominal, houve uma proporção aumentada dos conteúdos de quitosana nos híbridos H10 e H20 e uma proporção diminuída em relação ao híbrido H30. O fato da reação sol-gel não se completar plenamente pode predispor à presença de resíduos como subprodutos da condensação e hidrólise e do TEOS não reagido, que podem ser eliminados a baixas temperaturas e diminuir a quantidade do componente inorgânico do híbrido. Os procedimentos de neutralização também podem causar dissolução de componentes orgânicos e inorgânicos destes materiais. A figura a seguir (Fig. 5.14) mostra

uma comparação entre híbridos H2O neutralizados em solução de NH_4OH por 4 horas e os mesmos materiais não neutralizados.

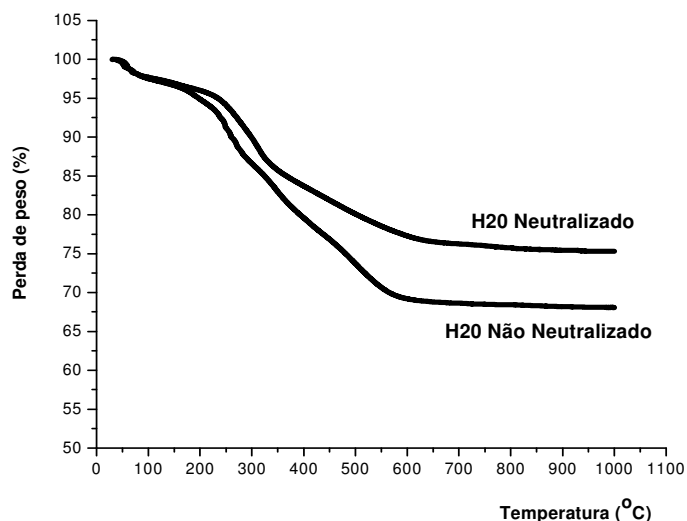


Figura 5.14 Curvas TGA dos híbridos H2O submetidos ou não à neutralização.

Até a temperatura de 200°C, a perda de peso de ambas as amostras foi muito parecida e limitada a 8%, referente à perda de água dos materiais. Em seguida pode-se observar que a perda de peso referente à degradação do componente polimérico, de 200 a 550°C, foi maior nos híbridos não neutralizados. Enquanto o percentual de perda de H2O neutralizado foi de 18%, o mesmo material sem a neutralização apresentou um percentual de perda de 25%. Este resultado confirma que a quantidade de quitosana foi maior nestes últimos e o procedimento de neutralização utilizando-se NH_4OH causou dissolução do componente polimérico do material diminuindo a sua quantidade no mesmo.

A DTA é uma técnica que permite acompanhar as transições de fase ou reações químicas ocorridas pela observação do calor absorvido ou liberado, sendo principalmente aplicável no estudo das transformações estruturais no interior do material a temperaturas elevadas. Durante o aquecimento, qualquer transição ou reação termicamente induzida no material será registrada como um pico, tratando-se de um evento exotérmico, ou como um vale, tratando-se de um evento endotérmico. A DTA da quitosana, do híbrido H2O e do vidro bioativo podem ser observados na figura a seguir (Fig. 5.15).

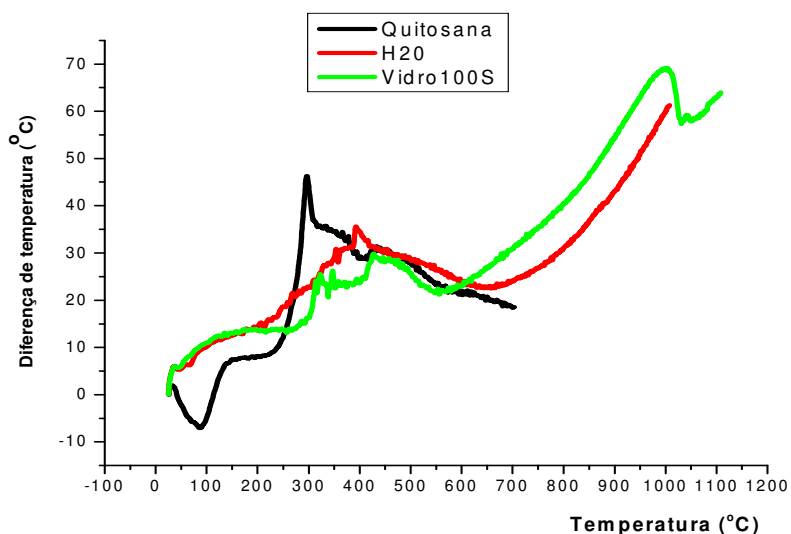


Figura 5.15 Curvas DTA da quitosana Aldrich, do híbrido H20 e do vidro 100S.

Analisando-se a curva DTA da quitosana, pode-se notar que o primeiro pico endotérmico correspondeu à temperatura aproximada de 100⁰C, e é relacionado à perda de água do material. Um pico exotérmico a 280⁰C e um endotérmico a 400⁰C poderiam ser relacionados à decomposição do polímero. Sabe-se que a fragmentação ou decomposição de cadeias de carbono apresentando oxidação precoce pode gerar picos exotérmicos nas curvas DTA. Em relação ao vidro bioativo, os picos exotérmicos observados a 300⁰C podem ser relacionados à remoção do agente surfactante utilizado para a produção da espuma e o pico endotérmico observado a 520⁰C pode estar relacionado à remoção de grupos silanol do material, como já verificado em outro estudo (Jones, Ehrenfried & Hench, 2006). Quando o vidro é submetido a altas temperaturas, a sua estrutura sofre uma mudança e a cristalinidade do material aumenta. O pico exotérmico apresentado a 1000⁰C representa o início do processo de cristalização da sílica.

5.4.2 Difração de Raios-X (DRX)

Há, basicamente, 3 polimorfismos nas quitinas que originam quitosanas - formas α , β e γ - que se diferem no arranjo das cadeias nas regiões cristalinas do polímero. A forma mais abundante e estável é a da α -quitina, que possui uma unidade de célula de cadeia dupla com arranjo antiparalelo e forte ligação de hidrogênio intermolecular. Essas quitosanas podem apresentar até 5 regiões de reflexão cristalina em 2θ associadas a 020, 110, 120, 101 e 130, sendo os dois primeiros os mais característicos e referentes aos ângulos 10 e 20^o (Zhang *et*

al., 2005). Comparando-se o padrão cristalino das duas quitosanas utilizadas neste estudo e do vidro bioativo contendo 100% de sílica, observou-se que ambas as quitosanas em seus estados *in natura* apresentaram um pico característico em 2θ a 20° . Em relação ao vidro bioativo, como já esperado, não foram observados picos característicos de cristalinidade (Fig.5.16).

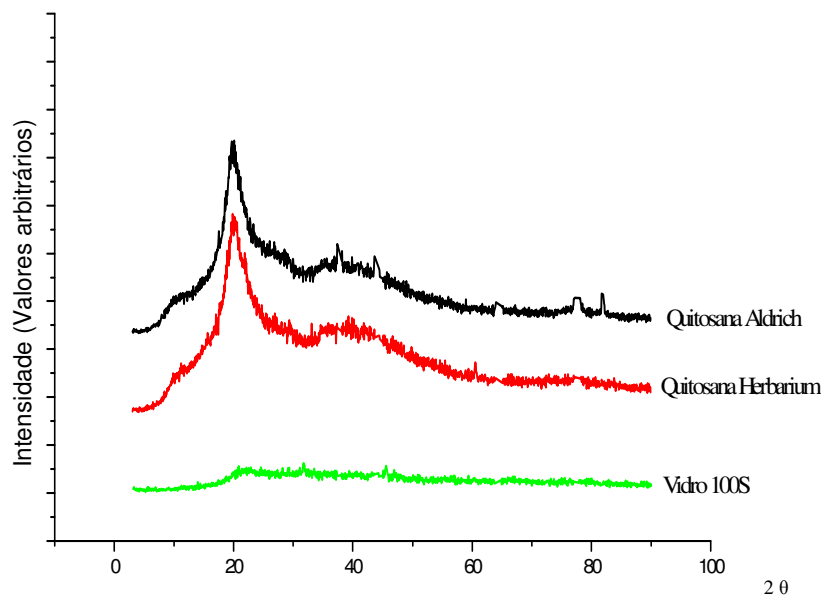
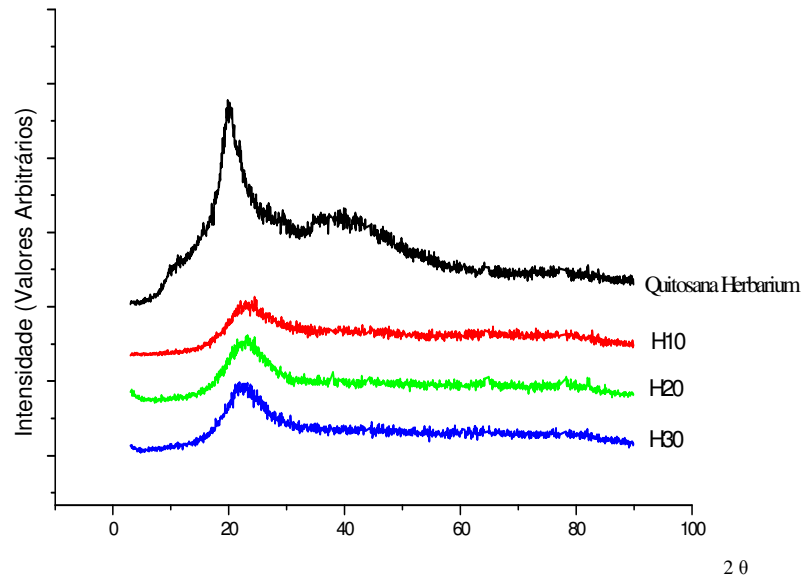


Figura 5.16 Difratogramas comparativos do vidro bioativo 100S e das quitosanas Aldrich e Herbarium.

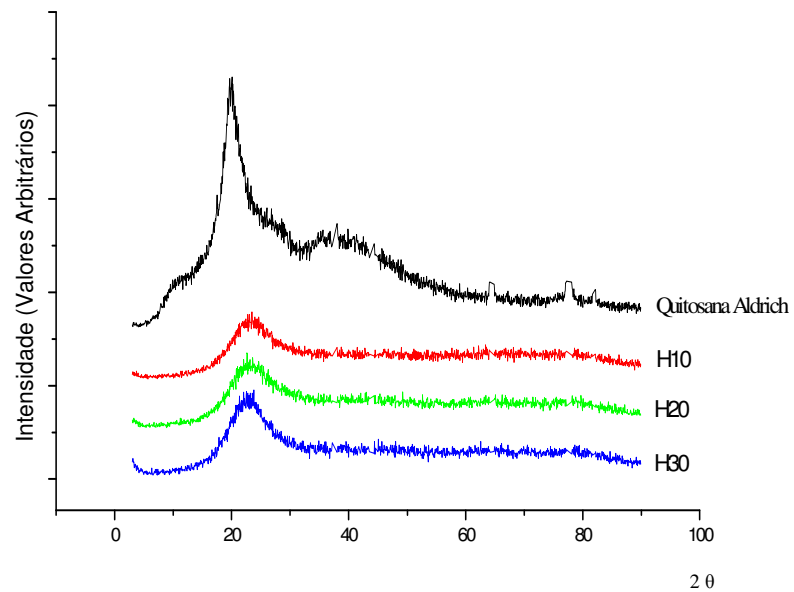
Segundo estudos da literatura, a quitosana possui 2 formas distintas de cristais: I e II. A forma cristalina I é ortorrômbica tendo uma unidade de célula $a=7,76 \text{ \AA}$, $b=10,91 \text{ \AA}$ e $c=10,30 \text{ \AA}$. A reflexão mais intensa ocorre a $2\theta= 11,4^\circ$, que está relacionada à reflexão (110). A forma cristalina II é também ortorrômbica tendo uma unidade de célula $a=4,4 \text{ \AA}$, $b=10,0 \text{ \AA}$ e $c=10,3 \text{ \AA}$. A reflexão mais intensa ocorre a $2\theta= 20^\circ$, que está relacionada à reflexão (100). A quitosana no seu estado natural apresenta uma reflexão mais forte em 2θ a 20° , enquanto a quitosana na forma de filmes produzidos com o ácido acético mostra uma fraca reflexão em 2θ a 20° e uma reflexão mais acentuada a $11,4^\circ$. Este comportamento foi explicado pela mudança parcial da forma cristalina II apresentando uma conformação de cadeias mais constricta para a forma cristalina I, com estrutura de 2θ mais estendida quando a quitosana foi dissolvida no ácido acético para a formação dos filmes (Zong *et al.*, 2000). De fato picos de reflexão a 110 não foram observados neste trabalho, já que apenas quitosanas puras na forma de pós foram analisadas.

Apesar das semelhanças entre as duas marcas de quitosanas, pequenas diferenças podem ser devidas, principalmente, à origem da quitina desacetilada da qual foi processada a quitosana, pois diversos crustáceos podem fornecer a matéria-prima para a sua obtenção. Além disso, a quitosana Herbarium, segundo o fabricante, possui em sua composição pequenas quantidades do ácido ascórbico que possui reflexão a 30° . Outro fator que deve ser considerado e que pode explicar as diferenças de intensidades de picos nos difratogramas das duas quitosanas é grau de desacetilação. De uma maneira geral, verifica-se que as quitosanas possuem menor grau de cristalinidade do que a quitina e, à medida que se aumenta o grau de desacetilação, diminui-se a cristalinidade (Monteiro Júnior, 1999; Zhang *et al.*, 2005). A diminuição do grau de cristalinidade durante a desacetilação da quitina não está associada apenas à remoção ou redução dos grupos acetil na quitosana, mas também às drásticas condições de processamento da quitina e quitosana. O grau de cristalinidade não dá uma relação direta com a presença ou ausência do grupo amina na cadeia polimérica do biopolímero. Diferenças entre a cristalinidade de diferentes quitosanas podem ser observadas, pois se originam também de diferentes quitinas e de diferentes condições de processamento (Monteiro Júnior, 1999).

Os difratogramas dos híbridos sintetizados com ambas as quitosanas são mostrados a seguir, juntamente com as quitosanas utilizadas como componente orgânico em seus estados *in natura* para efeito comparativo (Fig. 5.17a, b).



a)



b)

Figura 5.17 Difratogramas dos híbridos com fase inorgânica 100S e quitosanas Aldrich (a) e Herbarium (b).

Os difratogramas mostraram a presença de apenas um halo característico a 22° de menor intensidade e ligeiramente deslocado para a direita para todos os híbridos sintetizados, já que um pico de grande intensidade a 20° foi observado nas quitosanas puras. Este

deslocamento poderia estar relacionado às maiores distâncias intermoleculares presentes nas cadeias dos híbridos em relação às aquelas das quitosanas, as quais apresentariam maior empacotamento de cadeias. De uma maneira geral, os difratogramas denotaram o caráter essencialmente amorfo destes materiais, o que já era esperado, já que a quantidade relativa do componente inorgânico foi muito maior que a do componente orgânico semicristalino. Resultados parecidos já foram observados na literatura, quando difratogramas de híbridos de quitosana e sílica evidenciaram o caráter amorfo do material, onde os picos cristalinos característicos da quitosana não foram observados no híbrido (Rashidova *et al.*, 2004).

5.4.3 Microscopia Ótica

Amostras híbridas H10, H20 e H30 da quitosana Aldrich foram analisadas por microscopia ótica e as imagens ilustram a estrutura de poros obtida nos três híbridos (Fig. 5.18).

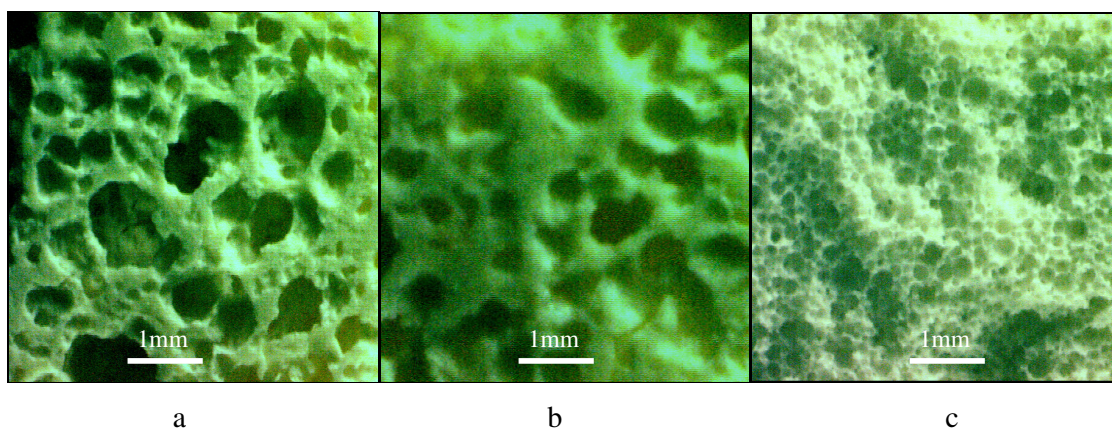


Figura 5.18 Imagens obtidas por microscopia ótica (aumento de 9x) dos híbridos H10 (a), H20 (b) e H30 (c).

As imagens mostram que, à medida que o conteúdo de quitosana aumentou no híbrido, especialmente nas amostras H30, menores foram os poros obtidos. As amostras H10 e H20 apresentaram uma faixa de tamanho de poros mais ampla e um grande número de poros maiores quando comparados aos híbridos H30. Como será discutido posteriormente com as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, a diferença na estrutura de poros dos híbridos H30, em relação aos outros materiais, pode estar relacionada às condições mais desfavoráveis de síntese destes híbridos através do processo sol-gel.

5.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma caracterização dos poros de um híbrido é necessária a fim de avaliarmos a viabilidade de aplicação do mesmo em meios biológicos. A presença de poros com dimensões controladas é importante do ponto de vista da adesão, proliferação e migração das células cultivadas *in vitro* ou das células presentes nos tecidos vivos sobre os quais a matriz híbrida será implantada. A interconectividade entre os poros é importante no desenvolvimento de uma adequada vascularização e nutrição das células em migração e proliferação, essencial para a manutenção das mesmas. Entretanto, a complexidade estrutural encontrada no tecido ósseo (porosidade, irregularidade dos poros, variabilidade de tamanho de poros e interconectividade) é um grande desafio durante a produção e caracterização de matrizes que visam mimetizar este tecido.

