

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
GABRIELLY DOS SANTOS PEREGRINO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA E
QUITOSANA COM FOSFATO TRI-CÁLCICO DO TIPO BETA PARA APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS

RIO DE JANEIRO
2012

Gabrielly dos Santos Peregrino

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ARCABOUÇOS DE QUITOSANA E QUITOSANA
COM FOSFATO TRI-CÁLCICO DO TIPO BETA PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de
Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Profa. Nilce Carbonel Campos da Rocha

Orientadora

Departamento de Química Analítica – IQ/UFRJ

Profa. Glória Dulce de Almeida Soares

Co-orientadora

Engenharia de Materiais – Coppe/UFRJ

Rio de Janeiro

2012

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem;

À minha irmã, que mostrou como seguir em frente;

À minha vovó, que acreditou em mim desde o início;

Ao meu namorado, por colaborar e apoiar nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Àquele sem o qual nada disto seria possível: Deus. Também à Nossa Senhora das Graças, que derramou graças sobre esta filha e possibilitou a realização desta experiência, e ao meu mentor espiritual, que nunca me deixou fraquejar diante das dificuldades desta jornada!

À UFRJ e seu corpo docente, que me forneceu conhecimentos teóricos e práticos para minha formação acadêmica.

Aos meus queridíssimos familiares Agnaldo, Eliana, Giselly e Mauricio, sem os quais nada poderia ter sido feito! Agradeço pelo amor, apoio na escolha da minha carreira e carinho. Obrigada! Sem vocês, eu nada seria!

Aos amigos Rafaela, Guilherme, Danielly, Dudu, Marquinhos e Lívia, que simplificaram as dificuldades e estavam presentes em todos os momentos. Obrigada!

Aos amigos biomaterialistas, sempre prestativos, seja com ajuda técnica, seja com a amizade!

Ao Dr. Emerson Schwingel, por apresentar a área de materiais!

À Dra. Glória Soares e Dra. Nilce Carbonel, que me orientaram nesta pesquisa e me ajudaram a evoluir.

Resumo

PEREGRINO, Gabrielly dos Santos. Produção e caracterização de arcabouços de quitosana e quitosana com fosfato tri-cálcico do tipo beta para aplicações biomédicas. Rio de Janeiro, 2012. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

O conhecimento do comportamento da degradação de arcabouços porosos é extremamente importante quando se trata de biomateriais. Neste trabalho, prepararam-se arcabouços tridimensionais de quitosana e quitosana/fosfato tri-cálcico do tipo beta (β -TCP) pelo método *freeze drying*. A caracterização físico-química dos arcabouços foi realizada por espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura. O estudo de biodegradação *in vitro* utilizando *phosphate buffer saline* (PBS) e lisozima (1,5mg/mL) foi feito por até vinte e oito dias. Avaliaram-se estrutura, perda de massa e morfologia dos poros dos materiais. Também mediu-se o valor do pH da solução sobrenadante após cada tempo de avaliação da degradação. A ação do agente reticulador tripolisofato de sódio também foi avaliada. Os arcabouços de quitosana sem reticular apresentaram-se mais frágeis ao final das quatro semanas frente aos que foram reticulados, de maneira que os poros daqueles praticamente sumiram. Para o material de quitosana/ β -TCP, ambas as formas, reticulados e sem reticular, se mantiveram equivalentes nas condições descritas anteriormente. O pH de todos os arcabouços envolvidos manteve-se acima de 6,5, e tal garantiu que os materiais permanecessem insolúveis durante todos os vinte e oito dias.

Palavras-Chave: quitosana, fosfato de cálcio, fosfato tri-cálcico do tipo beta, biodegradação, reticulação

Lista de Figuras

Figura 2-1 - Estutura da quitina. Adaptada de Kumar (2000).....	13
Figura 2-2 - Estruturas polimórficas da quitina (ANTONINO, 2007).....	14
Figura 2-3 - Levantamento de trabalhos científicos que utilizaram quitosana (base de dados Elsevier). Adaptado de RESENDE (2010).....	15
Figura 2-4 - Estutura da quitosana. Adaptada de Chen <i>et al.</i> (2010)	15
Figura 2-5 - Esquema da reticulação física da quitosana pelo tripolifosfato de sódio. Adaptada de LAUS <i>et al.</i> (2006)	19
Figura 4-1 – Difratoograma de DRX da quitosana em pó.....	26
Figura 4-2 - Espectro de FTIR da quitosana em pó.....	27
Figura 4-3 - Difratoograma de DRX do β -TCP em pó.....	29
Figura 4-4 - Espectro de FTIR do β -TCP em pó	29
Figura 4-5 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana sem reticular e: sem esterilizar (a), esterilizado (b).	31
Figura 4-6 - Espectros de FTIR dos arcabouços de quitosana sem reticular e reticulado (1% TPNa).	32
Figura 4-7 - Difratoograma de DRX para os arcabouços de quitosana sem reticular e reticulado (1% TPNa).....	32
Figura 4-8 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana sem reticular (a) e reticulado (1% TPNa m/v) (b).	33
Figura 4-9 - Taxa de intumescimento dos arcabouços de quitosana com e sem reticulação. ..	34
Figura 4-10 - Porcentagem de massa remanescente em função do tempo de degradação em um sistema estático para arcabouços de quitosana antes e após sofrer reticulação.....	34
Figura 4-11 - Micrografias de MEV dos arcabouços após teste de degradação.....	36
Figura 4-12 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular e: sem esterilizar (a), esterilizado (b).	37
Figura 4-13 - Micrografia de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular, mostrando a distribuição de partículas de β -TCP.	37
Figura 4-14 - Espectros de FTIR dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular e reticulado (1% TPNa).....	38

Figura 4-15 - Micrografia de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP reticulados e: sem esterilizar (a), esterilizado (b), mostrando a distribuição homogênea de partículas de β -TCP.	39
Figura 4-16 - Porcentagem de massa remanescente em função do tempo de degradação em um sistema estático para arcabouços de quitosana com β -TCP antes e após sofrer reticulação. ...	39
Figura 4-17 - Micrografias de MEV dos compósitos após teste de degradação	41
Figura 4-18 - Variação do pH na solução de degradação de acordo com o tempo: (a) arcabouços de quitosana, (b) arcabouços de quitosana + β -TCP	43

Lista de Tabelas

Tabela 2-1 - Principais propriedades da quitosana em relação ao seu uso em aplicações biomédicas. Adaptado de RINAUDO (2006).	16
Tabela 2-2 - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio. Adaptado de BUCHANAN (2008).....	17
Tabela 2-3 - Vantagens e desvantagens de diferentes formas de esterilização (MARRECO <i>et al.</i> , 2004).....	20
Tabela 4-1 - Regiões características de comprimentos de onda e sua relação com grupos químicos para a quitosana. Adaptado de Costa Jr. E.S. (2008).....	28
Tabela 4-2 - Frequências de vibração ativa em infravermelho dos fosfatos de cálcio (Slosarczyk <i>et al.</i> , 2005; Stoch <i>et al.</i> , 2000; Marques, 2003; Markovic <i>et al.</i> , 2004).....	30

Sumário

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 BIOMATERIAIS	13
2.2 QUITINA E QUITOSANA	13
2.3 FOSFATOS DE CÁLCIO	16
2.3.1 Importância dos Fosfatos de Cálcio como Biomateriais	17
2.3.2 Classificação dos Fosfatos de Cálcio.....	17
2.3.3 Fosfato Tri-Cálcico do tipo β (β -TCP)	18
2.4 RETICULAÇÃO.....	18
2.5 ESTERILIZAÇÃO	19
2.6 GRAU DE DESACETILAÇÃO.....	20
2.7 BIODEGRADAÇÃO	21
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODO	22
3.1 FOSFATO TRI-CÁLCICO.....	22
3.1.1 Obtenção do β -TCP	22
3.1.2 Caracterização do β -TCP.....	22
3.2 QUITOSANA	22
3.2.1 Caracterização da quitosana	22
3.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....	22
3.3.1 Arcabouço de Quitosana Monocamada.....	22
3.3.2 Compósito de Quitosana- β -TCP Monocamada.....	23
3.3.3 Neutralização	23
3.3.4 Reticulação	23
3.3.5 Esterilização.....	23
3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
3.3.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	24
3.3.8 Difração de raios-X (DRX)	24
3.3.9 Grau de Intumescimento.....	24
3.3.10 Biodegração <i>in vitro</i> dos arcabouços.....	24
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	26
4.1.1 Quitosana	26
4.1.2 Fosfato tri-cálcico do tipo β (β -TCP)	28
4.2 NEUTRALIZAÇÃO	31
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ARCABOUÇO DE QUITOSONA MONOCAMADA	31
4.3.1 Efeito da reticulação	31
4.3.2 Intumescimento	33
4.3.3 Biodegradação <i>in vitro</i>	34
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO QUITOSONA + B-TCP.....	37
4.4.1 Efeito da reticulação	38

4.4.2	Biodegradação <i>in vitro</i>	39
4.5	VARIAÇÃO DE PH.....	42
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO		44
	REFERÊNCIAS.....	45

Capítulo 1 – Introdução

Tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população devido aos avanços tecnológicos e à melhoria da qualidade de vida, faz-se necessário estudar materiais e métodos que proporcionem isso. Ademais, o esqueleto de um adulto não é imutável e se renova constantemente, da ordem de 10% ao ano, o que é necessário para conservação de propriedades mecânicas dos ossos e da cicatrização, em caso de fratura. Entretanto, há situações em que não é possível realizar a remodelagem óssea como, por exemplo, câncer ósseo, algumas patologias genéticas, entre outros. Em casos assim, justifica-se a utilização de biomateriais cerâmicos, em particular os fosfatos de cálcio.

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas devido às suas propriedades favoráveis para a substituição óssea, tais como: composição química próxima à do osso humano, osteocondutividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, em alguns casos (HENCH, 1998). Tais vantagens podem ser explicadas pela natureza química desses materiais; por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (KAWACHI, 2000).

Dentre os fosfatos de cálcio, as cerâmicas à base de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), HA, ou de fosfato tri-cálcico do tipo β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \beta$), β -TCP, são as mais empregadas em aplicações clínicas, como enxertos ósseos, reconstrução craniomaxilofacial e em arcabouços para engenharia de tecidos. Possuem estabilidade dimensional mínima, além de permitir degradabilidade em fluidos.

A produção e a caracterização dos materiais são de extrema importância a fim de se conhecerem os parâmetros que permitem prever a confiabilidade do material, além de extrapolar a sequência de estudo *in vitro* e *in vivo*, inerente ao processo de estudos, a qual é pertinente ao conhecimento da futura aplicação do biomaterial.

A avaliação da degradação de fosfatos de cálcio é uma forma de se prever o comportamento celular antes mesmo que o material seja testado *in vitro* na presença de células. A presença de íons cálcio no meio influencia a viabilidade, diferenciação e proliferação celular (SCHUMACHER et al., 2010). Sendo assim, o conhecimento da solubilidade dessas cerâmicas, em diferentes meios, pode auxiliar a escolha de materiais para uma determinada aplicação.

A quitosana é um polissacarídeo linear derivado da desacetilação parcial da quitina, que é comumente encontrada em carapaças de crustáceos marinhos, insetos e paredes

celulares de fungos; tem sido bastante utilizada em aplicações biomédicas por causa da sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, estrutura porosa; e por ser propícia ao crescimento celular, osteocondução e natureza bactericida. A vantagem de um implante polimérico degradável é que elimina a necessidade de uma segunda cirurgia e acelera o crescimento do novo osso. Ainda é preciso que se realizem estudos com relação a baixas porosidade interconectada para adesão celular e resistência mecânica de compósitos de quitosana (VENKATESAN *et al.*, 2011).

O comportamento de arcabouços porosos durante a degradação é importante. A taxa de degradação afeta o crescimento celular e a resposta ao hospedeiro (SHE *et al.*, 2008), uma vez que tais arcabouços, os quais são implantados no corpo, devem manter suas propriedades mecânicas e integridade estrutural até que a célula que abriga tal material se adapte ao meio e excrete quantidade suficiente de matriz extracelular, por exemplo (SHE *et al.*, 2008). Por outro lado, é desejável que o arcabouço seja totalmente degradado e absorvido pelo organismo após realizar a sua função. Acredita-se que a taxa de degradação *in vivo* seja similar ou um pouco menor que a taxa de formação tecidual (SHE *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar arcabouços de quitosana e quitosana com fosfato tri-cálcico do tipo beta (β -TCP), além de estudar a degradação dos mesmos em meio estático.

Capítulo 2 – Revisão da literatura

2.1 Biomateriais

O ser humano, ao longo de sua história, tem buscado longevidade e maiores padrões de qualidade de vida. Sendo assim, há necessidade de meios alternativos para reparo e substituição de tecidos vivos lesionados por fratura e traumas (PEREIRA, 1994; DOMINGUES, 2006). Com esse intuito, buscaram-se materiais sintéticos que acelerem a reparação óssea (BORGES, 2000; DOMINGUES, 2006).

Os biomateriais podem ser definidos como quaisquer substâncias, ou combinação destas, de origem sintética ou natural. Eles podem ser utilizados durante um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função corporal (WILLIANS, 1987).

