

RENATA DOS SANTOS ALMEIDA



**Compósitos de Quitosana e
Hidroxiapatita Nanoestruturada
como Biomateriais para o Reparo
de Defeito Ósseo Crítico**

Salvador
2018

RENATA DOS SANTOS ALMEIDA

Compósitos de Quitosana e Hidroxiapatita Nanoestruturada como Biomateriais para o Reparo de Defeito Ósseo Crítico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Fabiana Paim Rosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Peniche Covas

Salvador
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA

Almeida, Renata dos Santos

Compósitos de quitosana e hidroxiapatita nanoestruturada como biomateriais para o reparo de defeito ósseo crítico / Renata dos Santos Almeida. – Salvador, 2018. 62f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2018.

1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Hidroxiapatita. 4. Regeneração Óssea. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título. CDU

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO
DEFESA PÚBLICA DE TESE

RENATA DOS SANTOS ALMEIDA

**Compositos de Quitosana e Hidroxiapatita Nanoestruturada como Biomateriais para o
Reparo de Defeito Ósseo Crítico**

Salvador, Bahia, 26 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.ª Dr.ª Fabiana Paim Rosa – Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Carlos Andrés Peniche Covas – Universidad de La Habana

Prof.ª Dr.ª Eliana Cristina da Silva Rigo – Universidade de São Paulo USP

Prof.ª Dr.ª Elaine Christine de Magalhães Cabral – Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar – Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que mesmo em momentos de dificuldades, sempre me deu forças para seguir em frente, e nunca me desamparou.

A minha mãe Valdete, pelo incentivo, amor desmedido e por me fazer acreditar que sempre teremos novos objetivos para alcançar. A minha família, principalmente meus irmãos Jô e Iugo, por torcerem pelas minhas vitórias, e minha cunhada Lú por ter me presenteado com o melhor amor que eu já encontrei, minha sobrinha Ana Karolina.

Aos amigos (as), que entendem as minhas ausências, e mesmo distantes estão sempre repletos de carinho e cumplicidade.

À minha orientadora Profa. Fabiana Paim, da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pela paciência, carinho e inúmeros ensinamentos que levarei para toda a vida.

Ao Prof. Carlos Peniche Covas do laboratório BIOMAT (*Universidad de La Habana / Cuba*), e sua esposa Marlene, por terem me acolhido, pela gentileza e por todos os inúmeros ensinamentos.

A *Universidad de La Habana/Cuba*, por ter permitido o desenvolvimento da fase inicial deste estudo, e aos amigos de BIOMAT, especialmente Nancy, Hazel, Carlito, Yetsy, Yayma, Yanaisi, Jomarien, Gastón e Adrian, eu não sei como expressar o tamanho do carinho que tenho por vocês, sou grata por cada ensinamento e por cada abraço.

Ao Prof. Aryon Barbosa Jr. do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ) e a Profa. Eliana Rigo da Universidade de São Paulo (USP), pela gentileza e por colaborar na realização das análises deste estudo.

Ao Prof. Fúlvio Miguel, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por ter me colocado nesta jornada, por acreditar em minha capacidade e pela paixão na arte de ensinar. Você foi essencial em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB-UFBA), principalmente Ana Flávia, Iorrana e Guillermo, pela ajuda, ensinamentos e pelo valioso trabalho em equipe. Vocês conseguem transformar trabalho em prazer.

Aos professores, pós-graduandos e secretários do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (PIOS-UFBA), pela dedicação.

Às técnicas de laboratório, Elisângela e Cristina, pela paciência e dedicação. A Júnior, pela paciência e companheirismo em dias de biotério. Sem vocês eu não conseguiria.

E a CAPES pelo financiamento, que possibilitou a realização desta pesquisa.

*“Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias.
Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias.”*

Lao-Tsé

ALMEIDA, Renata dos Santos. **Compósitos de quitosana e hidroxiapatita nanoestruturada como biomateriais para o reparo de defeito ósseo crítico**. 62f. il. 2018. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

Introdução: A associação da quitosana com hidroxiapatita é muito promissora, por possibilitar que as propriedades individuais de cada biomaterial possam ser aproveitadas em conjunto, para síntese de compósitos biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis. **Objetivos:** Desenvolver, caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a citotoxicidade *in vitro* de micropartículas e nanopartículas compostas por quitosana, de baixa e média massa molecular com hidroxiapatita nanoestruturada, e avaliar *in vivo* o reparo ósseo após implantação das micropartículas em defeito ósseo crítico. **Metodologia:** As quitosanas foram caracterizadas pelos métodos gravimétrico e viscosimétrico, e por espectrofotometria ultravioleta. Os compósitos foram produzidos por abordagem biomimética de precipitação *in situ* e centrifugação (micropartículas) ou por *spray drying* (nanopartículas). Foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier e difração de raios-X. A citotoxicidade *in vitro* foi determinada por teste de viabilidade celular. Para o teste *in vivo* os compósitos foram implantados em defeito crítico na calvária de rato e o reparo avaliado após 15 e 45 dias. **Resultados:** As caracterizações revelaram que as quitosanas de baixa e média massa molecular possuem respectivamente 15,7% e 16,4% de umidade; 0,51% e 0,18% de cinzas; 79,5% e 77,7% de grau de desacetilação e $4,18 \times 10^4$ e $17,3 \times 10^4$ de massa molecular média viscosimétrica. Confirmou-se presença de grupos característicos dos materiais de origem nos compósitos. As amostras exibiram *in vitro* baixa ou nenhuma citotoxicidade. E *in vivo* notou-se conspícua neoformação óssea nas regiões de bordas do defeito e por condução de permeio às partículas dos biomateriais, sendo mais evidente na composição com quitosana de baixa massa molecular. As micropartículas sofreram intensa biodegradação e desencadearam discreta a moderada resposta inflamatória, que evoluiu para inflamação crônica granulomatosa. **Conclusões:** As adaptações realizadas no método biomimético foram eficazes para incorporação da hidroxiapatita nanoestruturada na matriz polimérica da quitosana. As técnicas utilizadas foram eficazes para a produção de compósitos com características físico-químicas e biológicas adequadas para aplicações biomédicas. As micropartículas foram biocompatíveis e osteocondutoras. A baixa massa molecular da quitosana na formulação foi um fator preponderante para a resposta biológica, sendo esta composição mais favorável à utilização como substituto ósseo.

Palavras-chave: Biomateriais. Quitosana. Hidroxiapatita. Regeneração Óssea.

ALMEIDA, Renata dos Santos. *Composites of chitosan and nanostructured hydroxyapatite as biomaterials for the repair of critical bone defect*. 62f. il. 2018. Doctoral (Thesis) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Introduction: The association between chitosan and hydroxyapatite is very promising, as it allows the individual properties of each biomaterial to be harnessed together for the synthesis of biocompatible, bioactive and biodegradable composites. **Objectives:** To develop and characterize the physico-chemical properties and evaluate the *in vitro* cytotoxicity of microparticles and nanoparticles composed of low and medium molecular weight chitosan with nanostructured hydroxyapatite and assess *in vivo* bone repair after microparticles implantation in critical bone defect. **Methodology:** Chitosan was characterized by gravimetric and viscosimetric methods, as well as ultraviolet spectrophotometry. The composites were produced by a biomimetic approach comprising *in situ* precipitation and centrifugation (microparticles) or by spray-drying (nanoparticles) and characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. *In vitro* cytotoxicity was determined by the cell viability test. For the *in vivo* test, the composites were implanted in a critical defect in rat calvaria and repairs were assessed after 15 and 45 days. **Results:** The characterization revealed that the low and medium molecular weight chitosan present 15.7% and 16.4% of humidity,; 0.51% and 0.18% ash; 79.5% and 77.7% deacetylation degree and 4.18×10^4 and 17.3×10^4 mean molecular weight viscosity respectively. The presence of characteristic source material groups in the composites was confirmed. Samples exhibited low or no *in vitro* cytotoxicity. Conspicuous *in vivo* bone neof ormation was observed in the border regions of the defect and by biomaterial particle permeation conduction, more evident in the composition containing the low molecular weight chitosan. The microparticles underwent intense biodegradation and triggered a mild to moderate inflammatory response, which evolved into chronic granulomatous inflammation. **Conclusions:** The adaptations carried out in the biomimetic method were effective for the incorporation of the nanostructured hydroxyapatite into the chitosan polymer matrix. The applied techniques were effective for the production of composites presenting suitable physico-chemical and biological characteristics for biomedical applications. The microparticles were biocompatible and osteoconductive. The presence of low molecular weight chitosan in the formulation was a preponderant factor for the biological response, and this composition was more favorable to be applied as a bone substitute.

Keywords: Hydroxyapatite. Chitosan. Biomaterials. Bone Regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| Artigo I | | Pág. |
|------------------|--|-------------|
| Figura 1 | Fotografia digital da morfologia macroscópica dos compósitos. | 32 |
| Figura 2 | Micrografia eletrônica de varredura demonstrando a superfície dos compósitos. | 33 |
| Figura 3 | Espectro de FTIR das amostras dos materiais de origem e dos compósitos. | 34 |
| Figura 4 | Padrões de difração de raios X dos compósitos. | 36 |
| Figura 5 | Percentual de viabilidade celular para determinar a citotoxicidade <i>in vitro</i> . | 37 |
| Artigo II | | |
| Figura 1 | Fotos das etapas do procedimento cirúrgico. | 43 |
| Figura 2 | Fotomicrografias da região do defeito aos 15 dias. | 45 |
| Figura 3 | Fotomicrografias da região do defeito aos 45 dias. | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | Artigo I | Pág. |
|-----------------|--|-------------|
| Tabela 1 | Resultados da caracterização físico-química das quitosanas de baixa (L-CHI) e média (M-CHI) massa molecular. | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓMULAS E SÍMBOLOS

| | |
|--|--|
| a | Constante da equação de Mark-Houwink |
| Abs | Absorbância |
| BO | Borda óssea |
| C | Concentração |
| Ca | Cálcio |
| Ca (CH ₃ COO) ₂ | Fórmula química do acetato de cálcio |
| Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ | Fórmula química da HÁ |
| CG | Célula gigante multinucleada |
| CH ₃ COOH | Fórmula química do ácido acético glacial |
| CHI | Quitosana / quitosanas |
| CHO-k1 | Células de ovário de hamster chinês |
| CN | Controle Negativo |
| cm | Centímetro |
| cm ⁻¹ | Centímetro recíproco (ou número de onda) |
| CON | Grupo controle - defeito vazio |
| CO ₂ | Gás carbônico |
| CP | Controle positivo |
| Cu- α | Radiação cobre-K-alpha |
| DCPD | Fosfato de cálcio di-hidratado |
| DD | Grau de desacetilação |
| DRX | Difração de Raios-X |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EHT | Tensão de aceleração |
| et al | <i>et alii</i> (e outros) |
| EX | Exsudato fibrinoleucocitário |
| FTIR | Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>) |
| g | Gramas |

| | |
|--------------|---|
| g/L | Gramas por litro |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônias de granulócitos e de macrófagos |
| h | Hora |
| H | Umidade |
| HÁ | Hidroxiapatita |
| HE | Hematoxilina – eosina |
| IC | Índice de citotoxicidade |
| IF | Infiltrado inflamatório |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IR | Infravermelho |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| JCPDS | <i>International Center for Diffraction Data</i> |
| K | Constante da equação de Mark-Houwink |
| KBr | Brometo de potássio |
| kGy | Quilogray |
| kV | Quilovolt |
| L-CHI | CHI de baixa massa molecular |
| L-CHI20/HA80 | Compósito com 20% de CHI de baixa massa molecular e 80% de HÁ |
| L-CHI50/HA50 | Compósito com 50% de CHI de baixa massa molecular e 50% de HÁ |
| Lim | Limite |
| m | Massa |
| M | Molar |
| mA | Microampère |
| M-CHI | CHI de média massa molecular |
| M-CHI20/HA80 | Compósito com 20% de CHI de média massa molecular e 80% de HÁ |
| M-CHI50/HA50 | Compósito com 50% de CHI de média massa molecular e 50% de HÁ |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| mg | Miligrama |
| mg/kg | Miligrama por quilograma |

| | |
|-----------------|--|
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| MSC | Meio de cultura suplementado |
| MON | Matriz osteoide neoformada |
| M_v | Massa molecular viscosimétrica média |
| m^3/h | Metros cúbicos por hora |
| n° | Número |
| N_2 | Nitrogênio |
| Na | Sódio |
| Na_3PO_4 | Fórmula química do fosfato de sódio |
| $Na_5P_3O_{10}$ | Fórmula química do tripolifosfato de sódio |
| NAG | N-acetilglucosamina |
| NaH_2PO_4 | Fórmula química do di-hidrogenofosfato de sódio |
| NaOH | Fórmula química do hidróxido de sódio |
| NH_2 | Grupamento amino |
| NH_{3+} | Amônia |
| NI/h | Normal litro por hora |
| nm | Nanômetro |
| NO | Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>) |
| p | Peso |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PIFG | Picrossírius-Red |
| rpm | Rotação por minuto |
| RPMI | Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| T | Tempo de escoamento da solução |
| t_0 | Tempo de escoamento do solvente |
| TC | Tecido conjuntivo |

| | |
|-----------------------------|--|
| TMG | Tricrômico de Masson-Goldner |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| UI | Unidades por mililitro |
| UV | Espectroscopia no ultravioleta visível |
| v | Volume |
| VC | Veia central |
| Vc | Viabilidade celular |
| VS | Vaso sanguíneo |
| W _C | Peso das cinzas na amostra de quitosana |
| W _f | Peso da amostra seca de quitosana |
| W _{H₂O} | Peso da água contida na amostra de quitosana |
| W _i | Peso da amostra inicial de quitosana |
| ® | Registrado |
| μg | Microgramas |
| μm | Micrômetro |
| μL | Microlitro |
| H | Viscosidade intrínseca |
| H _{esp} | Viscosidade específica |
| H _{red} | Viscosidade reduzida |
| γ | Gamma |
| ° | Graus |
| °C | Graus Célsius |
| % | Percentual |
| Θ | Teta |
| ≈ | Aproximadamente |
| ± | Mais ou menos |
| * | Biomaterial |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO | 06 |
| <i>ABSTRACT</i> | 07 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 08 |
| LISTA DE TABELAS | 09 |
| LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 Objetivo Geral | 20 |
| 2.2 Objetivos Específicos do Artigo I | 20 |
| 2.3 Objetivos Específicos do Artigo II | 20 |
| 3. DESENVOLVIMENTO | 22 |
| 3.1 Artigo I | 22 |
| Resumo | 22 |
| <i>Abstract</i> | 22 |
| INTRODUÇÃO | 23 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| CONCLUSÕES | 38 |
| AGRADECIMENTOS | 38 |
| 3.2. Artigo II | 39 |
| Resumo | 39 |
| <i>Abstract</i> | 39 |
| INTRODUÇÃO | 40 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| CONCLUSÕES | 49 |
| AGRADECIMENTOS | 49 |

| | |
|--|----|
| 4. CONCLUSÕES GERAIS | 51 |
| 5. REFERÊNCIAS | 53 |
| 5.1 Referências do Textual Geral | 53 |
| 5. 2 Referências do Artigo I | 53 |
| 5. 3 Referências do Artigo II | 56 |
| ANEXOS | 60 |
| Anexo I - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 60 |
| Anexo II – Comprovante de submissão do artigo I | 61 |
| Anexo III – Comprovante de submissão do artigo II | 62 |

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

As pesquisas direcionadas para promover a regeneração óssea são essenciais, particularmente em situações clínicas em que há perdas extensas. Diversos biomateriais são utilizados nos tratamentos médicos e passam por constantes testes e aperfeiçoamentos. Entretanto, ainda existe a necessidade de desenvolver biomateriais ideais, a fim de garantir resposta adequada na reconstrução tecidual.