Apesar da microscopia eletrônica de varredura permitir uma avaliação mais qualitativa que quantitativa da estrutura de poros do material, através dela pode-se estimar o tamanho de poros e a espessura das paredes dos mesmos. Como principais desvantagens, as imagens obtidas são bidimensionais e os campos de visão são mais limitados, permitindo a visualização de apenas uma fração superficial da amostra. Desta forma, o exame do interior da matriz é comprometido, não fornecendo informações adequadas sobre a interconectividade do material (Ho & Hutmacher, 2006; Jones *et al.*, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada neste trabalho com o intuito de se obter uma visualização da estrutura de poros e uma estimativa da faixa de tamanho de poros do material. A técnica de escolha para o nosso trabalho foi a de difração de elétrons retroespalhados, pois fornece informações sobre o mapa composicional das amostras que, apesar de não fornecer os elementos químicos, permite a visualização das diferenças entre eles. Quanto maior a densidade atômica do componente químico, mais brilhante ele aparecerá na imagem. No nosso trabalho, a imagem gerada por esta técnica facilitou a observação da estrutura de poros do material. As imagens obtidas nos híbridos sintetizados com a quitosana Herbarium são mostradas a seguir (Fig. 5.19a a f).

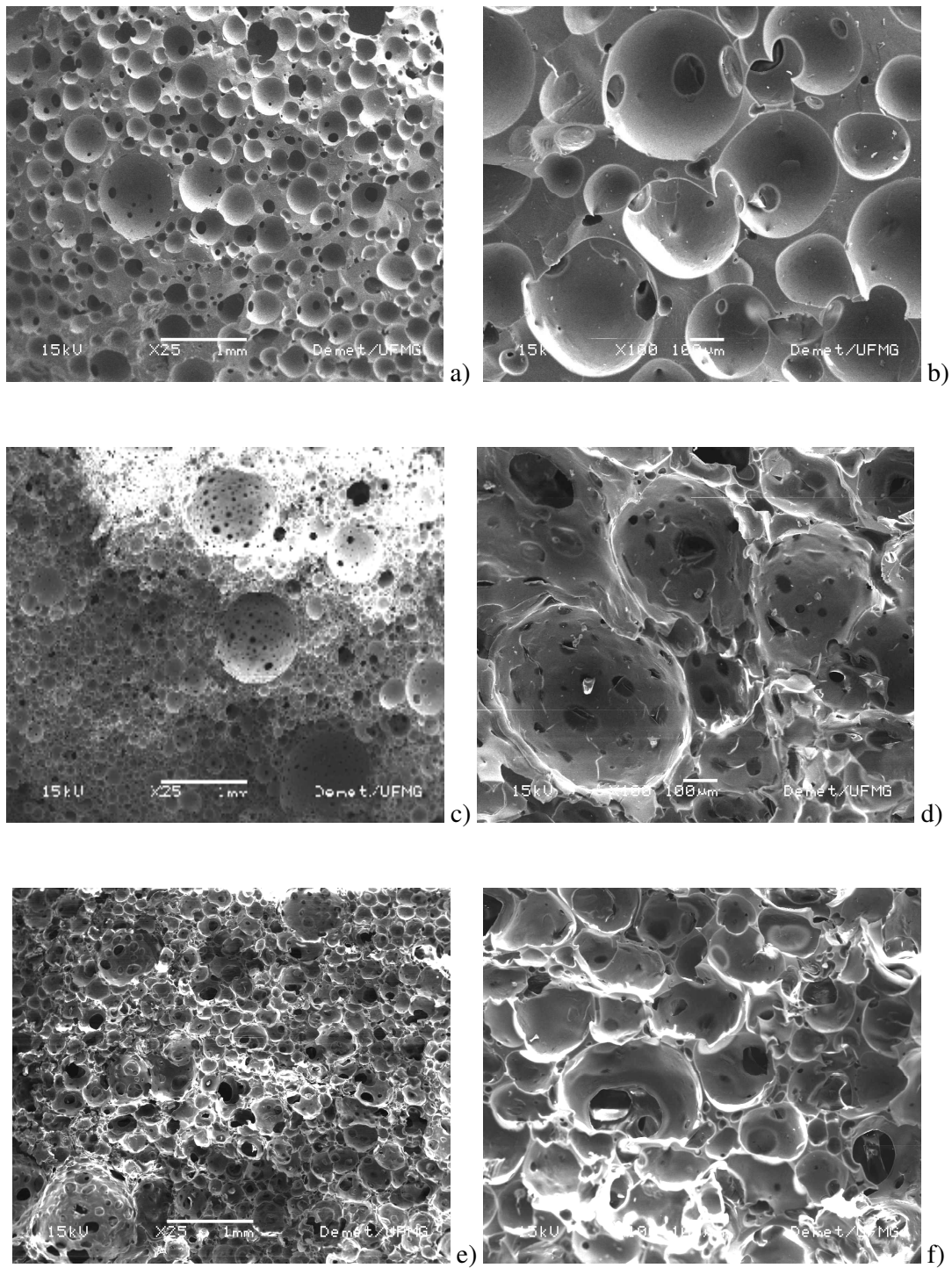


Figura 5.19. Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica e quitosana Herbarium nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 100x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 100x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 100x).

As imagens obtidas mostram que a síntese de híbridos porosos foi possível para as três formulações analisadas quando da utilização da quitosana Herbarium, embora uma análise quantitativa da porosidade do material e da interconectividade não possa ser fornecida adequadamente por esta técnica. Nota-se, entretanto, uma estrutura porosa mais bem definida nos híbridos H10 e H20, onde os mesmos apresentam forma mais regular. Os híbridos H30 apresentaram aspecto mais irregular, embora a presença de poros possa ser observada em todo o material. De fato, à medida que se aumenta a quantidade de solução de quitosana adicionada à solução de vidro, a mistura torna-se mais viscosa e difícil para a formação de espumas. Os híbridos H10 apresentaram uma ampla faixa de tamanho de poros, quando comparado aos outros híbridos, que variou de 80 a 400 μm , com poros menores e maiores distribuídos de maneira mais uniforme pelo material. Como mencionado anteriormente, este padrão pode estar relacionado às condições de síntese dos materiais, já que a formação de espuma foi melhor nestes híbridos. Os híbridos H20 apresentaram uma faixa de tamanho de poros parecida que variou de 100 a 400 μm , mas com predominância dos poros menores na faixa de 100 a 200 μm . A menor faixa de tamanho de poros foi observada em H30, a qual variou de 100 a 250 μm , e cujos poros apresentaram um tamanho mais homogêneo ao longo do material e menor conectividade entre eles. A conectividade entre os poros, apesar de não ser avaliada adequadamente pela microscopia, foi observada mais marcadamente nos híbridos H10 e H20.

Híbridos sintetizados com a quitosana Aldrich de médio peso molecular também foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura e as imagens obtidas são mostradas a seguir (Fig. 5.20a a f).

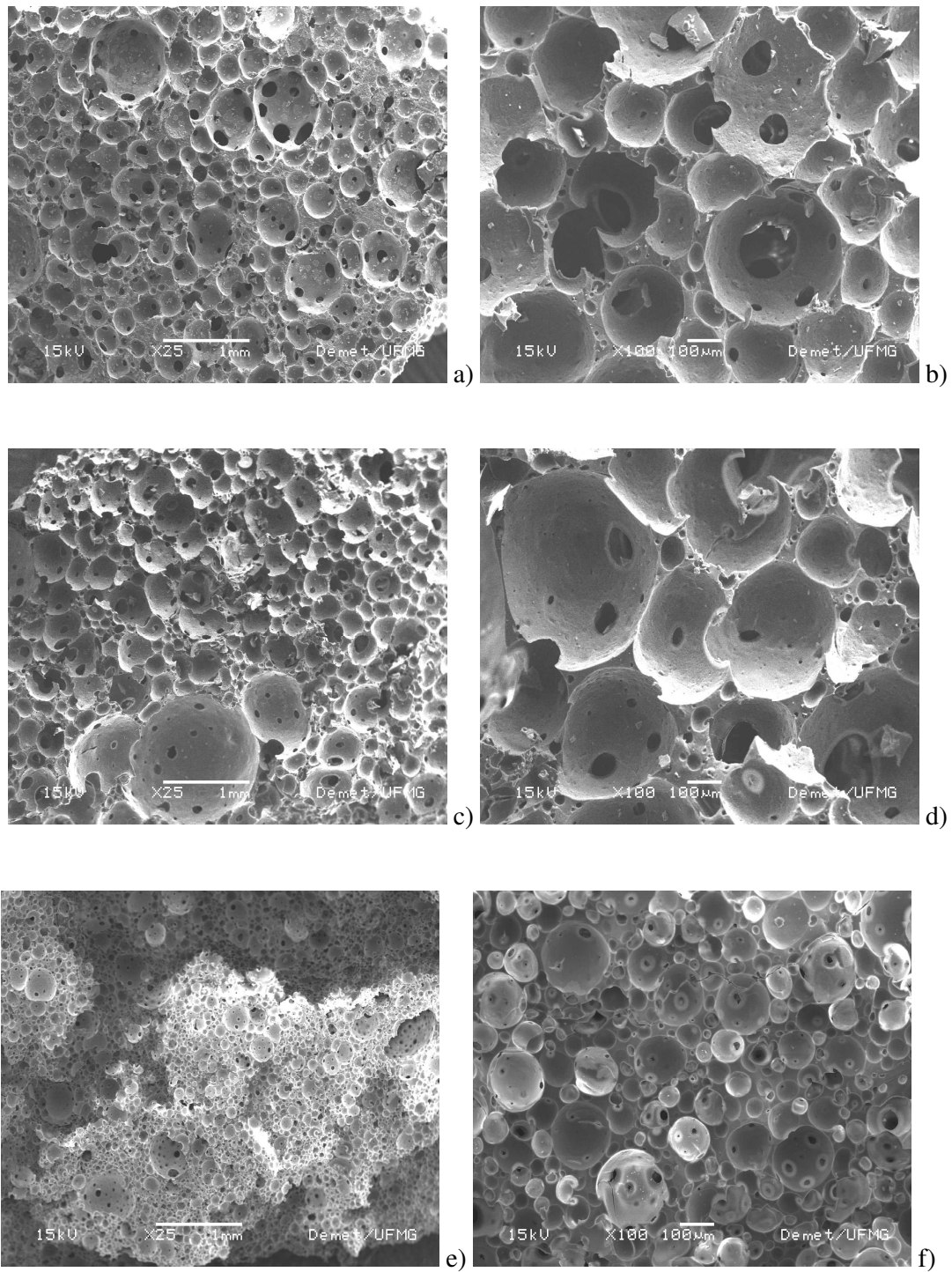


Figura 5.20 Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica e quitosana Aldrich nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 100x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 100x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 100x).

Os híbridos H10 e H20 sintetizados com a quitosana Aldrich mostraram uma estrutura de poros parecida, apresentando uma ampla faixa de tamanho de poros que variou de 100 a 500 μm , com predominância de poros na faixa aproximada de 200 μm . Apesar da impossibilidade de quantificar por esta técnica, a presença de conectividade entre os poros pôde ser notada. Conectividade entre poros e uma faixa de tamanho de poros significativamente menor (50 a 150 μm) foi observada nas amostras H30, o que denota a maior dificuldade de obtenção de espumas com estes híbridos, dificuldade esta também encontrada com a quitosana Herbarium.

Amostras híbridas contendo como fase orgânica a quitosana Aldrich e a fase inorgânica sílica-cálcia (70%SiO₂/30%CaO) foram sintetizadas e também analisadas por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 5.21a a f).

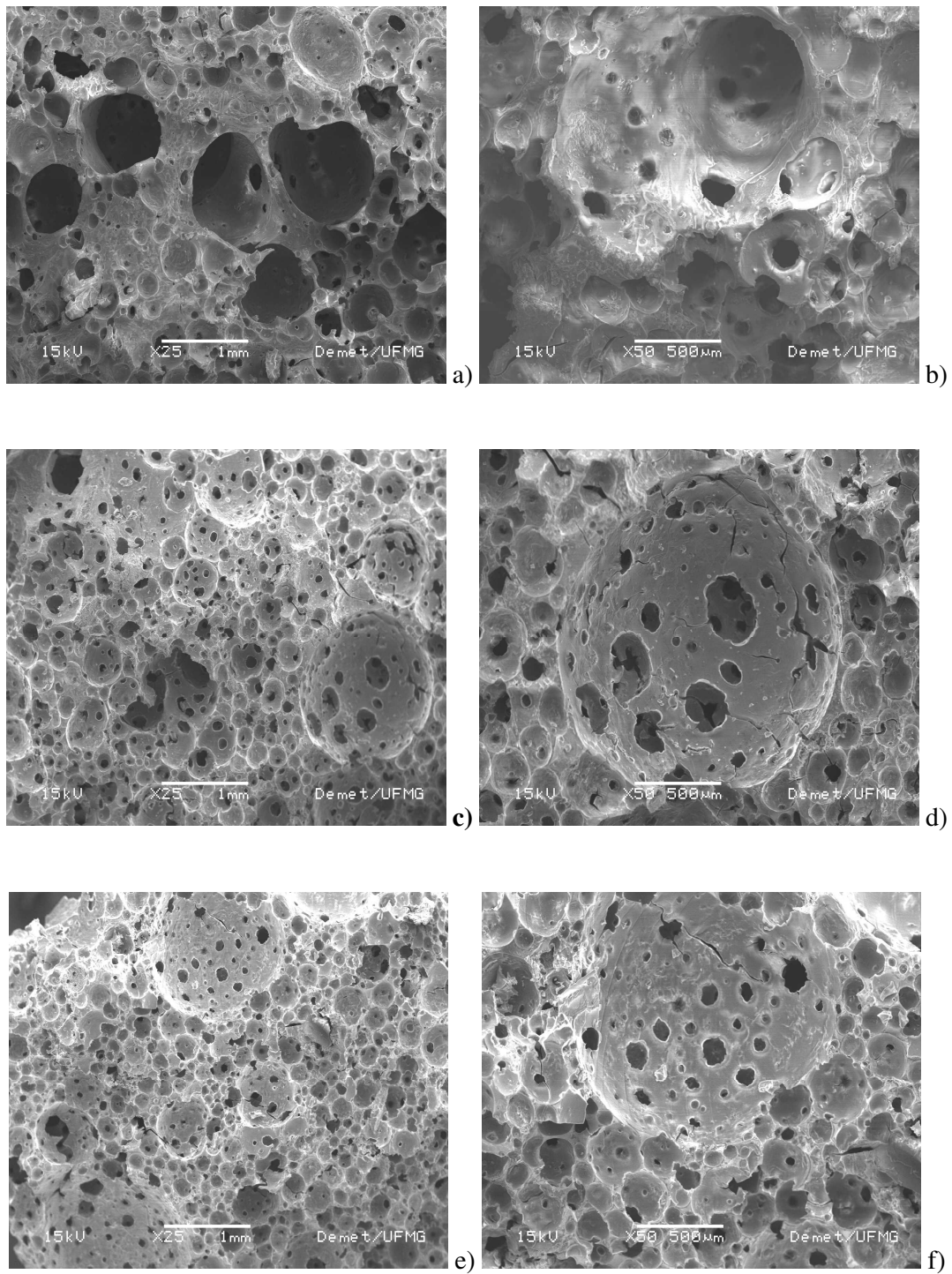


Figura 5.21 Imagens obtidas por MEV de híbridos de sílica-cálcia (70S) e quitosana Aldrich nas diversas composições: a) H10 (aumento de 25x); b) H10 (aumento de 50x); c) H20 (aumento de 25x); d) H20 (aumento de 50x); e) H30 (aumento de 25x) e f) H30 (aumento de 50x).

Nota-se que o padrão apresentado em relação à faixa de tamanho de poros e conectividade entre eles foi parecido com aquele apresentado pelos híbridos 100S, em relação às várias composições avaliadas, com exceção dos híbridos H30 que apresentaram uma faixa de tamanho de poros e conectividade maiores (100 a 250 μ m) em relação aos anteriores.

Nas imagens obtidas de vidro bioativo 100S e 70S podem ser observados uma ampla faixa de tamanho de poros e um padrão de interconectividade maior que o apresentado pelos híbridos sintetizados (Fig. 5.22a, b; Fig. 5.23a, b).

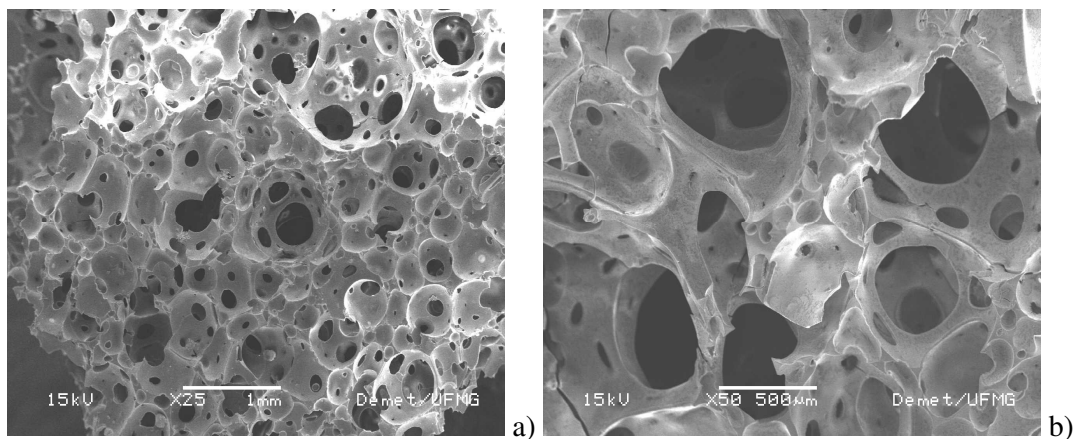


Figura 5.22 Imagens obtidas por MEV de vidro bioativo 100S:
a) aumento de 25x e b) aumento de 50x.