Os materiais utilizados para tais fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros (BERTRAN, 2000), ou a combinação de materiais distintos, gerando um material compósito (RESENDE, 2010).

2.2 Quitina e Quitosana

A quitina (Figura 2-1), poli (β -(1,4)-N-acetil-D-glicosamina, é um polissacarídeo natural de grande importância que foi identificado pela primeira vez por Bracconot, em 1884. É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e fica apenas atrás da celulose, podendo ser encontrado em animais marinhos, insetos e fungos e, sobretudo, em exoesqueletos de crustáceos e nas paredes celulares de alguns fungos (ANTONINO, 2007).

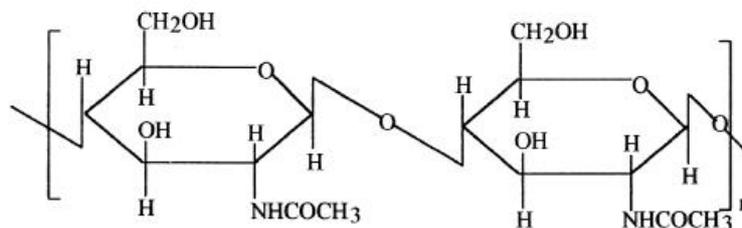


Figura 2-1 - Estrutura da quitina. Adaptada de Kumar (2000)

As principais fontes de quitina são as carapaças de caranguejos e cascas de camarão, os quais são obtidos de descartes da indústria pesqueira. Os exoesqueletos de crustáceos podem apresentar de 15-20% de quitina, 25-40% de proteínas e 40-55% de carbonatos de cálcio (MATHUR e NARANG, 1990).

Industrialmente, a separação da quitina de outros componentes da carapaça envolve um processo químico com etapas de desmineralização e desproteíntização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo (AZEVEDO, 2007). A quitina é um material biodegradável, não tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos.

Por meio de estudos de difração de raios-X, é possível observar que a fase cristalina da quitina é ordenada, e ela ocorre em 3 diferentes formas, denominadas α , β e γ . Estas diferem entre si no arranjo de suas cadeias, conforme Figura 2-2.

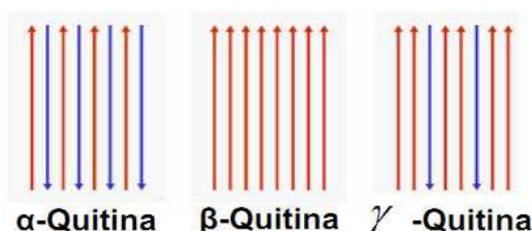


Figura 2-2 - Estruturas polimórficas da quitina (ANTONINO, 2007)

Conforme Antonino (2007), as três estruturas polimórficas estão possivelmente relacionadas a diferentes funções no organismo. A forma α é encontrada onde é necessária uma extrema dureza (resistência), como em cutículas de artrópodes e, frequentemente, é associada a proteínas ou materiais inorgânicos ou a ambos. As formas β e γ são encontradas onde são necessárias flexibilidade e dureza, mas em diferentes graus. A forma dominante, α -quitina, é mais estável que as formas β e γ ; entretanto, estas podem ser convertidas à forma α por tratamentos adequados.

A utilização de polímeros naturais em diversas aplicações tem sido sobremaneira importante para o avanço da ciência. Recentemente, a quitina e a quitosana vêm sendo mais frequentemente utilizadas, por se tratarem de materiais potencialmente úteis para diversos fins. Fez-se uma busca por trabalhos científicos que utilizassem a quitosana, entre 1993 e 2011, na base de dados *Elsevier*. O resultado, em porcentagem, está mostrado na Figura 2-3. É notável que, nos últimos anos, o interesse por esse material é crescente, e isso é justificado pelas diversas áreas de aplicação da quitosana como, por exemplo: na agricultura – em pesquisas por mecanismos defensivos e adubo para plantas –, no tratamento de água e nas indústrias alimentícia, biomédica, farmacêutica e cosmética (AZEVEDO, 2007).

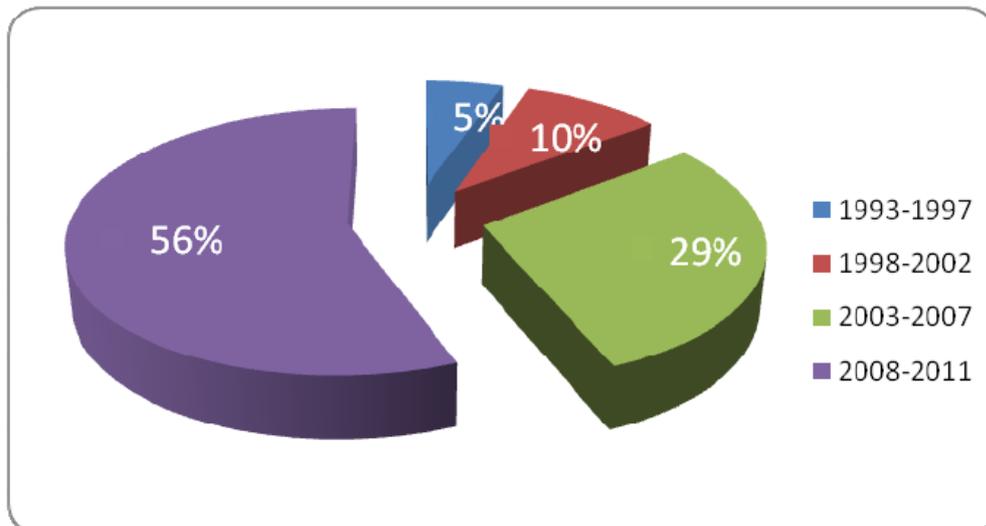


Figura 2-3 - Levantamento de trabalhos científicos que utilizaram quitosana (base de dados *Elsevier*). Adaptado de RESENDE (2010).

A quitosana (Figura 2-4), por sua vez, é um copolímero da quitina, e ambos são constituídos por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis, sendo este último o predominante na quitosana (SILVA, 2006). Essas unidades são ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.

Uma parcial desacetilação da quitina leva à formação da quitosana, mas esta também pode estar presente naturalmente em alguns fungos pertencentes ao gênero *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA, 2006). A quitosana possui muitas propriedades biológicas específicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade (CHEN, 2010).

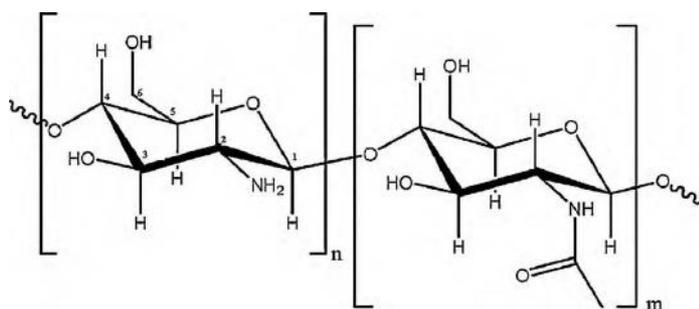


Figura 2-4 - Estrutura da quitosana. Adaptada de Chen *et al.* (2010)

A produção industrial de quitosana ocorre pela desacetilação alcalina da quitina. Durante essa reação, os grupamentos acetoamidos ($-\text{NHCOCH}_3$) são rompidos e transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$) (ANTONINO, 2007). A desacetilação da quitina raramente é completa, uma vez que, quando a reação atinge cerca de 60%, a quitosana é obtida. Contrariamente ao que se possa pensar, o prolongamento da

reação, que gera produtos mais desacetilados, também provoca severa degradação das cadeias poliméricas (MATHUR, 1990).

É válido ressaltar que os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características da quitosana são a temperatura e tempo de reação, a concentração do solvente básico utilizado e sua razão com a quantidade de quitina, o tamanho das partículas de quitina, a atmosfera da reação e a presença de agentes que evitem a despolimerização (MATHUR, 1990; ROBERTS, 1992).

Na literatura, consta uma grande variedade de aplicações biomédicas para a quitosana, dado que é um material biocompatível e biodegradável pela ação da lisozima, enzima presente nos fluidos corpóreos dos humanos (KUMAR, 2000). A Tabela 2-1 apresenta as principais propriedades da quitosana em relação à sua utilização como material biomédico.

Tabela 2-1 - Principais propriedades da quitosana em relação ao seu uso em aplicações biomédicas. Adaptado de RINAUDO (2006).

Aplicações Biomédicas Potenciais	Principais Características
Suturas	Biocompatível
Pele artificial	Biodegradável
Reconstrução óssea	Renovável
Lentes de contato para córnea	Forma filme
Carreador para liberação controlada de fármacos em humanos e animais	Agente hidratante
Material para encapsulamento	Não-tóxico Hidrolisado pela lisozima Cicatrizante Eficiente contra bactérias, vírus e fungos

A reação de degradação da quitosana pela lisozima se dá via hidrólise dos grupos acetilados residuais e a taxa de degradação diminui com o aumento do grau de acetilação e cristalinidade do polímero (MARTINO, 2005; RESENDE, 2010).

2.3 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaP) são a família de biocerâmicas mais utilizada por seu grande uso em aplicações biológicas, já que suas fases químicas estão presentes em alguns tecidos como, por exemplo, nos ossos e dentes.

2.3.1 Importância dos Fosfatos de Cálcio como Biomateriais

Os principais materiais utilizados como biomateriais para repor e regenerar o tecido ósseo são os fosfatos de cálcio. Dentre suas principais características, destacam-se: composição química, degradabilidade e atividade de superfície, que os tornam bastante próximos à fase mineral óssea (SANTOS, 2008).

Devido a essa semelhança, nos últimos 20 anos, a hidroxiapatita (HA) era o material preferencialmente escolhido por não possuir toxicidade local e sistêmica, respostas inflamatórias e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro, segundo Kawachi *et al.* (2000, *apud* GUASTALDI, A.C. e APARECIDA, A.H., 2010). Apesar disso, a HA possui baixo índice de bioatividade e baixa taxa de degradação, fatores que limitavam seu uso. Por esse motivo, aumentou-se o interesse em outros fosfatos de cálcio para utilização como biomaterial.

2.3.2 Classificação dos Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são classificados de acordo com a razão molar Ca/P, que pode variar entre 0,5 a 2,0, conforme Tabela 2-2.

Tabela 2-2 - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio. Adaptado de BUCHANAN (2008)

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
fosfato monocálcico hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
fosfato bicálcico bihidratado (DCPD, bruxita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
fosfato bicálcico anidro (DCPA, monetita)	CaHPO_4	1,0
fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
fosfato α -tri-cálcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
fosfato tri-cálcico do tipo β (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2 – 2,2
hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5 – 1,67
hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

2.3.3 Fosfato Tri-Cálcico do tipo β (β -TCP)

Dentre os fosfatos de cálcio, a HA e o β -TCP vêm ganhando cada vez mais notoriedade devido à marcante resposta biológica ao ambiente fisiológico. Esses materiais são utilizados em áreas de aumento, substituição e reparo ósseo, além de na odontologia (LEGEROS, 1993).

Há forte semelhança química entre HA e a fase mineralizada do osso humano, e por isso HA sintética possui grande afinidade com tecidos rígidos hospedeiros. Já estudos com β -TCP apontam que o material é reabsorvível *in vivo* conforme o novo crescimento ósseo vai substituindo o material implantado (KIVRAK, N. e TAS, A.C., 1998). Todavia, em alguns casos, a taxa de biodegradação do β -TCP é muito rápida e o material se degrada antes da completa substituição. Nesses casos, é preferível obter um material constituído de uma mistura de fosfatos de cálcio, a fim de diminuir essa taxa de degradação (KIVRAK, N., TAS, A.C., 1998).

De acordo com Legeros (1991, *apud* TONKOVIĆ, M., SIKIRIĆ, M., BABIĆ-IVANČIĆ, V., 2000), é possível obter o β -TCP a partir de reações de estado sólido a 800-1000°C ou por sinterização de apatita deficiente em cálcio (razão Ca/P= 1,65).

2.4 Reticulação

Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação desse polissacarídeo, podem-se utilizar reticulantes. Estes têm peso molecular muito menor que o da cadeia principal entre duas ligações cruzadas consecutivas e, normalmente, apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (COSTA Jr. e MANSUR, 2008). Eles permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes, além de bloquearem os grupos amino com um agente bifuncional (COSTA Jr. e MANSUR, 2008). A quitosana pode ser reticulada, por vários agentes químicos, incluindo o glutaraldeído, o formaldeído, o ácido sulfúrico, ácidos carboxílicos e agentes físicos, como a genipina, o tripolifosfato de sódio e o alginato.

As ligações cruzadas influenciam a resistência, a taxa de degradação e a biocompatibilidade dos biomateriais. A finalidade de promover ligações cruzadas, inter e/ou intra-molecular, nas cadeias poliméricas, se deve, principalmente, ao aumento da rigidez da matriz polimérica e, conseqüentemente, a uma melhora nas propriedades mecânica do

material. Por outro lado, o polímero perde a sua fluidez e, portanto, a sua capacidade de ser moldável (RESENDE, 2010).