Existe uma grande diversidade de biomateriais que podem ser utilizados com o objetivo de aumentar, substituir, estimular e proporcionar a reconstrução de tecidos ou órgãos. Estes devem promover uma interação com o tecido circundante e, quando integrado, favorecer a formação de novo tecido, sem induzir uma resposta adversa¹.

Entre os que têm despertado grande interesse para aplicações clínicas, a associação entre o polímero quitosana e o fosfato de cálcio hidroxiapatita apresenta características interessantes para a bioengenharia tecidual. Por possuírem composição química similar ao tecido ósseo, são frequentemente utilizados como materiais para a reparação óssea.

A quitosana é um copolímero biocompatível, biodegradável, não-tóxico e mucoadesivo. É obtida a partir da reação de desacetilação da quitina (encontrada no exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos e na parede celular de fungos)².

A semelhança química da quitosana com o ácido hialurônico e outros polissacarídeos, como o sulfato de condroitina, confere à quitosana uma afinidade com a matriz extracelular, o que sugere bioatividade. Isso a torna atrativa para a aplicação como biomaterial, ao desempenhar papel análogo aos componentes da matriz extracelular, auxiliando no processo de regeneração tecidual³.

Já a hidroxiapatita apresenta uma fase superficial (hidroxiapatita carbonatada) muito semelhante à fase mineral óssea. Dessa forma estabelece uma integração química bastante íntima com o osso após implantação em meio biológico, e tem a capacidade de recrutar osteoblastos para a síntese de matriz osteoide. Este fosfato de cálcio pode ser obtido por desproteinização do tecido ósseo, tratamento hidrotérmico de corais ou por processos sintéticos (precipitação)⁴. Nesse sentido, os compósitos de quitosana com hidroxiapatita apresentam propriedades de ambos os biomateriais, como: função estrutural, bioatividade e biodegradabilidade, além de flexibilidade e osteocondutividade.

Em trabalhos anteriores foi possível obter experimentalmente compósitos de CHI com HA nanoestruturada pelo método biomimético de precipitação *in situ*^{4,5}. A partir

desses estudos, foram selecionadas quitosanas com diferentes massas moleculares (L-CHI: baixa, e M-CHI: média) e as concentrações que obtiveram melhor resultado *in vitro* (quitosana/hidroxiapatita: 20% / 80% e 50% / 50%). A técnica utilizada foi modificada para síntese de novos compósitos e incrementada com o uso do *spray dryer* como alternativa para produção de nanopartículas.

Além das etapas de produção e caracterização, os biomateriais precisaram passar por testes *in vitro* e *in vivo* para serem classificados como viáveis para aplicações biomédicas. Os estudos *in vitro* são preliminares e eliminatórios, e os *in vivo* são determinantes para a avaliação da biocompatibilidade de qualquer material. Ainda que os estudos *in vitro* procurem simular de forma mais fidedigna possível os sistemas vivos, muitas variáveis não podem ser reproduzidas.

Dessa forma, realizou-se um esboço das etapas essenciais para o desenvolvimento de novos biomateriais (Figura 1). Inicialmente, realizou-se a seleção dos materiais a serem testados e, após definição da composição, estudou-se as melhores técnicas para o processamento. Por conseguinte, os biomateriais produzidos foram caracterizados e testados *in vitro*. A partir desses resultados selecionou-se os compósitos mais viáveis para o teste *in vivo*. Este projeto foi desenvolvido numa parceria entre a Universidade Federal da Bahia, Universidad de La Habana (Cuba) e Universidade de São Paulo.

Este trabalho organiza-se da seguinte forma:

- I. Introdução geral sobre o tema;
- II. Objetivos da tese;
- III. Desenvolvimento;
 - a. Artigo I – Etapa físico-química: produção, caracterização dos biomateriais e teste *in vitro*;
 - b. Artigo II – Etapa biológica: testes *in vivo*;
- IV. Conclusões gerais da tese.

 *Objetivos*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar, *in vitro* e *in vivo*, biomateriais compósitos de CHI com HA nanoestruturada para regeneração de defeito ósseo crítico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO ARTIGO I

- Adaptar o método de abordagem biomimética de precipitação *in situ*, para desenvolver compósitos com quitosana de baixa e média massa molecular associada a hidroxiapatita nanoestruturada;
- Produzir micropartículas por centrifugação;
- Produzir nanopartículas por *spray drying*;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das quitosanas e dos compósitos obtidos;
- Avaliar por viabilidade celular a citotoxicidade *in vitro*.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO ARTIGO II

Avaliar histologicamente a biocompatibilidade e o reparo tecidual de defeito ósseo crítico após implantação de micropartículas com:

- HQB - 20% de quitosana de baixa massa molecular e 80% de hidroxiapatita nanoestruturada;
- HQM - 20% de quitosana de média massa molecular e 80% de hidroxiapatita nanoestruturada.

 *Desenvolvimento*

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO I

Produção, caracterização e avaliação *in vitro* de partículas de quitosana/hidroxiapatita nanoestruturada para substituição óssea

Development, characterization and in vitro evaluation of chitosan/nanostructured hydroxyapatite particles for bone replacement

Renata dos Santos Almeida¹; Carlos Andrés Peniche²; Yaimara Solís²; Hazel Peniche²; Eliana Cristina da Silva Rigo³; Fabiana Paim Rosa⁴

¹Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia-Brasil;
²Doutor(a) em Química, Universidad de La Habana-Cuba; ³Doutora em Ciências e Engenharia dos Materiais, Universidade de São Paulo-Brasil; ⁴Doutora em Odontologia, Universidade Federal da Bahia-Brasil

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos e avaliados compósitos de quitosana, de baixa e média massa molecular, com hidroxiapatita nanoestruturada. As quitosanas foram caracterizadas por gravimetria, viscosimetria e espectrofotometria ultravioleta. Os compósitos foram produzidos por abordagem biomimética de precipitação *in situ* e centrifugação (micropartículas) ou *spray drying* (nanopartículas), caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier e difração de raios-X. A citotoxicidade *in vitro* foi determinada por viabilidade celular. As caracterizações revelaram que as quitosanas de baixa e média massa molecular possuem respectivamente 15,7% e 16,4% de umidade; 0,51% e 0,18% de cinzas; 79,5% e 77,7% de grau de desacetilação e 4,18x10⁴ e 17,3x10⁴ de massa molecular média viscosimétrica. Confirmou-se a presença de grupos característicos dos materiais de origem nos compósitos. As amostras exibiram *in vitro* baixa ou nenhuma citotoxicidade. Conclui-se que a metodologia foi apropriada para produção dos compósitos, com características físico-químicas e biológicas adequadas para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Biomateriais. Compósitos. Hidroxiapatita. Quitosana. Nanoestruturas.

Abstract

In this work, we developed and evaluated chitosan composites of low and medium molecular weight with nanostructured hydroxyapatite. Chitosan was characterized by gravimetry, viscometry and ultraviolet spectrophotometry. Composites were prepared by a biomimetic approach of in situ precipitation and centrifugation (microparticles) or by spray drying (nanoparticles). They were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and x-ray diffraction. In vitro cytotoxicity was determined by cell viability. The characterization revealed that chitosan of low and medium molecular weight possessed respectively 15,7% and 16,4% moisture; 0,51% and 0,18% ashes; 79,5% and 77,7% deacetylation degree; and 4,18x10⁴ and 17,3x10⁴

viscosity average molecular weight. The presence of groups characteristic of the original materials in the composites was confirmed. All samples exhibited in vitro low or no cytotoxicity. We conclude that the methodology was appropriate for the preparation of composites, with adequate physicochemical and biological characteristics for biomedical applications.

Keywords: *Biomaterials. Composites. Hydroxyapatite. Chitosan. Nanostructures.*

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos biomateriais tem sido de vital importância para a melhoria da qualidade de vida de indivíduos acometidos por doenças degenerativas, lesões teciduais, entre outros. Esses biomateriais podem ser qualquer substância, natural ou sintética, que possa ser utilizada de forma temporária ou definitiva, como parte de um sistema que objetiva restaurar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo¹. Em meio a diversas classificações, os biomateriais podem ser agrupados como metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos (associação de dois ou mais tipos diferentes). A bioengenharia tecidual visa desenvolver novos biomateriais com alta bioatividade, de modo a promover a adesão e a migração celular, fornecer fatores bioquímicos para a difusão de nutrientes necessários à célula, além de ter funções mecânicas. Esses processos podem ser avaliados *in vitro* e *in vivo*².

Um dos biomateriais mais utilizados nas aplicações clínicas para substituição óssea e dentária é a hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Isso em virtude de: demonstrar forte biocompatibilidade com células e tecidos; ter capacidade de associação com moléculas, íons e metais; estabilidade no meio biológico; atividade osteocondutora; e ter uma variedade de processamento em diferentes formatos³. Entretanto, a HA possui algumas limitações que podem comprometer sua atividade biológica em algumas aplicações, como fragilidade mecânica, alta cristalinidade, baixa taxa de dissolução *in vivo* e migração das partículas do sítio de implante, o que pode causar danos ao tecido saudável⁴.

Para resolver essa problemática, a HA pode ser incrementada ao ser associada a polímeros naturais ou sintéticos (colágeno, alginato, gelatina e quitosana), e a combinação das propriedades funcionais dos materiais monofásicos pode ser aproveitada em conjunto. Um polímero natural que tem desempenhado um papel significativo em muitas aplicações de engenharia de tecidos é a quitosana (CHI) $[(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n]$, por ser biodegradável e

atóxica. Trata-se de um polissacarídeo amino, obtido por N-desacetilação em uma extensão variável da quitina, que tem a estrutura química primária formada pela repetição de unidades unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucano (N-acetil-D-glucosamina) e (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxi- β -D-glucano (D-glucosamina)^{5,6}.

A quitina constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, sendo considerada como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose⁶. Difere da CHI em relação à proporção de grupos acetamida e amino no polímero, o que resulta em diferentes solubilidades, ou seja, a quitina possui mais de 50% de grupos acetamida (N-acetil D-glucosamina) comparando-se aos grupos amino, e é inerte e insolúvel na maioria dos solventes comuns. A CHI possui maior porcentagem de grupos amino (D-glucosamina) em relação aos grupos acetil, o que possibilita que ela seja reativa e solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos⁷.

A composição das cadeias da CHI e suas dimensões geralmente variam dependendo do material de origem e do rigor do método de produção, de modo que o grau de desacetilação (DD) e a massa molecular (Mv) são dois parâmetros de conhecimento obrigatório para caracterizar uma amostra desse polissacarídeo. Outras características, como polidispersidade de sua massa molecular, teor de umidade, solubilidade e porcentagens de cinzas também são conhecimentos obrigatórios para muitas aplicações⁸. O uso de análises químicas, físicas e ópticas é importante para determinar as características da matéria-prima e se estas foram mantidas durante o processamento do biomaterial.

Portanto, o desafio da pesquisa atual reside em produzir compósitos de biocerâmicas associadas a polímeros com alta taxa de degradação e com características ideais para estimular a neoformação tecidual, propiciar a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular, facilitar a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas e fomentar o reparo de lesões. Estas características estão intimamente relacionadas ao desempenho biológico, como bioatividade, condução e capacidade de dissolução após a implantação *in vivo*. Além disso, testes qualitativos de citotoxicidade *in vitro* (observação de mudanças morfológicas das células) e/ou quantitativa (investigação de parâmetros celulares, como: morte celular, inibição do crescimento, proliferação celular ou formação de colônias) são necessários para materiais com potencial para aplicações biomédicas.

Inúmeras metodologias permitem produzir compósitos de CHI com HA, que variam desde misturas, revestimento, co-precipitação a biomineralização. Recentemente,

uma nova rota biomimética foi adaptada para a produção destes compósitos. Trata-se de uma abordagem biomimética, que permite controlar a arquitetura e a composição química dos biomateriais para a obtenção de uma HA nanoestruturada, e consiste na coprecipitação de fosfato di-cálcico di-hidratado (DCPD) em solução ácida de CHI^{9,10,11}.

Essa técnica de biomimetismo *in situ* também pode simular a temperatura, força iônica e pH dos meios biológicos, o que faz com que os materiais produzidos possuam propriedades semelhantes ao tecido que se deseja recuperar. Outra técnica também adaptada à bioengenharia tecidual para *coating* de partículas com tamanhos controlados é o *spray drying*, que é amplamente utilizado na indústria alimentar e farmacêutica por ser de baixo custo, rápida execução e de fácil ampliação. Esta recente técnica utiliza um bico atomizador para gerar milhões de gotículas com elevada área superficial, que são rapidamente secas por um fluxo de gás contra corrente, com temperatura variando de 0°C a 120°C, o que permite a obtenção de um produto em escala micrométrica e nanométrica¹².