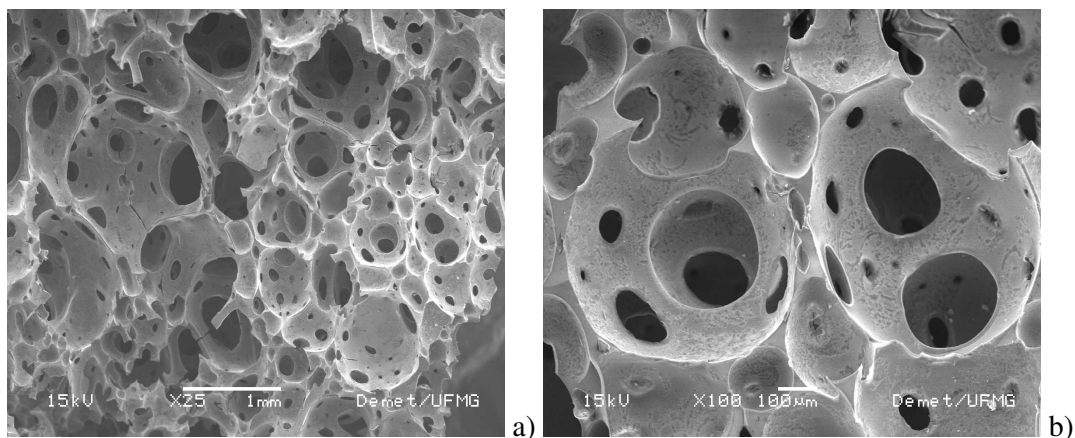


Figura 5.23 Imagens obtidas por MEV de vidro bioativo 70S:
a) aumento de 25x e b) aumento de 100x.

Diante da visualização das matrizes porosas obtidas neste estudo, observa-se que a matriz produzida via sol-gel possui poros mais esféricos, com forma e tamanho homogêneos, diferentes do osso trabecular, cujos poros são mais irregulares na forma e tamanho. As matrizes possuem poros esféricos porque elas são obtidas a partir da produção de bolhas em uma solução que possui em sua composição um agente surfactante que reduz a tensão superficial e estabiliza as bolhas antes da geleificação. A conectividade acontece quando as bolhas esféricas entram em contato umas com as outras antes da geleificação e ficam separadas apenas por uma fina camada de sol. Após a geleificação e processos térmicos, o filme drena e uma contração ocorre, levando à interconectividade (Jones *et al.*, 2007).

Dependendo da aplicação desejada, o tamanho dos poros deve ser cuidadosamente controlado. Na literatura, é postulado que existe uma correlação entre o tamanho de poros de uma matriz e o crescimento de tecido ósseo no seu interior. O tamanho mínimo de poros necessário para possibilitar crescimento ósseo mineralizado é 100 μm (Jones *et al.*, 2004). Grandes poros (100 a 200 μm) permitem crescimento ósseo substancial, ao passo que poros menores (75 a 100 μm) permitem crescimento de tecido não mineralizado. Poros menores (10 a 75 μm) são penetrados apenas por tecido fibroso (Karageorgiou & Kaplan, 2005). A interconectividade entre poros deve situar-se acima de 100 μm de diâmetro para permitir a angiogênese (Atwood *et al.*, 2004). Apesar disso, matrizes porosas com diferentes tamanhos de poros (50, 75, 100 e 125 μm) foram testadas em defeitos ósseos de ratos e todas elas permitiram crescimento de tecido ósseo mineralizado, sugerindo que 100 μm pode não ser o tamanho crítico para crescimento ósseo (Itala *et al.*, 2001). O diâmetro de células em suspensão exige um tamanho mínimo de poros, que pode variar de um tipo celular para outro (Yang *et al.*, 2001; Gross & Rodríguez-Lorenzo, 2004). O efeito do tamanho dos poros do biomaterial é mostrado em outro estudo na literatura que mostra um tamanho de poro ideal de 5 μm para permitir revascularização, 5 a 15 μm para crescimento de fibroblastos, aproximadamente 20 μm para crescimento de hepatócitos, 20 a 125 μm para regeneração de tecido epitelial, 40 a 100 μm para crescimento de osteócitos e de 100 a 350 μm para permitir regeneração óssea (Whang, Joseph & Bonfield, 1998). É importante salientar que o conceito de material poroso, sob a ótica da biocompatibilidade, está fundamentado em dimensões de poros completamente diferentes do que é usualmente utilizado para a Química, onde materiais macroporosos apresentam poros com dimensões maiores que 50nm. Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é

necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 μ m) (Kawachi *et al.*, 2000).

Levando-se em consideração estes parâmetros, pode-se concluir que o sistema sílica/sílica-cálcia-quitosana pode ser uma alternativa interessante para produção de matrizes porosas, embora uma análise quantitativa da estrutura de poros e da interconectividade deva ser realizada.

5.4.5 Avaliação da porosidade - Técnica da Balança de Arquimedes

Através da técnica da Balança de Arquimedes foi possível calcular a densidade volumétrica (ρ volumétrica) e as porosidades aparente (P aparente) e total (P total) dos híbridos sintetizados. A densidade verdadeira (ρ verdadeira) foi obtida pela Picnometria de Hélio. Os valores obtidos para os híbridos H10, H20 e H30 Herbarium são mostrados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 Valores obtidos para as densidades verdadeira e volumétrica e porosidades aparente e total para os híbridos H10, H20 e H30 Herbarium.

Híbridos	ρ verdadeira (g/cm ³)	ρ volumétrica (g/cm ³)	P aparente (%)	P total (%)
H10 Herbarium	1,99 \pm 0,02	0,203 \pm 0,005	80,53 \pm 0,08	89,79 \pm 0,08
H20 Herbarium	1,85 \pm 0,01	0,268 \pm 0,006	79,53 \pm 0,06	85,52 \pm 0,02
H30 Herbarium	1,74 \pm 0,02	0,384 \pm 0,003	74,55 \pm 0,05	77,86 \pm 0,03

A porosidade é o conjunto de vazios ou cavidades de diversas formas e tamanhos que fazem parte da estrutura do material. Se as cavidades estão isoladas no interior do material temos uma porosidade fechada, enquanto que, no caso de poros interconectados que afloram na superfície, temos porosidade aberta. Os valores de porosidade aparente referem-se aos poros abertos presentes no material, ao passo que a porosidade total corresponde o volume ocupado pelos poros abertos e fechados. Como pode ser observado pelos valores obtidos, os valores de porosidade total e aparente foram menores à medida que o conteúdo de quitosana aumentou nos híbridos. Estes resultados, juntamente com aqueles obtidos pelas imagens de MEV, mostram que os híbridos H30 apresentaram uma estrutura de poros mais desfavorável do ponto de vista da produção de matrizes para crescimento ósseo.

É necessário salientar que, devido ao aspecto complexo das estruturas porosas, atualmente não há um padrão ou um método preciso para a descrição e caracterização geométrica correta das mesmas. A avaliação da porosidade e do diâmetro médio de poros de um determinado material poroso é freqüentemente utilizada para caracterizar o mesmo, mas não constitui uma representação real da sua natureza (Coelho, 2003).

5.4.6 Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho fornece informações através das frequências e intensidades das bandas de absorção que podem ser úteis na determinação dos processos químicos envolvidos em determinadas reações e na identificação das espécies químicas formadas (Coates, 2000). Quando se inicia o processo sol-gel, as partículas de sílica de pequenas dimensões são formadas devido às condições ácidas deste método. Em seguida, estas partículas agregam-se para formar os aglomerados. Quando a quitosana está presente na solução, ela pode interagir com a sílica através de uma variedade de interações, incluindo ligações de hidrogênio e ligações do tipo Si-O-C que, por sua vez, manterão as partículas de sílica próximas umas das outras e facilitarão a formação dos híbridos. Portanto, a quitosana tem o potencial para servir como conexão para as partículas de sílica (Hu *et al.*, 2001). Para melhor estudar estas interações, uma análise por espectroscopia de infravermelho é essencial. A espectroscopia de infravermelho (FTIR) é um método capaz de fornecer informações sobre o efeito da adição da fase polimérica à fase cerâmica, bem como das interações entre as duas fases o que poderia indicar a efetividade da síntese do híbrido.

As principais bandas características da quitosana e da sílica presentes nos híbridos sintetizados foram pesquisados na literatura e podem ser visualizados na tabela a seguir (Tab. 5.7).

Tabela 5.7 Principais bandas identificadas na literatura no espectro de FTIR para amostra de quitosana e vidro bioativo à base de sílica

Frequências	Associação	Referências
465 cm ⁻¹	460-470cm ⁻¹ (dobramento Si-O-Si)	5 e 6
798 cm ⁻¹	780-800 cm ⁻¹ (estiramento simétrico Si-O-Si)	5, 6 e 12
898 cm ⁻¹	900cm ⁻¹ (C-C)	1 e 2
967 cm ⁻¹	950-967cm ⁻¹ (estiramento Si-OH)	5, 6, 12 e 13
1000-1100 cm ⁻¹	1020-1190 cm ⁻¹ (estiramento assimétrico Si-O-Si)	5, 6, 12 e 13
1000-1100 cm ⁻¹	1030-1078cm ⁻¹ (estiramento C-O)	4, 2 e 12
1000-1100 cm ⁻¹	1000-1100cm ⁻¹ (Si-O-C)	13, 15 e 16
1160 cm ⁻¹	1154cm ⁻¹ (estiramento assimétrico C-O-C)	12, 14
1320 cm ⁻¹	1313-1464m ⁻¹ (estiramento CH₂)	3, 7, 8, 10
1321 cm ⁻¹	1323 cm ⁻¹ (estiramento acil quitina)	10
1560 cm ⁻¹	1557-1560cm ⁻¹ (amida II: dobramento N-H)	1, 2, 4, 7, 10 e 11
1630 -1640 cm ⁻¹	1640cm ⁻¹ (moléculas de água adsorvidas)	2, 4 e 5
1655 cm ⁻¹	1626-1700cm ⁻¹ (amida I: estiramento carbonila-C=O)	1, 2, 4, 7, 9, 10, 11 e 12
2930 cm ⁻¹	2828-2950cm ⁻¹ (estiramento CH)	2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8
3400 cm ⁻¹	3269-3500cm ⁻¹ (estiramento NH)	1 e 2
3450 cm ⁻¹	3400-3600cm ⁻¹ (estiramento OH nas moléculas de água)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10

(1)Pinotti *et al.*, 2007; (2) Duarte *et al.*, 2002; (3) Shirosaki *et al.*, 2005; (4) Shigemasa *et al.*, 1996; (5) Pereira, Jones & Hench, 2005; (6) Yoo & Rhee, 2004; (7) Monteiro Júnior, 1999; (8) Zong *et al.*, 2000; (9) Gupta & Jabrail, 2006; (10) Paulino *et al.*, 2005; (11) Yang, Wang & Tan, 2004; (12) Martinez *et al.*, 2004; (13) Liu, Su & Lai, 2004; (14) Osman & Arof, 2003; (15) Rashidova *et al.*, 2004; (16) Yeh, Chen & Huang, 2006.

Estudos na literatura associam os picos da fase inorgânica relacionados à presença da sílica às bandas de absorção que variam de 1150-1020, 950-900, 800-780 e 460-470 cm^{-1} , onde se caracterizam respectivamente as regiões de absorção de ligações Si-O-Si (modo de estiramento assimétrico), ligações Si-OH (modo de estiramento), ligações Si-O-Si (modo de estiramento simétrico) e ligações Si-O-Si (modo de dobramento) (Yoo & Rhee, 2004; Martinez *et al.*, 2004; Liu, Su & Lai, 2004; Pereira, Jones & Hench, 2005).

Os espectros da quitina e quitosana caracterizam-se pela presença de banda na região entre 3400 e 3500 cm^{-1} intensa e larga devido às vibrações de estiramento do grupo OH presente nos polímeros e na água que acompanha o polímero e permanece presente em todos os espectros das quitosanas derivadas (Shigemasa *et al.*, 1996; Monteiro Júnior, 1999; Duarte *et al.*, 2002; Yoo & Rhee, 2004; Yang, Wang & Tan, 2004; Shirosaki *et al.*, 2005; Paulino *et al.*, 2005; Pinotti *et al.*, 2007; Grupta & Jabrail, 2006). As quatro bandas consideravelmente fortes, observadas entre 1700 e 1300 cm^{-1} são bem características destes biopolímeros. A banda a 1655-1630 cm^{-1} é atribuída ao modo de estiramento da carbonila (C=O) presente e denominada amida I e a banda a 1557-1560 cm^{-1} corresponde à mistura de 2 modos vibracionais, dobramento da ligação N-H e estiramento de C-H, sendo denominada amida II (Shigemasa *et al.*, 1996; Monteiro Júnior, 1999; Duarte *et al.*, 2002; Yang, Wang & Tan, 2004; Paulino *et al.*, 2005; Grupta & Jabrail, 2006; Pinotti *et al.*, 2007).

Quando se compara os espectros da quitina e quitosana verificam-se modificações significativas na região entre 1700 e 1300 cm^{-1} . O desaparecimento da banda a 1558 cm^{-1} e o surgimento de uma nova banda a 1598 cm^{-1} , devido à deformação NH_2 , predomina sobre a banda em 1654 cm^{-1} , que está associada à carbonila C=O e tende a diminuir conforme se aumenta o GD da quitosana. O desaparecimento das bandas entre as regiões 3200 e 3100 cm^{-1} está relacionado à desacetilação do grupamento NHCOCH_3 transformando a amida em amina primária (Monteiro Júnior, 1999).

Os espectros referentes às quitosanas utilizadas neste trabalho podem ser visualizados a seguir (Fig. 5.24).

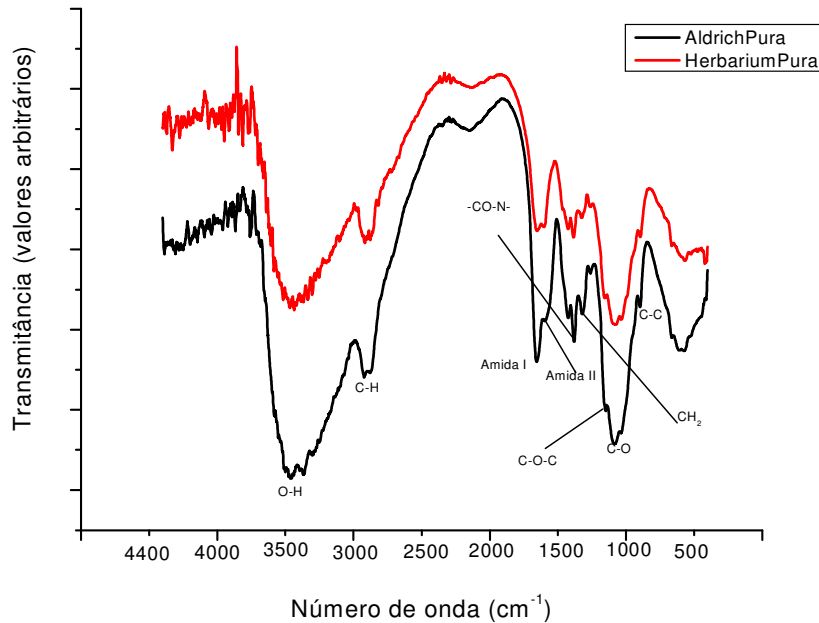


Figura 5.24 Espectro FTIR das quitosanas utilizadas como fase orgânica dos híbridos

Pôde ser notado que os espectros de ambos os materiais são bastante semelhantes e as bandas correspondentes foram as esperadas baseando-se nos estudos da literatura. Uma diferença marcante refere-se à banda associada à amida I, que mostrou um pico mais intenso na quitosana Aldrich. Isto poderia ser explicado pela diferença de GD das quitosanas estudadas, já que esta característica influencia a intensidade de absorção da amida I (1655 cm^{-1}), pois quando a quitina é desacetilada há uma tendência à diminuição de intensidade desta banda (Paulino *et al.*, 2005). O GD da quitosana Aldrich é fornecido pelo fabricante ($>75\%$), ao passo que o ensaio H NMR possibilitou a determinação do GD da quitosana comercial Herbarium (85%), portanto, maior que o GD do outro material, e mostrando que realmente este fator influenciou a intensidade de absorção da amida I. De forma similar, a banda correspondente ao grupamento -CO-N- (estiramento do grupo acil da quitina) na região 1321 cm^{-1} mostrou uma intensidade maior na quitosana Aldrich, o que pode ser explicado também pelo menor GD desta quitosana, que leva à maior presença destes grupos no carbono 2 da sua cadeia polimérica. Como se sabe, a desacetilação completa da quitina é um procedimento inviável, de modo que todas as quitosanas possuem “um pouco de quitina em sua estrutura”.

Os híbridos de vidro bioativo (100S) contendo 10, 20 e 30% de ambas as quitosanas foram analisados por FTIR a fim de se verificar a interação entre as 2 fases e o efeito da adição do polímero nesta interação (Fig. 5.25 e 5.26).

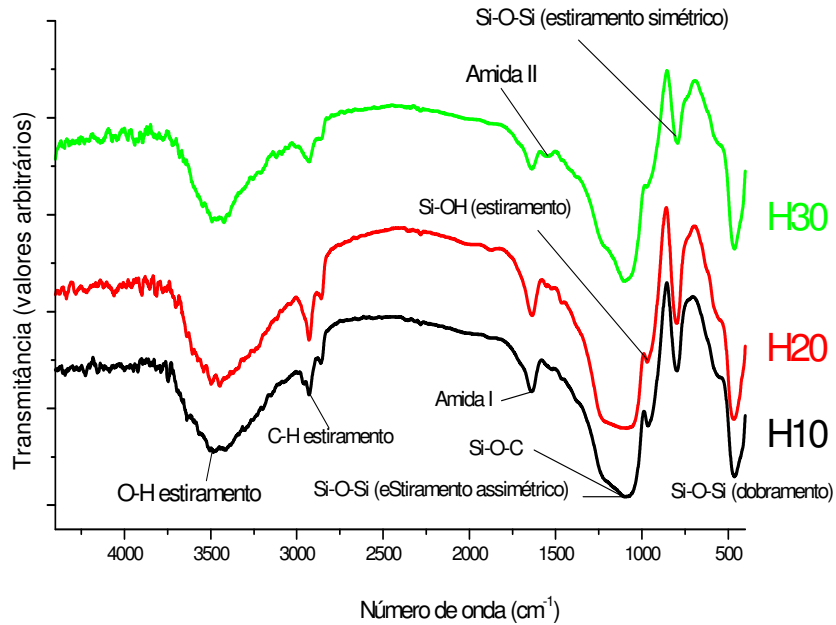


Figura 5.25 Espectro FTIR dos híbridos H10, H20 e H30 Aldrich.