A imersão de arcabouços de quitosana, em uma solução de tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), induz a uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados da quitosana, como consta na Figura 2-5. A reticulação da quitosana previne que o polímero seja dissolvido em meio ácido e introduz grupos fosfatos, os quais possuem sítios básicos que poderão interagir com íons H_3O^+ e íons metálicos em solução aquosa (LAUS *et al.*, 2006).

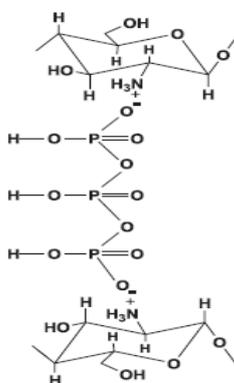


Figura 2-5 - Esquema da reticulação física da quitosana pelo tripolifosfato de sódio. Adaptada de LAUS *et al.* (2006)

2.5 Esterilização

Qualquer material que seja implantado ou entre em contato com o corpo precisa, necessariamente, ser esterilizado. Após passar por esterilização, o material pode sofrer mudanças negativas em suas características físicas, mecânicas e/ou biológicas; por isso, é preciso escolher cuidadosamente o método a ser utilizado.

Alguns métodos de esterilização, segundo Marreco *et al.* (2004), que podem ser utilizados são: autoclavagem, radiação gama, óxido de etileno, ultravioleta e imersão em solução de álcool a 70%, 75%, ou 80%. Ainda de acordo com o mesmo autor, no período de 1988 a 2003, a utilização de solução alcoólica apareceu como método de esterilização mais utilizado.

A Tabela 2-3 apresenta as vantagens e desvantagens de alguns métodos de esterilização.

Tabela 2-3 - Vantagens e desvantagens de diferentes formas de esterilização (MARRECO *et al.*, 2004)

Método	Vantagens	Desvantagens
Óxido de etileno (EtO)	Pode ser utilizado em baixas temperaturas, possui alta penetração e pode ser utilizado em vários materiais.	Pode alterar algumas propriedades mecânicas e físicas, é inflamável, explosivo e produz resíduos tóxicos.
Radiação gama	É o mais simples e eficiente método de esterilização, já que não gera resíduos tóxicos.	Quebra ligações químicas, diminui a força de tensão e não pode ser utilizado em alguns polímeros.
Solução alcoólica	É de fácil implantação e utilização.	Não é esterilizante e sim desinfetante, não age nos poros internos, mas superficialmente.

Em estudo realizado com membranas de quitosana, mostrou-se que a cor das mesmas foi muito afetada devido a radiações gama, e isso pode ser devido à formação de insaturações ou complexos coloridos que poderiam causar deterioração (MARRECO *et al.*, 2004).

2.6 Grau de desacetilação

Na estrutura da quitosana, sempre haverá unidades monoméricas de acetilamida provenientes da quitina. Por este motivo, de acordo com Khor e Lim (2003), quando a quantidade de grupos acetilados for menor que 50%, estaremos tratando da quitosana; do contrário, da quitina.

Algumas pesquisas mostram a influência do grau de desacetilação (GD) em teste *in vitro* com células. Tigh *et al.* (2007) avaliaram a influência do grau de desacetilação nas propriedades biológicas de arcabouços de quitosana. De acordo com Howling *et al.* (2001), as quitosanas de alto GD foram mais eficientes na modulação da mitogênese dos fibroblastos humanos. Chatelet *et al.* (2001) observaram que, de uma forma geral, um aumento contínuo da adesão e da proliferação celular é observado para o aumento do GD, tanto para queratinócitos, quanto para fibroblastos. Este comportamento foi associado ao fato de que,

mesmo que em pH neutro, ainda existem sítios catiônicos nas cadeias da quitosana, permitindo interações eletrostáticas com as cargas negativas da superfície das membranas celulares. Arcabouços de quitosana com GD mais altos apresentam uma taxa de crescimento celular superior aos arcabouços com GD menores. De maneira geral, quando o GD aumenta, a densidade de cargas na superfície aumenta.

2.7 Biodegradação

A degradação da quitosana depende de vários fatores, como o tamanho da cadeia, o grau de desacetilação, a presença ou não de reticulante e se há outros materiais presentes (WEI *et al.*, 2011). A utilização de enzimas também pode afetar a taxa de degradação, mas seu uso possibilita comparações mais realísticas com o que ocorre no organismo humano.

Para a quitosana, em específico, uma das enzimas que pode ser utilizada, nesse processo, é a lisozima, que é muito presente nos fluidos do corpo humano (WEI *et al.*, 2011; VERHEUL *et al.*, 2009).

De acordo com Wei *et al.*(2011), a biodegradabilidade de materiais que possuem quitosana depende do comportamento do ambiente, pois a taxa aumenta quando se diminui o pH ou aumenta a temperatura, por exemplo.

Os testes de biodegradação *in vitro* podem ser feitos utilizando-se meios estático ou dinâmico; neste último, há presença de uma taxa de fluido. Agrawal *et al.*(2000) observaram que a presença de um fluido passando diminuiu a taxa de degradação significativamente, o que vai contra o esperado. Outro ponto ressaltado por eles é que quando o material estudado era posto em um biorreator, sob condições de fluxo, ele continuava íntegro por mais tempo e mantinha suas propriedades mecânicas por um período maior, se comparado à utilização sob condição estática.

Capítulo 3 – Material e método

3.1 Fosfato tri-cálcico

O fosfato tri-cálcico (TCP) foi obtido da Merck-Darmstadt-Germany (Ref. 1.0213.9026).

3.1.1 Obtenção do β -TCP

Para obter o β -TCP utilizado neste trabalho, triturou-se o pó de TCP em gral de ágata e, em seguida, peneirou-se em peneira de 125 μ m.

O material foi tratado termicamente para que ocorresse a mudança para a fase β do TCP. A seguinte rampa de aquecimento foi utilizada: 17 horas para atingir a temperatura de 550°C, 2 horas em 550°C, 6 horas até atingir 1150°C, 2 horas em 1150°C e o restante até chegar à temperatura ambiente.

3.1.2 Caracterização do β -TCP

O β -TCP foi analisado por difração de raios-X (DRX) e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

3.2 Quitosana

A quitosana utilizada neste trabalho foi obtida da SIGMA (lote 01207CH e viscosidade 200 cps) e não continha especificação quanto ao seu grau de desacetilação (GD).

Neste projeto, não se determinou o GD, pois o mesmo lote do material já havia sido determinado por Resende (2010), pertencente ao mesmo laboratório. O método escolhido por ela foi o da titulação potenciométrica e obteve GD médio de 70%.

3.2.1 Caracterização da quitosana

Realizaram-se análises deste material por difração de raios-X (DRX) e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) pelo modo de refletância total atenuada (ATR).

3.3 Produção e caracterização dos arcabouços

3.3.1 Arcabouço de Quitosana Monocamada

O arcabouço de quitosana foi obtido dissolvendo-se quitosana em ácido acético 1%, de forma a obter uma solução de quitosana a 2% em massa. Tal solução foi agitada constantemente durante 24 horas.

O material obtido foi acomodado em moldes cilíndricos, de teflon, com diâmetro de aproximadamente 10mm, congelados por 24 horas e, posteriormente, liofilizados (equipamento L101 da Liobras) por 48 horas. Este método é conhecido como freeze drying

3.3.2 Compósito de Quitosana- β -TCP Monocamada

A proporção utilizada foi de 1:1 de Quitosana : β -TCP de acordo com estudos prévios de Resende (2010).

O compósito de quitosana com β -TCP foi obtido dissolvendo-se quitosana em ácido acético 1%, de forma a obter uma solução de quitosana a 2% em massa. Essa solução foi agitada constantemente durante 24 horas. Passado esse tempo, dispersou-se, sob agitação magnética, 0,125g de β -TCP, a mesma massa utilizada de quitosana. Com a finalidade de eliminar bolhas, deixou-se a solução no ultrassom por 5 minutos.

O material obtido foi acomodado em moldes cilíndricos, de teflon, com diâmetro de aproximadamente 10mm, congelados por 24 horas e, posteriormente, liofilizados (equipamento L101 da Liobras) por 48 horas.

3.3.3 Neutralização

Após liofilização do material, todos os arcabouços foram neutralizados com solução de NaOH 0,025 mol/L até estabilização do pH e, em seguida, eles foram imersos em água ultrapura, substituindo-a até pH 7.

3.3.4 Reticulação

Após neutralização, os arcabouços foram reticulados com tripolifosfato de sódio 1% (TPNa 1%) ($\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$), durante 3 horas à temperatura de 37°C. Essas condições foram estabelecidas por Resende (2010), com base em um planejamento de experimento do tipo 2³.

As amostras foram acomodadas em placas de poço, onde se imergiu cada arcabouço em 2mL da solução reticulante nas condições descritas acima. Após o tempo estipulado, trocou-se a solução de reticulante por água ultrapura, com a finalidade de remover o excesso do reticulante até que o pH fosse aproximadamente 7.

Após a lavagem, o material foi congelado por 24 horas e submetido à liofilização pelo mesmo tempo.

3.3.5 Esterilização

Os materiais utilizados neste trabalho foram esterilizados com raios gama com dose de radiação total de 25kGy. A unidade de medida utilizada é o quilogray (kGy).

3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Cada amostra foi fraturada utilizando-se uma lâmina do tipo Gillette® e foram cobertas por ouro. A investigação morfológica dos arcabouços produzidos antes e após a reticulação foi realizada por MEV (JEOL – JSM 6460, acoplado ao sistema de análise espectroscópica de energia dispersiva (EDS)).

3.3.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os arcabouços de quitosana foram analisados por FTIR (Spectrum 100, PerkinElmer) no modo de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos com resolução de 550 cm^{-1} e 32 varreduras (scan).

Para os arcabouços de quitosana com β -TCP, fez-se pastilha do material com KBr, em que 1mg da amostra foi triturado e misturado a 100mg de KBr. Os espectros foram obtidos com resolução de 400 cm^{-1} e 32 varreduras (scan).

3.3.8 Difração de raios-X (DRX)

Um difratômetro Miniflex Rigaku foi utilizado com o objetivo de caracterizar as fases presentes, utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ e 2θ variando de 3 a 70° com *step width* de 0,05 e *count time* igual a 1.

3.3.9 Grau de Intumescimento

Avaliou-se o grau de intumescimento dos arcabouços de quitosana e quitosana após reticulação imergindo-os em solução de PBS (solução salina tamponada em fosfato). O teste foi feito em triplicata, utilizando-se 15 amostras ao total.

Primeiramente, cada amostra foi pesada e, após os tempos de 5, 10, 30, 60 e 70 minutos, foram retiradas e colocadas sobre papel de filtro, para que o excesso de PBS fosse removido. Os arcabouços foram novamente pesados e retornados para a solução até que atingisse o tempo seguinte.

O grau de intumescimento foi avaliado em porcentagem de massa das amostras úmidas e foi calculado como segue:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (1)$$

3.3.10 Biodegração *in vitro* dos arcabouços

O teste de degradação dos arcabouços de quitosana e quitosana com β -TCP, antes e após serem reticulados, foi feito com solução de PBS contendo lisozima, de forma que houvesse concentração de lisozima igual 1,5mg/mL. Os ensaios foram realizados em estufa a 37°C durante os tempos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias e foi realizado em triplicata.

A degradação foi avaliada visualmente e por perda de massa. Após cada tempo, as amostras foram retiradas das soluções, lavadas com água ultrapura, congeladas por 24h, liofilizadas pelo mesmo tempo e finalmente pesadas. Assim sendo, as amostras foram pesadas antes e após a degradação. A perda de massa foi calculada como segue:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Os pH dos sobrenadantes foram medidos ao fim de cada tempo do teste de degradação.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

Conseguiu-se preparar os arcabouços tridimensionais que continham uma razão 1:1 de quitosana : fosfato tri-cálcico do tipo β , além do material formado apenas por quitosana, para fins de comparação.

4.1 Caracterização das matérias-primas

4.1.1 Quitosana

O padrão de difração de raios X da quitosana pode ser visto na figura 4-1.

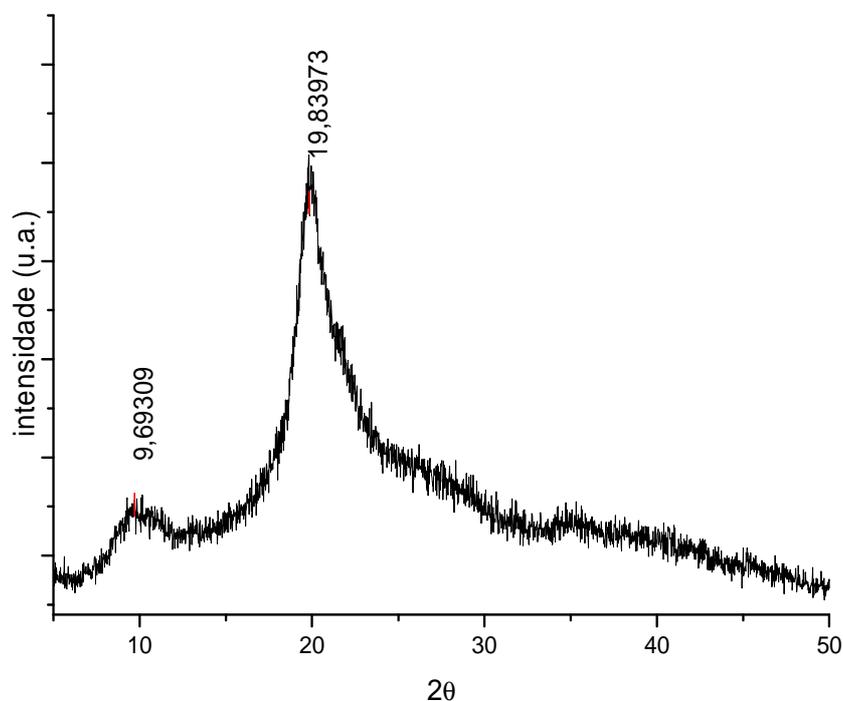


Figura 4-1 – Difratograma de DRX da quitosana em pó

A quitosana é um polímero semicristalino, quando está no estado sólido – apresenta um pico definido e um halo amorfo quando submetido à análise de DRX – e sua morfologia tem sido amplamente estudada. A literatura menciona a existência de diversos polimorfismos. De acordo com Ogawa (1991), a difração de raios-X mostra a existência de célula unitária ortorrômbica contendo duas cadeias de quitosana antiparalelas sem molécula de água.