Existe grande empenho para aprimorar as propriedades físico-químicas dos biomateriais como: porosidade, densidade, cristalinidade, formato e tamanho das partículas, para que possam atuar como um mecanismo que envia sinais para os tecidos circunvizinhos e recruta células¹³. A área de superfície disponível para reagir com células e fluidos biológicos tem relação com o formato e tamanho do biomaterial. Assim, partículas de tamanhos variados, ao serem implantadas, favorecem a formação de um interstício, uma vez que as partículas menores ocuparão os intervalos entre as partículas maiores, possibilitando a difusão de micronutrientes e fatores de crescimento, migração, proliferação, diferenciação celular e angiogênese¹⁴.

Os biomateriais nanoestruturados possuem organização estrutural com partículas de tamanhos menores que 100 nm e apresentam propriedades diferentes de materiais em escalas maiores e de partículas agregadas. A HA nanoestruturada desempenha papel significativo nas terapias ósseas, devido às suas propriedades funcionais de alta relação superfície/volume e estrutura semelhante a apatita biológica. Essa semelhança é crucial para as interações células - biomaterial e consequente regeneração¹⁵.

Apesar dos avanços científicos, ainda são necessários constantes estudos para desenvolvimento de novos biomateriais, com propriedades similares ao tecido lesionado. Isso porque ainda não existe um biomaterial que atenda a todas as características físico-químicas ideais para aperfeiçoar a regeneração, principalmente de defeitos críticos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo desenvolver, caracterizar as propriedades

físico-químicas e avaliar a citotoxicidade *in vitro* de biomateriais compósitos de CHI, com baixa e média massa molecular, associada à HA nanoestuturada.

MATERIAL E MÉTODOS

PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA

Utilizaram-se duas amostras de CHI's comerciais [(C₆H₁₁O₄N)_n, Aldrich[®], Reino Unido] que, segundo o fabricante, possuem baixa (L-CHI = 5 - 19x10⁴ g/mol) e média (M-CHI, 19 - 31x10⁴ g/mol) massa molecular, e grau de desacetilação de 75-85% respectivamente. A CHI foi dissolvida em ácido acético glacial aquoso (CH₃COOH, Panreac[®], Barcelona) até a obtenção de uma solução homogênea a 0,5% (m/v); depois foi sucessivamente filtrada através de filtros de vidro (diâmetros dos poros: 45 a 5 µm) e membranas porosas (0,8 a 0,45 µm). Deixou-se a solução precipitar por gotejamento em hidróxido de sódio 1M (NaOH, Sigma Chemical[®], Alemanha) até pH ≈ 8 e filtrou-se novamente. O sólido foi cuidadosamente lavado com água bidestilada até que nenhuma alteração na condutividade tenha sido detectada, seguida de sucessivas lavagens com concentrações de 70, 80, 90 e 100% de etanol (v/v) (C₂H₆O, Sigma Chemical[®], Alemanha)⁹. Por fim, o polímero purificado foi seco em vácuo a temperatura de 25 - 28 °C.

PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS

Os compósitos foram preparados baseando-se num método descrito na literatura com algumas modificações^{9,10,11}. Consistiu numa abordagem biomimética em dois estágios fundamentais: precipitação e hidrólise *in situ* da fase inorgânica (HA) dentro da matriz polimérica (CHI). A princípio, prepararam-se as soluções de CHI's em ácido acético glacial e as soluções precursoras de cálcio (acetato de cálcio 5% m/v) [Ca(CH₃COO)₂, BDH[®], Reino Unido] e de fósforo (di-hidrogenofosfato de sódio 5% m/v) (NaH₂PO₄, Sigma Chemical[®], Alemanha). Em seguida, empregaram-se duas técnicas para a preparação dos compósitos:

Técnica 1 – Centrifugação: adicionou-se à solução de CHI 5% (m/v) do sal precursor de fósforo (di-hidrogenofosfato de sódio) e a solução precursora de cálcio,

mantendo sob agitação por 24 horas para assegurar uma dispersão homogênea do DCPD (fase precursora da HA) precipitado na solução viscosa de CHI (suspensão CHI/DCPD). Para a produção das partículas com concentração de 20% de CHI e 80% de HA (L-CHI20/HA80 e M-CHI20/HA80), a solução de CHI/DCPD foi centrifugada e o sobrenadante descartado para a obtenção do precipitado.

Técnica 2 – Spray drying: adicionou-se à solução de CHI as soluções precursoras de cálcio e de fósforo, mantendo-as sob agitação constante para precipitação do DCPD na solução de CHI (suspensão CHI/DCPD). Para a produção das partículas com concentração de 50% de CHI e 50% de HA (L-CHI50/HA50 e M-CHI50/HA50), a solução de CHI/DCPD foi pulverizada em um Buchi Mini *Spray-Dryer* B-191 (Flawil[®], Suíça) com um bico padrão de 0,7 mm. As condições de secagem do pulverizador foram definidas da seguinte forma: taxa de fluxo 32 m³/h, taxa de fluxo de ar comprimido 473 NL/h e temperatura de entrada 160 °C.

Após produção, ambas as amostras foram submetidas ao processo de hidrólise para obtenção da HA a partir do DCPD precipitado na matriz de CHI. Os materiais foram imersos numa solução saturada de fosfato de sódio 8,8% (m/v) e pH 12 (Na₃PO₄, Riedel-de Haën[®], Alemanha), com solução de tripolifosfato de sódio a 1% (m/v) (Na₅P₃O₁₀, Acros Organics[®], Bélgica), e mantidos em banho-maria a 60 °C por 72 horas. Por fim, as amostras foram filtradas e passaram por banhos de água fria (aproximadamente 10 °C) / quente (aproximadamente 60 °C) até a neutralidade do pH, e secos em estufa a 50 – 60 °C. As amostras produzidas passaram por uma malha granulométrica de 425 – 250 µm, depois foram fracionadas em *ependorfs* e esterilizadas por radiação γ com dose de 25 kGy.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS QUITOSANAS

Determinou-se o teor de umidade (%H) por gravimetria, em que uma amostra de CHI previamente pesada foi seca numa estufa (MLW WS100, Coimsa[®], México) a 105 °C até atingir um peso constante. O %H foi calculado a partir da diferença entre os pesos da amostra úmida original e a amostra seca, em que W_i e W_f são os pesos da amostra inicial e seca, respectivamente, e W_{H_2O} é o conteúdo de água, como mostrada na equação A.

$$\%H = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 = \frac{W_{H_2O}}{W_i} \times 100 \quad (A)$$

Também por gravimetria obteve-se o percentual de cinzas (%Cz) ao colocar uma amostra de CHI previamente pesada em cadinhos tarados e levá-la a um forno tipo mufla H1064 (Termiber[®], Espanha) pré-aquecido a 900 °C durante 6 horas. Os cadinhos foram deixados no forno para resfriar até 200 °C e depois colocados em dessecadores com um topo ventilado. O teor de cinzas foi calculado conforme a equação B.

$$\%Cz = \frac{\text{Peso das cinzas}}{\text{Peso da amostra inicial}} \times 100 \quad (\text{B})$$

A média da massa molecular viscosimétrica (Mv) foi calculada a partir da viscosidade intrínseca $[\eta]$ de soluções de CHI em ácido acético (0,3 M) / acetato de sódio (0,2 M) a 25 °C. As determinações foram realizadas em triplicata, usando-se um viscosímetro de tipo Ubbelohde; a Mv foi calculada utilizando-se a equação Mark-Houwink-Sakurada (equação C), para um sistema CHI – solvente de $K = 0.076 \text{ mL/g}$ e $a = 0.76$ ¹⁶:

$$[\eta] = K' M_v^a \quad (\text{C})$$

O grau de desacetilação (DD) foi determinado pelo método de primeira derivada por ultravioleta (UV)¹⁷, que é uma medida quantitativa do número de grupos funcionais de amina no polímero. O DD foi calculado a partir de gravações da primeira derivada dos espectros UV de N-acetil glucosamina das amostras de CHI a 202 nm, usando-se cuvets de quartzo ultravioleta com comprimento de 1 cm, espectrofotômetro visível a UV Cintra 10e (GBC[®], Austrália) e o software UV-Spectrum Scan (GBC[®], Austrália).

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPÓSITOS

A imagem macroscópica dos compósitos foi registrada por uma câmera digital D3200 (Nikon[®], Japão), e a morfologia superficial foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com microscópio ambiental EVO LS 10 (Carl Zeiss[®], Inglaterra - Alemanha). As amostras secas sem qualquer tratamento prévio foram montadas em um *stub* de alumínio e fixadas com fita adesiva de carbono. A observação foi realizada em condições de alto vácuo, utilizando-se um detector de elétrons secundário. A tensão de aceleração (EHT), o tamanho do ponto e as ampliações utilizadas estão especificadas nas micrografias.

A análise por Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) foi obtida através da mistura dos compósitos com brometo de potássio (KBr, Sigma Chemical[®], Alemanha) para formação de discos. Estes foram registrados na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando o espectrômetro Tensor 27 FTIR (Bruker[®], Alemanha) e o software OPUS Data Collection Program[®] (Bruker[®], Alemanha). Os espectros foram obtidos com uma resolução de 2 cm^{-1} e calculados com média de mais de 100 varreduras. O espectro da HA foi determinado a partir de uma amostra produzida anteriormente pelo grupo de pesquisa⁹.

Os padrões de difração de raios-X (DRX) dos diferentes biomateriais foram obtidos com um difratômetro de raios-X D5005 (Siemens[®], Alemanha), com radiação Cu-K α ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$), tensão de 40 KV e corrente de 15 mA. A varredura angular (2θ) foi de 10° a 60° com passo de 2° por minuto. Os picos padrões encontrados foram comparados aos disponíveis nos arquivos da JCPDS (n° 46-0905 para HA e n° 39-1894 para CHI).

ENSAIOS *IN VITRO*

O ensaio baseou-se na determinação de células viáveis após a exposição da população de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) a diversas concentrações do extrato (amostra dos biomateriais)¹⁸. Realizou-se um monocultivo de CHO-k1 em placa de 150 mm de diâmetro com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco[®], EUA), suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B (0,025 $\mu\text{g/mL}$), glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%), a 37 °C em atmosfera de CO₂ (5%), por 72 horas em estufa incubadora CCL-170B-8 (ESCO[®], Dinamarca).

Para garantir um crescimento celular satisfatório, o meio de cultura suplementado (MCS) foi trocado nos períodos de 24 e 48 horas. Após 72 horas o meio foi retirado e as células removidas com solução de tripsina Tryple Express (Gibco[®], EUA) com vermelho de fenol 12605 (Gibco[®], EUA). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer por diluição em azul de trypan 0,4% (1:5), utilizando-se um microscópio óptico 8060A (Bel[®], Itália). O método é baseado na observação de células viáveis, impermeáveis ao corante, enquanto as células não viáveis permitem a penetração do corante devido à formação de poros na membrana, exibindo a coloração azul¹⁹.

Para a avaliação da viabilidade celular, os materiais foram preparados conforme a norma ISO 10993-12 (2012)²⁰ e previamente esterilizados por radiação gama, com uma

dose de 25 kGy. Todas as amostras foram adicionadas em criotubos e misturadas ao MCS na proporção 2% (m/v) e, em seguida, incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos numa microcentrifuga CT 14000 (Cientec[®], Brasi) e o sobrenadante reservado para o ensaio. Utilizaram-se dois controles: 1) Alumina (controle negativo); 2) solução de fenol 0,2% (controle positivo). Após as 24 horas, tanto as amostras como os controles foram submetidos a diluições seriadas, obtendo-se as concentrações 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

O ensaio de citotoxicidade utilizado foi o método indireto de incorporação do vermelho neutro, conforme norma ISO 10993-5 (2009)²¹, em que as células (1x10⁴ células/poço) foram cultivadas em MCS (200 µL) e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas, utilizando-se placa de 96 poços. Após esse período, o MCS foi retirado, os tratamentos (amostras e controles) e suas respectivas diluições (200 µL) foram adicionados na placa contendo as células e foram novamente incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO₂ (5%), por 24 horas. Após o tratamento observou-se a morfologia celular com microscópio óptico invertido Primo (Carl Zeiss[®], Inglaterra - Alemanha), e o meio contendo os tratamentos foi retirado dos poços.

Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) (200 µL). Após a retirada do PBS, adicionou-se 200 µL da solução de vermelho neutro (50 µg/mL) e, para a incorporação, a placa foi incubada em estufa a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 3 horas. A solução de vermelho neutro foi retirada e os poços foram lavados com 200 µL de PBS. Depois, foram adicionados 200 µL de solução de extração (50% etanol: 1% ácido acético: 49% água destilada) e a placa submetida à agitação de 150 rpm por 10 minutos, numa incubadora com agitação Shaker TE-420 (Tecnal[®], Brasil) para extração do vermelho neutro das células.

As leituras das absorvâncias foram realizadas em triplicata para cada amostra, em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific[®], EUA), a 540 nm. Os resultados foram expressos em viabilidade celular (%Vc), em que *Abs amostra* é a absorvância da amostra a 540 nm e *Abs branco* é a absorvância do branco a 540 nm, conforme a equação D.

$$\%Vc = \frac{Abs\ amostra}{Abs\ branco} \times 100 \quad (D)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS QUITOSANAS

Na tabela I constam os resultados da avaliação físico-química das CHI's. Para determinar as características deste polímero e correlacioná-las com as propriedades que podem resultar em aplicações biológicas, foi necessária uma prévia purificação, tendo em vista que a utilização da CHI como biomaterial exige um grau extremamente alto de pureza e pouca quantidade de matéria inorgânica (menos de 1%)²².