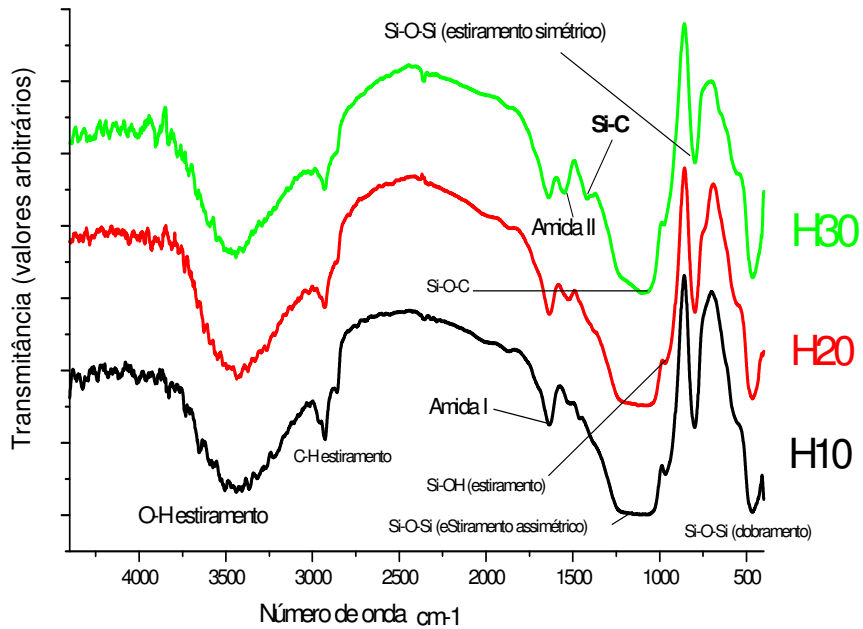


Figura 5.26 Espectro FTIR dos híbridos H10, H20 e H30 Herbarium.

Há uma certa controvérsia na literatura quanto ao comportamento do espectro FTIR no que se refere à modificação das bandas da amida I e II da quitosana quando da incorporação da sílica na síntese de híbridos. Alguns estudos mostraram diminuição de intensidade ou ausência da banda referente à amida II (Liu, Su & Lai, 2004; Deriu *et al.*, 2005; Yeh, Chen & Huang, 2006), enquanto outros mostraram a ausência das bandas referentes à amida I e II (Rashidova *et al.*, 2004; Yang, Wang & Tan, 2004). Os espectros dos híbridos sintetizados neste trabalho com as quitosanas Aldrich e Herbarium mostraram ausência completa da banda da amida II (1560 cm^{-1}) em H10 e uma diminuição muito acentuada nos híbridos H20 e H30 em relação às quitosanas puras. As bandas referentes à amida I (1650 cm^{-1}) estavam presentes em todos os híbridos e foram maiores nos híbridos H10 e H20 do que em H30 em ambos os grupos de quitosana.

A presença de bandas referentes à ligação Si-O-C na faixa de 1000 a 1100 cm^{-1} é documentada na literatura quando da síntese de híbridos de quitosana e sílica (Hu *et al.*, 2001; Rashidova *et al.*, 2004; Liu, Su & Lai, 2004; Yeh, Chen & Huang, 2006) e pôde ser observada em todos os híbridos sintetizados neste trabalho. Esta banda mostrou intensidade parecida em todos os híbridos testados e significativamente maior que o pico referente ao da quitosana pura, o que pode ser um forte indício da interação entre os dois materiais. A diminuição crescente das bandas referentes aos grupos silanol do vidro e a diminuição das bandas da amida I à medida que o conteúdo de quitosana aumentou no híbrido, também reforçam esta afirmativa. Este comportamento já foi observado em um estudo na literatura (Rashidova *et al.*, 2004), segundo o qual a modificação do espectro FTIR referente às bandas da amida I e dos grupos silanol poderia prever a existência das seguintes ligações entre os dois materiais: a) ligações de hidrogênio entre os grupos silanol da rede de sílica e os grupos amidas da quitosana e b) ligações iônicas entre os grupos silanol da sílica e grupos aminas da quitosana, conforme esquema hipotético mostrado na figura 5.27 pelos autores. Há que se salientar, entretanto, que a presença de bandas na faixa de 1000 a 1100 cm^{-1} para os híbridos de sílica e quitosana pode ser de difícil interpretação, já que esta faixa de comprimento de onda pode estar associada também à presença de ligações Si-O-Si (estiramento assimétrico) do vidro (1070 cm^{-1}) e de ligações C-O ($1030\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$) presentes nas quitosanas.

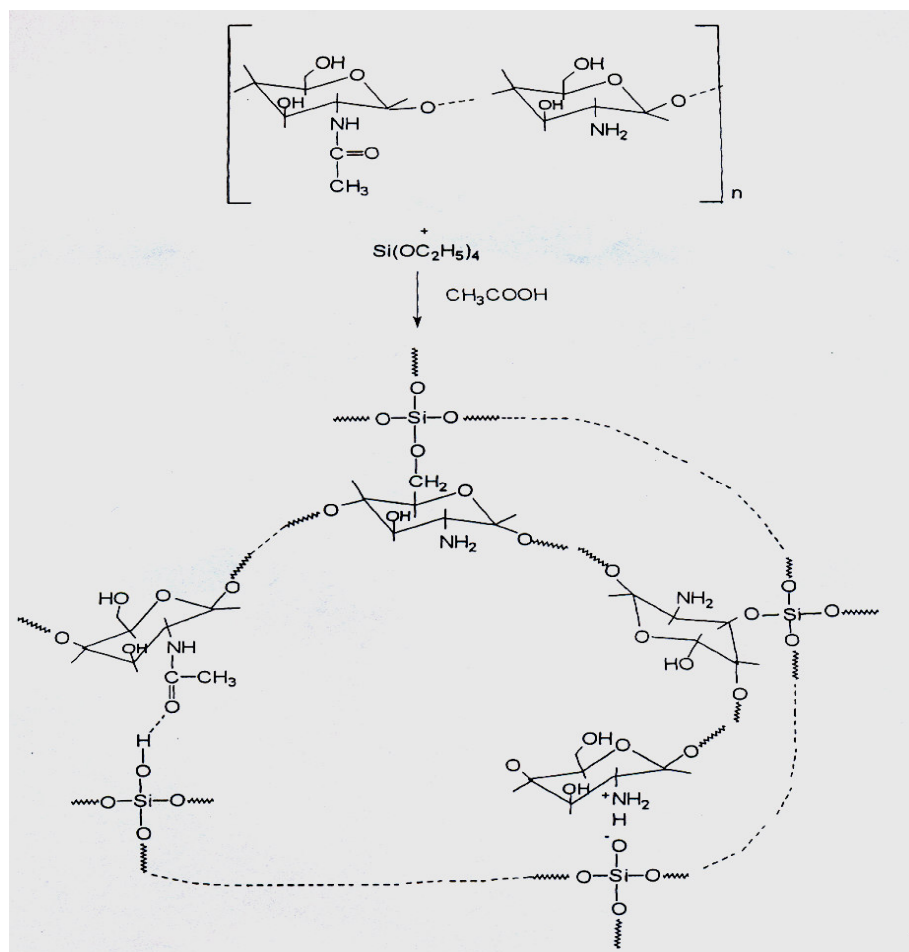


Figura 5.27 Esquema hipotético da interação entre a sílica e a quitosana.
(Adaptado de Rashidova *et al.*, 2004)

Uma outra alteração observada nos híbridos H30 Herbarium sintetizados neste trabalho foi o estreitamento da banda localizada na faixa de 1100 cm^{-1} , referente às ligações Si-O-Si, e o aparecimento de uma banda a 1400 cm^{-1} . Resultados semelhantes já foram encontrados em outro estudo na literatura, onde esta banda ficou evidenciada à medida que o conteúdo de quitosana aumentou em proporção em um híbrido com a sílica (Deriu *et al.*, 2005). Estes autores associaram a banda à presença de ligações do tipo Si-C, que poderia sugerir uma interação entre as fases orgânica e inorgânica do híbrido.

Híbridos contendo a fase inorgânica composta por 70% de sílica e 30% de cálcio também foram analisados por FTIR e comparados com híbridos 100S (Fig. 5.28). Em vidros binários e terciários, contendo cálcio e fósforo pode-se esperar um espectro diferente. A relação entre a intensidade dos picos correspondentes à ligação Si-O-Si (1050 cm^{-1}) e ligação Si-OH (950 cm^{-1}) fornece informações sobre a efetividade da introdução dos precursores de

cálcio e fósforo no reticulado tridimensional da sílica. A presença de menores razões entre Si-O-Si e Si-OH é esperada para composições com maior porcentagem de sílica e menores de cálcio e fósforo. A incorporação de ligações Ca-O nos reticulados de sílica pode resultar em uma diminuição gradual dos compostos Si-OH, por substituição, dando origem a ligações do tipo Si-O-Ca (Pereira, Vasconcelos & Oréfica, 1999). Em outro estudo, quando a concentração de CaO atingiu uma proporção de 36% em mol no vidro à base de sílica, o pico em torno de 938 cm^{-1} associado ao estiramento da ligação Si-O-Ca começou a aparecer (Coelho, 2003).

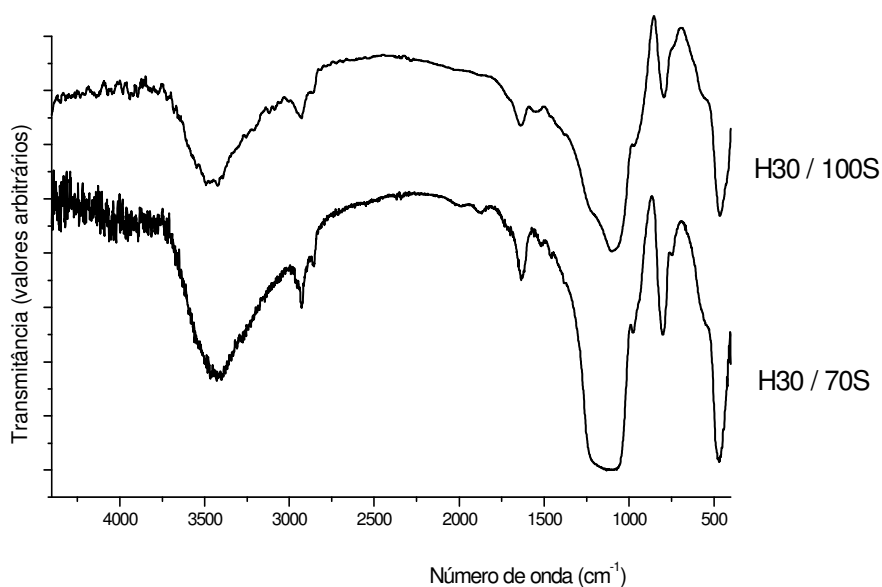


Figura 5.28 Espectro FTIR comparativo dos híbridos H30 Aldrich com fase inorgânica 100S e 70S.

Comparando-se híbridos H30 de quitosana Aldrich com e sem cálcio incorporado na fase inorgânica, não foi observado o “ombro” evidenciado na região referente à ligação Si-O-Ca (938 cm^{-1}) como no trabalho anterior, nem tampouco uma diminuição na intensidade do pico referente à ligação Si-OH, também já citado. Nas condições ácidas presentes no processamento sol-gel, os íons cálcio têm pouca possibilidade de formar uma rede com o silício, o que poderia explicar a ausência de bandas referentes a estas ligações. Apesar disto, uma possível interação entre os íons cálcio incorporados com a quitosana pode ser esperado, como já documentado na literatura (Viala, Freche & Lacout, 1996; Zhang & Zhang, 2001; Aimoli & Beppu, 2004).

5.4.7 Ensaio Mecânico de Compressão

Quando avaliamos as propriedades de um determinado material híbrido, devemos sempre levar em consideração as características de cada um dos componentes em separado. Como já mencionado, o comportamento mecânico do vidro bioativo tem limitado a sua utilização como matriz para crescimento tecidual devido, principalmente, à sua natureza frágil e à baixa tenacidade à fratura. Entretanto, a utilização de cerâmicas bioativas no projeto de materiais híbridos é muito atrativa, visto que elas têm demonstrado capacidade de formação da camada de HCA sobre a sua superfície, fator altamente favorável para alcançarmos sucesso no processo de regeneração óssea (Wang, 2003; Kokubo, Kim & Kawashita, 2003; Pereira *et al.*, 2005b).

Os resultados do ensaio mecânico de compressão dos híbridos não porosos com as quitosanas Herbarium e Aldrich e sílica (100S) ou sílica-cálcia (70S) são mostrados a seguir (Tab. 5.8 e Fig. 5.29). Apesar destes híbridos não serem indicados para a produção de matrizes devido à ausência de porosidade, podem ser úteis na produção de outros biomateriais como membranas (Suzuki & Mizushima, 1997; Park *et al.*, 2001; Liu, Su & Lai, 2004; Shirotsaki *et al.*, 2005; Yeh, Chen & Huang, 2006), géis para imobilização de enzimas (Yang, Wang & Tan, 2004; Deriu *et al.*, 2005), aerogéis (Ayers & Hunt, 2001; Hu *et al.*, 2001) e em aplicações na cromatografia (Rashidova *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004). Esta avaliação pode trazer informações importantes sobre o efeito da quantidade de quitosana adicionada nas propriedades mecânicas dos híbridos, embora os valores obtidos não possam ser necessariamente indicativos de comportamento destes materiais nas formas porosas, pois não levam em consideração a influência de agentes externos inerentes ao procedimento de síntese, como a incorporação dos agentes surfactantes, tempo e temperatura de mistura.

Tabela 5.8 Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos não porosos em diversas composições.

Amostras Não Porosas	Deformação à Tensão Máxima Média (%)	Tensão Máxima à Fratura Média (MPa)
Vidro Bioativo 100 S	3,33 ± 2,06	0,79 ± 0,18
H10 Herbarium	8,51 ± 1,61	1,66 ± 0,39
H20 Herbarium	8,30 ± 1,15	1,67 ± 0,25
H30 Herbarium	6,64 ± 2,55	8,44 ± 2,33
H10 Aldrich	6,91 ± 1,04	2,80 ± 0,39
H20 Aldrich	8,52 ± 2,59	4,29 ± 0,90
H30 Aldrich	10,69 ± 3,15	12,89 ± 1,93
H20 Aldrich APM	9,13 ± 3,20	1,55 ± 0,18
H20 Aldrich 10% Glicerol (v/v)	18,41 ± 8,79	4,51 ± 0,53
H20 Aldrich 20% Glicerol (v/v)	9,07 ± 2,37	0,43 ± 0,06
H20 Aldrich 30% Glicerol (v/v)	11,58 ± 2,21	0,57 ± 0,13
Vidro Bioativo 70S	15,00 ± 4,92	1,66 ± 0,13
H20 Aldrich 70S	13,51 ± 2,03	2,48 ± 0,44

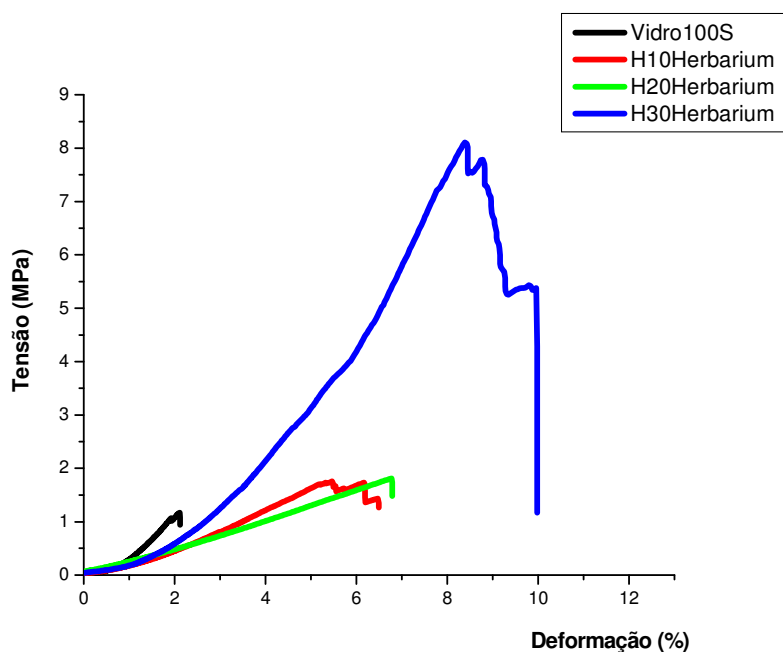


Figura 5.29 Curvas tensão x deformação de híbridos não-porosos da quitosana Herbarium e sílica.

A análise dos valores obtidos e do gráfico ilustrativo indica um comportamento diferenciado das amostras H30 da quitosana Herbarium em relação aos grupos H10 e H20, apresentando um valor da tensão máxima à fratura significativamente superior. A deformação máxima à fratura foi parecida nos três híbridos e significativamente superior ao do vidro bioativo 100S. Este resultado preliminar indica que a quitosana Herbarium poderia ser utilizada para a síntese de híbridos com sílica para melhorar as suas propriedades mecânicas. Neste caso, para a síntese de híbridos não porosos, uma quantidade de quitosana em 30% por peso trouxe os melhores resultados. A tentativa de incorporação de quitosana numa proporção de 40 e 50% foi tentada, mas resultou em materiais gelatinosos sem propriedades mecânicas adequadas.

Os híbridos sintetizados com a quitosana Aldrich mostraram um comportamento parecido com o dos outros híbridos (Fig. 5.30). O híbrido H30 da quitosana Aldrich também mostrou um comportamento diferenciado, com valores de tensão máxima à fratura significativamente superiores aos demais. A tensão máxima à fratura foi proporcional à quantidade de quitosana adicionada, embora este fator não tenha mostrado influência nos valores de deformação máxima à fratura, que foram relativamente parecidos nos três grupos de híbridos.