O difratograma da quitosana evidencia um pico de alta intensidade em $19,8^\circ$ que caracteriza a presença de uma fase cristalina e uma ampla faixa abaixo dos picos menores em que predomina a forma amorfa do material. O pico em aproximadamente 10° é relativo à

presença de cristais anidros e, caso houvesse outro pico em 15° , indicaria a presença de cristais hidratados (OGAWA, 1991).

A técnica FTIR-ATR foi utilizada para identificar, por meio das bandas características, os grupamentos químicos típicos da quitosana. O espectro é mostrado na figura 4-2.

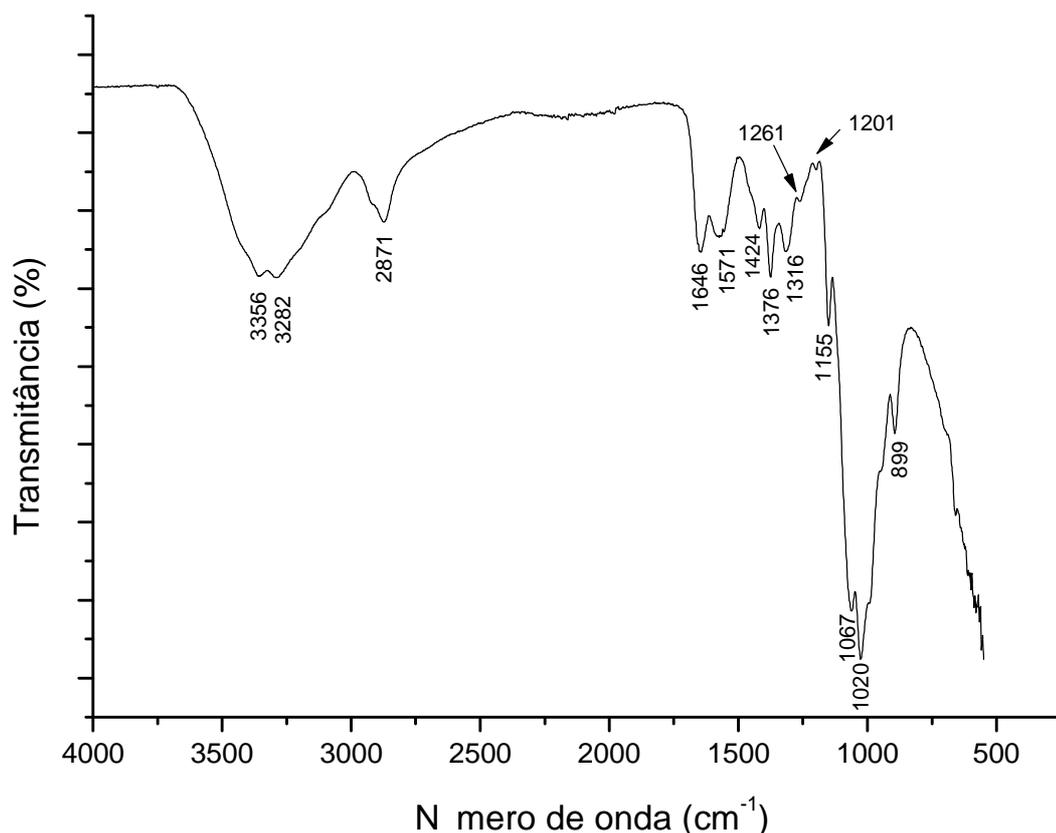


Figura 4-2 - Espectro de FTIR da quitosana em pó

De acordo com Costa Jr. (2008), a quitosana pode exibir bandas nas regiões de comprimentos de onda que estão resumidas na Tabela 4-1.

O espectro de FTIR apresenta um pico em 3356cm^{-1} que está associado ao estiramento N-H, à ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H. O estiramento C-H assimétrico pode ser visto em 2871cm^{-1} ; já em 1424cm^{-1} é associado ao estiramento angular do grupo CH_2 do tipo tesoura. A banda na região de 1646cm^{-1} refere-se ao modo vibracional da amida primária C=O. Em 1571cm^{-1} pode ser visto o estiramento N-H primário. Os picos em 1316cm^{-1} , 1261cm^{-1} e 1376cm^{-1} correspondem, respectivamente, às vibrações de dobramento das ligações C-N primária, secundária e terciária. Nota-se também uma banda referente ao estiramento antissimétrico do C-O-C em 1155cm^{-1} correspondente à ligação

glicosídica β (1-4), ou seja, a estrutura sacarídea. O estiramento da ligação C-O cíclica foi visto em 1067cm^{-1} e 899cm^{-1} .

Tabela 4-1 - Regiões características de comprimentos de onda e sua relação com grupos químicos para a quitosana. Adaptado de Costa Jr. (2008)

Bandas (cm^{-1})	Grupo químico
3570 – 3200 3450	νOH ligado νNH_2
2955 – 2845 2922	$\nu\text{C-H}$ (assimétrico)
2878	$\nu\text{C-H}$ (simétrico)
1900 – 1500 1658	Amida I: $\nu\text{C=O}$
1650 – 1550 1658 – 1630	$\delta\text{N-H}$ (I)
1570 – 1515 1560	$\delta\text{N-H}$ (II)
1465 1423	δOH e CH_2 (tesoura)
1340 – 1250 1379	$\delta\text{C-N}$ (terciária)
1321	$\nu\text{C-N}$ (primário)
1260	$\nu\text{C-N}$ (secundário)
1154 e 896	νCOC (glicose β -1-4)
1160 1154	Hidrogênio ligado
1300 – 1000	$\nu\text{C-O}$ (cíclico)
897	$\nu\text{C-O}$ (cíclico)
1640 - 1690	$\nu\text{C=NO}$ (fraca) (Base Schiff)

4.1.2 Fosfato tri-cálcico do tipo β (β -TCP)

A Figura 4-3 mostra o padrão de difração de raios-x do pó de β -TCP. De acordo com a ficha JCPDS 9-0169 para este material puro, os três picos mais intensos, identificados pelos ângulos 2θ de $31,0^\circ$, $34,5^\circ$, $27,9^\circ$, são correspondentes aos planos (0210), (220) e (214), respectivamente. Não foi observada a presença de outros fosfatos de cálcio como, por exemplo, α -TCP.

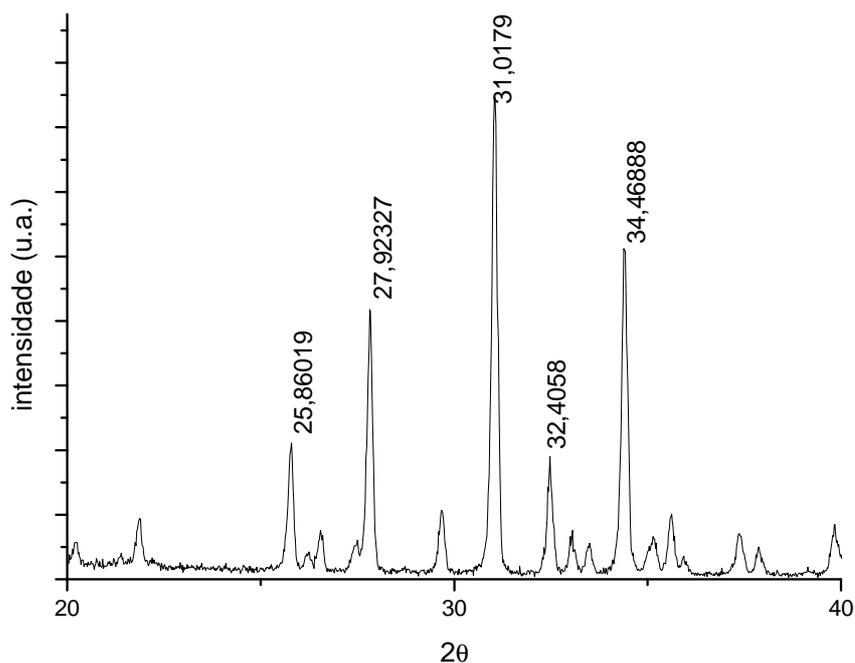


Figura 4-3 - Difratoograma de DRX do β -TCP em pó

O FTIR foi utilizado para determinar as bandas que caracterizam a fase β do TCP no material estudado. O espectro de FTIR pode ser visto na Figura 4-4; através dele, pode-se notar a presença de bandas características em 1115cm^{-1} , 1100cm^{-1} , 1079cm^{-1} e 1011cm^{-1} relativas ao estiramento 3 do grupamento PO_4^{3-} ; 945cm^{-1} e 971cm^{-1} referentes ao grupo TCP. Outras bandas como 603cm^{-1} , 590cm^{-1} e 569cm^{-1} são os estiramentos 4 do grupamento PO_4^{3-} .

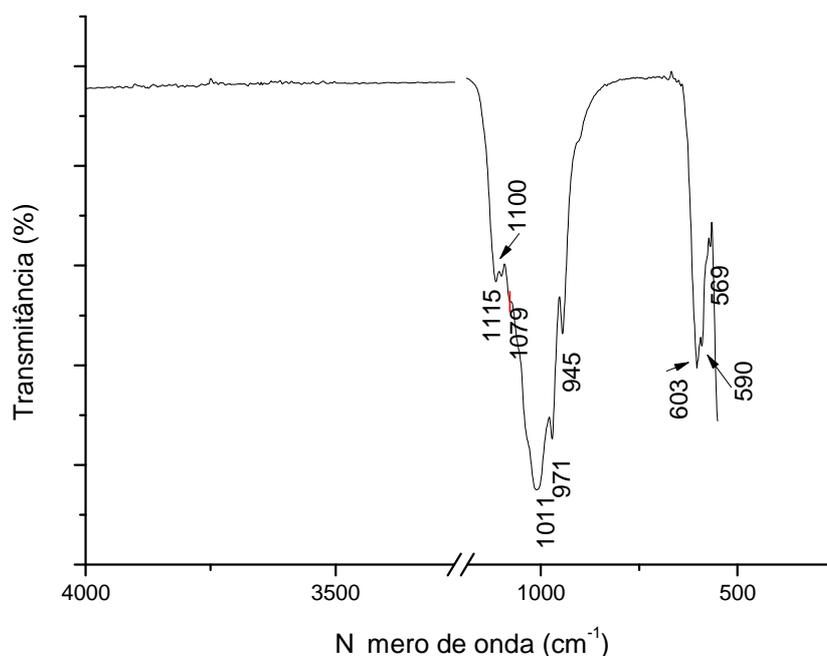


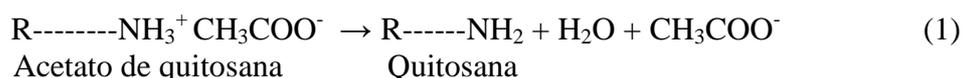
Figura 4-4 - Espectro de FTIR do β -TCP em pó

Tabela 4-2 - Frequências de vibração ativa em infravermelho dos fosfatos de cálcio (Slosarczyk et al., 2005; Stoch et al., 2000; Marques, 2003; Markovic et al., 2004).