Após criterioso processo de purificação, foram obtidas amostras uniformes e completamente solúveis de CHI, com um rendimento (%R) de 80,2% para L-CHI e 86,7% para M-CHI, nas quais as perdas estão relacionadas aos materiais insolúveis e agregados, excluídos após filtrações e a própria manipulação durante o experimento. A CHI de baixa massa molecular (L-CHI) teve menor rendimento devido a uma maior fluidez, mas os valores encontrados são semelhantes ao reportado na literatura, quando compararam a eficácia de diferentes métodos de purificação²².

Por gravimetria, os valores obtidos do teor de umidade (%H) foram semelhantes entre as duas amostras. Esses valores são explicados pelo fato de que os grupos amino da CHI apresentam forte afinidade pela água, e no estado sólido as macromoléculas podem apresentar mudanças na conformação, que tendem a adsorver água, sendo facilmente hidratadas²³. Por ser um polímero natural, a CHI pode ter origem e composição variadas, e sua pureza depende do processo que foi realizado. O percentual de cinzas (%Cz) refere-se ao teor residual inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica. Os valores encontrados foram baixos, obedecendo aos padrões aceitáveis para amostras ultrapuras (< 0,6%), e dentro dos valores para amostras comerciais (< 1%)²⁴.

A média da massa molecular viscosimétrica (Mv) obtida confirma que as CHI possuem baixa e média massa molecular. A Mv está inversamente relacionada à solubilidade da CHI, pois quanto maior a cadeia, maior é sua Mv, o que favorece interações entre os segmentos e, conseqüentemente, diminui a solubilidade do polímero. Dessa forma, pode-se concluir que a M-CHI poderá ser menos solúvel em meios ácidos²⁵.

Outra característica avaliada foi o grau de desacetilação (DD), que é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da CHI, sendo definido como o percentual de unidades do polímero que estão desacetiladas²⁶. O DD também está relacionado à

solubilidade da CHI em meios ácidos, pois seu valor expressa a quantidade de grupos aminos disponíveis para protonação que geram cargas ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica, em vista que quanto maior o valor do DD, maior a quantidade de cargas presentes na cadeia e ocorre mais repulsão eletrostática entre elas, conseqüentemente, maior será a solubilidade da CHI²⁵. Dessa forma, os DD obtidos neste estudo foram inferiores aos observados por outros autores²⁵, o que sugere que as CHI utilizadas podem apresentar menor solubilidade em soluções de acidez moderada, e similares ao reportado em um estudo que avaliou CHI comerciais de diferentes origens²⁷.

Tabela I: Resultados da caracterização físico-química das quitosanas de baixa (L-CHI) e média (M-CHI) massa molecular.

| Amostra (n=3) | %R | %H | %Cz | Mv | DD |
|---------------|------------|------------|-------------|----------------------|--------------|
| L-CHI | 80,2 ± 0,3 | 15,7 ± 0,2 | 0,51 ± 0,01 | 4,18x10 ⁴ | 79,51 ± 0,04 |
| M-CHI | 86,7 ± 2,7 | 16,4 ± 0,3 | 0,18 ± 0,04 | 17,3x10 ⁴ | 77,7 ± 0,3 |

(%H) teor de umidade; (%Cz) percentual de cinzas; (Mv) massa molecular viscosimétrica e (DD) grau de desacetilação.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS

Compósitos de CHI/HA podem ser produzidos por diferentes técnicas, sendo que o método biomimético utilizado consiste na precipitação *in situ* e nucleação do componente inorgânico dentro da matriz polimérica. Esse sistema é considerado mais vantajoso por permitir um melhor controle da microestrutura, homogeneidade e composição química dos materiais finais¹⁰. Os biomateriais produzidos possuíam um aspecto macroscópico de pó (Fig. 1), sendo que os produzidos pela técnica do *spray drying*, L-CHI50/HA50 (Fig. 1C) e M-CHI50/HA50 (Fig. 1D), aparentavam ser mais higroscópico, aglomerando-se com facilidade.

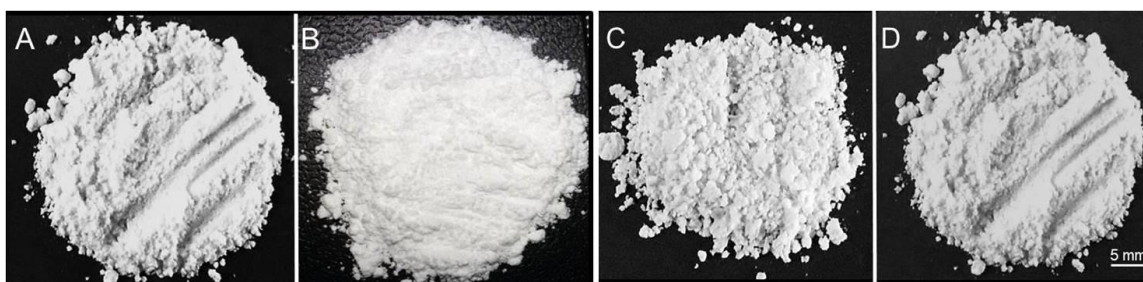


Figura 1: Fotografia digital da morfologia macroscópica dos compósitos. (A) L-CHI20/HA80; (B) M-CHI20/HA80; (C) L-CHI/50HA50 e (D) M-CHI50/HA50.

A MEV demonstrou que as partículas individuais dos compósitos produzidos se agregaram formando estruturas maiores, com tamanhos variados. Não foi observada segregação de cristais de HA, o que sugere que estava depositada na matriz da CHI e juntas constituíam as partículas individuais. Nota-se que os compósitos produzidos pela técnica de centrifugação (Fig. 2A e 2B) possuem tamanhos de partícula maiores (micropartículas de $\approx 5 \mu\text{m}$) que os compósitos produzidos por *spray drying* (nanopartículas de $\approx 50 \text{ nm}$), o que confirma que este é viável para a produção de materiais em escala nanométrica (Fig. 2C e 2D). Esses resultados demonstram que ambas as técnicas proporcionaram a obtenção de partículas menores do que de estudos anteriores (≈ 140 a $300 \mu\text{m}$)^{9,11}, nos quais empregou-se o método biomimético de precipitação *in situ*.

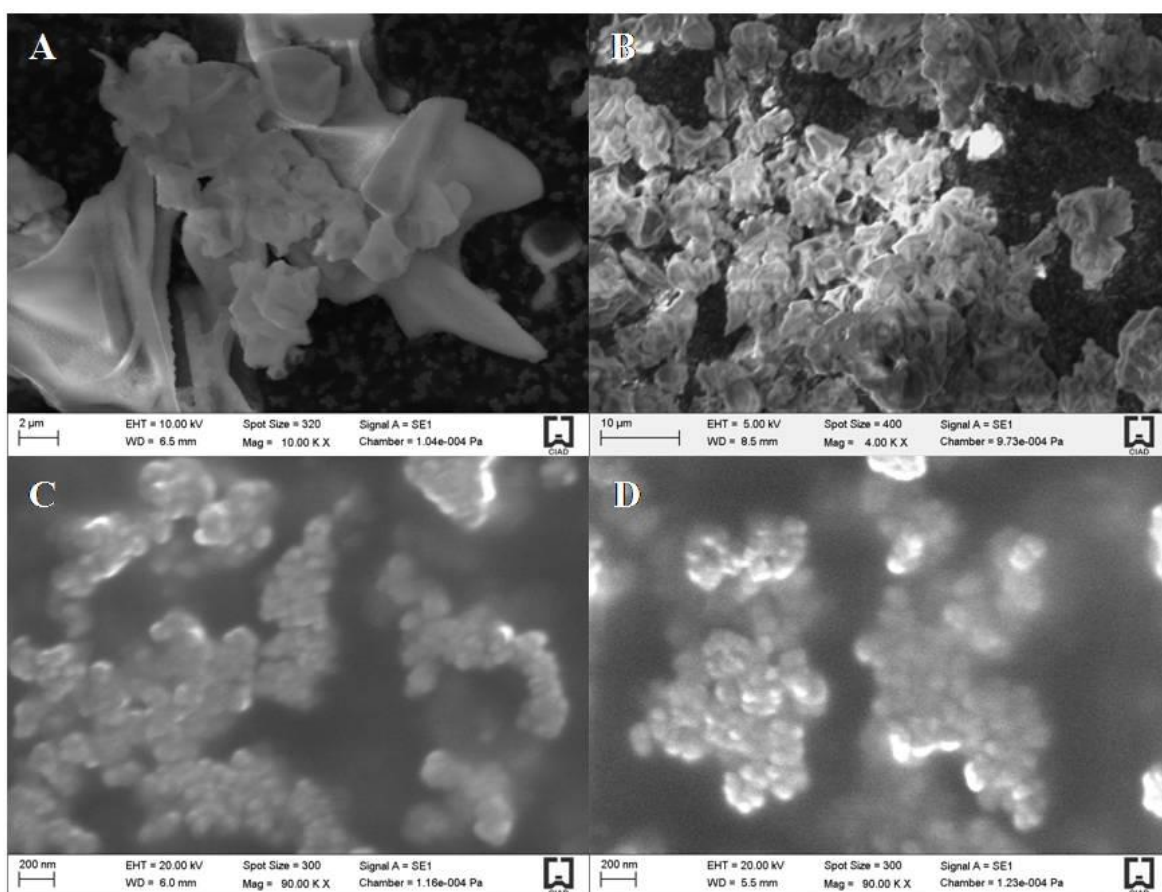


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura demonstrando a superfície dos compósitos. (A) L-CHI20/HA80; (B) M-CHI20/HA80; (C) L-CHI50/HA50 e (D) M-CHI50/HA50.

Estudos apontam que nanobiomateriais com partículas menores que 100 nm mimetizam melhor a microestrutura do tecido, o que potencializa a interação celular^{3,28}. Embora os potenciais benefícios dos materiais nanoestruturados e das nanopartículas sejam

bem descritos, o impacto no organismo como um todo ainda não foi bem esclarecido. Em geral, o efeito das nanopartículas no corpo depende de propriedades como tamanho, massa, composição química, superfície e também como elas agem em conjunto. À medida em que entram no organismo, os locais de penetração, a possibilidade de acumulação e a translocação destas nanopartículas podem determinar os riscos potenciais e toxicidade dos materiais²⁸. Desse modo, são imprescindíveis estudos aprofundados a fim de tentar elucidar como os biomateriais nanométricos se comportam ao entrar em contato com meios biológicos e qual o tamanho de partícula ideal.

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura dos biomateriais. Os espectros FTIR das amostras da HA, L-CHI, M-CHI e dos compósitos L-CHI50 e M-CHI50 estão representadas na figura 3 (L-CHI20 e M-CHI20 não estão representadas porque apresentaram o mesmo espectro das amostras exibidas).

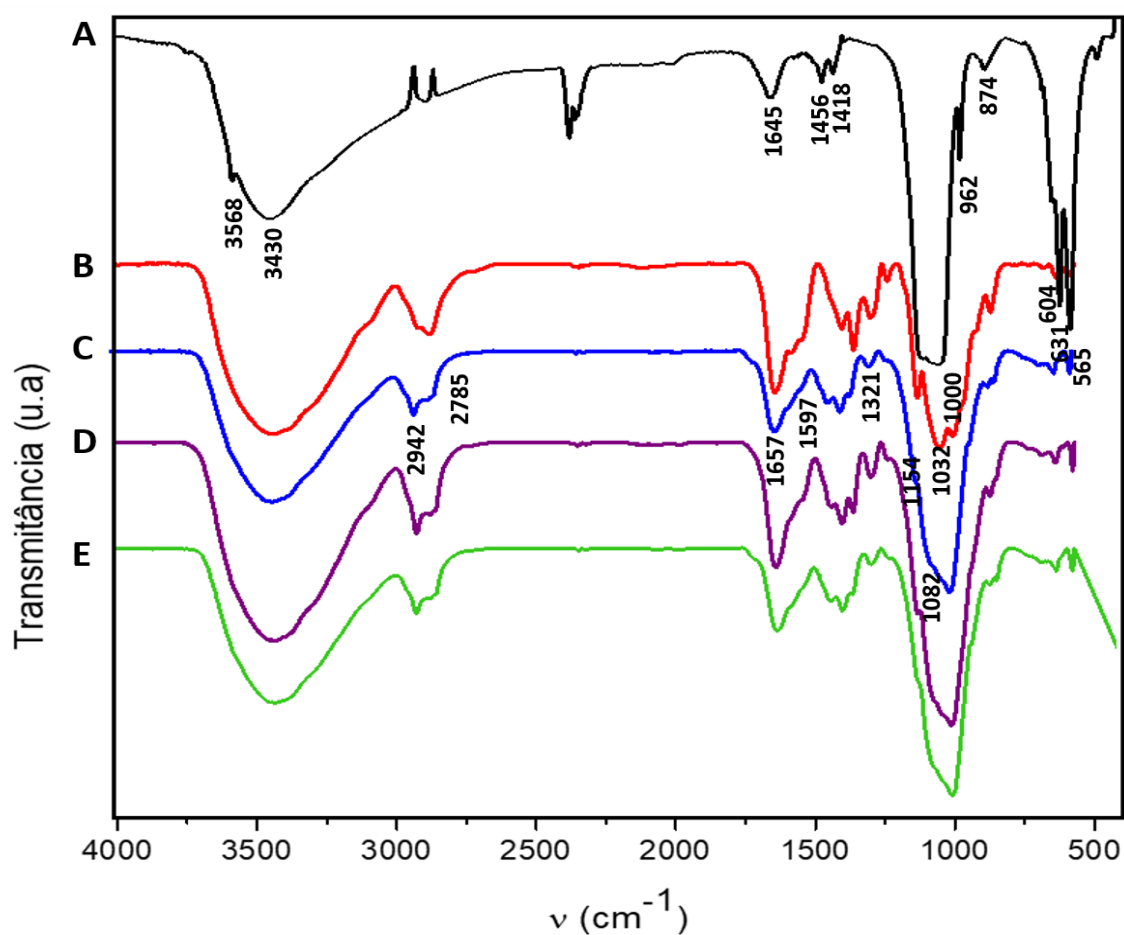


Figura 3: Espectro de FTIR das amostras dos materiais de origem e dos compósitos. (A) HA; (B) M-CHI (C) L-CHI; (D) M-CHI50/HA50 e (E) L-CHI50/HA50.