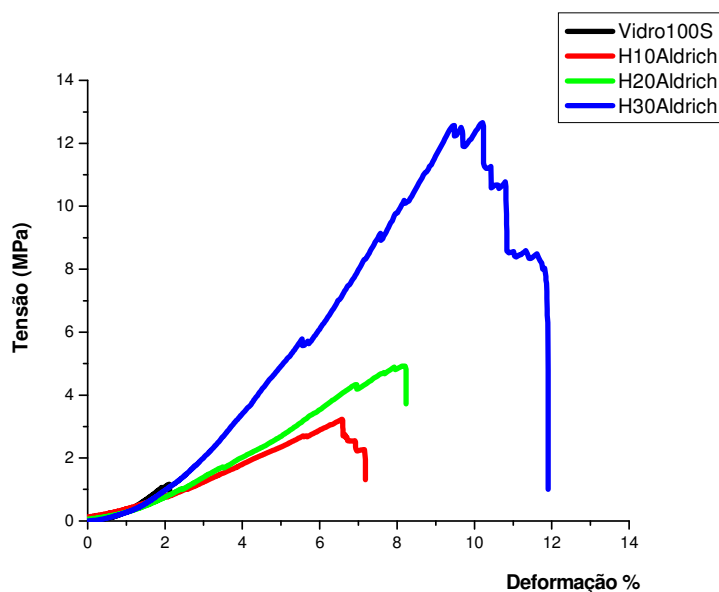


Figura 5.30 Curvas tensão x deformação de híbridos não-porosos da quitosana Aldrich e sílica.

Esses resultados podem indicar que a quantidade de quitosana adicionada teve uma influência significativa no comportamento mecânico dos híbridos deste estudo. Entretanto, é importante salientar que os híbridos designados aqui como “não porosos”, na verdade, podem possuir poros em níveis nanométricos ou micrométricos em sua estrutura. Estes poros são inerentes às condições do processo sol-gel utilizado para a síntese dos híbridos e podem ser fatores importantes na determinação do comportamento mecânico destes materiais.

Comparando-se os grupos de híbridos com quitosana Aldrich e Herbarium, nota-se que valores mais altos de tensão máxima à fratura foram obtidos no grupo Aldrich. No caso específico da quitosana, o peso molecular e o grau de desacetilação são fatores que afetam a sua solubilização e podem ser determinantes nas propriedades mecânicas destes materiais. Durante o processamento sol gel, a solução sol-gel é adicionada e misturada à solução de quitosana até que o processo de geleificação do sistema ocorra. O alto grau de desacetilação apresentado pela quitosana Herbarium (85% medido anteriormente por ressonância magnética nuclear no estado líquido) permitiu uma solubilização mais fácil deste polímero e a solução apresentou-se menos viscosa durante a mistura com a solução de vidro. Embora a solubilização da quitosana Aldrich tenha se mostrado facilitada, a solução resultante apresentou-se mais viscosa, o que poderia ser explicado pelo GD da quitosana (75-85%) e do seu peso molecular representado pela viscosidade (200-800 cps). A origem e a forma de processamento para a obtenção das quitosanas podem, também, ter influência neste comportamento. Por se tratar de uma quitosana muito utilizada em pesquisas científicas, presume-se que a quitosana Aldrich possua maior pureza e um controle de processamento mais apurado que a quitosana comercial Herbarium, que inclusive apresenta em sua composição o ácido ascórbico. A presença de impurezas no material pode levar a uma situação em que a presença de pequenas porções do polímero não se dissolvam adequadamente no processo sol-gel, embora uma análise mais apurada desta quitosana não tenha sido realizada neste trabalho.

Além da comparação do comportamento mecânico apresentado pelos híbridos de acordo com as quitosanas utilizadas neste trabalho, uma outra variável, o peso molecular da quitosana, também foi avaliada. Desta forma, híbridos H20 sintetizados com a quitosana Aldrich de alto peso molecular foram submetidos ao ensaio mecânico (Fig. 5.31).

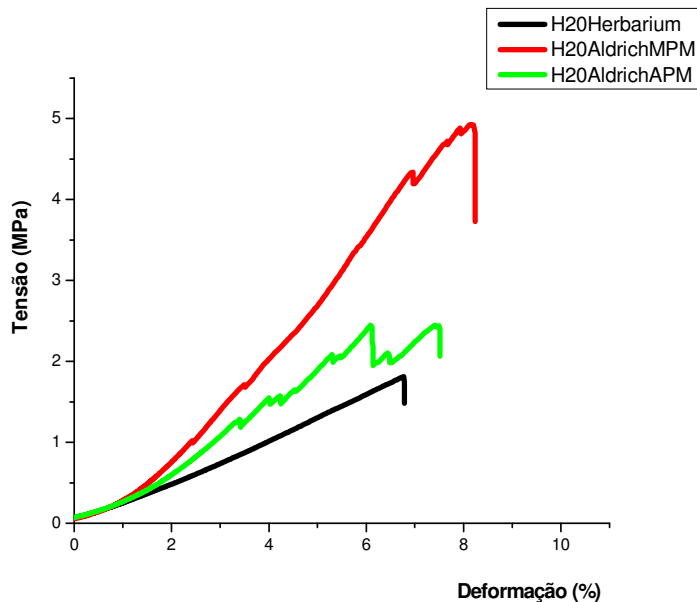


Figura 5.31 Curvas tensão x deformação de híbridos H20 não-porosos das quitosanas Herbarium, Aldrich APM e Aldrich MPM com a sílica.

De acordo com o fabricante, a quitosana Aldrich de alto peso molecular apresenta GD de 75%, inferior ao da quitosana Aldrich utilizada até então, e viscosidade bem superior (800-2000 cps). Esperava-se, logicamente, um aumento das propriedades mecânicas com este material, já que estudos na literatura associam o aumento do peso molecular a um maior emaranhamento das cadeias poliméricas e diminuição das distâncias entre elas, o que facilitaria as interações intermoleculares e o ordenamento estrutural, resultando em aumento da resistência (Chen, Tsaih & Lin, 1996; Chen & Hwa, 1996). Neste trabalho, este comportamento não foi observado. Os valores de tensão máxima à fratura foram significativamente superiores para a quitosana de médio peso molecular, embora resultados parecidos tenham sido obtidos na deformação à tensão máxima. Este resultado poderia ser atribuído à dificuldade de solubilização da quitosana em ácido acético e a alta viscosidade apresentada pela solução, dificultando a sua mistura com a solução de vidro utilizada no processamento sol gel. Embora a utilização de polímeros com alto peso molecular seja sempre preferível do ponto de vista da melhora das propriedades mecânicas dos materiais híbridos (Shao *et al.*, 2003), há de se salientar a importância das condições de processamento nas suas propriedades finais. Não basta apenas o material possuir características e propriedades adequadas de maneira isolada, é preciso que o mesmo tenha compatibilidade de processamento com os demais materiais envolvidos na síntese. Em

algumas situações, especialmente quando da utilização de polímeros não-biodegradáveis, a utilização de polímeros com alto peso molecular pode dificultar a sua eliminação pelos rins (Rhee, 2003).

O grande desafio na produção de matrizes para tecido ósseo é a compatibilização de propriedades que muitas vezes se opõem como módulo de elasticidade elevado com elevada porosidade e tenacidade, que é uma medida da capacidade de deformação do material. Neste trabalho, a quitosana mostrou um comportamento elástico limitado quando confeccionada na forma de membranas, embora a sua adição ao material híbrido tenha aumentado a deformação à fratura em todos os grupos estudados. A utilização de amostras semi-úmidas pode conferir maior flexibilidade aos híbridos, pois a água pode funcionar como um agente plastificante de rede polimérica, como observado em híbridos de sílica e PVA (Pereira *et al.*, 2005b). Neste trabalho um agente plastificante, o glicerol, foi utilizado conjugado à solução de quitosana, com o objetivo de flexibilizar o híbrido obtido, já que a utilização do mesmo em outro estudo aumentou a flexibilidade de membranas de quitosana e de quitosana com queratina (Tanabe, Okitsu & Yamauchi, 2004). Os resultados obtidos são apresentados na figura 5.32.

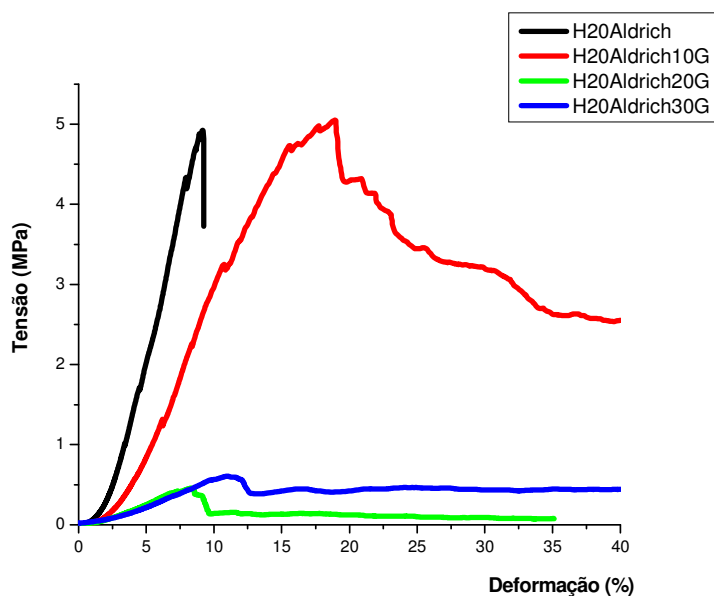


Figura 5.32 Curvas tensão x deformação de híbridos H20 não-porosos de quitosana Aldrich com o aditivo glicerol e sílica.

Como pôde ser observado, a adição do glicerol à solução de quitosana numa proporção de 10% por volume mostrou um resultado satisfatório, pois manteve os valores de tensão máxima à fratura em níveis adequados (aproximadamente 4,51 MPa) e aumentou significativamente a deformação à tensão máxima aplicada (18,40%), quando comparado com as amostras sem a adição do plastificante (8,52%). O controle adequado da quantidade de plastificante adicionado deve ser levado em conta, visto que a adição de proporções maiores (20 e 30%) diminuiu drasticamente a resistência à compressão do material, apesar de manter o seu padrão de alongamento.

A composição do componente inorgânico também foi alterada para avaliarmos a sua influência na síntese de híbridos com quitosana não porosos. O cloreto de cálcio foi adicionado à mistura da solução de vidro, com o objetivo de se obter um híbrido com 30% de CaO por peso. Os resultados mostraram que a adição do cálcio modificou o comportamento mecânico dos vidros bioativos e híbridos sintetizados. (Fig. 5.33).

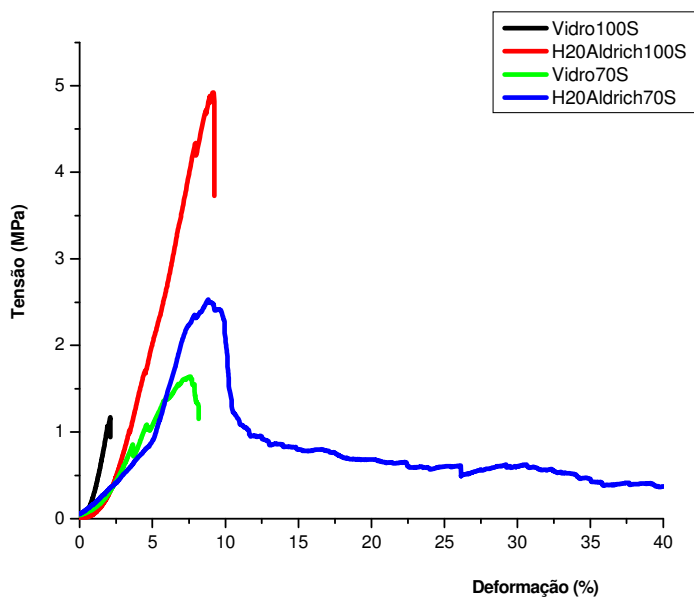


Figura 5.33 Curvas tensão x deformação de híbridos H2O não-porosos de quitosana Aldrich com sílica e sílica-cálcia (70S).

O vidro 70S apresentou tensão máxima à fratura e deformação à tensão máxima maiores que a dos vidros sem cálcio (100S). Os híbridos H2O 100S e 70S mostraram valores de tensão máxima maiores que a dos vidros, mostrando que a adição do polímero melhorou as

propriedades mecânicas dos híbridos sintetizados. Embora a tensão máxima à fratura não tenha sido melhorada com a adição de cálcio, a deformação à fratura aumentou para os híbridos H20, quando comparados com os híbridos sem cálcio. Este comportamento poderia ser explicado pelo fato do íon cálcio ser considerado um modificador da rede de sílica, diminuindo a sua conectividade e afrouxando a estrutura do gel resultante (Coelho, 2003).

Os híbridos porosos foram obtidos utilizando-se a mesma metodologia para obtenção dos não porosos, mas com a adição de um agente surfactante na mistura e agitação mecânica vigorosa. Os valores obtidos no ensaio de compressão e as curvas tensão-deformação para os vidros bioativos à base de sílica (100S) e híbridos porosos sintetizados com as quitosanas Herbarium e Aldrich são apresentados a seguir (Tab. 5.9, Fig. 5.34 e Fig. 5.35).

Tabela 5.9 Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos porosos em diversas composições.

Amostras Porosas	Deformação à Tensão Máxima Média (%)	Tensão Máxima à Fratura Média (Mpa)
Vidro Bioativo 100 S	5,73 ± 2,07	0,13 ± 0,02
H10 Herbarium	5,27 ± 2,35	0,25 ± 0,06
H20 Herbarium	8,85 ± 4,08	0,31 ± 0,08
H30 Herbarium	9,15 ± 2,70	0,29 ± 0,09
H10 Aldrich	5,28 ± 4,33	0,30 ± 0,06
H20 Aldrich	10,55 ± 4,42	0,58 ± 0,16
H30 Aldrich	6,92 ± 3,30	0,28 ± 0,08
H20 Aldrich 70S	9,54 ± 4,44	0,55 ± 0,13

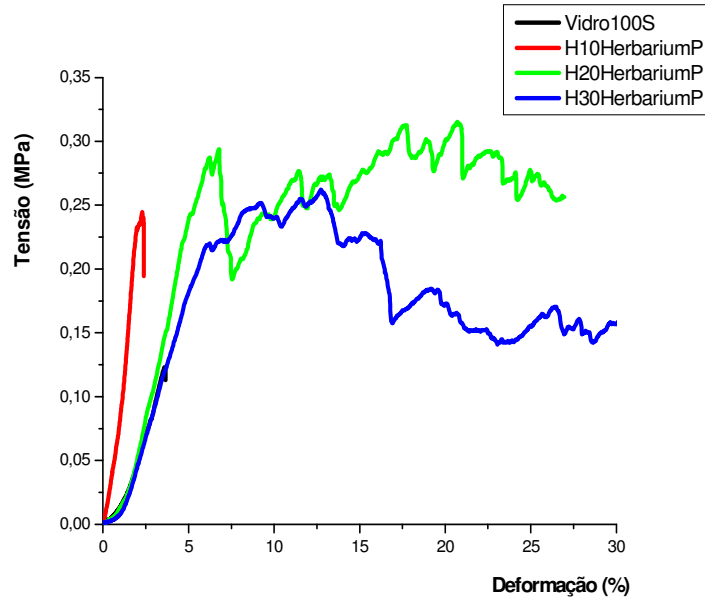


Figura 5.34 Curvas tensão x deformação de híbridos porosos da quitosana Herbarium e sílica.

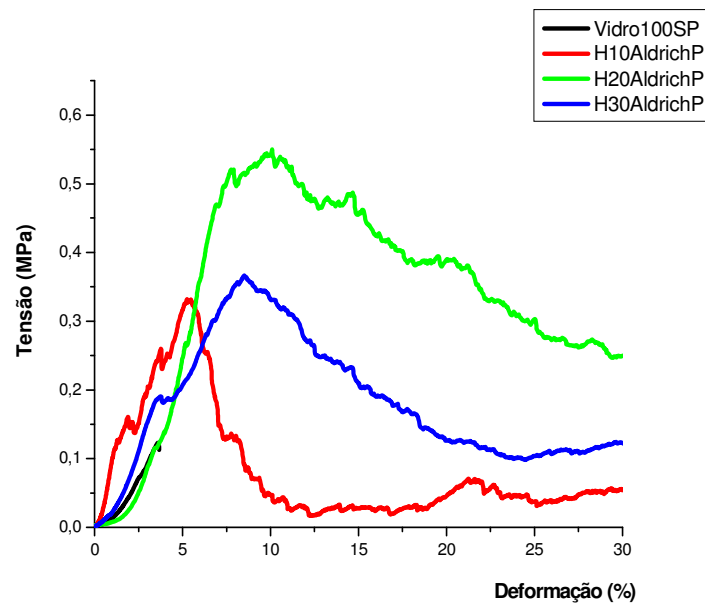


Figura 5.35 Curvas tensão x deformação de híbridos porosos da quitosana Aldrich e sílica.

Como esperado, o mecanismo da fratura dos híbridos porosos apresentou um comportamento diferente daquele apresentado pelos densos. O perfil mais irregular das curvas tensão-deformação observado nos gráficos mostrados demonstra isso. No início do ensaio de compressão os poros mais frágeis do material se rompem, levando a um pequeno aumento da resistência, já que o material torna-se mais compactado. À medida que a compressão prossegue, novas camadas de poros se rompem até o colapso total do material. Em muitos casos, há uma desintegração total dos híbridos submetidos ao ensaio, apresentando-se como um pó compacto. Nos ensaios realizados neste trabalho estabeleceu-se uma deformação máxima de 50% como referência para interromper o ensaio, razão pela qual poucas amostras foram avaliadas até o final de curso da máquina de ensaio.

Um gráfico comum de ensaio de compressão força *versus* deformação para vidros bioativos porosos obtidos pelo processo sol-gel foi postulado por Jones, Ehrenfried & Hench (2006) e mostrado a seguir (Fig. 5.36).

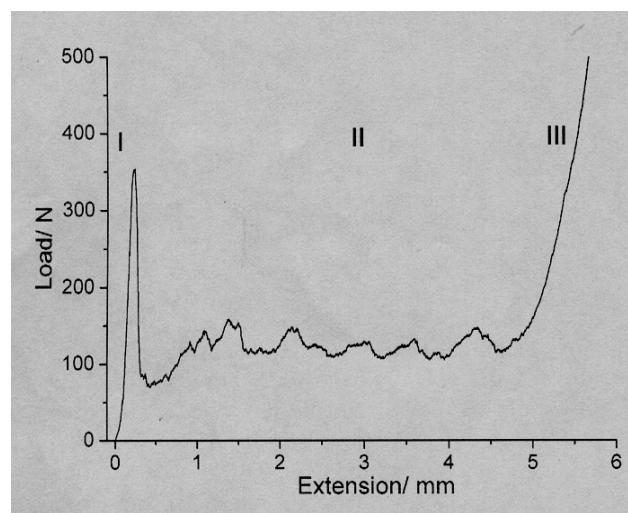


Figura 5.36 Curva força x deformação típica de ensaio de compressão pelo método de pratos paralelos de vidros bioativos porosos. (Adaptado de Jones, Ehrenfried & Hench, 2006)

Segundo os autores, as três fases assinaladas pela curva corresponderiam às seguintes situações:

Fase I: região relacionada à deformação elástica do material, mais linear, e que termina quando o material falha (tensão máxima à compressão). A falha ocorre quando as paredes dos poros do material sofrem trinca;

Fase II: região correspondente às sucessivas falhas nas colunas dos poros do material, mais irregular, até que todas as paredes dos poros entram em colapso e material apresenta-se na forma de pó; e

Fase III: região correspondente à compressão do pó.