Bandas (cm⁻¹)	Grupo químico
3568-3574, 3550, 3536	OH (v ₁)
3500	H ₂ O
2400-3200	PO-H
1635-1640	H ₂ O
1534-1548, 1455	CO₃²⁻ (v ₃) sítio A
1515	CO₃²⁻ AB
1350-1540, 1498-1500, 1470-1471, 1465-1467, 1449- 1460, 1414-1430, 1417-1419, 1410-1412, 1321	CO₃²⁻ sítio B
1143-1145	HPO₄²⁻ (v ₃)
1138, 1126, 1108, 1105, 1075	HPO₄²⁻ (OCP)
1090-1100, 1096, 1088-1092, 1085, 1077-1081, 1052-1065, 1064, 1057-1061, 1048-1053, 1034-1046, 1041-1045, 1032-1034, 1036, 999-1004, 1095, 960-1200	PO₄³⁻ (v ₃)
1038, 1022, 1025, 920	PO₄³⁻ (OCP)
1020	HPO₄²⁻ (HA deficiente em Ca)
950-1000, 980-982, 959-966	PO₄³⁻ (v ₁)
878-883	CO₃²⁻ (v ₂) sítio A
872-877, 870	CO₃²⁻ (v ₂) sítio B
866-870	Vibração P-OH em HPO₄²⁻
629-635, 342	OH ⁻
629-633, 614-615, 600-608, 590-592, 580-581, 573-574, 568	PO₄³⁻ (v ₄)
540-550, 520-535	HPO₄²⁻
467-472, 446-450, 431-433	PO₄³⁻ (v ₂)
945 e 972	TCP

4.2 Neutralização

Os arcabouços, após preparados e liofilizados, foram neutralizados com NaOH 0,025mol/L até que o pH se mantivesse constante. Tal etapa é necessária, pois, antes disso, o arcabouço é um sal de quitosana, formado pela interação dos íons acetatos (originários do ácido acético) com os íons NH_3^+ da quitosana, conforme reação (1) a seguir (RESENDE, 2010):



4.3 Caracterização do arcabouço de quitosana monocamada

As micrografias dos arcabouços de quitosana são apresentadas na Figura 4-5.

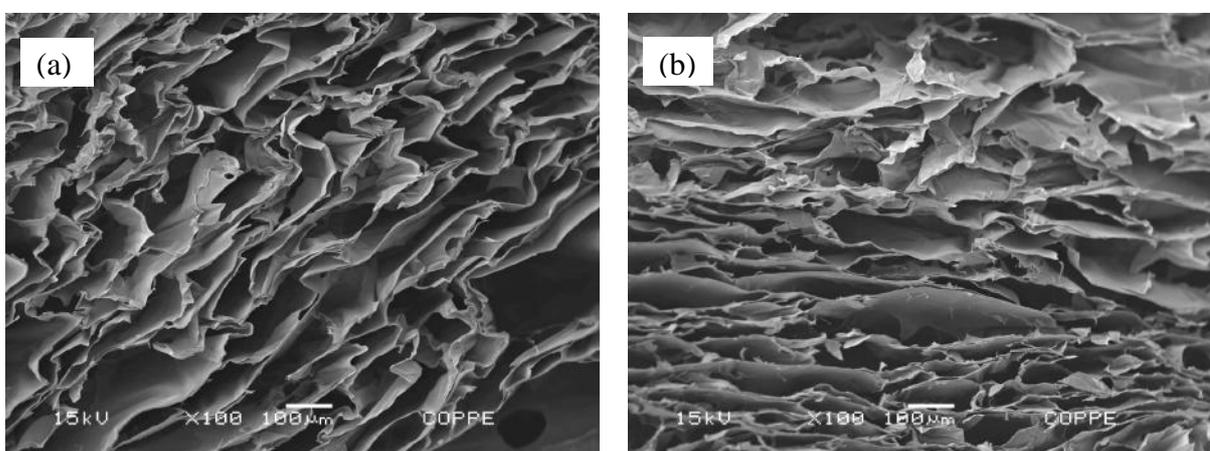


Figura 4-5 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana sem reticular e: sem esterilizar (a), esterilizado (b).

Na micrografia apresentada na Figura 4-5a, nota-se uma das possíveis formas de poros encontradas em arcabouços de quitosana, em consonância com o observado por Francis e Matthew (2000). Os poros apresentam estruturas interconectadas e de diferentes tamanhos. Após o material passar por esterilização (Figura 4-5b), não se nota alteração significativa, levando-se em consideração que o material foi cortado com Gillette® e que o material é naturalmente heterogêneo.

4.3.1 Efeito da reticulação

Os espectros de FTIR dos arcabouços sem e com reticulação (1% TPNa/3h/37°C) podem ser vistos na Figura 4-6. Percebe-se que não ocorreu mudança significativa no espectro. Lin *et al.* (2007) relataram o aparecimento, após a reticulação com TPNa 5%, da banda de absorção característica em 1200cm^{-1} referente à presença do grupo R-O-P-O, que

ratifica a reticulação da quitosana. Outro aspecto que pode ser ressaltado é a definição das bandas ao redor de 1372cm^{-1} . As mudanças sutis que foram observadas são, provavelmente, decorrentes da baixa concentração do reticulante utilizado, como observado por Resende (2010).

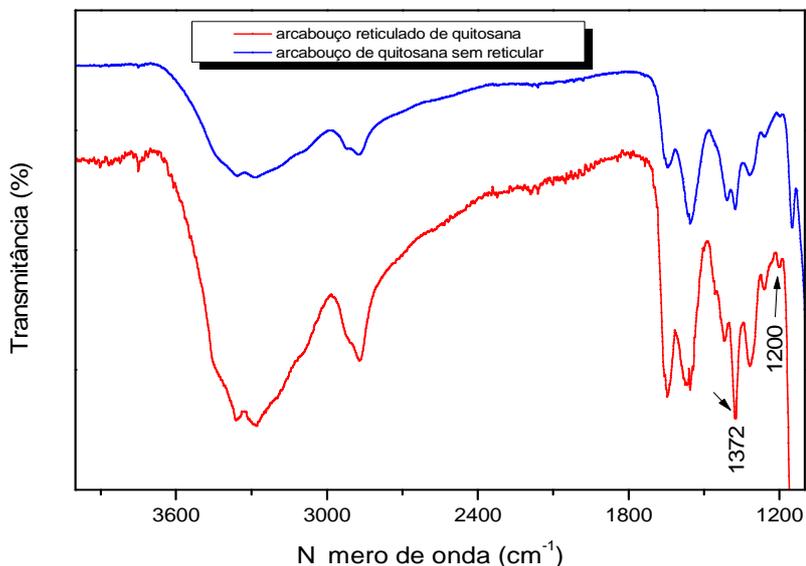


Figura 4-6 - Espectros de FTIR dos arcabouços de quitosana sem reticular e reticulado (1% TPNa).

Ainda para avaliar a ação do agente reticulante realizou-se o DRX (Figura 4-7), por meio do qual é possível notar alteração na forma do pico característico da quitosana: tornou-se mais estreito após a reticulação, e isso pode ser devido ao aumento da cristalinidade do polímero.

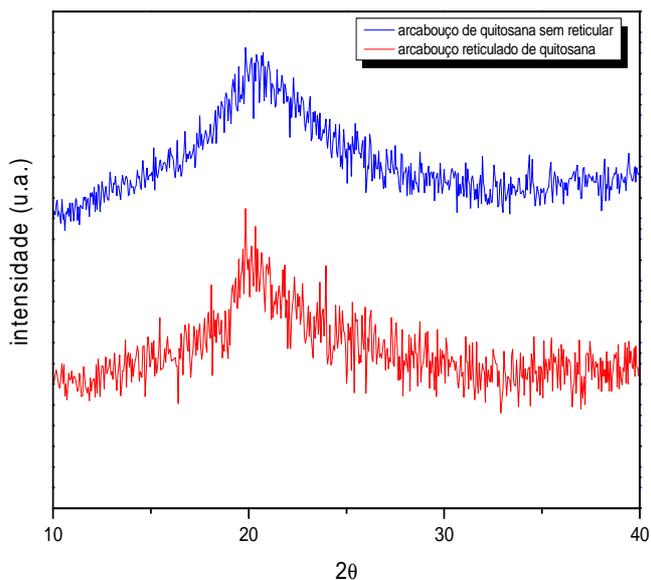


Figura 4-7 - Difratoograma de DRX para os arcabouços de quitosana sem reticular e reticulado (1% TPNa)

Para analisar a influência do reticulante na estrutura dos poros dos arcabouços, realizou-se MEV e o resultado pode ser visto na Figura 4-8.

A presença do reticulante não afetou a existência de poros no material, mas observa-se que gerou o aparecimento de interconexões dos mesmos. Não se nota a presença de material precipitado, que indicaria a presença de algum TPNa utilizado em excesso.

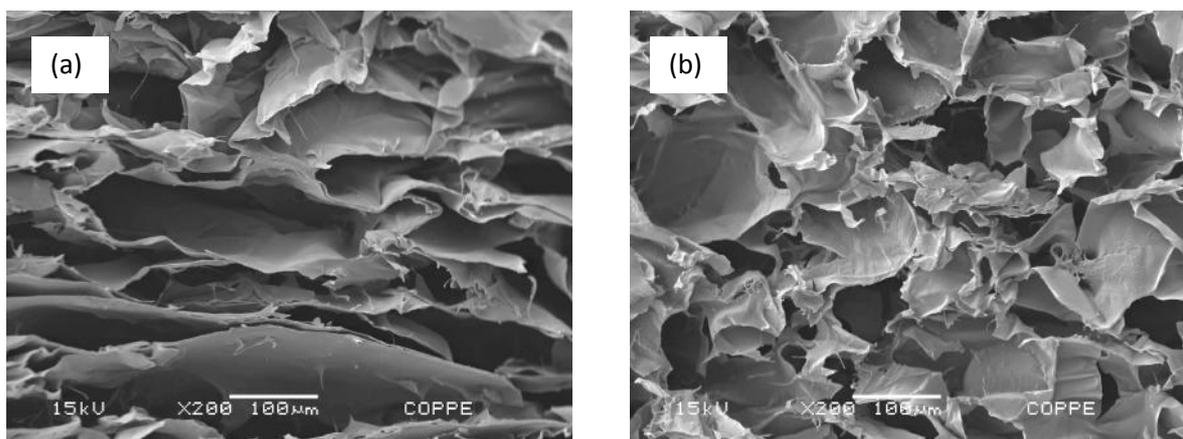


Figura 4-8 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana sem reticular (a) e reticulado (1% TPNa m/v) (b).

4.3.2 Intumescimento

A figura 4-9 mostra a taxa de inchamento dos arcabouços de quitosana, com e sem a ação do agente reticulante, após imersão em PBS com pH 7,4. Os valores apresentados são as médias dos valores obtidos.

A entrada de água nos arcabouços acontece muito rapidamente, e pode-se ver que, após 5 minutos de imersão, a taxa de intumescimento atinge níveis acima de 400 e 600% para o material sem reticular e reticulado, respectivamente. Isso acontece, pois a quitosana é altamente hidrofílica, possuindo grupamentos hidroxila e amino. Estes grupos conferem alta afinidade por outras moléculas polares. Considerando o desvio padrão, ambos arcabouços convergiram ao mesmo equilíbrio, após 30 minutos.

Notou-se que a taxa de absorção é maior para os arcabouços que foram reticulados; talvez, o agente reticulante também absorva água, uma vez que o TPNa possui 2 átomos de hidrogênio disponíveis, que são capazes de realizar ligação hidrogênio.

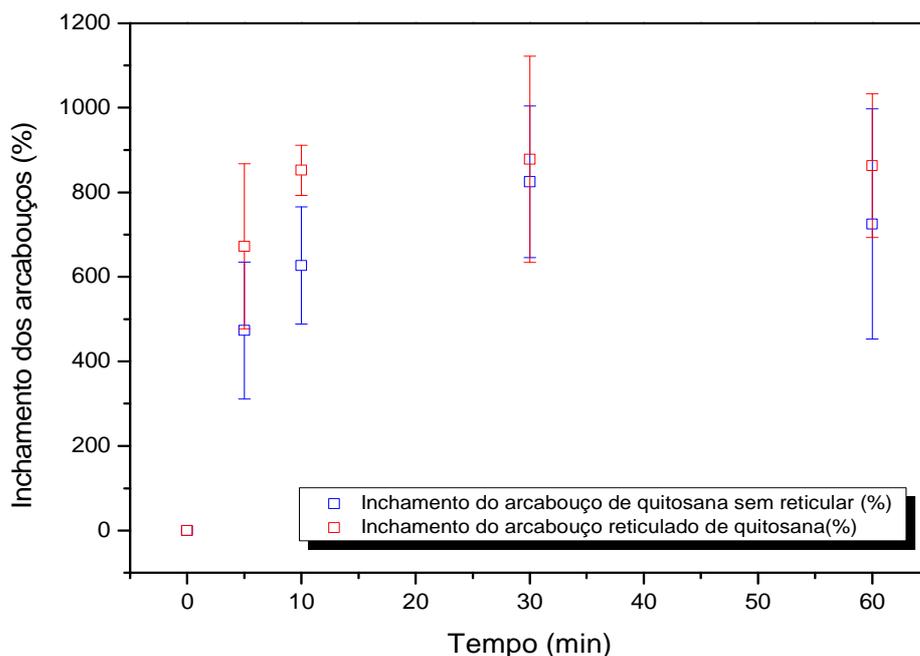


Figura 4-9 - Taxa de intumescimento dos arcabouços de quitosana com e sem reticulação.

4.3.3 Biodegradação *in vitro*

Os arcabouços contendo quitosana com e sem reticulação foram imersos em solução de PBS com lisozima para avaliar seu perfil de degradação por quatro semanas em um sistema estático, ou seja, sem ação de um fluxo de meio. O resultado pode ser avaliado na Figura 4-10 em relação à porcentagem inicial de massa.