O espectro infravermelho de HA (Fig. 3A) exibiu as bandas de absorção típicas na faixa de 3568 cm^{-1} (estiramento de OH) e 631 cm^{-1} (vibração de OH). As bandas largas que alcançam cerca de 3430 e 1645 cm^{-1} são devidas à água adsorvida (alongamento de HOH e flexão respectivamente). Também apresentou as bandas de absorção típicas do grupo PO_4 em HA a $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$ (ν_3) e 962 cm^{-1} (ν_1)²⁹. As bandas de absorção a 604 e 565 cm^{-1} correspondem ao modo ν_4 do grupo PO_4 . As bandas que aparecem em 1456 , 1418 e 874 cm^{-1} indicam a presença de íons de carbonato de tipo B na apatita³⁰. O benefício da presença de carbonato na apatita sintética é que ele contribui para aumentar a resistência mecânica e a bioatividade^{31,32}.

O espectro infravermelho da L-CHI (Fig. 3C) e da M-CHI (Fig. 3B) exibiram as bandas de absorção distintas a $2942 - 2784\text{ cm}^{-1}$ (banda de alongamento alifática C-H), 1657 cm^{-1} (amida I) e 1597 cm^{-1} (flexão de NH_2) e 1321 cm^{-1} (amida III). As bandas de absorção a 1154 cm^{-1} (alongamento antissimétrico da ponte C-O-C), 1082 e 1032 cm^{-1} (vibrações esqueléticas envolvendo alongamento C-O), são características da sua estrutura sacarídea³³. Pode-se apreciar que os espectros de FTIR dos compósitos MCHI50/HA50 e (Fig. 3D e 3E) exibiram as bandas de absorção de ambos os componentes. Esses resultados confirmam que não foi identificada a presença de contaminantes nas amostras e que houve formação de HA em associação com a CHI nos compósitos, com a presença dos grupos característicos dos materiais de origem.

Nos difratogramas de DRX das amostras (Fig. 4) observam-se os padrões de DRX dos biomateriais, e nota-se um pico largo na região de 15° e 30° (2θ) correspondente aos principais picos de difração da CHI (Arquivo JCPDS n°. 39-1894).

A presença da fase inorgânica é evidenciada pelo pico largo de $30,3^\circ$ a $35,4^\circ$ em 2θ devido à contribuição dos picos de difração característicos da HA em $2\theta = 31,7^\circ$ (211), $32,2^\circ$ (112) e $32,8^\circ$ (300), juntamente com o pico a $2\theta = 26^\circ$ (002), conforme relatado no arquivo JCPDS n° 46-0905. Vale ressaltar que a difração corresponde à parte cristalina, visto que a porção amorfa não apresenta picos em DRX. Ou seja, a ausência desses picos característicos da CHI não significa que o polímero não esteja presente, mas sim que é pouco cristalino. Os resultados de DRX não apresentaram nenhuma alteração estrutural e comprovam a presença das duas fases (CHI e HA) nos compósitos.

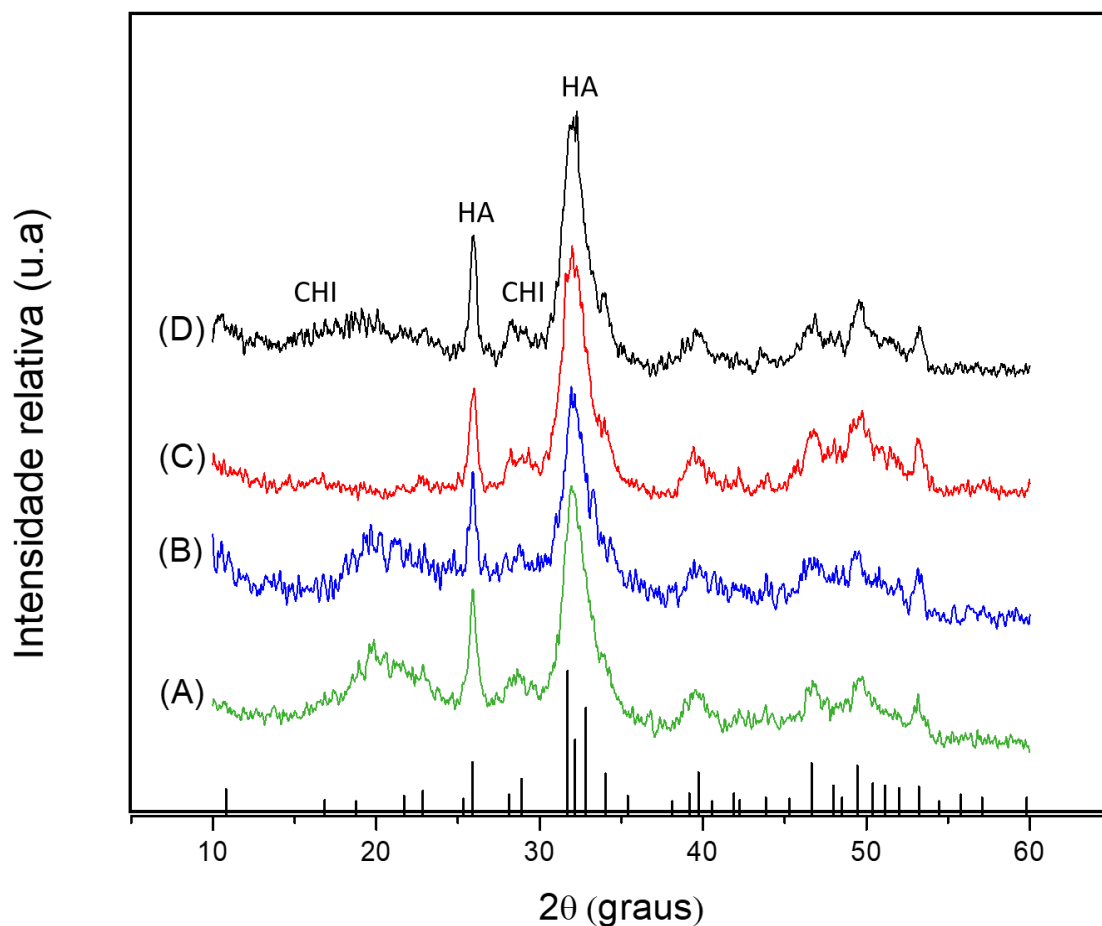


Figura 4: Padrões de difração de raios X dos compósitos. (A) L CHI50/HA50; (B) M-CHI50/HA50; (C) L-CHI20/HA80 e (D) M-CHI20/HA80. As linhas na parte inferior correspondem às linhas de difração da hidroxiapatita (JCPDS n° 46-0905).

TESTES *IN VITRO*

Os testes de citotoxicidade avaliam o efeito tóxico no nível celular, ou seja, a capacidade de causar morte celular, alterações na permeabilidade da membrana ou inibição enzimática. Os resultados encontrados são muito importantes para a avaliação das técnicas empregadas, tendo em vista que não foi avaliada a citotoxicidade dos compósitos produzidos nos estudos anteriores, nos quais empregou-se o método biomimético^{9,10,11}. As percentagens de viabilidade celular (% Vc) deste estudo estão expressas na figura 5.

A classificação de citotoxicidade, segundo a norma ISO 10993-5 (2009)²¹, foi determinada de acordo com contração de 100% do extrato celular, devido ao interesse do estudo em avaliar os biomateriais como produtos finais para utilização biomédica. Os compósitos L-CHI20/HA80 e L-CHI50/HA50 foram considerados não citotóxicos (% Vc

>90%), e os compósitos M-CHI20/HA80 e M-CHI50/HA50 apresentaram baixa citotoxicidade ($80 < \%Vc < 89\%$).

Nota-se que o tamanho da partícula e da concentração de CHI/HA nos compósitos não foram determinantes para a avaliação da citotoxicidade. O que resultou em diferenças entre os grupos foi cadeia polimérica da CHI, ocorrendo melhor viabilidade nos extratos em contato com os compósitos que possuíam CHI de baixa massa molecular (L-CHI) em sua composição.

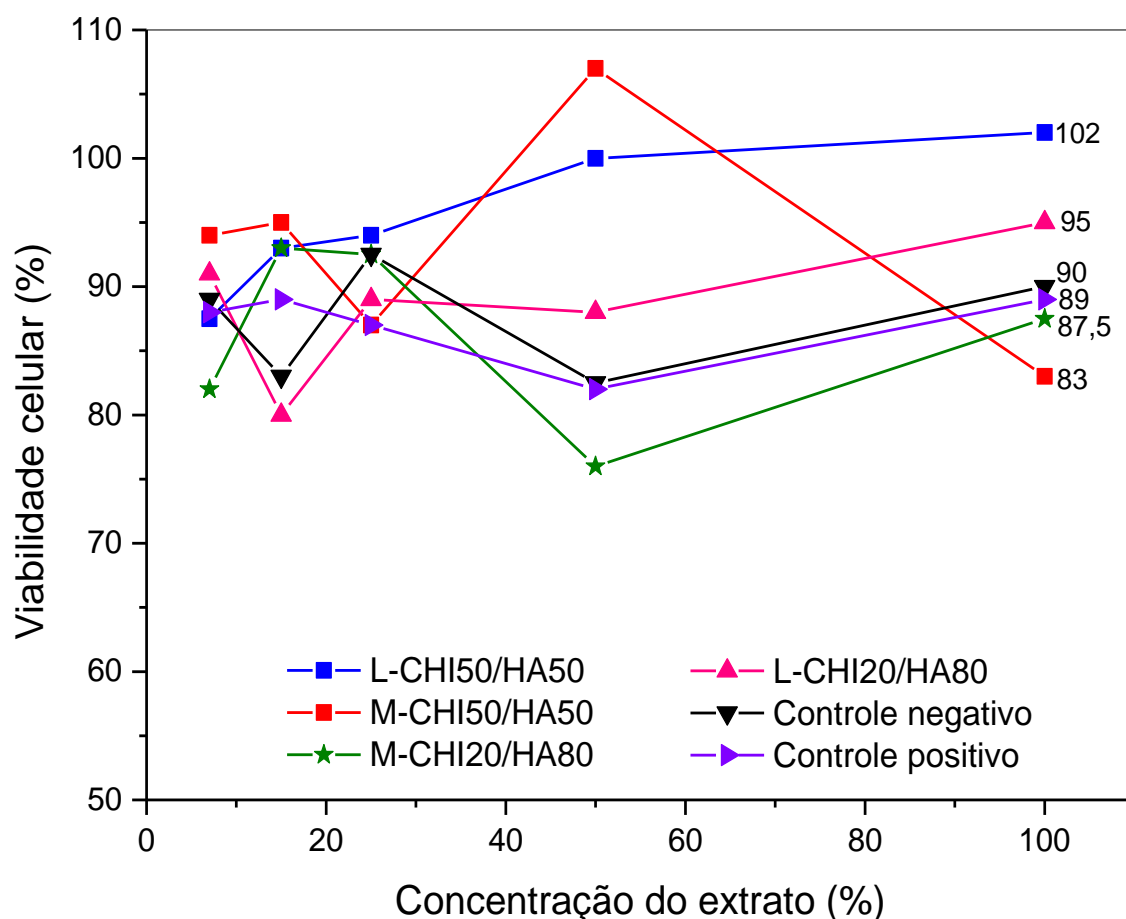


Figura 5: Percentual de viabilidade celular para determinar a citotoxicidade *in vitro*.

Não há um consenso na literatura sobre a massa molecular ideal para o uso da CHI como biomaterial. Alguns estudos referem que a baixa massa faz com que a CHI, ao ser hidrolisada, libere unidades necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular, o que induz a uma tolerância tecidual e favorece o reparo³⁴. Outros sugerem que uma massa molecular maior contribui para ação anti-inflamatória, antitumoral e atividade imunomoduladora³⁵. Estes resultados são similares a

outro estudo que, ao avaliar arcabouços de HA/CHI, detectou que os arcabouços induziram a um decréscimo na morte celular quando comparados ao grupo controle, afirmando, dessa forma, que foi possível combinar propriedades osteocondutoras da HA com uma possível propriedades anti-inflamatória da CHI³⁶.

CONCLUSÕES

As adaptações realizadas no método biomimético foram eficazes para a incorporação da hidroxiapatita nanoestruturada na matriz polimérica da quitosana. As técnicas utilizadas foram eficazes para a produção dos compósitos, micropartículas por centrifugação e nanopartículas por *spray drying*, com tamanhos de partículas menores ao reportado na literatura.

As quitosanas e os compósitos produzidos apresentaram características físico-químicas potenciais para a utilização como substitutos ósseos. *In vitro* os compósitos que continham quitosana de baixa massa molecular (L-CHI20/HA80 e L-CHI50/HA50) não foram citotóxicos, e os com média massa molecular (M-CHI20/HA80 e M-CHI50/HA50) apresentaram baixa citotoxicidade, sendo promissores para aplicações biomédicas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brasil pelo financiamento do projeto CAPES MES-CUBA (nº 132/2011), ao Centro de Biomateriales (BIOMAT) da Universidad de La Havana/Cuba e a Universidade de São Paulo (USP) pela colaboração.