Pelos valores médios observados na tabela e pelas curvas tensão-deformação dos híbridos porosos à base de quitosana Herbarium/Aldrich e sílica, pode ser notado uma melhora das propriedades mecânicas do material com a incorporação do polímero. No caso dos híbridos com a quitosana Herbarium, as medidas de tensão máxima à fratura e deformação à tensão máxima foram significativamente superiores aos dos vidros puros, especialmente nas amostras H20 e H30. Nota-se, porém, que esta melhora não foi diretamente proporcional à quantidade de quitosana adicionada, pois as amostras H20 mostraram resultados melhores que as demais. Este resultado poderia ser atribuído às melhores condições de síntese observadas nas amostras H20, comportamento também observado no grupo da quitosana Aldrich. A viscosidade das soluções de quitosana dos híbridos H10 e H20 foi considerada adequada para a mistura com a solução de vidro e para a produção de espumas, enquanto que na síntese de híbridos com 30% de quitosana, a mistura dos precursores orgânicos e inorgânicos e a produção das espumas mostraram-se dificultadas devido à alta viscosidade. Neste caso, as condições dificultadas de síntese alteraram negativamente a qualidade do material final, embora os híbridos H30 ainda tenham apresentado um desempenho mais satisfatório que as amostras de vidro puro do ponto de vista das propriedades mecânicas.

Um teste mecânico foi realizado nos híbridos H20 com o objetivo de se avaliar a influência de fatores como tipo de quitosana, composição da fase inorgânica e o procedimento de neutralização nas propriedades mecânicas dos híbridos porosos sintetizados (Fig. 5.37).

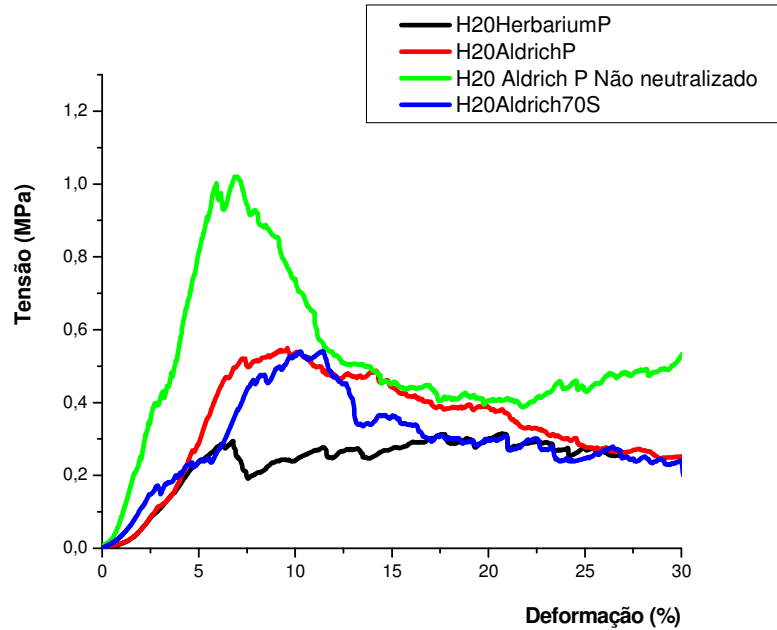


Figura 5.37 Curvas tensão x deformação de híbridos H20 porosos de quitosana Aldrich antes e depois da neutralização e Herbarium com sílica e sílica-cálcia.

A quitosana Aldrich mostrou melhores resultados que a quitosana Herbarium em relação aos valores de tensão máxima à fratura, embora a deformação à tensão máxima tenha sido parecida. O efeito da adição de 30% de CaO à fase inorgânica trouxe uma melhora sutil na tensão máxima à fratura. A etapa de neutralização necessária para reduzir acidez dos híbridos produzidos pelo método sol-gel pode levar a um prejuízo das propriedades mecânicas do material, como já evidenciado em outro estudo de híbridos de sílica e PVA (Pereira *et al.*, 2005a). Como pode ser observado no gráfico anterior, a neutralização realizada neste trabalho com NH_4OH durante 4 horas diminuiu significativamente a resistência do híbrido H20, embora a capacidade de deformação do material não tenha sido afetada (Tab. 5.10).

Tabela 5.10 Valores médios de deformação à tensão máxima e tensão máxima à fratura de híbridos H20 com ou sem procedimento de neutralização

Amostras Porosas	Deformação à Tensão Máxima Média (%)	Tensão Máxima à Fratura Média (Mpa)
H20 Aldrich Não Neutralizada	7,61 ± 3,33	0,83 ± 0,26
H20 Aldrich Neutralizada	10,55 ± 4,42	0,58 ± 0,16

Este prejuízo das propriedades mecânicas pode ser originado da alteração da composição do material pela perda de produtos para a solução neutralizadora ou pelo efeito da secagem adicional a qual a amostra foi submetida, a qual poderia gerar trincas no interior do material.

A estabilidade estrutural de matrizes porosas depende fortemente da rede interconectada de poros obtida pelo processamento sol-gel. Neste aspecto, as condições de síntese como o tipo e a quantidade de agente surfactante utilizado, tipo de agitação mecânica e solubilização dos componentes da mistura podem ser determinantes nas propriedades mecânicas dos materiais finais. Como exemplo pode ser citado o surfactante Renex, utilizado por ser não aniônico e não reagir com a quitosana, que é catiônica. Embora as condições de solubilização e de formação de espumas observadas com este surfactante tenham sido muito satisfatórias quando comparado com o surfactante LESS, os híbridos obtidos após a secagem mostraram-se extremamente frágeis. Não menos importantes são as condições de secagem das amostras que, apesar de causar uma diminuição gradual dos tamanhos de poros e aumentar a resistência do material, pode também levar ao seu enfraquecimento, já que a evaporação dos líquidos dos poros do material tem grande potencial para provocar pressões capilares internas.

Idealmente, o módulo de elasticidade de uma matriz e a sua resistência deveriam ser os mais próximos possíveis do tecido ósseo hospedeiro. Se uma determinada matriz possuir um módulo de elasticidade muito menor que aquele do tecido hospedeiro, sob uma solicitação mecânica específica essa matriz poderá sofrer fratura. Contrariamente, se a matriz possuir um módulo de elasticidade muito maior que o do osso, a carga poderá ser transmitida através da matriz, causando uma tensão de cisalhamento e reabsorção óssea ao invés de regeneração (Berry, 2002). Como se sabe, os materiais cerâmicos apresentam dureza muito superior àquela do osso, ao passo que a maioria dos polímeros apresenta um comportamento contrário (Wang, 2003). A resistência do osso cortical compacto no sentido longitudinal (paralelo ao seu longo eixo) situa-se entre 78,8 e 151 MPa na tração e entre 131 e 224 MPa na compressão. No sentido transversal (perpendicular ao seu longo eixo) esta resistência diminui para 51-56 MPa na tração e 106-133 MPa na compressão. O módulo de elasticidade varia de 17 a 20 GPa no sentido longitudinal e entre 6 e 13 GPa na direção transversal. O osso trabecular ou esponjoso possui um comportamento diferenciado e mais complexo, apresentando uma densidade média 8 vezes menor que a do osso compacto e uma

porosidade média de 75%. A resistência e o módulo de elasticidade podem variar de 2 a 5 MPa e de 90 a 400 MPa, respectivamente (Athanasίου *et al.*, 2000). A avaliação das propriedades mecânicas de alguns tecidos humanos foi realizada em um estudo (Yang *et al.*, 2001) e os resultados podem ser visualizados na tabela 5.11.

Tabela 5.11 Propriedades mecânicas de tecidos humanos. N/A: não avaliado

Tecido	Resistência à tração (MPa)	Resistência à compressão (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidade (MPa.m^{1/2})
Osso Esponjoso	N/A	4 - 12	0,02 – 0,5	N/A
Osso cortical	60 - 160	130 - 180	3 - 30	2 - 12
Cartilagem	3,7 – 10,5	N/A	0,7 – 15,3 (MPa)	N/A
Ligamento	13 - 46	N/A	0,065 – 0,541	N/A
Tendão	24 - 112	N/A	0,143 – 2,31	N/A

(Adaptado de Yang *et al.*, 2001)

5.5 Teste de Biodegradação *in vitro*

Os ensaios *in vitro*, submetendo os biomateriais em meios que simulam os fluidos corporais, desempenham um importante papel para a avaliação da bioatividade e da biodegradabilidade dos mesmos. Os testes envolvem a imersão das amostras em SBF ou PBS por períodos controlados de tempo e a caracterização das amostras. Para a avaliação da bioatividade, procura-se quantificar e identificar o padrão de formação de cristais de HCA sobre a superfície do biomaterial, através da imersão do mesmo em SBF. Já a degradação *in vitro* é mais comumente avaliada através da perda de massa dos materiais em função do tempo, e um meio muito utilizado para a sua avaliação é o PBS (Tomihata & Ikada, 1996; Boccaccini & Maquet, 2003; Wang, 2003; Martin, Salinas & Regi, 2005, Freier *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Hsieh, Chang & Lin, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

Neste trabalho, os híbridos H20 Herbarium foram submetidos a um teste preliminar de biodegradação através da imersão dos mesmos em PBS a 37⁰C em intervalos de tempo de 24 horas a 28 dias. O percentual de perda de massa das amostras em função do tempo de imersão pode ser visualizado a seguir (Fig. 5.38).

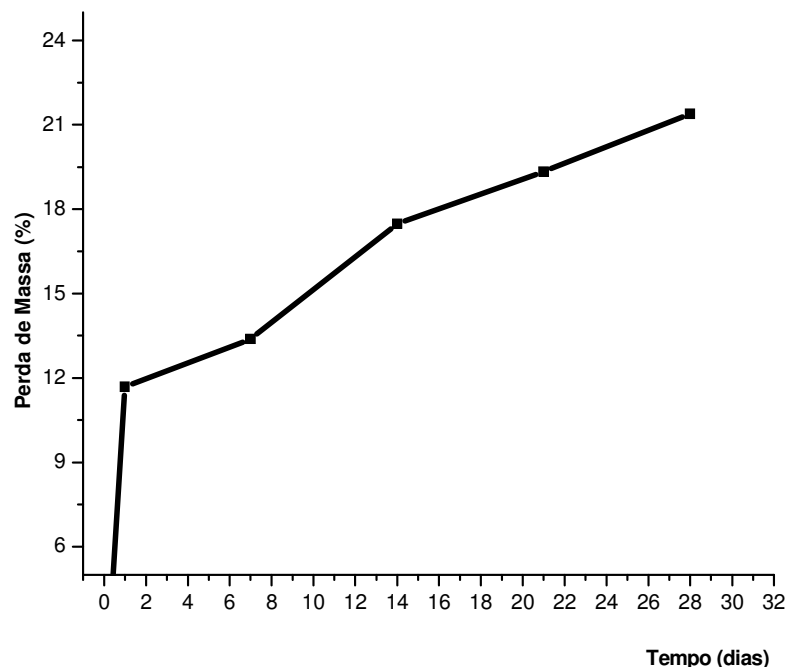


Figura 5.38 Teste de biodegradação de híbridos H20 Herbarium. Percentual de perda de massa em função do tempo de imersão em PBS a 37⁰C.

Como previsto, o percentual de perda de massa foi diretamente proporcional ao tempo de imersão em PBS, alcançando valores de 12, 14, 18, 19 e 22% de perda de massa para os tempos de imersão de 1 dia, 1, 2, 3 e 4 semanas, respectivamente. A perda de massa nas primeiras 24 horas foi significativa e apresentou pequena alteração até a primeira semana de teste. A partir da primeira semana, entretanto, a perda de massa sofreu um aumento significativo e cresceu lentamente até a quarta semana de imersão. A velocidade da degradação diminuiu com o aumento do tempo de imersão.

A comparação destes resultados com os obtidos em outros estudos na literatura, em se tratando de testes de biodegradação *in vitro* é difícil, pois se observa uma falta de padronização nos mesmos. Fatores como o tempo de imersão, meio utilizado para imersão, utilização de agitação mecânica, utilização da lisozima para avaliar a degradação da quitosana e os meios de se avaliar a biodegradação são muito variáveis nos diversos estudos, o que geram resultados diversos.

A quitosana pode ser degradada por diversos tipos de enzimas, embora *in vivo* a degradação enzimática seja principalmente atribuída à ação da lisozima, que hidrolisa as ligações glicosídicas presentes na sua estrutura. A lisozima está presente nos fluidos corporais humanos e pode ser liberada por células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos (Freier *et al.*, 2005). Por este motivo, diversos estudos na literatura avaliando biomateriais à base de quitosana utilizam esta enzima em diversas concentrações (0,5 a 4 mg/ml de PBS) para avaliação da biodegradação em condições mais próximas às encontradas *in vivo* (Tomihata & Ikada, 1996; Ren *et al.*, 2006; Hsieh, Chang & Lin, 2007), embora outros não a utilizem (Ratajska & Boryniec, 1998; Kurita *et al.*, 2000; Wang, 2003; Zhang *et al.*, 2007). Nos testes *in vitro* a degradação da quitosana é acelerada na presença de lisozima. Comparando-se a degradação da quitosana em PBS com e sem lisozima, observou-se que, após 18 dias de imersão em PBS sem a enzima, o peso das amostras não sofreu alteração significativa. Nas amostras submetidas à imersão com a enzima, a perda de massa foi significativa após os três primeiros dias e aumentou bruscamente até 8 dias de imersão, onde se observou a perda total do material (Hong *et al.*, 2007). Em outro estudo, membranas de quitosana submetidas à degradação *in vitro* em PBS e lisozima apresentaram perda apreciável de peso de 10 a 30% após a primeira semana de teste, mostrando perda de peso insignificante após este período (Ren *et al.*, 2006). Outra avaliação realizada em PBS e lisozima durante 20 dias e sob agitação mecânica resultou em 20% de perda de massa da quitosana e foi maior nos primeiros 15 dias, sendo insignificante após este período (Hsieh, Chang & Lin, 2007). Por outro lado, a degradação da quitosana realizada em PBS sem a presença da lisozima durante 35 dias e sob agitação mecânica apresentou 40% de perda de massa (Wang, 2003), e durante 5 semanas sem agitação mecânica em torno de 10 a 12%, apresentando maior degradação na primeira semana e um padrão mais lento até a quinta semana (Reis *et al.*, 2007).

Todos os materiais de origem orgânica, incluindo os polímeros naturais como a quitosana, têm uma tendência natural à decomposição. Embora esta propriedade tenha sido considerada indesejável por muitas décadas, para aplicações em engenharia de tecidos ela pode ser de útil quando se necessita de matrizes bioreabsorvíveis (Ratajska & Boryniec, 1998). A adição de uma fase inorgânica à quitosana pode ser favorável para alterar o comportamento de degradação deste polímero *in vivo* e *in vitro*. Tem sido proposto que partículas de vidro bioativo usadas como inclusões ou coberturas em polímeros biodegradáveis poderiam causar uma troca de prótons em água por álcalis do vidro,

proporcionando um efeito tampão na superfície do polímero e prevenindo a aceleração da degradação do mesmo (Boccacini & Maquet, 2003). É de se esperar que os híbridos com maior porcentagem de fase inorgânica apresentem maior estabilidade frente ao meio de imersão e menores graus de inchamento, pois as regiões inorgânicas podem funcionar como ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, proporcionando maior resistência à dissolução (Notingher *et al.*, 2003).

5.6 Testes de Citotoxicidade

O cultivo de células *in vitro* possui a grande vantagem de fornecer um método de exame rápido e de custo razoável para a avaliação de biomateriais. Além disso, a alta sensibilidade dos métodos utilizados permite reconhecer materiais que podem ser potencialmente citotóxicos e excluí-los em um estágio primário do procedimento de testes. Outra vantagem além destas, é a avaliação de parâmetros que possibilita a comparação entre os vários biomateriais. A principal e fundamental desvantagem do método *in vitro*, entretanto, é a impossibilidade de extrapolação dos resultados obtidos para as condições *in vivo*, onde as mudanças no material em resposta aos fluidos biológicos e às mudanças no tecido adjacente em resposta ao material são comuns e difíceis de serem simulados *in vitro*. Desta maneira, os testes *in vitro* realizados nos materiais deste estudo devem ser considerados preliminares e como parte do estudo de biocompatibilidade.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese, secreção e mineralização da matriz extracelular óssea. Desta maneira, o comportamento destas células na presença dos híbridos sintetizados neste trabalho é muito importante para a avaliação da biocompatibilidade e aplicabilidade dos mesmos em futuros testes *in vivo*. Foram realizados ensaios para a avaliação da viabilidade celular (MTT), da secreção de fosfatase alcalina (ALP) e secreção de colágeno.

5.6.1 Viabilidade Celular (MTT)

A avaliação da viabilidade celular *in vitro*, realizada através do ensaio MTT, mostrou a presença de osteoblastos viáveis para o grupo controle (presença de células no meio sem as amostras) e para os híbridos H10 e H30 (Fig. 5.39).