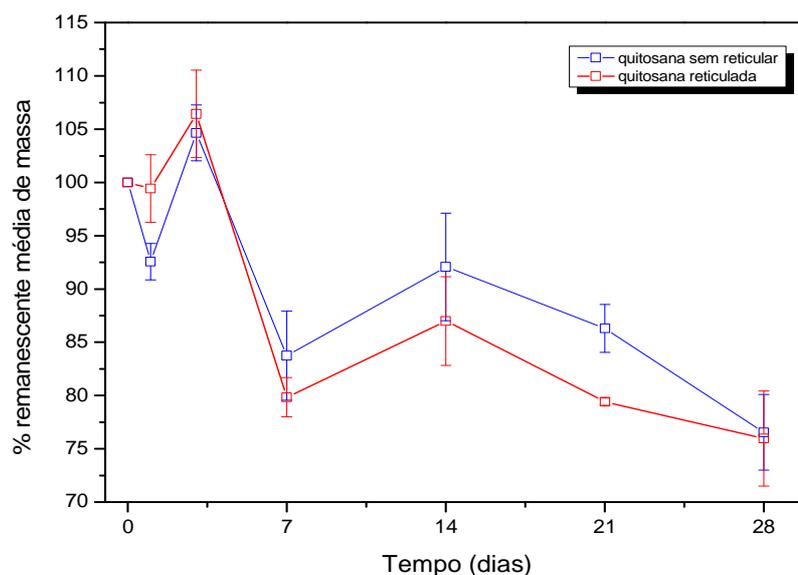


Figura 4-10 - Porcentagem de massa remanescente em função do tempo de degradação em um sistema estático para arcabouços de quitosana antes e após sofrer reticulação.

Apesar de nem sempre permeabilidade e porosidade estarem relacionadas, Agrawal *et al.* (2000) perceberam uma diminuição e posterior aumento na porosidade dos arcabouços sob degradação; o decréscimo ocorreu em duas semanas para, em seguida, aumentar. Uma possível explicação viria do fato de as cadeias moleculares precisarem realinhar-se, já que a estrutura poderia estar “amarrada”, após a evaporação do solvente, ocupando altos estados energéticos no espaço tridimensional (AGRAWAL *et al.*, 2000). Após a segunda semana, a porosidade viria a aumentar devido à degradação e perda de massa (AGRAWAL *et al.*, 2000).

O que pode ser avaliado da Figura 4-10 é a diminuição da massa em uma semana para posterior aumento e subsequente perda de massa a partir de duas semanas. Resultados semelhantes foram encontrados por Huang *et al.* (2005) em meio de PBS contendo lisozima. Este perfil pode ser visto para ambos materiais e, nessa situação, não houve diferença significativa no material antes ou após sofrer reticulação. Este resultado não condiz com o avaliado por Resende (2010), que não esterilizou o material, e isso pode ter resultado na diferença, visto que os raios gama alteram a estrutura do polímero.

As micrografias de MEV, para alguns tempos realizados, podem ser vistas na Figura 4-11. Em um dia, ambos arcabouços contendo quitosana não apresentam degradação do material, podendo-se notar uma abertura maior dos poros da quitosana sem reticular.

As amostras resistiram aos 28 dias sob influência do PBS e lisozima, embora o material sem reticular tenha se apresentado menos firme, ao final do mencionado tempo, o que é corroborado pela micrografia referente ao mesmo.

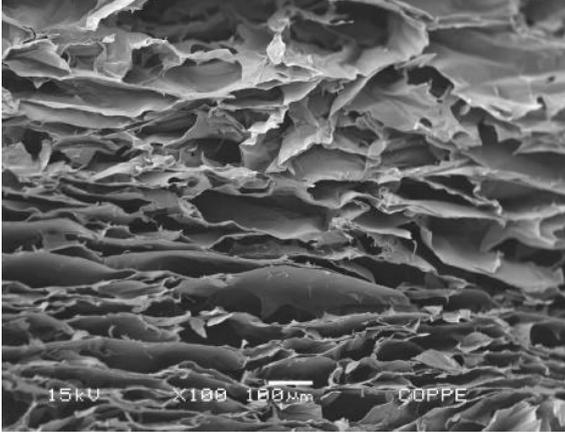
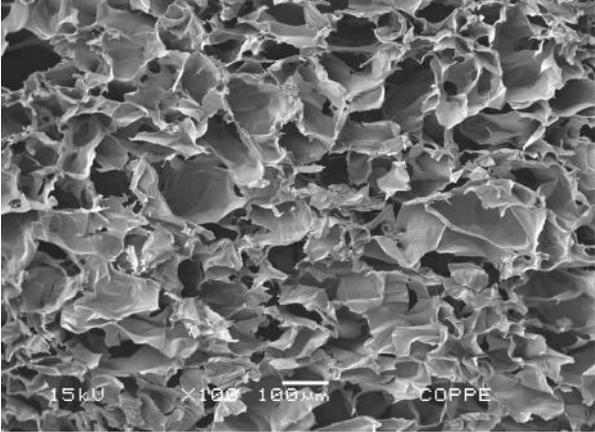
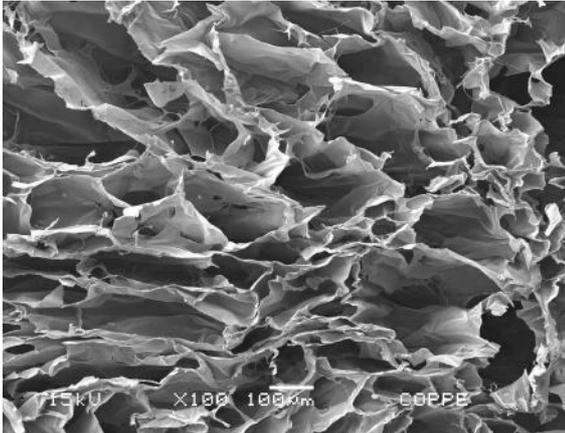
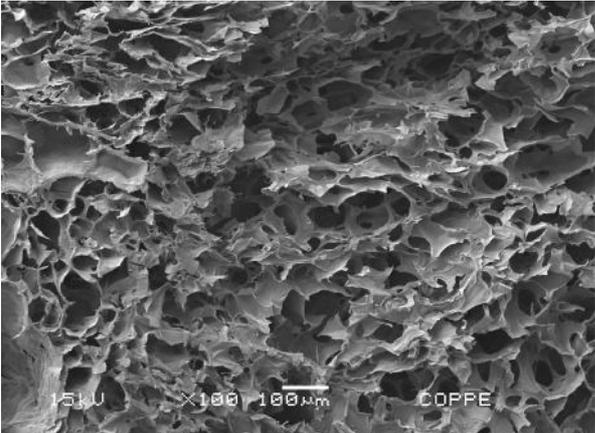
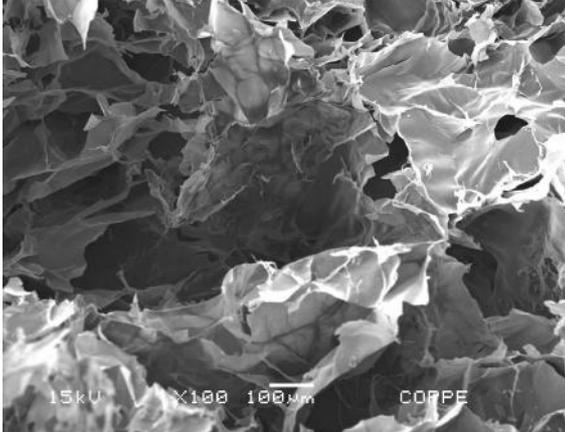
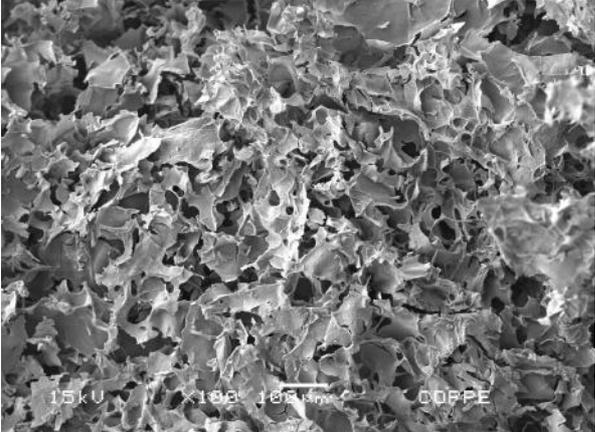
Dias	Arcabouços de quitosana sem reticular	Arcabouços de quitosana reticulada
0	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>
1	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>
28	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>	 <p>15kV X100 100µm COPPE</p>

Figura 4-11 - Micrografias de MEV dos arcabouços após teste de degradação

4.4 Caracterização do compósito quitosana + β -TCP

As micrografias dos arcabouços de quitosana com TCP são apresentadas na Figura 4-12.

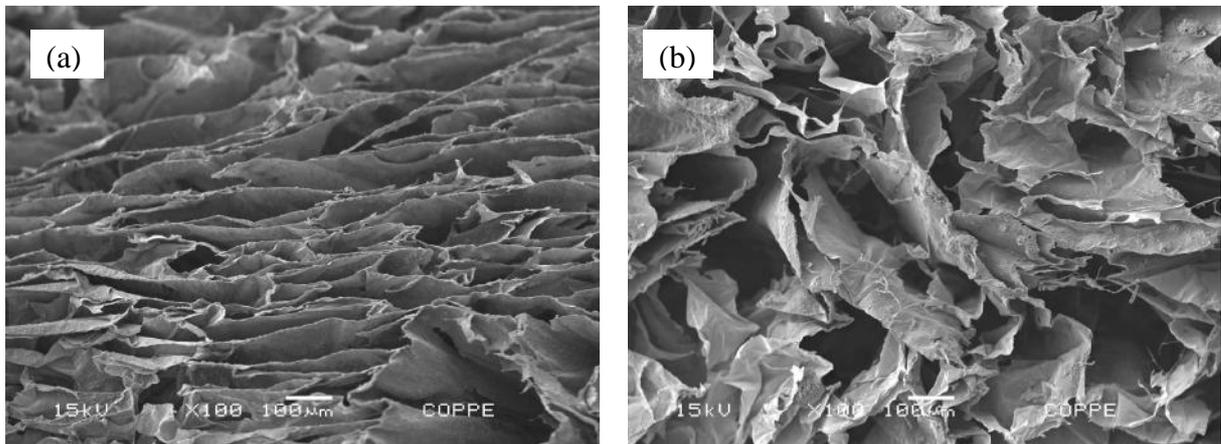


Figura 4-12 - Micrografias de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular e: sem esterilizar (a), esterilizado (b).

Os poros apresentam estruturas interconectadas e semelhantes. Após sofrer esterilização (Figura 4-12b), percebe-se um desordenamento nessa estrutura, mas provavelmente é devido ao corte do material.

Na Figura 4-13, está representada uma micrografia de MEV para o arcabouço sem reticular com uma magnitude de 300 vezes. É possível observar a presença de partículas de β -TCP sobre o material, oriundas da aglomeração do pó quando da produção do compósito.

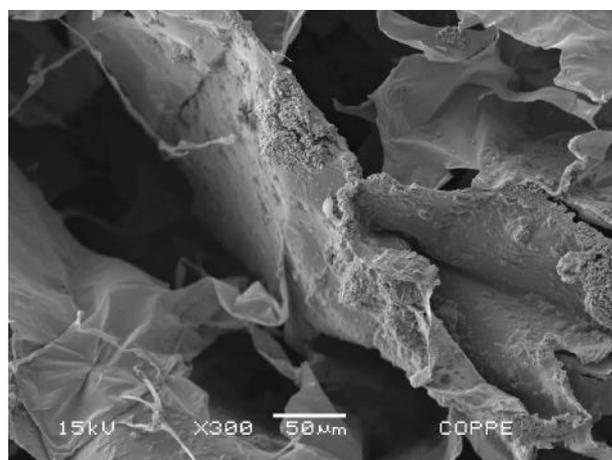


Figura 4-13 - Micrografia de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular, mostrando a distribuição de partículas de β -TCP.

4.4.1 Efeito da reticulação

Os espectros de FTIR dos compósitos com e sem reticulação (1% TPNa/3h/37°C) podem ser vistos na Figura 4-14. É possível observar ainda algumas mudanças no espectro, como intensificação e definição de algumas bandas após o material ser reticulado.

Comparando-se o espectro do arcabouço quitosana + β -TCP com o de quitosana e β -TCP, pode-se observar bandas de ambos materiais (quitosana e β -TCP) presentes no material. No compósito, surgem duas novas bandas a 550cm^{-1} e 1115cm^{-1} , correspondente ao modo vibracional do P-O (RESENDE, 2010). Essas observações sugerem que a quitosana não apenas serve como matriz para as partículas de β -TCP, mas também funciona como uma espécie de cola para as partículas na sua estrutura, ligando-as ao compósito. A quitosana apresenta uma alta afinidade pelo β -TCP, o que promove uma distribuição homogênea desse último, quando em solução de quitosana (RESENDE, 2010), apesar de a micrografia da Figura 4-13 sugerir partículas aglomeradas.

A reticulação não alterou significativamente a forma dos difratogramas de DRX (dados não mostrados).