3.2 ARTIGO II

Resposta tecidual após implantação de partículas de hidroxiapatita nanoestruturada e quitosana para o reparo de defeito ósseo crítico

Tissue response after implantation of nanostructured hydroxyapatite and chitosan particles for the repair of critical bone defect

Renata dos Santos Almeida^{1,7}; Carlos Andrés Peniche^{2,8}; Eliana Cristina da Silva Rigo^{3,9}; Ana Flávia Calmon Daltró^{4,7}; Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro^{1,7}; Guillermo Alberto López^{1,10}; Aryon de Almeida Barbosa Jr.^{5,11}; Fabiana Paim Rosa^{6,7}

¹Doutor(a) em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas; ²Doutor em Química; ³Doutora em Ciências e Engenharia dos Materiais; ⁴Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas; ⁵Doutor de Medicina; ⁶Doutora em Odontologia; ⁷Universidade Federal da Bahia, Brasil; ⁸Universidad de La Habana, Cuba; ⁹Universidade de São Paulo, Brasil; ¹⁰Instituto Federal da Bahia, Brasil; ¹¹Fundação Oswaldo Cruz

Resumo

Compósitos de quitosana com hidroxiapatita tem se mostrado propícios para regeneração óssea, visto que, possibilitam que as propriedades individuais de cada biomaterial possam ser aproveitadas em conjunto. Desta forma, avaliou-se o reparo tecidual em 15 e 45 dias após implantação de micropartículas compostas com 80% hidroxiapatita nanoestruturada e 20% de quitosana (baixa e média massa molecular) para regeneração de defeito ósseo crítico na calvária de ratos. Notou-se conspícua neoformação óssea nas regiões de bordas do defeito e por condução de permeio às partículas dos biomateriais, sendo mais evidente na composição com quitosana de baixa massa molecular. Os biomateriais sofreram intensa biodegradação e desencadearam discreta a moderada resposta inflamatória, que evoluiu para inflamação crônica granulomatosa. Conclui-se que os compósitos foram biocompatíveis e osteocondutores. A baixa massa molecular da quitosana na formulação das micropartículas foi um fator preponderante para a resposta biológica, sendo esta composição mais favorável à utilização como substituto ósseo.

Palavras-chave: Biomateriais. Hidroxiapatita. Quitosana. Regeneração Óssea.

Abstract

Composites of chitosan with hydroxyapatite is very promising for bone regeneration, as it allows the individual properties of each biomaterial to be harnessed together. The tissue repair were evaluated 15 and 45 days after implantation of microparticles composed of 80% nanostructured hydroxyapatite and 20% chitosan (low and medium molecular weight) in a critical bone defect in rat calvaria. Conspicuous bone neoformation was observed in the border regions of the defect and by biomaterial particle permeation conduction, more evident in the composition containing the low molecular weight chitosan. The biomaterials underwent intense biodegradation and triggered mild to moderate inflammatory response, which evolved into chronic granulomatous inflammation. It was concluded that the biomaterial were biocompatible and osteoconductive. The presence of

low molecular weight in the formulation was a preponderant factor for the biological response, and this composition was more favorable to be applied as a bone substitute.

Keywords: *Biomaterials. Hydroxyapatite. Chitosan. Bone Regeneration.*

INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual tem desenvolvido biomateriais com a finalidade de aumentar, substituir, estimular ou proporcionar a reconstrução de tecidos e órgãos. Estes biomateriais devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas, bem como morfologia compatível com os tecidos vivos, para promover a interação tecidual e favorecer a regeneração, sem induzir uma resposta adversa¹.

Estudos com animais experimentais têm demonstrado que a regeneração óssea depende da localização, tamanho do defeito, espécie e a idade do animal utilizado². O modelo experimental empregado foi o estabelecido por Takagi e Urist³ e revalidado por Schmitz e Hollinger⁴ que, a fim de padronizar os estudos dos biomateriais para a reparação óssea, propuseram um defeito reprodutível em calvária de rato, de tamanho crítico. Isso não necessita de fixação para a estabilização, sendo o menor tamanho de lesão intraóssea, que não vai regenerar-se de forma espontânea durante a vida do animal. Recentemente, esse conceito foi reformulado como uma região que não se regeneraria espontaneamente durante o período do estudo². Portanto, nesse tipo de perda óssea a regeneração é limitada e demanda procedimentos de enxertia e substituição óssea com biomateriais.

Os biomateriais cerâmicos são de grande interesse para a medicina regenerativa, principalmente o fosfato de cálcio hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], que é amplamente utilizado nas aplicações clínicas devido à similaridade com a apatita biológica encontrada na porção mineral do tecido ósseo, por ser bioativo, biocompatível e osteocondutor. Possuem densidade moderada e boa resistência à compressão, além de poderem substituir tecidos duros como ossos e dentes⁵. Também têm ampla capacidade de associação com moléculas, íons e metais, além de serem estáveis em meio biológico e versatilidade para processamento em diferentes formatos. Entretanto, algumas limitações podem comprometer sua atividade biológica em algumas aplicações, como baixa tenacidade à fratura, fragilidade mecânica, alta cristalinidade e baixa taxa de dissolução *in vivo*⁶.

Já os biomateriais poliméricos são de fácil obtenção e possuem baixa densidade. Entre estes, a quitosana é um polímero natural, promissor para a bioengenharia de tecidos, podendo ser aplicada como sistema de liberação controlada de drogas, recobrimento de feridas e reparo tecidual, inclusive ósseo¹, devido a características propícias como biocompatibilidade, bioadesividade, biodegradabilidade, ser hemostático e atuar como arcabouço para migração celular⁷.

É derivada da N-desacetilação da quitina (presente em fungos e no exoesqueleto de crustáceos, insetos, entre outros) e tem fórmula molecular genérica expressa por $(C_6H_{11}O_4N)_n$. Sua estrutura química primária é formada pela repetição de unidades (1→4)-2-acetamida-2-deoxi-β-D-glucano (N-acetil-D-glucosamina) e (1→4)-2-amino-2-deoxi-β-D-glucano (D-glucosamina) unidos por ligações β (1→4)⁸.

Estruturalmente considera-se a quitosana como um polissacarídeo, por mimetizar os carboidratos das glicoproteínas extracelulares, podendo exercer funções morfogênicas semelhantes. Também é o único biopolímero polissacarídeo que compartilha uma série de produtos químicos e estruturais semelhantes ao colágeno⁹. Suas propriedades físico-químicas dependem do grau de acetilação (que representa o percentual de grupos NH₂ livres), da distribuição de cargas e da massa molecular. Essas propriedades podem ser controladas durante o processo de desacetilação da quitina⁸.

A associação entre fosfatos de cálcio e polímeros tem o intuito de aprimorar as características físico-químicas do compósito em relação aos materiais, quando aplicados individualmente. Nesse sentido, sabe-se que os compósitos de hidroxiapatita com quitosana apresentam características interessantes para a reparação do tecido ósseo, tendo em vista que sua composição química é muito similar ao osso, por isso são frequentemente utilizados como materiais de preenchimento na ortopedia. A quitosana apresenta biodegradabilidade, muco-adesividade, flexibilidade e restringe a migração das partículas para os tecidos circunjacentes, enquanto a hidroxiapatita proporciona estrutura, bioatividade e osteocondutividade⁹.

O formato do biomaterial também é um fator importante para a sua aplicabilidade. Sua morfologia deve ser adequada ao sítio de aplicação e ao tipo tecidual a ser reparado. As partículas são estruturas tridimensionais que, após a implantação, organizam-se semelhante a um mosaico, no qual os fragmentos menores agrupam-se entre os maiores. São comumente utilizados em situações nas quais não são requeridas cargas mecânicas, podendo atuar como substitutos até o reparo ou regeneração do tecido e sua

bioreabsorção¹⁰. Os biomateriais nanoestruturados desempenham papel significativo nas terapias ósseas, isso em virtude de suas propriedades funcionais, como a relação superfície/volume e estrutura semelhante à apatita biológica. Essa semelhança é crucial para as interações células - biomaterial e consequente regeneração¹¹.

Desse modo, objetivou-se avaliar o reparo tecidual após a implantação de micropartículas compostas por hidroxiapatita nanoestruturada e quitosana, de baixa e média massa molecular, para a regeneração de defeito ósseo crítico.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal da Bahia (Protocolo 63/2014), e seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008).

As micropartículas foram desenvolvidas e caracterizadas durante a primeira fase de execução do estudo¹², a partir da adaptação do método descrito na literatura^{13,14}. Utilizaram-se duas amostras comerciais de quitosanas (Aldrich[®], Reino Unido), com baixa ($4,18 \times 10^4$ g/mol) e média massa molecular ($17,3 \times 10^4$ g/mol), que possuem 80% e 72% de grau de desacetilação respectivamente.

Utilizou-se uma rota de aproximação biomimética, com precipitação e hidrólise *in situ* de cristais de hidroxiapatita dispersos dentro de uma solução polimérica de quitosana. Para isso, preparou-se soluções de quitosana a 2% em ácido acético, depois adicionou-se o sal precursor de fósforo (di-hidrogenofosfato de sódio, NaH_2PO_4 , Sigma Chemical[®], Alemanha) e a solução precursora de cálcio (acetato de cálcio, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BDH[®], Reino Unido) para a dispersão do DCPD (fase precursora da hidroxiapatita).

Em seguida, essa solução foi centrifugada para a obtenção do precipitado, que foi hidrolisado numa solução saturada de fosfato de sódio (Na_3PO_4 , Riedel-de Haën[®], Alemanha) e tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, Acros Organics[®], Bélgica) para a obtenção da hidroxiapatita. As amostras produzidas passaram por uma malha granulométrica de 425 – 250 μm , depois foram fracionadas em eppendorfs e esterilizadas por radiação gamma com dose de 25 kGy.

Para a implantação dos biomateriais, foram utilizados 50 *rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos adultos, com massa corpórea entre 350 e 400 g, distribuídos

aleatoriamente para composição de três grupos para implantação dos seguintes compósitos: **HQB** (micropartículas com 80% de hidroxiapatita e 20 % de quitosana de baixa massa molecular), **HQM** (micropartículas com 80% de hidroxiapatita e 20% de quitosana de média massa molecular) e **CON** (defeito vazio).

O procedimento cirúrgico foi o mesmo descrito por Miguel¹⁵, no qual confeccionou-se um defeito ósseo crítico com aproximadamente 8,5 mm de diâmetro e 0,8 mm de espessura, na porção mediana da calvária de ratos. Após remoção do fragmento ósseo, os biomateriais foram implantados de acordo com seus respectivos grupos experimentais, exceto para o grupo controle. Ao final, o tecido subcutâneo foi reposicionado e suturado com pontos simples (Fig. 1).

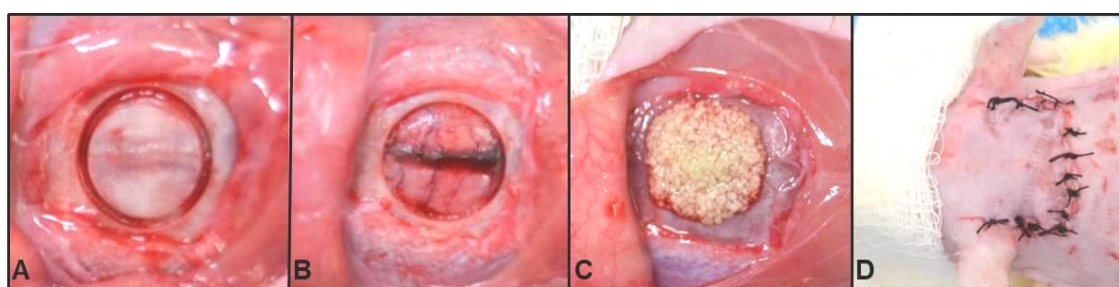


Figura 1. Fotos das etapas do procedimento cirúrgico. (A) demarcação do defeito; (B) remoção do fragmento ósseo; (C) implantação do biomaterial; (D) reposicionamento do retalho e sutura.

Após 15 e 45 dias de cirurgia, os animais foram eutanasiados com dose letal do anestésico para remoção da calvária. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado a 4% (Aldrich[®], Reino Unido) por no mínimo 72 horas, descalcificados com EDTA 5% (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*, Synth[®], Brasil) por sete dias, e processados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados de forma seriada com 5 μ m de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Picrossírius-Red (PIFG) e Tricrômico de Masson-Goldner (TMG).

A análise histológica foi realizada por microscopia de luz comum, utilizando um microscópio MM6B (Leica[®], Alemanha) acoplado a uma câmera digital DFC7000T (Leica[®], Alemanha), e ao Sistema de Análise de Processamento de Imagens LAS Core (Leica[®], Alemanha).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, aos 15 dias, nas regiões de bordas do defeito houve neoformação óssea reparativa, ocupando 13% de extensão linear do defeito (EL) no grupo com quitosana de baixa massa molecular (**HQB**) (Fig. 2A). Esse processo foi mais acentuado (EL= 25%) no grupo com quitosana de média massa molecular (**HQM**) (Fig. 2B), com aspecto proliferativo, rico em osteoblastos e osteócitos ativos. Em contrapartida, essa neoformação foi restrita as bordas do defeito no grupo **CON** (EL= 9%) (Fig. 2C). A regeneração das bordas do defeito foi basicamente reacional. Isso é decorrente da lesão tecidual causada pelo procedimento cirúrgico, no qual as células osteoprogenitoras presentes no periósteo e no endósteo do osso circunjacente podem ser estimuladas a proliferar-se e diferenciar-se em osteoblastos, produzindo, assim, uma nova matriz óssea¹⁶.

As micropartículas apresentaram acentuada eosinofilia, aparência flocada e tamanhos variados. Preencheram toda a extensão do defeito, exercendo papel de arcabouço tridimensional, com espessura similar ao osso remanescente (Fig. 2D), e permitiram a formação de um interstício no qual houve notória migração e adesão celular. Permeando as partículas, formaram-se septos de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 2E e G), bem vascularizado com capilares sanguíneos conspícuos, proliferação de células fusiformes mesenquimais e fibroblastos.

Dessa forma, a organização espacial do biomaterial com o tecido de preenchimento forneceu suporte estrutural para a proliferação de células e reparo ósseo. Esses dados estão em consonância com diversos estudos que utilizaram biomateriais como terapia^{17, 18}. Entretanto, no grupo **CON**, por ausência de um suporte estrutural, houve apenas formação de delgado septo fibroso, com espessura inferior as bordas ósseas (Fig. 2F).

Notou-se que no grupo **HQB** as micropartículas desencadearam discreta resposta inflamatória crônica granulomatosa (Fig. 2G), e em **HQM** houve intensa reação inflamatória aguda, com predomínio de plasmócitos, macrófagos e acentuada presença de células polimorfonucleares e algumas mononucleares, com formação de exsudato fibrinoleucocitário circuncidando as partículas (Fig. 2E).

Em ambos os grupos foi possível observar a presença de células gigantes multinucleadas degradando as partículas (Fig. 2H). A presença destas células se dá devido a uma reação natural do tipo corpo estranho, em que há tentativa de “destruição” dos biomateriais, sendo uma etapa muito importante para a biodegradação¹⁹.