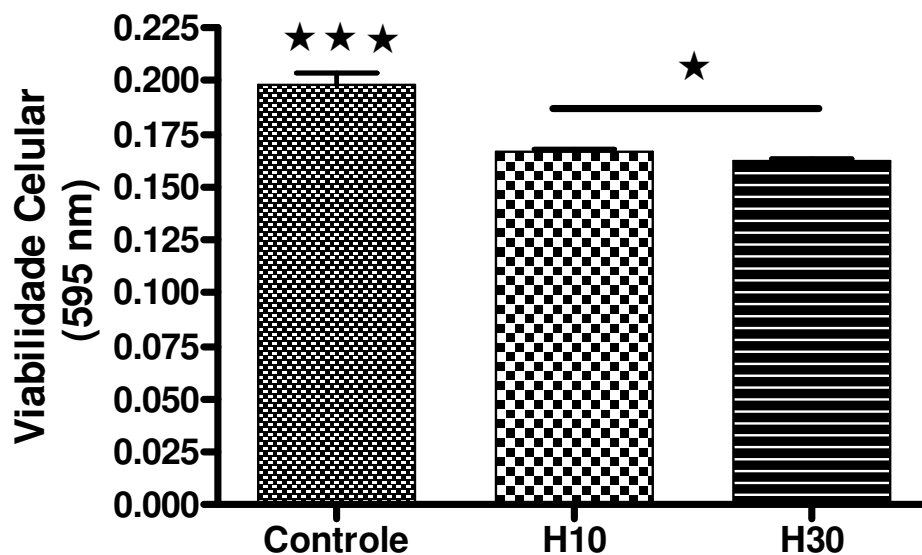


Figura 5.39 Viabilidade celular de osteoblastos no grupo controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5×10^4 células por poço. Análise estatística realizada por ANOVA:
 *** = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$)
 * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos mostraram a presença de células viáveis em maior quantidade no grupo controle em relação aos híbridos avaliados. Comparando-se os híbridos analisados, H10 e H30, pode-se concluir que à medida que o conteúdo de quitosana aumentou no material, a viabilidade celular diminuiu no mesmo, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Possíveis explicações para a menor viabilidade observada com os híbridos seria a presença de produtos de dissolução dos mesmos quando em contato com o meio de cultura, o que poderia alterar o pH do meio e o crescimento celular. Além disso, sabendo-se que os grupos Si-OH e Si-O-Si têm um efeito positivo na proliferação de células osteoblásticas (Shirosaki *et al.*, 2005), a reação da sílica com a quitosana poderia diminuir a liberação de íons de silício disponíveis para o meio de cultura e diminuir a proliferação das células osteoblásticas.

Estudos na literatura observaram viabilidade celular superior em relação ao grupo controle quando da utilização de vidros bioativos com 60% de sílica (Valério *et al.*, 2004; Valério *et al.*, 2005), embora em outro estudo a viabilidade celular não tenha sido alterada em relação ao grupo controle (Agathopoulos *et al.*, 2005). Estes resultados foram atribuídos à capacidade dos produtos de dissolução destas biocerâmicas em estimular a proliferação osteoblástica. A imersão prévia das amostras de vidro bioativo em SBF poderia ser uma

estratégia interessante, já que em estudo prévio demonstrou aumentar significativamente a viabilidade celular devido à formação de uma camada de HCA sobre a superfície do material (Andrade *et al.*, 2006). Um ensaio MTT realizado com células osteoblásticas da linhagem MG63 em membranas híbridas de quitosana-sílica mostraram uma viabilidade celular similar àquela do grupo controle e significativamente superior em relação à viabilidade de membranas de quitosana pura. (Shirosaki *et al.*, 2005). De fato, à sílica tem sido atribuído um importante papel na proliferação de células osteoblásticas (Hench, 1997; Suzuki & Mizushima, 1997; Sepúlveda, Jones & Hench, 2002; Bosetti & Cannas, 2005; Jones & Hench, 2003; Pereira *et al.* 2004; Shirosaki *et al.*, 2005).

Neste trabalho, apesar de ter sido observada uma menor viabilidade celular dos híbridos em relação ao grupo controle, os resultados podem ser considerados satisfatórios, já que a morte celular não foi observada marcadamente e uma viabilidade celular de cerca de 86% para os híbridos H10 e de 80% para os híbridos H30 foi obtida. Além disso, há a possibilidade de adaptação dos osteoblastos ao novo ambiente com o passar do tempo, o que poderia manter a viabilidade celular constante ou até maior em relação ao grupo controle, como já foi observado em outro estudo com vidros bioativos (Guimarães, 2003).

Como se sabe, as condições de síntese impostas pelo processo sol-gel resultam, invariavelmente, em híbridos com alto caráter ácido. A impossibilidade de eliminar os produtos tóxicos dos híbridos contendo uma fase polimérica através da sinterização em altas temperaturas, leva à necessidade de uma etapa de neutralização dos materiais obtidos. A utilização de uma solução de NH_4OH por 3 horas para neutralizar híbridos de sílica e PVA em um estudo (Pereira *et al.*, 2005a) mostrou grande efetividade no controle da acidez e resultou em materiais com viabilidade celular de 80 a 90% em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos no teste de viabilidade celular também comprovam a efetividade do método de neutralização utilizado para os híbridos deste trabalho. A imersão das amostras em uma solução de NH_4OH 0,5M por um período de 3 a 4 horas provou ser efetiva no controle da acidez e na diminuição da toxicidade das mesmas.

As imagens obtidas com o ensaio MTT podem ser visualizadas a seguir através da microscopia ótica (Fig. 5.40).

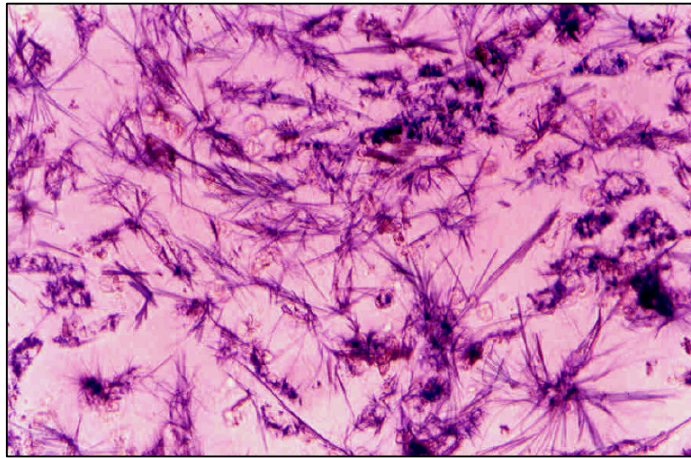


Figura 5.40. Imagem obtida por microscopia ótica do ensaio de viabilidade celular (MMT) em amostras H10.

Pode ser observada a presença de osteoblastos viáveis no meio de cultura em contato com o híbrido sintetizado, através da verificação dos cristais arroxeados pelo formazan, que só acontece quando as células estão metabolizando e vivas, pois a redução do sal de tetrazolium é feita pelas mitocôndrias.

5.6.2 Fosfatase Alcalina (ALP)

Os resultados obtidos com o ensaio de ALP mostram a produção de fosfatase alcalina pelas células cultivadas em ambos os híbridos em relação ao grupo controle (Fig.5.41).

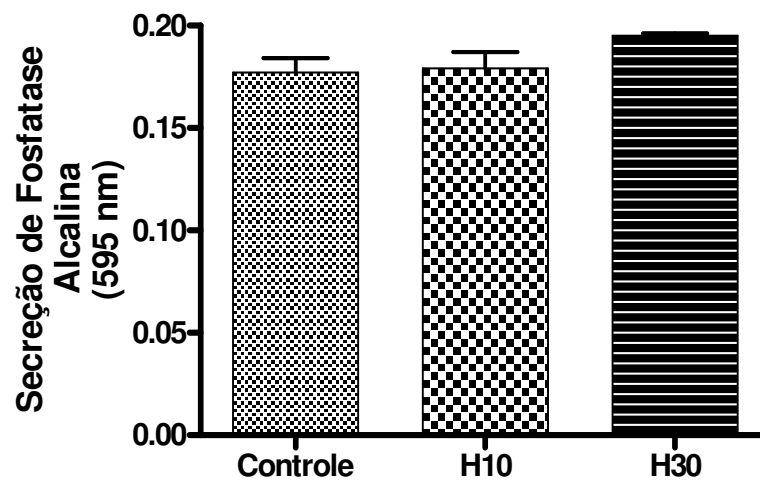


Figura 5.41 Produção de fosfatase alcalina por osteoblastos nos grupos controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5×10^4 células por poço.

Pode ser notado que a produção de fosfatase alcalina nos 3 grupos foi muito parecida, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre eles. Resultados parecidos foram obtidos em outro estudo na literatura avaliando membranas híbridas de quitosana e sílica, onde as mesmas mostraram produção de fosfatase alcalina semelhante ao grupo controle (Shirosaki *et al.*, 2005). Por outro lado, a produção de fosfatase alcalina por células osteoblásticas mostrou-se aumentada em relação ao grupo controle em estudos na literatura utilizando-se vidros bioativos, o que poderia ser explicado pelo reconhecido papel do silício em estimular a produção de fosfatase alcalina pelas células osteoblásticas (Agathopoulos *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006), embora em outros estudos nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada (Valério *et al.*, 2004; Valério *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Bosetti & Cannas, 2005).

Diante dos resultados obtidos, a produção de fosfatase alcalina apresentada pelos híbridos deste trabalho pode ser considerada satisfatória do ponto de vista da biocompatibilidade.

5.6.3 Produção de Colágeno

A produção de colágeno pelas células cultivadas nos 3 grupos de estudo foi mensurada e os resultados podem ser observados a seguir (Fig.5.42).

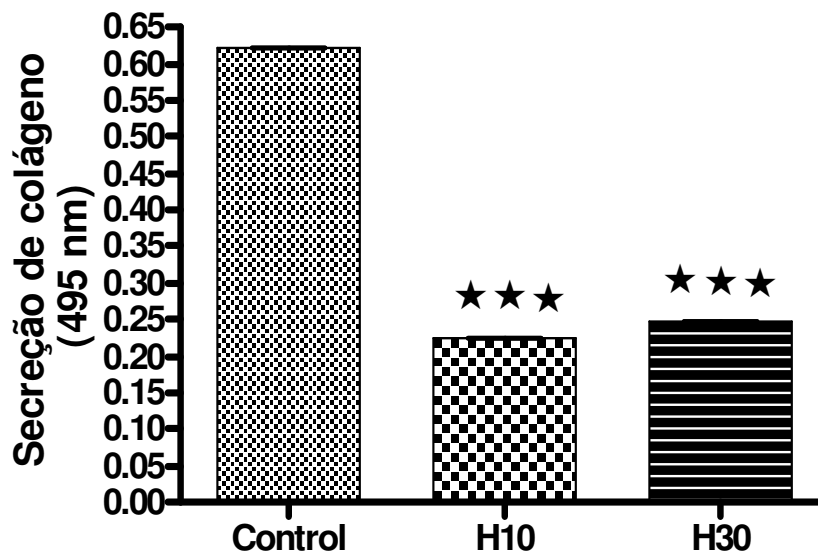


Figura 5.42 Produção de colágeno por osteoblastos nos grupos controle (isento de amostras), H10 e H30. Utilização de 5×10^4 células por poço. Análise estatística realizada por ANOVA: *** = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$)

A produção de colágeno pelos híbridos foi significativamente diminuída em relação ao grupo controle. O padrão de dissolução de um determinado biomaterial pode interferir positivamente ou negativamente com a resposta tecidual. Tem-se demonstrado que os íons liberados da dissolução de biomateriais e as conseqüentes trocas com o meio de cultura podem provocar alterações na atividade celular (Sepulveda, Jones & Hench, 2002). Neste caso, a dissolução de vidros bioativos causa a liberação de ácido silicílico no meio de cultura, o que promove a sua alcalinização devido à troca iônica. Esta mudança do meio poderia favorecer a proliferação celular e aumentar a capacidade de produção de colágeno por osteoblastos e fibroblastos, o que poderia explicar a produção de colágeno 25% superior ao do grupo controle obtida em vidros bioativos contendo 60% de sílica (Valério *et al.*, 2004; Valério *et al.*, 2005).

Nos híbridos sintetizados neste trabalho o padrão de dissolução dos materiais poderia estar ocorrendo de maneira mais lenta, o que poderia explicar a baixa produção de colágeno pelas células cultivadas. Deve ser salientado, entretanto, que a síntese de colágeno pelas células para a formação da matriz extracelular deve ser compatibilizada com o padrão de biodegradação do biomaterial que estiver sendo utilizado como substrato. A produção acelerada de colágeno em um substrato com biodegradação lenta, por exemplo, pode não ser interessante do ponto de vista da regeneração tecidual.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o processo sol-gel possibilitou a obtenção de híbridos porosos com fase inorgânica composta de sílica e sílica-cálcia (70S) e fase orgânica composta pelas quitosanas Herbarium e Aldrich em proporções que variaram de 10 a 30% em peso nos híbridos. Para a produção das espumas, o surfactante aniônico LESS foi o mais efetivo, pois possibilitou a obtenção de grande volume de espuma e escoamento adequado para permitir o vazamento dos moldes. Entretanto, à medida que se aumentou a quantidade de quitosana adicionada à solução de vidro, a mistura tornou-se mais viscosa e difícil para a formação de espumas. O procedimento de secagem em estufa à temperatura de 50^oC foi o escolhido pela sua efetividade e pela manutenção da integridade das amostras, ao contrário das secagens realizadas em dessecador a alto vácuo e por liofilização. A imersão dos híbridos em solução aquosa de NH₄OH 0.5M por 3 a 4 horas após os procedimentos de secagem mostrou-se efetiva para a neutralização das amostras, mas provocou mudanças estruturais nas mesmas, evidenciadas pelo FTIR, com a diminuição de intensidade da banda referente ao grupamento C-H e com o desaparecimento da banda referente ao grupo amida II, ambas associadas à fase polimérica dos híbridos, e pela perda das propriedades mecânicas dos materiais, com diminuição significativa dos valores de tensão máxima à fratura. Os espectros obtidos pelo infravermelho mostraram bandas características dos componentes orgânico e inorgânico presentes no material e uma banda a 1100cm⁻¹, a qual poderia ser associada ao grupamento Si-O-C e sugerir uma interação química entre a quitosana e a sílica.

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura mostraram uma estrutura com poros de diâmetro na faixa de 80 a 400µm para os híbridos H10 e H20 e na faixa de 100 a 250µm para H30. A porosidade total, avaliada pela da técnica da balança de Arquimedes, foi inversamente proporcional à quantidade de quitosana presente nos híbridos, variando de 78% para H30 a 90% para H10. O ensaio mecânico de compressão em híbridos não porosos mostraram que a tensão máxima à fratura foi diretamente proporcional à quantidade de quitosana adicionada e significativamente superior à obtida nos vidros puros. A adição do glicerol como agente plastificante, numa proporção de 10% em volume na solução de quitosana, aumentou significativamente a deformação máxima à fratura dos híbridos H20 sem comprometer a tensão máxima à compressão. Os híbridos porosos também apresentaram uma melhora significativa nas propriedades mecânicas do material com a

incorporação do polímero. As medidas de tensão máxima à fratura e deformação à tensão máxima foram superiores aos dos vidros puros, especialmente nas amostras H20 e H30, embora os melhores resultados tenham sido obtidos com H20, os quais poderiam ser atribuídos às melhores condições de processamento destes híbridos.

Os testes de citotoxicidade realizados em células osteoblásticas mostraram resultados satisfatórios com os híbridos sintetizados. Os índices de viabilidade celular, avaliados através do ensaio MTT, variaram de 86% para os híbridos H10 a 80% para os híbridos H30, quando comparados ao grupo controle. A produção de fosfatase alcalina mostrou-se satisfatória para todos os híbridos testados e em níveis semelhantes aos do grupo controle, embora a produção de colágeno pelas células tenha se mostrado diminuída.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATHOPOULOS, S. et al. A new model formulation of the SiO₂-Al₂O₃-B₂O₃-MgO-CaO-Na₂O-F glass-ceramics. *Biomaterials*. v. 26, p.2255-2264, 2005.

AGRAWAL, C. M. & RAY, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 55, p. 141-150, 2001.

AIMOLI, C. G. & BEPPU, M. M. Deposição de compostos de cálcio sobre membranas de quitosana. *III Congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais*, Campinas, p. 108, 2004.

AIROLDI, C. & FARIAS, R. F. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. *Química Nova*. v. 27, n. 1, p. 84-88, 2004.

ALFAYA, A. A. S. & KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*. v.25, n. 5, p. 835-841, 2002.

ALSARRA, A. A et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*. v. 23, p. 3637-3644, 2002.

ANDRADE, L.A. et al. Influence of morphology on *in vitro* compatibility of bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2006.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. v. 21, p. 667-681, 2000.

ATHANASIOU, K. A. *et al.* Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Engineering*. v. 6, n.4, p.361-381, 2000.

ATWOOD, R. C. Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography. *Scripta Materialia*. v. 51, p. 1029-1033, 2004.

AYERS, M. R. & HUNT, A J. Synthesis and properties of chitosan-silica hybrid aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v. 285, p.123-127, 2001.

BALAMURUGAN, A. et al. Synthesis and characterization of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. *Materials Letters*. In Press. 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C.A ; DUEK, E. A R. Polímeros reabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros; Ciência e Tecnologia*. v.15, n. 1, p.13-21, 2005.

BERRY *et al.* Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements. *J. Bone Jt. Surg. (Am)*. v. 84A, n. 2, p. 171-177, 2002.

BOCCACCINI, A. R. & MAQUET, V. Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology*. v. 63, p. 2417-2429, 2003.

BOSETTI, M. & CANNAS, M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*. v. 26, p. 3873-3879, 2005.

CANCEDDA, R. *et al.* Tissue Engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. v. 22, p. 81-91, 2003.

CAPLAN, A. I. & BRUDER, S. P. Cell and molecular engineering of bone regeneration. In: LANZA, P. R., LANGER, R., CHICK, L. W. *Principles of Tissue Engineering*. Texas: R. G. Lands and Academic Press, 1997. Cap.37, p. 603-618.

CESTARI, A. R. et. Al. Multistep adsorption of anionic dyes on silica/chitosan hybrid 1. Comparative kinetic data from liquid and solid-phase models. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 292, p. 363-372, 2005.

CHEN, R. H. & HWA, H-D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*. v. 29, p. 353-358, 1996.

CHEN, R. H.; TSAIH, M. L. & LIN, W-C. Effect of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical and release characteristics of the prepared capsule. *Carbohydrate Polymers*. v. 31, p. 141-148, 1996.