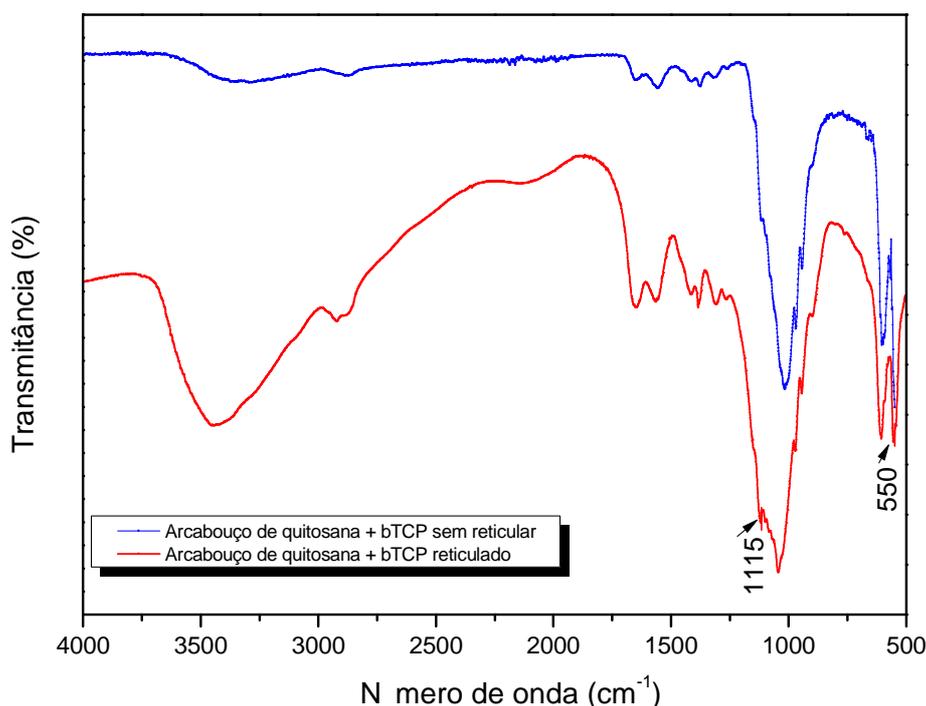


Figura 4-14 - Espectros de FTIR dos arcabouços de quitosana + β -TCP sem reticular e reticulado (1% TPNa).

Micrografias referentes ao material reticulado podem ser visualizadas na Figura 4-15, de onde podemos observar uma boa dispersão do β -TCP e, por conseguinte, a matriz polimérica o suportou.

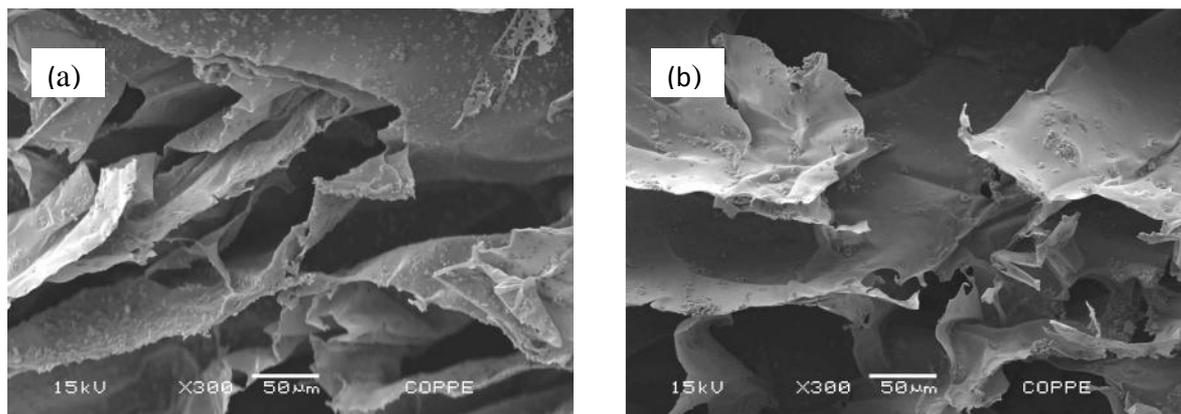


Figura 4-15 - Micrografia de MEV da seção transversal dos arcabouços de quitosana + β -TCP reticulados e: sem esterilizar (a), esterilizado (b), mostrando a distribuição homogênea de partículas de β -TCP.

4.4.2 Biodegradação *in vitro*

Os compósitos de quitosana com β -TCP foram avaliados da mesma maneira que o anterior, sob condição estática, em meio contendo PBS com lisozima. A Figura 4-16 apresenta a porcentagem média da massa dos compósitos após a biodegradação. Alguns tempos do material sem reticular não foram realizados, mas pode-se observar que resistiu aos 28 dias, apesar de não apresentar mais a aparente rigidez. Observou-se que, até sete dias, os arcabouços de quitosana apresentaram o mesmo perfil. Após esse tempo, o material apresentou contínua degradação, apresentando ao final de quatro semanas uma perda mássica de aproximadamente 16%.

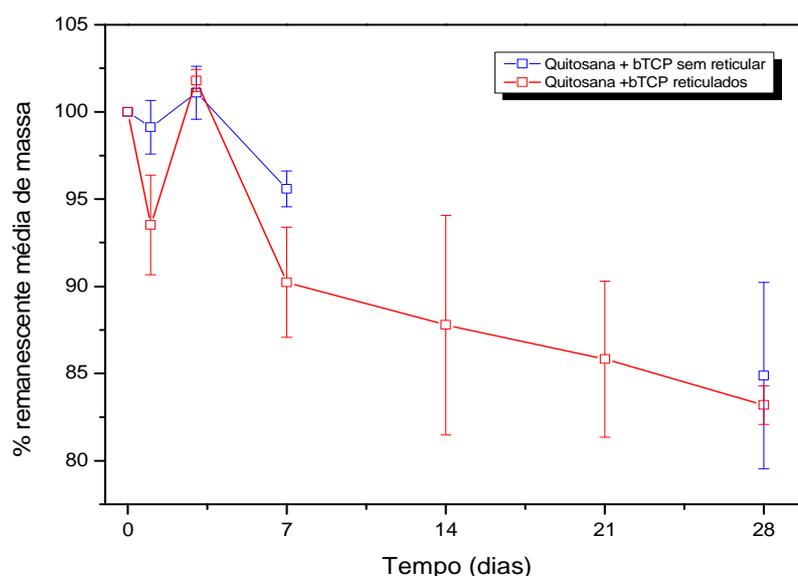


Figura 4-16 - Porcentagem de massa remanescente em função do tempo de degradação em um sistema estático para arcabouços de quitosana com β -TCP antes e após sofrer reticulação.

Nas micrografias de MEV (Figura 4-17), ambos são comparáveis nos tempos iniciais, ficando a diferença por conta do tempo final, em que o compósito que não foi reticulado mostra ter sofrido maior influência da biodegradação. O fato de o material reticulado ter mantido bem sua estrutura de poros até quatro semanas de degradação é relevante, quando se pensa em utilizá-lo para crescimento celular.

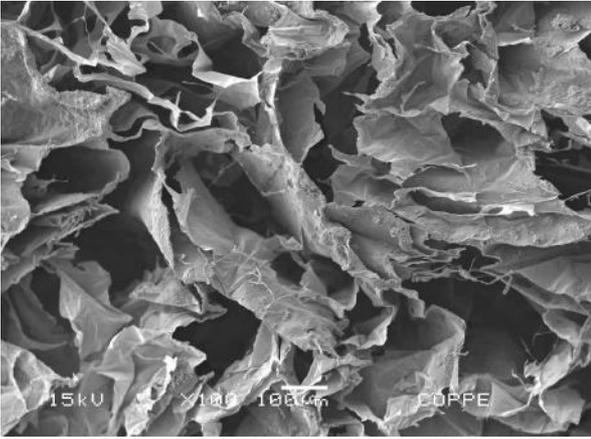
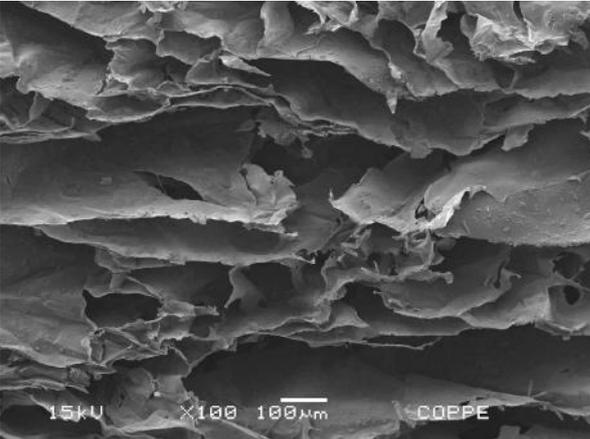
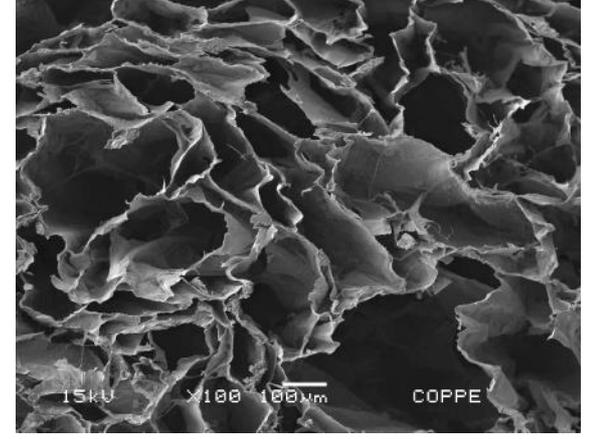
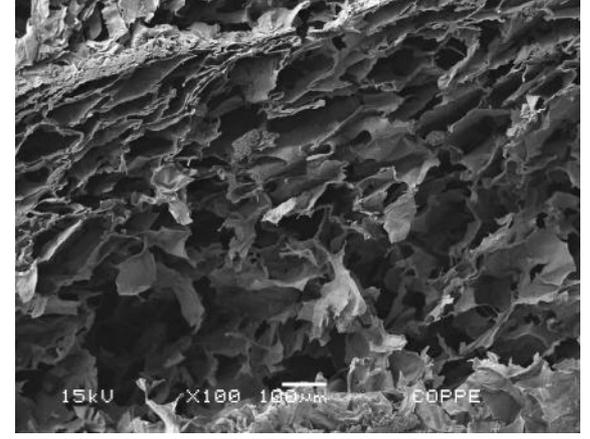
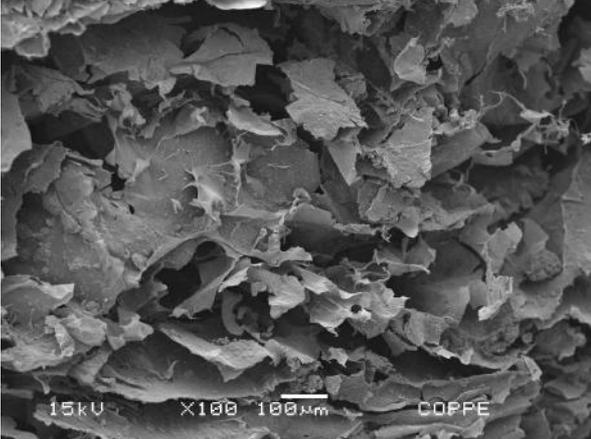
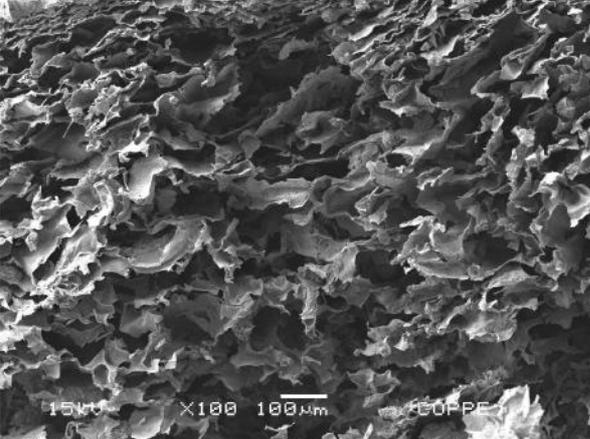
Dias	Compósito de quitosana + β -TCP sem reticular	Compósitos de quitosana + β -TCP reticulado
0		
1		
28		

Figura 4-17 - Micrografias de MEV dos compósitos após teste de degradação

4.5 Variação de pH

A Figura 4-18 mostra a variação de pH na solução de PBS com lisozima durante os tempos de degradação *in vitro*. A diminuição do pH para tempos até três semanas, pode ser devido ao ácido acético presente nos arcabouços.

É sabido que o pH é capaz de alterar a carga e as propriedades da quitosana. Em um pH menor que 6,0, as aminas estão protonadas e carregadas positivamente, e a quitosana é um polietrólito catiônico solúvel em água (SHE *et al.*, 2008). Para pH maior que 6,5, as aminas perdem seus prótons, o polímero perde sua carga e se torna insolúvel. A mesma autora afirma que o pK_a da quitosana é próximo da neutralidade, e a transição solúvel-insolúvel ocorre na faixa de pH 6 – 6,5, que atende aos propósitos das aplicações biológicas. Na Figura 4-18, nota-se que, em ambos casos, o pH sempre foi acima de 6,8, o que garante que os arcabouços permaneceram insolúveis.