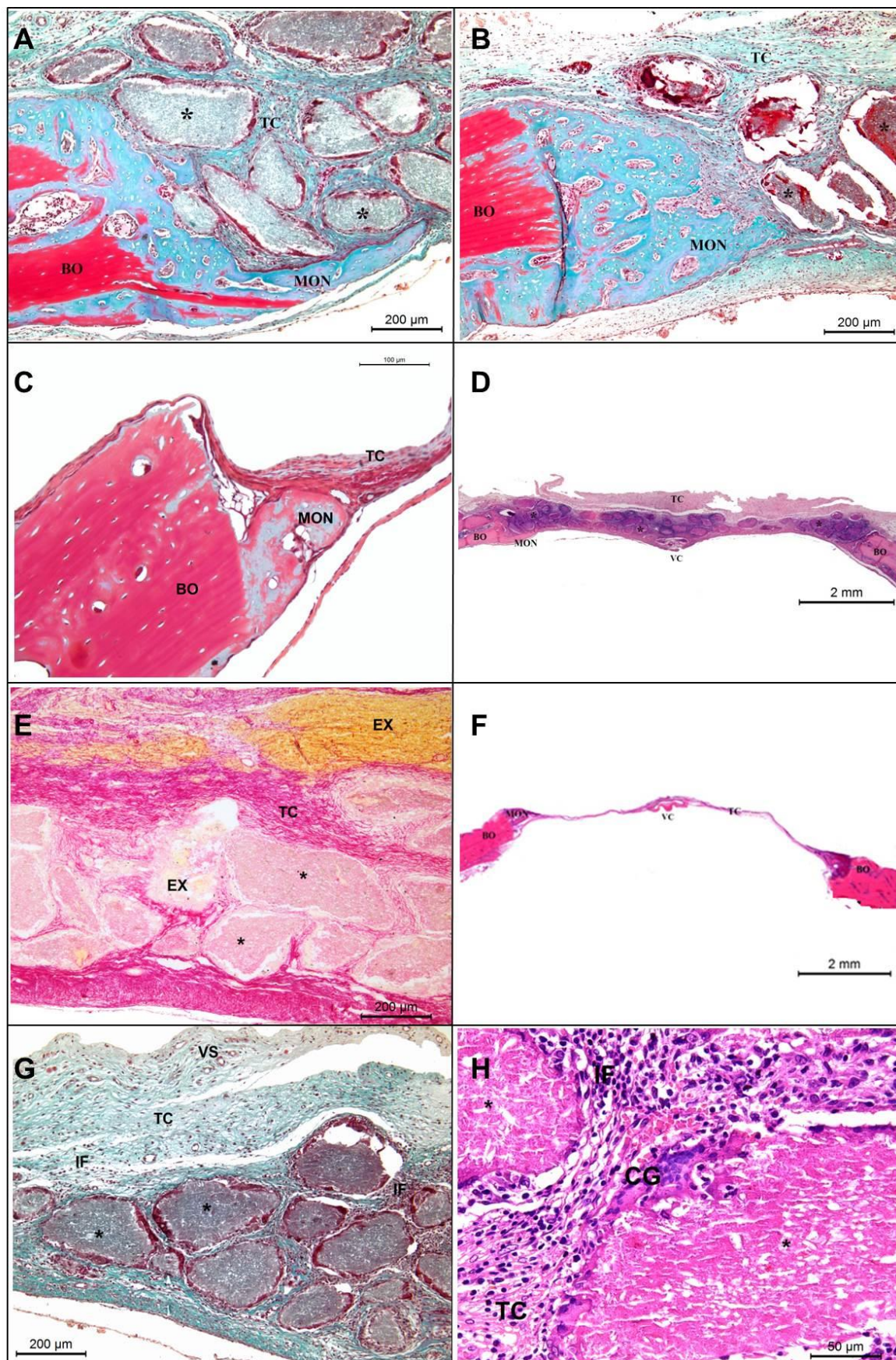


Figura 2. Fotomicrografias da região do defeito aos 15 dias. Pode ser observado a deposição de matriz osteoide (MON) nas regiões de bordas ósseas (BO) (A-C). O preenchimento da extensão se deu pela

organização tridimensional das partículas dos biomateriais (*) e por deposição de tecido conjuntivo (TC) rico em vasos sanguíneos (VS) (**D-G**), principalmente próximo a veia central (VC). Nota-se evidente infiltrado inflamatório (IF) em resposta a implantação dos biomateriais (**G e H**), com presença de células gigantes multinucleadas (CG) (**H**) e áreas purulentas com exsudato fibrinoleucocitário (EX) permeio as partículas do biomaterial (**E**). *Legenda: (A) HQB em TGM; 200 µm. (B) HQM em TMG; 200 µm. (C) CON em TMG; 200 µm. (D) HQB em HE; 2 mm. (E) HQM em PIFG; 200 µm. (F) CON em HE; 2 mm. (G) HQB em TMG; 200 µm. (H) HQM em HE; 50 µm.*

No grupo CON ocorreu apenas discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Uma reação inflamatória é esperada por estar relacionada ao dano do próprio tecido por metaloproteinasas da matriz, favorecendo uma angiogênese acentuada e posterior regeneração²⁰. Porém, a intensidade, duração do processo inflamatório e a rapidez de sua resolução são fatores que caracterizam a biocompatibilidade de um material²¹.

Já aos 45 dias a neoformação óssea estendeu-se por condução entre as partículas dos biomateriais, em direção centrípeta, das bordas para a região central do defeito. Tornou-se mais evidente em HQB, que regenerou aproximadamente 1/3 da extensão do defeito (EL= 34%) (Fig. 3A). Este resultado pode ter sido devido a um reparo mais eficiente, com a regressão do processo inflamatório. Já em HQM, a área de neoformação ocupou aproximadamente 20% da EL (Fig. 3B), e no grupo CON não houve sinais de proliferação (EL= 11%) (Fig. 3C). Essas áreas de neoformação estavam em regiões próximas às bordas ósseas do defeito e à dura-máter, que são fontes primárias de células osteogênicas e fatores osteoindutivos²². Este resultado é compatível com estudos que mostram a capacidade osteocondutora dos compostos à base de fosfatos de cálcio^{17, 19}.

As partículas dos biomateriais encontravam-se mais fragmentadas e com tamanhos diminutos em relação ao ponto biológico de 15 dias, principalmente no grupo que continha quitosana de baixa massa molecular (HQB) (FIG. 3D). Essa fragmentação é importante para a neoformação tecidual, e isso é, em grande parte, estimulado pela matriz polimérica da quitosana, que apresenta uma degradação mais rápida que o constituinte mineral, uma vez que em condições ácidas, como o local inflamatório, ocorre a dissolução do polímero.

De acordo com Li²³, quanto maior a massa molecular e o grau de desacetilação da quitosana, menor é a taxa de degradação, destarte parece haver uma relação inversa entre estes dois fatores. Todavia, Hsu²⁴ relatou que a quitosana com massa molecular mais alta demonstrou maior biodegradação *in vitro*. Já no estudo de Spin Neto²⁰, não foram notadas diferenças entre os grupos, tendo em vista que ambos os materiais foram totalmente degradados aos 15 dias.

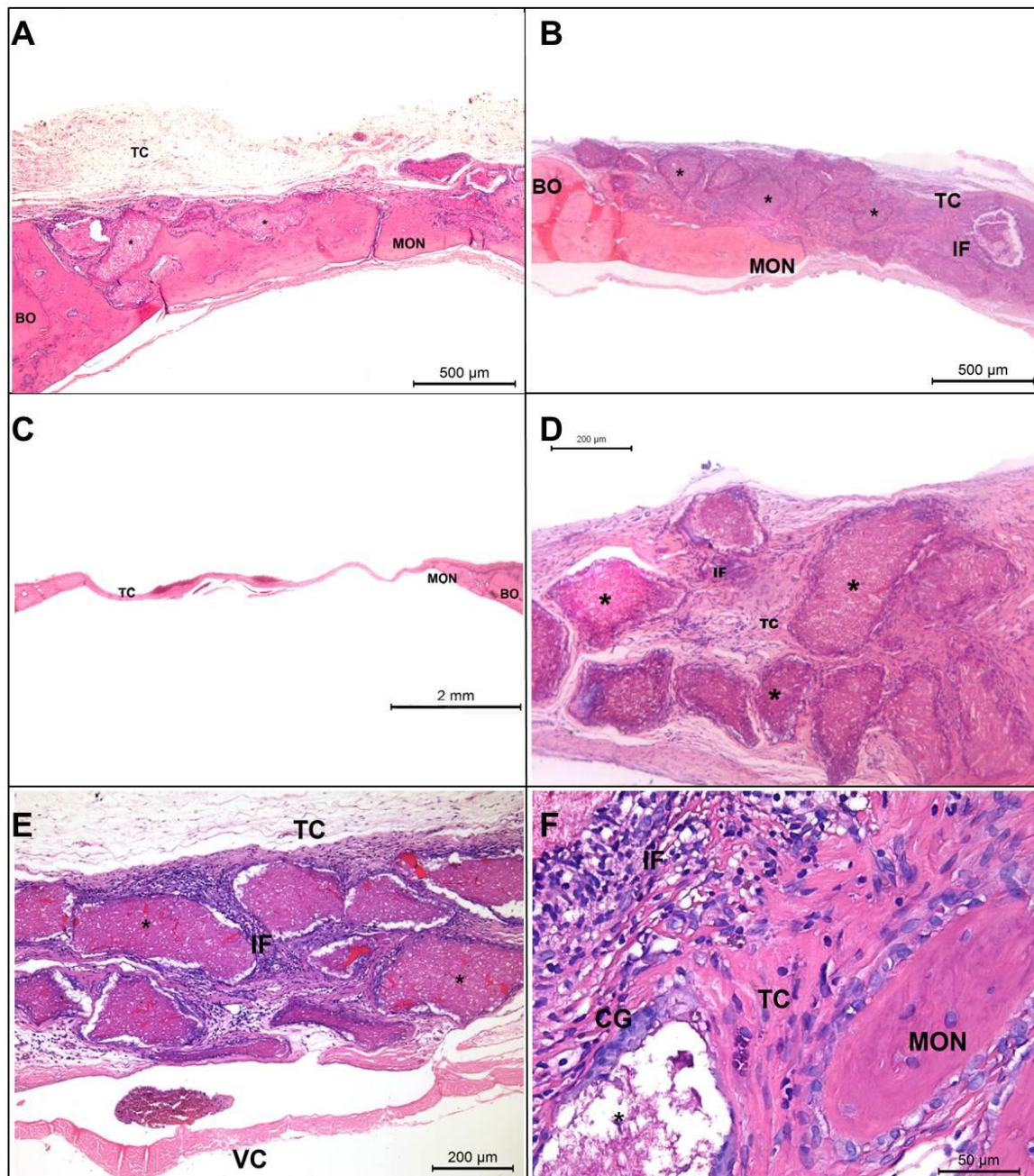


Figura 3. Fotomicrografias da região do defeito aos 45 dias. Evidencia-se a neoformação óssea (MON) por condução entre as partículas do biomaterial (*), das bordas ósseas (BO) para a região da veia central (VC) do defeito (A e B), exceto em C, onde a neoformação permaneceu restrita às bordas. Nota-se o preenchimento do espaço por tecido conjuntivo fibroso (TC) (A-F), formando septos permeio as partículas, com presença de difuso infiltrado inflamatório mononuclear (IF) (B, D-F) e rico em células gigantes multinucleadas (CG) degradando o biomaterial (F). *Legenda:* (A) HQB; 500 μ m. (B) HQM; 500 μ m. (C) CON; 2 mm. (D) HQB; 200 μ m. (E) HQM; 200 μ m. (F) HQM; 50 μ m.

A degradabilidade desempenha papel crucial no comportamento a longo prazo, por afetar muitos processos celulares, o que inclui crescimento celular, regeneração de tecidos e resposta do hospedeiro. O ideal é que, após a implantação, haja um equilíbrio entre a degradação do biomaterial e a regeneração tecidual. De forma geral, as análises diferem

muito quanto à origem do polímero, o tipo de modelo animal utilizado, e quanto às características físico-químicas dos biomateriais, o que dificulta a discussão dos resultados.

Nos grupos experimentais na região de preenchimento do defeito, o estroma evoluiu para um tecido de granulação, principalmente nas regiões periféricas e próximas à dura máter, com muita fibrose, abundante deposição de colágeno e boa vascularização. Em geral, a resposta inflamatória aparecia diminuída, principalmente em HQB (Fig. 3D). Entretanto, ainda foi possível observar em HQM persistência inflamatória e 50% dos animais possuíam áreas edemaciadas em torno das partículas (Fig. 3E). Ambos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear rico em células gigantes multinucleadas e macrófagos espumosos, principalmente em torno das partículas (Fig. 3F).

Essa resposta no grupo HQB pode ser devido ao fato de que os oligômeros da quitosana de baixa massa molecular libertam N-acetilglucosaminidase, que a hidrolisam em unidades necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular²⁵. Já Tavaría²⁶ aponta que uma maior massa molecular da quitosana aumenta a produção de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulante de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico (NO) e interleucina-6 (IL-6) em macrófagos, contribui para a ação anti-inflamatória e antitumoral e para a atividade imunomoduladora.

A própria estrutura química da quitosana, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador²⁰. Entretanto, características como grau de acetilação, massa molecular e concentração da quitosana raramente são reportadas, e poucos estudos investigam a influência dessas características em sua biocompatibilidade, principalmente *in vivo*. Essas controvérsias dificultam a discussão sobre a massa molecular ideal para os processos reparativos.

No grupo CON, o tecido conjuntivo tornou-se mais delgado (Fig. 3C), sem evidências de neoangiogênese, e o processo inflamatório se tornou inconspícuo com presença de poucas células inflamatórias. O que ratifica a necessidade da utilização de substitutos ósseos que atendam a demanda estrutural e funcional requerida pela região lesionada. Esses achados estão em consonância com outros estudos que utilizaram o modelo de defeito crítico em calvária de rato^{15, 17, 20}.

Entre as características dos biomateriais testados, podemos concluir que o compósito com quitosana de baixa massa molecular foi mais bem tolerado pelo organismo, e que a concentração da hidroxiapatita favoreceu a neoformação óssea e osteocondução.