- CHEN, J.; WANG, M.; HO, C.J. *Agric. Food Chem.* 46, 3207-3209, 1998.
- CHEN, G.; USHIDA, T. & TATEISHI, T. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. v. 17, p. 63-69, 2001.
- CHO, J. et al. Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behavior and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. *Food Hydrocolloids*. v. 20, p. 936-945, 2006.
- CHOI, C. Y. et al. Effect of N-acylation on the structure and properties of chitosan fibers. *Carbohydrate Polymers*. *In Press*, 2006.
- CHUPA, J. M. et al. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials*. v. 21, p. 2315-2322, 2000.
- COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. p. 10815-10837, 2000.
- COELHO, M. B. Desenvolvimento de estruturas tridimensionais porosas para aplicação em engenharia de tecidos. Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. (Tese de Doutorado).
- COELHO, M. B. *et al.* Effect of the type of surfactant on bioactive glasses foam formation. *Key Engineering Materials*. p. 240-242, 2003.
- COELHO, M. B & PEREIRA, M. M. Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration. *Journal of Materials Science*. (Submetido, 2004).
- COSTA, R. O. R. Influência da metodologia de síntese no controle estrutural de híbridos organo-inorgânicos. Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. (Tese de Doutorado).

DARLING, E. M. & ATHANASIOU, K. A. Articular cartilage bioreactors and bioprocesses. *Tissue Engineering*. v. 9, n. 1, p. 9-26, 2003.

DERIU et al. Structural characterization of new chitosan-containing hybrid bioactive gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v. 351, p. 3037-3043, 2005.

DHIMAN, H. K.; RAY, A. R. & PANDA, A. K. Characterization and evaluation of chitosan matrix for in vitro growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials*. v. 25, p. 5147-5154, 2004.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M. & RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering. *Biomaterials*. p. 1-7, 2005.

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

DUARTE et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 28, p. 359-363, 2001.

DUARTE, M. L. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 31, p. 1-8, 2002.

FREED, L. E. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Culture of organized cell communities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 33, p. 15-30, 1998.

FREIER, T. et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials*. v. 26, p. 5872-5878, 2005.

GIL-ALBAROVA, J. et al. The vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials*. v. 25, p. 4639-4645, 2004.

GOPFERICH, T. B. A. & TESSMAR, J. Special issue-Biomimetic polymers. *Biomaterials*. v. 24, p. 4335, 2003.

GOUGH, J. E.; JONES, J. R & HENCH, L. L. Nodule formation and mineralization of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials*. v. 25, p. 2039-2046, 2004.

GREEN, D. *et al.* The potencial of biomimesis in bone tissue engineering: Lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone*. v. 30, p. 810-815, 2002.

GROSS, K. A. & RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials*. v. 25, p. 4955-4962, 2004.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Progress in Polymer Science*. v. 30, p. 71-109, 2005.

GUIMARÃES, M. H. R. Avaliação in vitro de matrizes porosas de vidros bioativos obtidas por processamento sol-gel. Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. (Dissertação de Mestrado).

GUPTA, G. *et al.* Characterization of a novel bioactive composite using advanced X-ray computed tomography. *Composite Structures*. v. 71, p. 423-428, 2005.

GUPTA, K. C. & JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrates Polymers*. In Press.2006.

HENCH, L. L. An introduction to bioceramics. New Jersey: World Scientific Publishing, 386p, 1993.

HENCH, L. L. Sol-gel materials of bioceramic applications. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. v. 2, p. 604-610, 1997.

HENCH, L. L. & POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. *Science*. v. 295, p.1014, 2002.

HIRANO, S.; *Biotech. Ann. Res.*, 1996, 2, 237-258.

HO, M. H. et al. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*. v. 26, p. 3197-3206, 2005.

HO, S. T. & HUTMACHER, D. W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*. v. 27, p.1362-1376, 2006.

HOLY, C. E. et al. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 51, p. 376-382, 2000.

HOLY, C. E. et al. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 65A, p. 447-553, 2003.

HONG, Y. et al. Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of *in vitro* degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta Biomaterialia*. v. 3, p. 23-31, 2007.

HSIEH, W. C.; CHANG, C. P. & LIN, S. M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007.

HU, X. et al. Characterization of silica-polymer aerogel composites by small-angle neutron scattering and transmission electron microscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v. 288, p.184-190, 2001.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. v. 21, p. 2529-2546, 2000.

JONES, J. R. & HENCH, L. L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. v. 7, p. 301-307, 2003.

JONES, J. R. & HENCH, L. L. Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. *Journal Biomedical Materials Research- Part B*. v. 68B, p. 36-44, 2004.

JONES, J. R et al. Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials*. v. 25, p. 4947-4954, 2004.

JONES, J. R.; EHRENFRIED, L. M. & HENCH, L. L. Optimizing bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. v. 27, p. 964-973, 2006.

JONES, J. R et al. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimization of tissue scaffolds. *Biomaterials*. v. 28, p. 1404-1413, 2007.

JORGENSEN, C.; GORDELADZE, J. & NEL, D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 15, p. 406-410, 2004

KARAGEORGIU, V. & KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. v. 26, p. 5474-5491, 2005.

KATO et al. Silica sol-gel organic hybrid material for protein encapsulated column of capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1044, p. 267-270, 2004.

KAWACHI et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*. v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KELLOMAKI, M. et al. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials*. v. 21, p. 2495-2505, 2000.

KHALID, M. N. et al. Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *European Journal Pharmaceutical Sciences*. v. 15, p. 425-432, 2002.

KIM, H. Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7. p. 289-299, 2003.

KITTUR, F.S. et al. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*. v. 49, p. 185-193, 2002.

KOFUJI, K. et al. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*. v. 41, p. 2784-2791, 2005.

KOKUBO, T.; KIM, H. & KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. v. 24, p. 2161-2175, 2003.

KUBOTA, N. et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*. v. 324, p. 268-274, 2000.

KUMAR, M. N. V. & HUDSON, S. M. Chitosan. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. P. 310-323, 2004.

KURITA, K. et al. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*. v. 42, p. 19-21, 2000.

LANGER, R. Biomaterials and Biomedical Engineering. *Chemical Engineering Science*. v. 50, n. 24, p. 4109-4121, 1995.

LACZKA, M.; CHOLEWA, K. & OSYCZKA, A. L. Gel-derived of CaO-P₂O₅-SiO₂ system as a starting material to production of bioactive ceramics. *Journal of Alloys and Compounds*. v. 248, p. 42-51, 1997.

LARENA, A. & CÁ CERES, D. A. Variability between chitosan membrane surface characteristics as function of its composition and environmental conditions. *Applied Surface Science*. v. 238, p. 273-277, 2004.

LAVERTU, M. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 32, p. 1149-1158, 2003.

LEE, J. Y. et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*. v.78, p. 187-197, 2002.

LEE, K-Y et al. Ceramic bioactivity: progresses, challenges and perspectives. *Biomedical Materials*. v. 1, p. R31-R37, 2006.

LENTHE, G. H. et al. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction *in vivo*. *Biomaterials*. In Press, 2007.

LIMA, I. S. Quitosana e quitosanas morfológicamente modificadas com anidrido succínico-propriedades, adsorção e termoquímica. Campinas, SP: Instituto de Química da Unicamp, 2005. (Tese de Doutorado).

LIN, A. S. P. *et al.* Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*. v. 24, p. 481-489, 2003.

LIU, Y. L.; SU, Y. H. & LAI, J. Y. *In situ* crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. *Polymer*. v. 45, p. 6831-6837, 2004.

MA, P. X. & CHOI, J. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering*. v. 7, n. 1, p. 23-32, 2001.

MADIHALLY, S. V. & MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. v. 20, p. 1133-1142, 1999.

MAMEDE, J. N. & PRADO, L. A. S. A .Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. *Química Nova*. v.28, n.2, p. 281-288, 2005.

MARTIN, A. I.; SALINAS, A. J. & VALLET-REGI, M. Bioactive and degradable organic-inorganic hybrids. *Journal of the European Ceramic Society*. v. 25, p. 3533-3538, 2005.

MARTÍNEZ, J. R. et al. Infrared spectroscopy analysis of the local atomic structure in silica prepared by sol-gel. *Journal of Chemical Physics*. v. 109, n. 17, p. 7511-7514, 1998.

MARTINEZ, Y. et al. Hybrid ternary organic-inorganic films based on interpolymer complexes and silica. *Polymer*. v. 45, p. 3257-3265, 2004.

MEYER, U.; JOOS, U. & WIESMANN, H. P. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III. *Oral & Maxillofacial Surgery*. v. 33, p. 635-641, 2004.

MIDDLETON, J. C. & TRIPTON, A J. *Biomaterials*, v.21, p. 2335, 2000.

MONTEIRO JÚNIOR, O. A. C. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana. Campinas, SP: Instituto de Química da Unicamp, 1999. (Tese de Doutorado).

MOLINARO, G. et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*. v. 23, p. 2717-2722, 2002.

MONTEBAULT, A.; VITON, C. & DOMARD, A. Rheometric study of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. v. 26, p. 1633-1643, 2005a.

MONTEBAULT, A.; VITON, C. & DOMARD, A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. v. 26, p. 933-943, 2005b.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. v. 16, n. 65, p.55-63, 1983.

MUZZARELLI, C.& MUZZARELLI, R. A A. Natural e artificial chitosan-inorganic composites. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v.92, p. 89-94, 2002.

NAGAHATA, M. et al. The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*. v. 26, p. 5138-5144, 2005.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. v. 74, p. 65-72, 2002.

NOTINGHER, I. et al. Application of Raman microspectroscopy to the characterization of bioactive materials. *Materials Characterization*. v. 49, p. 255-260, 2003.

NUTTELMAN, C. R. et al. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels NIH3T3 cell adhesion, proliferation and migration. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 57, p. 217-223, 2001.

NUTTELMAN, C. R.; HENRY, S. M. & ANSETH, K. S. Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. v. 23, p. 3617-3626, 2002.

OLIVEIRA, A. A. R. Síntese de espumas híbridas de vidro bioativo/PVA para aplicação em engenharia de tecidos. Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. (Dissertação de Mestrado).

OLIVIER, V.; FAUCHEUX, N. & HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *DDT-Research Focus*. v. 9, n. 18, p.803-811, 2004.

OLMO, N. et al. Bioactive sol-gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation. *Biomaterials*. v. 24, p. 3383-3393, 2003.

ORBAN, J. M.; MARRA, K. G. & HOLLINGER, J. O. Composition options for tissue engineering bone. *Tissue Engineering*. v. 8, n. 4, p. 529-539, 2002.

ORTEGA, F. S. et al. Surfactants: A necessity for producing porous ceramics. *Am. Ceram. Soc. Bull.* v. 80, n. 4, p. 37-42, 2001.

OSMAN, Z. & AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Eletrochimica*. v. 48, p. 993-999, 2003.

PACHECO, R. B. & BEPPU, M. M. Membranas de quitosana e colágeno tipo 1 para biomineralização-osteogênese. *III Congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais*, Campinas, p. 100, 2004.

PARK, S. B. et al. A novel pH – sensitive membrane from chitosan-TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics. *Biomaterials*. v. 22, p. 323-330, 2001.

PAULINO, A.T et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrates Polymers*.v.64, p.98-103, 2005.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L. & ORÉFICE, R. L. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Out/Dez 1999.

PEREIRA, M. M. & HENCH, L. L. Mechanisms of hidroxyapatite formation on porous gel-silica substrates. *Journal of sol-gel science and technology*. v. 7, p. 59-68, 1996.

PEREIRA, M. M. *et al* Citotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared sol-gel method. *Key Engineering Materials*. v. 284, p. 589-592, 2005a.

PEREIRA, M. M. *et al*. Mechanical behavior of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams obtained by the sol-gel process. *Key Engineering Materials*, Suíça. v. 284, p.757-760, 2005b.

PEREIRA, M. M. *et al*. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by sol-gel method. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. v. 16, p. 1045-1050, 2005c.

PEREIRA, M. M.; JONES, J. R. & HENCH, L. L. Bioactive glass a hybrid scaffolds prepared by the sol-gel method for bone tissue engineering. *Advances Applied Ceramics*. v 104, p. 35-42, 2005.

PETER, M.,G. *Pure Appl. Chem*. v. 4, p. 629-640, 1995.

PINOTTI, A. et al. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*. v. 21, p. 66-72, 2007.

RÁMILA, A. & VALLET-REGÍ, M. Static and dynamic in vitro of a sol-gel glass bioactivity. *Biomaterials*. v. 22, p. 2301-2306, 2001.

RASHIDOVA, S.S. et al. Bionanocompositional chitosan-silica sorbent for liquid chromatography. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* v. 800, n. 1-2, p. 49-53, 2004.

RATAJSKA, M. & BORYNIEC, S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive & Functional Polymer*. v. 38, p. 35-49, 1998.

RATNER, B.D. et al. Biomaterials Science: an interdisciplinary endeavor. *Biomaterials Science*, 1996.

REGE, P. R. & BLOCK, L. H. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research*. v. 321, p. 235-245, 1999.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J. & BLOCK, L. H. Spray-dried chitinosans. Part I: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 252, p. 41-51, 2003.

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

REN, D. et al. A preliminary study on fabrication of nanoscale fibrous chitosan membranes in situ by biospecific degradation. *Journal of Membrane Science*. v. 280, p. 99-107, 2006.

RHEE, S. Effect of molecular weight of poly(ϵ -caprolactone) on interpenetrating network structure, apatite-forming ability, and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/silica nano-hybrid materials. *Biomaterials*. v. 24, p. 1721-1727, 2003.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G. & DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. v. 40, p. 7029-7032, 1999.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* v. 31, p. 603-632, 2006.

ROCHA, J. H. G. et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone*. v. 37, p. 850-857, 2005.

ROSE, F. R. A. J. & OREFFO, R. O. C. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biomechanical and Biophysical Research Communications*. v. 292, n. 1, p. 1-7, 2002.

ROSE, F. R. A. et al. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials*. v. 25, p. 5507-5514, 2004.

SASHIWA, H. & AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. v. 29, p. 887-908, 2004.

SENSO, A.; OLIVEROS, L. & MINGUILLÓN, C. Chitosan derivatives as chiral selectors bonded on allyl silica gel: preparation, characterization and study of resulting high performance liquid chromatography chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*. v. 839, p.15-21, 1999.

SEPULVEDA, P.; JONES, J. R. & HENCH, L. L. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 61, n. 2, p. 301-311, 2002.

SHAO, C. et al. Fiber mats of poly(vinylalcohol)/silica composite via electrospinning. *Materials Letters*. v. 57, p. 1579-1584, 2003.

SHCHIPUNOV, Y. A. et al. Gelling of otherwise nongelable polysaccharides. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 287, p. 373-378, 2005.

SHIN, H.; JO, S. & MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. v. 24, p. 4353-4364, 2003.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 18, p. 237-242, 1996.

SHIROSAKI, Y. et al. In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes. *Biomaterials*. v. 26, p. 485-493, 2005.

SIGNINI, R. & CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polímeros*. v.11, n.2, 2001.

SILVA, M.M.C.G et al. The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. v. 27, p.5909-5917, 2006.

SITTINGER, M.; HUTMACHER, D. W. & RISBUD, M. V. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 15, p. 411-418, 2004.

SRINAVA, P.C. et al. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*. v. 63, p. 79-85, 2004.

STAMMEM, J. A. et al. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials*. v. 22, p. 799-806, 2001.

STANKUS, J. J.: GUAN, J. & WAGNER, W. W. Elastomers, biodegradable. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. P. 484-494, 2004.

SUZUKI, T. & MIZUSHINA, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v. 84, n. 2, p. 128-132, 1997.

TANABE, T.; OKITSU, N. & YAMAUCHI, K. Fabrication and characterization chemically crosslinked keratin films. *Materials Science and Engineering C*. v. 24, p. 441-446, 2004.

TOMIHATA, K. & IKADA, Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. v. 18, p. 567-575, 1996.

TONOLI, M. S.; LEAL, C. V. & BEPPU, M. M. Preparação e caracterização de cimentos de quitosana e β -TCP. *III Congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais*, Campinas, p. 100, 2004.

TORRES, M. A et al. Produção e otimização de microesferas de quitosana. *III Congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais*, Campinas, p. 100, 2004.

TSANG, V. L. & BHATIA, S. N. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.56, p. 1635-1647, 2004.

VALÉRIO, P. et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. v. 25, p. 2941-2948, 2004.

VALÉRIO, P. et al. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v. 16, p. 851-856, 2005.

VALLET-REGÍ, M. et al. nanostructure of bioactive sol-gel glasses and organic-inorganic hybrids. *Chem. Mater*. v. 17, p. 1874-1879, 2005.

VIALA, S.; FRECHE, M. & LACOUT, J. L. Effect of chitosan on octacalcium phosphate cristal growth. *Carbohydrate Polymers*. v. 29, p. 197-201, 1996.

WANG, M.; JOSEPH, R. & BONFIELD, W. Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials*. v. 19, p. 2357-2366, 1998.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. v. 24, p. 2133-2151, 2003.

WANG, Y. C. et al. Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. v. 24, p. 1047-1057, 2003.

WONORAHARDJO, S. NMR relaxation studies of porous sol-gel glasses. *Magnetic Resonance Imaging*. v. 16, n. 5/6, p. 511-513, 1998.

WRIGHT, D. D. Degradable polymer composites. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. P. 423-432, 2004.

YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*. v. 7, n. 6, p. 679-686, 2001.

YANG, X. B. et al. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone*. v. 29, n. 6, p. 523-5431, 2001.

YANG, Y. M.; WANG, J. W. & TAN, R. X. Immobilization of oxidase on chitosan-SiO₂ gel. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 34, p. 126-131, 2004.

YEH, J. T.; CHEN, C. L. & HUANG, K. S. Synthesis and properties of chitosan/SiO₂ hybrid materials. *Materials Letters*. IN PRESS. 2006.

YOO, J. J. & RHEE, S. Evaluations of bioactivity and mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone)/silica nanocomposite following heat treatment. *J. Biomed. Mater. Res*. v. 68A, P. 401-410, 2004.

ZAJACZKOWSKI, M. B. et al. Cell-matrix adhesions on poly *Tissue Engineering*. v. 9, n. 3, p. 525-532, 2003.

ZHANG, X. et al. In vitro degradation and biocompatibility of poly(L-lactic acid)/chitosan fiber composites. *Polymer*. v. 48, p. 1005-1011, 2007.

ZHANG, Y. & ZHANG, M. Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v. 282, p. 159-164, 2001.

ZHANG, Y. & ZHANG, M. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. v. 15, p. 255-260, 2004.

ZHANG, Y. et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*. v. 340, p. 1914-1917, 2005.

ZONG, Z. et al. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*. v. 41, p. 899-906, 2000.