Outro ponto que pode ser ressaltado de acordo com o resultado apresentado na Figura 4-18 (b) é que, como o pH diminuiu com o passar do tempo, uma parte dos produtos de degradação ácidos pode ter sido neutralizado pelo β -TCP alcalino, presente nos arcabouços. Após três semanas de incubação, observa-se um ligeiro aumento no referido valor, o que pode ser justificado por alguma ruptura dos arcabouços, porquanto visualmente as soluções se apresentavam turvas, especialmente ao final das quatro semanas – embora o material não se tenha desintegrado totalmente. Tais resultados corroboram com os obtidos por Yang *et al.* (2008).

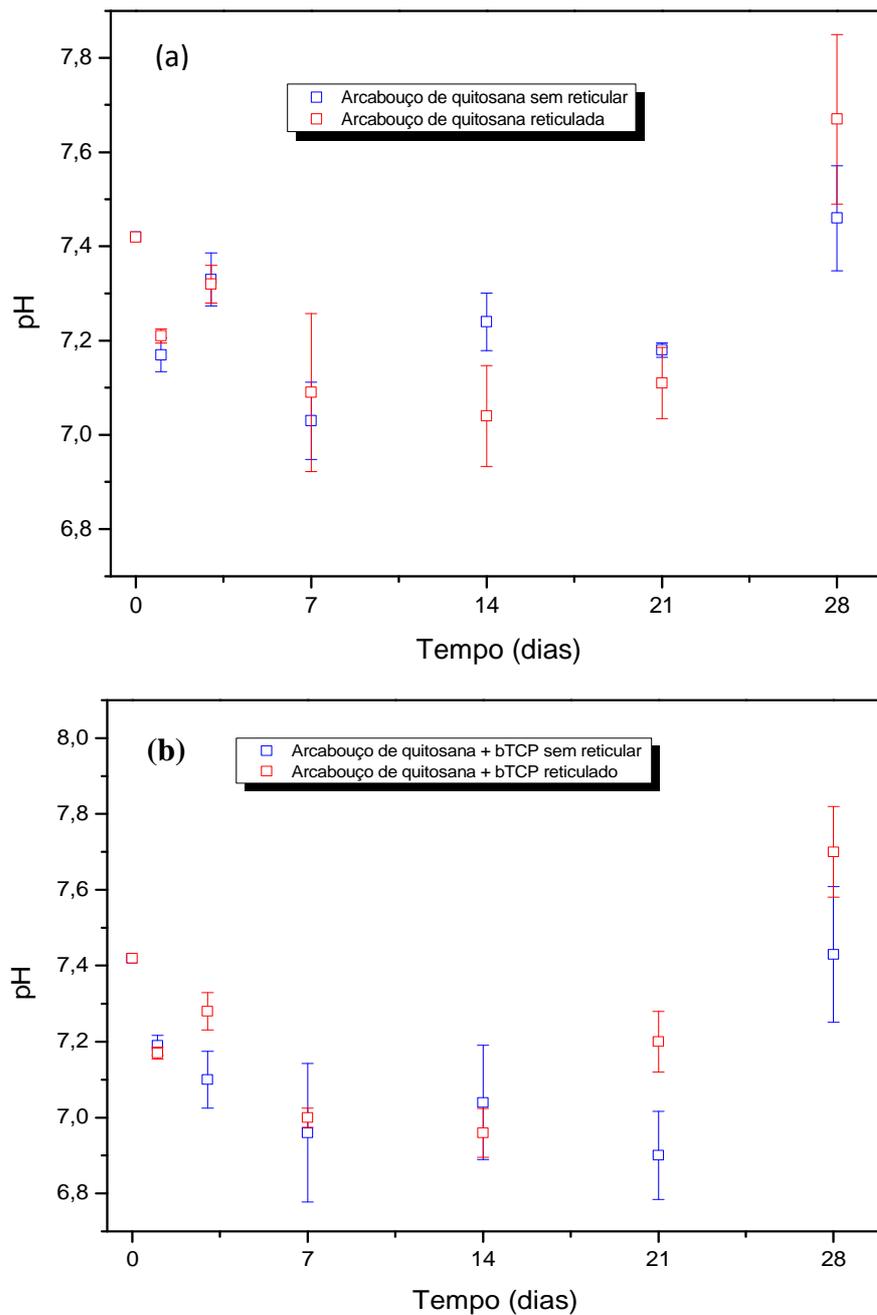


Figura 4-18 - Variação do pH na solução de degradação de acordo com o tempo: (a) arcabouços de quitosana, (b) arcabouços de quitosana + β -TCP

Capítulo 5 - Conclusão

O comportamento dos arcabouços de quitosana e quitosana com β -TCP, ambos sob influência ou não de reticulante, foi avaliado em condição de degradação estática *in vitro* utilizando-se meio de PBS com lisozima (1,5mg/mL) a 37°C por 28 dias. Os resultados mostraram que:

- A perda de massa obedeceu ao mesmo perfil para todos os materiais estudados, não sendo superior a 17% ao final de 28 dias;

- O arcabouço de quitosana sem reticular foi menos resistente à degradação em meio de PBS com lisozima que o que foi reticulado, conforme visto na aparência dos poros das micrografias de MEV;

- O arcabouço de quitosana com β -TCP manteve sua estrutura porosa praticamente imutável independente da reticulação, sugerindo que o fosfato tri-cálcico atua aumentando a resistência mecânica e degradação do compósito;

- A variação do pH do meio, após os testes de degradação, se manteve como o esperado: abaixo de 7,4, mas não inferior a 6,5, de forma que isso garantia a insolubilidade dos arcabouços.

Referências

- ANTONINO, N.A., **Otimização do processo de obtenção da quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana.**, 2007, 88f. Dissertação (Mestrado em química inorgânica) – CCEN, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.
- AGRAWAL, C.N. *et al.*, **Effects of fluid flow on the *in vitro* degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering.** *Biomaterials*, v.21, pp.2443-2452, 2000.
- ARGWAL, B.D., BROUTMAN L.J., **Analysis and performance of fiber composites.**, 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1990.
- AZEVEDO, V.V.C., CHAVES, S.A., BEZERRA, D.C., LIA FOOK, M.V., COSTA, A.C.F.M., **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais.**, *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.23, pp.27-34, 2007.
- BERTRAN, C.A., KAWACHI, E.Y., REIS, R.R., ALVES, O.L., **Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.** *Química Nova*, v.23, no. 4, 2000.
- BONFIELD W., GRYNPAS M.D., TULLY A.E., BOWMAN J., ABRAM J., **Hydroxyapatite reinforced polyethylene – a mechanically compatible implant material for bone replacement.**, *Biomaterials*, v.2, pp.185-186, 1981.
- BORGES, A.P.D., *et al.*, *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 52, p.216, 2000.
- BUCHANAN, F., **Degradation rate of bioresorbable materials.** Cambridge: Woodhead, 2008. 424p
- CHATELET C., DAMOUR O., DOMARD A., **Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films.** *Biomaterials*, v.22, pp.261-268.
- CHEN, J., *et al.*, **Characterization and biocompatibility of nanohybrid scaffold prepared via *in situ* crystallization of hydroxyapatite in chitosan matrix.**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.81, pp.640-647, 2010.
- COSTA Jr. E. S. e MANSUR H. S., **Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido.** *Química Nova*, v. 31, n. 6, pp. 1460-1466, 2008.
- DOMINGUES, R.Z., ANDRADE, A.L., **Cerâmicas bioativas – estado da arte.**, *Química Nova*, v. 29, pp.100-104, 2006.
- FRANCIS SUH, J. K. AND. MATTHEW, H.W.T., **Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review.** *Biomaterials*, v.21, pp.2589-2598, 2000.
- HENCH, L. L., **Biomaterials: a forecast for the future.** *Biomaterials*, v.19, n. 16, pp. 1419-1423, 1998.

- HOWLING, G.I. DETTMAR, P.Q., GODDART, P.A., *et al.*, **The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro.***, *Biomaterials*, v.22, pp.2959-2966, 2004.
- HUANG, Y., *et al.*, ***In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering**, *Biomaterials*, v.26, pp.7616-7627, 2005.
- KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., DOS REIS, R. R., ALVES, O. L., **Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar**, *Química Nova*, v. 23, n. 518-522, 2000,
- KAWACHI, E., *et al.*, 2000, In: GUASTALDI, A.C., APARECIDA, A.H., **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos**, *Química Nova*, v.33, 2010.
- KHOR, E., LIM, L.Y., **Implantable applications of chitin and chitosan.**, *Biomaterials*, v.24, n.33, pp.2339-2349, 2003.
- KIVRAK, N., TAS, A.C., **Synthesis of calcium hydroxyapatite- tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramics powders and their sintering behavior.** *Journal of the American Ceramic Society*, v.81, n.9, pp.2245–2252, 1998.
- KOBUKO, T. TAKADAMA, H., **How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?**, *Biomaterials*, v.27, pp.2907-2915, 2006.
- KUMAR, M.R., **A review of chitin and chitosan applications**, *Reactive & Functional Polymers*, v.26, pp.1-7, 2000.
- LAUS, R., LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O. *et al.*, **Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(iii) e manganês(ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão**, *Química Nova*, v. 29, n.1, pp. 34-39, 2006.
- LEGEROS, Rachel L., 1991, In: TONKOVIĆ, M., SIKIRIĆ, M., BABIĆ-IVANČIĆ, V., **Controversy about β -tricalcium phosphate**, *Coloids and Surfaces A*, n.170, pp.107-112, 2000.
- LEGEROS, Rachel L., **Biodegradation and Bioresorption of calcium phosphate ceramics**, *Clinical Materials*, v.14, pp.65-88, 1993.
- LI, J., CHEN, Y., YIN, F., YAO, F., YAO, K., **Modulation of nano-hidroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ.**, *Biomaterials*, v.28, pp.781-790, 2007.
- LIN, H.R., CHEN, K.S., CHEN, S.C. *et al.* 2007, **Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$** , *Materials Science and Engineering: C*, v.27, n.2, pp.280-284.
- MARKOVIC, M., FOWLER, B.O., TUNG, M.S., 2004, **Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material**, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, v. 109, n. 6, pp. 553-568.

- MARQUES, P.A.d.A.P., **Reacções de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio em plasma simulado**, 2003. Tese (doutorado) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. 2003.
- MARTINO, A., SITTINGER, M., RISBUD, M.V. **Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering**, *Biomaterials*, v.26, pp.5983-5990, 2005.
- MATHUR, N.K., NARANG, K. **Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals**, *J. Chem. Educ.*, v.67, p.11, 1990.
- MOHAMED, K.R., EL-RASHIDY, Z.M., SALAMA, A.A., **In vitro properties of nano-hidroxyapatite/chitosan biocomposites.**, *Ceramics International*, 2011.
- OGAWA, K., **Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the cristallinity and polymorphs**, *Agric. Biol. Chem.*, v.55, pp.2375-2379, 1991.
- PEREIRA, M.M., CLARK, A.E, HENCH, L.L., *Biomed. Mater. Res.*, v. 28, p.693, 1994.
- RESENDE, C.X., **Desenvolvimento de compósito dupla-camada à base de quitosana para aplicação em reconstrução tecidual.**, 2010. 103f. Tese (Doutorado) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.
- RINAUDO, M., 2006, **Chitin and chitosan: Properties and applications**, *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 603-632, 2006.
- ROBERTS, G.A.F., **Chitin Chemistry**, *The Macmillan Press*, London, 1992.
- SANTOS, E.A., **Influência química e topográfica de hidroxiapatita e β -tricálcico sobre o comportamento de osteoblastos humanos**, 2008. 73f. Tese (Doutorado) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.
- SCHUMACHER, M., *et al.*, **Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique**, *J Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 21, 11, 3039-3048, 2010.
- SHE, Z. *et al.*, **Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold**, *Polymer degradation and stability*, v.93, pp.1316-1322, 2008.
- SILVA, H.S.R.C., SANTOS, K.S.C.R., FERREIRA, E., **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.**, *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 4, 2006.
- SLOSARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, **FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods**, *Journal of Molecular Structure*, v. 744, pp. 657-661.
- STOCH, A., JASTRZEBSKI, W., BROZEK, A. *et al.* 2000, **FTIR absorptionreflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants**, *Journal of Molecular Structure*, v. 555, pp. 375-382.
- TIGH, R.S., KARAKECILL, A., GUMUSDERELIOGLU, M., **In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree.**, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v.18, pp.1665-1674, 2007.

VENKATESAN, J. *et al.*, **Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering**, *Carbohydrate Polymers*, v.83, pp.569-577, 2011.

VERHEUL, R.J., *et al.*, **Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans**, *Biomaterials*, v.30, pp.3129-3135, 2009.

YANG, Y., *et al.*, **In vitro degradation of porous poly (L-lactide-co-glycolide)/ β -tricalcium phosphate (PLGA/ β -TCP) scaffolds under dynamic and static conditions**, *Polymer degradation and stability*, v.93, pp.1818-1845, 2008.

WEI, L. *et al.*, **Degradation controllable biomaterials constructed from lysozyme-loaded Ca-alginate microparticle/chitosan composites**, *Polymer*, v.52, pp.5139-5148, 2011.

WILLIAMS, D.F., **Definitions in Biomaterials**, *Elsevier*, Ed, Amsterdam, 1987.