Contudo, ambas as amostras foram consideradas biocompatíveis, tendo em vista que a reação inflamatória regrediu e não houve expulsão do biomaterial, mas sim formação de tecido de granulação, profuso em colágeno e bem vascularizado, decorrente da cicatrização de segunda intenção.

No entanto, se o compósito de hidroxiapatita com quitosana deve ser considerado como um biomaterial promissor, é importante estudar como ele interage com os vários componentes celulares do tecido vascularizado, especialmente com os macrófagos, um dos mais importantes tipos celulares imunocompetentes presentes em tecidos dos mamíferos²⁷. Por fim, os achados do presente estudo são essenciais para o entendimento dos processos que acontecem durante o reparo ósseo após implantação de biomateriais compósitos. São igualmente essenciais para avaliar previamente a sua biocompatibilidade e o seu potencial osteogênico.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais testadas, os biomateriais foram biocompatíveis, atuaram como arcabouços tridimensionais para o reparo ósseo e foram osteocondutores. A cadeia polimérica da quitosana foi um fator preponderante para a resposta biológica, sendo o compósito com 80% de hidroxiapatita e 20% de quitosana de baixa massa molecular mais favorável à utilização como substituto ósseo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil pelo financiamento do projeto CAPES MES-CUBA (nº 132/2011), ao Centro de Biomateriales (BIOMAT) da Universidad de La Havana/Cuba e a Universidade de São Paulo (USP) pela colaboração, e ao Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana pela disposição do espaço para realização dos procedimentos.

 *Conclusões*

4 CONCLUSÕES GERAIS

- As adaptações realizadas no método biomimético foram eficazes para a incorporação da hidroxiapatita nanoestruturada na matriz polimérica da quitosana;
- As técnicas utilizadas foram eficazes para a produção dos compósitos, micropartículas por centrifugação e nanopartículas por *spray drying*, com tamanhos de partículas menores ao reportado na literatura;
- As quitosanas e os compósitos produzidos apresentaram características físico-químicas potenciais para a utilização como substitutos ósseos;
- *In vitro*, os compósitos que continham quitosana de baixa massa molecular (L-CHI20/HA80 E L-CHI50/HA50) não foram citotóxicos, e os com média massa molecular (M-CHI20/HA80 E M-CHI50/HA50) apresentaram baixa citotoxicidade, sendo promissores para aplicações biomédicas.
- *In vivo*, os biomateriais testados foram biocompatíveis;
- As micropartículas atuaram como arcações tridimensionais para o reparo ósseo, sendo também osteocondutoras;
- A cadeia polimérica da quitosana foi um fator preponderante para a resposta biológica, sendo o compósito com 80% de hidroxiapatita e 20% de quitosana de baixa massa molecular mais favorável à utilização como substituto ósseo.

Referências

5 REFERÊNCIAS

5.1 Referências do textual geral

1. Fráguas RM, Rocha DA, Queiroz ER, Abreu CMP, Sousa RV, Oliveira Júnior EN. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. *Polímeros* 2015; 25: 205–211.
2. Wang T, Hu Q, Zhou M, Xue J, Luo Y. Preparation of ultra-fine powders from polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by innovative nano spray drying technology. *Res Chem Intermed* 2016; 511: 2165–2175.
3. Peniche C, Fernández M, Rodríguez G, Parra J, Jimenez J, Bravo AL et al. Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 1719–1726.
4. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solís Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomater* 2010; 6: 466–476.
5. Solis Y, Carrodegua RG, Davidenko N, Peniche C. Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana. *Rev CENIC Ciencias Químicas* 2008; 39: 17–22.

5.2 Referências do artigo I

1. Gutierrez M, Ascensão Lopes M, Sooraj Hussain N, Trigo Cabral A, Almeida L, Domingos Santos J. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. *Arq Med* 2005; 19: 153–162.
2. Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Chem* 2004; 32: 1–31.
3. Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim Nova* 2000; 23: 518–522.
4. Fisher J, Reddi A. Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds. In: Ashammakhi N, Ferretti P. *Topics Tissue Engineering*. 1. ed. Helsinki: University of Oulu; 2003. P. 1-29.
5. Kim MS, Jung UW, Kim S, Lee JS, Lee IS, Choi SH. Bone apposition on implants coated with calcium phosphate by ion beam assisted deposition in oversized drilled sockets: A histologic and histometric analysis in dogs. *J Periodontal Implant Sci* 2013; 43: 18–23.

6. Peniche C, Solís Y, Davidenko N, García R. Chitosan/hydroxyapatite-based composites. *Biotecnol Apl* 2010; 27: 202–210.
7. Mohamed KR, Beherei HH, El-Rashidy ZM. In vitro study of nano-hydroxyapatite /chitosan–gelatin composites for bio-applications. *J Adv Res* 2014; 5: 201–208.
8. Ribeiro JCV, Vieira RS, Melo IM, Araújo VMA, Lima V. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. *Sci. World J* 2017; 2017: 1-25.
9. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solís Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomater* 2010; 6: 466–476.
10. Solís Y, García Carrodegua R, Davidenko N, Peniche C. Preparación y caracterización de composites de hidroxapatita deficiente en calcio y quitosana. *Rev CENIC Ciencias Químicas* 2008; 39: 17–22.
11. Solís Y, Davidenko N, Carrodegua RG, Cruz J, Hernández A, Tomás M et al. Preparation, characterization, and in vitro evaluation of nanostructured chitosan/apatite and chitosan/Si-doped apatite composites. *J Mater Sci* 2013; 48: 841–849.
12. Wang T, Hu Q, Zhou M, Xue J, Luo Y, Ngan LTK et al. Preparation of ultra-fine powders from polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by innovative nano spray drying technology. *Res Chem Intermed* 2016; 511: 2165–2175.
13. Xu HHK, Weir MD, Burguera EF, Fraser AM. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials* 2006; 27: 4279–4287.
14. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. Acta Biomaterialia New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater* 2010; 6: 2863–2873.
15. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res - Part A* 2008; 85: 777–786.
16. Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol* 1993; 15: 281–285.
17. Muzzarelli RAA, Rocchetti R. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry and Roberto Rocchetti. 1985; 5: 461–472.
18. Zhang B, Hou Y, Wang X, Wang Y, Geng L. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg – Zn – Ca biomedical alloys with different compositions. *Mater Sci Eng C* 2011; 31: 1667–1673.
19. Konopka K, Pretzer E, Felgner PL, Düzgüneş N. Human immunodeficiency virus type-

- 1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 312: 186–196.
20. International Organization for Standardization. ISO 10993-12. Geneva, 2012, 20p.
21. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Geneva, 2009, 34p.
22. Signini R, Campana Filho SP. Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros* 1998; 8: 63–68.
23. Rinaudo M, Áres JD, Le Dung P, Thuy Binh P, Dong NT. NMR investigation of chitosan derivatives formed by the reaction of chitosan with levulinic acid. *Carbohydr Polym* 2001; 46: 339-348.
24. Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer (Guildf)* 2003; 44: 7939–7952.
25. Fráguas RM, Rocha DA, Queiroz ER, Abreu CMP, Sousa RV, Oliveira Júnior EN. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. *Polímeros* 2015; 25: 205–211.
26. Fai AEC, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, Santa-Cruz PDA, Freitas MC, Campos-Takaki GM et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules* 2011; 16: 7143–7154.
27. Santos, JE; Soares, JP; Dockal, ER; Campana Filho, SP; Cavalheiro E. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros Ciência e Tecnol* 2003; 13: 242–249.
28. Forbe T, García M, Gonzalez E. Potencial risks of nanoparticles. *Food Sci Technol* 2011; 31: 835–842.
29. Fowler B. Infrared studies of apatites. I. vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg Chem* 1974; 13: 194–207.
30. Wilson CE, Kruyt MC, Bruijn JD De, Blitterswijk CA Van, Oner FC, Verbout AJ et al. A new in vivo screening model for posterior spinal bone formation : Comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials* 2006; 27: 302–314.
31. Merry JC, Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9: 779-783.
32. Walsh WR, Labrador DP, Kim HD, Guzelsuw N. The effect of in vitro fluoride ion treatment on the ultrasonic properties of cortical bone. *Ann Biomed Eng* 1994; 22: 404–415.
33. Arguelles-Monal, W; Peniche-Covas C. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and carboxymethyl cellulose. *Makromol Chem Rapid Commun* 1988; 9: 693–697.

34. Hidaka Y, Ito M, Mori K, Yagasaki H, Kafrawy AH. Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 418–423.
35. Mecwan MM, Rapalo GE, Mishra SR, Haggard WO, Bumgardner JD. Effect of molecular weight of chitosan degraded by microwave irradiation on lyophilized scaffold for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2011; 97: 66–73.
36. Brun V, Guillaume C, Alami SM, Josse J, Jing J, Draux F et al. Chitosan / hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Bio Med Mater Eng* 2014; 24: 63–74.

5.3 Referências do artigo II

1. Gutierrez M, Ascensão Lopes M, Sooraj Hussain N, Trigo Cabral A, Almeida L, Domingos Santos J. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. *Arq Med* 2005; 19: 153–162.
2. Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2006; 102: 7–13.
3. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982; 196: 100–109.
4. Schmitz, JP, Hollinger JO. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunion. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 205: 299–308.
5. Wilson CE, Kruyt MC, Bruijn JD De, Blitterswijk CA Van, Oner FC, Verbout AJ et al. A new in vivo screening model for posterior spinal bone formation : Comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials* 2006; 27: 302–314.
6. Santos ML, Florentino AO, Saeki MJ, Aparecida AH, Lia Fook MV, Guastaldi AC. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química* 2005; 30: 29–35.
7. Molamma P Prabhakaran, J Venugopal, Casey K Chan RS. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 4532–4539.
8. Peniche C, Solís Y, Davidenko N, García R. Chitosan/hydroxyapatite-based composites. *Biotechnol Apl* 2010; 27: 202–210.
9. Mohamed KR, Beherei HH, El-Rashidy ZM. In vitro study of nano-hydroxyapatite/chitosan–gelatin composites for bio-applications. *J Adv Res* 2014; 5: 201–208.

10. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2347-2359.
11. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res - Part A* 2008; 85: 777–786.
12. ALMEIDA, RS Compósitos de quitosana e hidroxiapatita nanoestruturada como biomateriais para o reparo de defeito ósseo crítico. 2018. 61f. Tese de Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
13. Solís Y, García Carrodegua R, Davidenko N, Peniche C. Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana. *Rev CENIC Ciencias Químicas* 2008; 39: 17–22.
14. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solís Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomater* 2010; 6: 466–476.
15. Miguel FB, Barbosa Júnior AA, Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 2567–2575.
16. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2015; 23: S53–S82.
17. Almeida RS, Ribeiro ÍA, Silva MHP, Rocha DN, Miguel FB, Rosa FP. Evaluation of bone repair after implantation of biomaterials based on calcium phosphate. *Rev Ciências Médicas e Biológicas* 2014; 13: 331–36.
18. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008; 29: 944–953.
19. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10: 96–101.
20. Spin-Neto R, Pavone C, Moreno De Freitas R, Adriana R, Marcantonio C, Marcantonio-Júnior E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Rev Odontol da UNESP* 2008; 37: 155–161.
21. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008; 20: 86–100.
22. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Phil G, Losee JE, Huard J. Testing the ‘critical-size’ in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect (CSD). *Plast Reconstr Surg* 2011; 125: 1685–1692.
23. Li J, Du Y, Liang H. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. *Polym Degrad Stab* 2007; 92: 515–524.

24. Hsu SH, Whu SW, Tsai CL, Wu YH, Chen HW, Hsieh KH. Chitosan as scaffold materials: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. *J Polym Res* 2004; 11: 141–147.
25. Mecwan MM, Rapalo GE, Mishra SR, Haggard WO, Bumgardner JD. Effect of molecular weight of chitosan degraded by microwave irradiation on lyophilized scaffold for bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2011; 97: 66–73.
25. Tavarria FK, Costa EM, Pina-Vaz I, Carvalho MF, Pintado MM. A quitosana como biomaterial odontológico: Estado da arte. *Rev Bras Eng Biomed* 2013; 29: 110–120.
26. Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosic L, Calabró D et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994; 15: 1215–1220.

 *Anexos*

ANEXO I– Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **064/2014**, intitulado **“Nanobiomateriais para bioengenharia tecidual óssea”**, sob a responsabilidade do Professora Doutora Fabiana Paim Rosa, lotada no setor de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.


 Prof^a Dra. Tania Tavares Rodriguez
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Profa. Tânia Tavares Rodrigues
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

CEUA-ICS

Av. Reitor Miguel Calmon S/N . Instituto de Ciências da Saúde . Vale da Canela CEP 40110-100 – Salvador – Bahia – Brasil .
 Telefone: 55-(71) 3283-8958 ou (71) 3245-0917 . E-mail: ceuaiscs@ufba.br.

Telefone: (71) 3283-8958

Anexo II – Comprovante de submissão do artigo I

Cerâmica

Cerâmica

Produção, caracterização e avaliação *in vitro* de partículas de quitosana/hidroxiapatita para substituição óssea

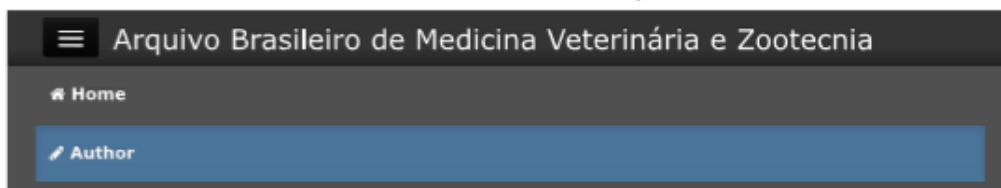
| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | Cerâmica |
| Manuscript ID | CE-2018-0263 |
| Manuscript Type: | Original Article |
| Date Submitted by the Author: | 13-Nov-2018 |
| Complete List of Authors: | Almeida, Renata; Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais Peniche, Carlos; Universidad de la Habana, Centro de Biomateriales Solís, Yaimara; Universidad de la Habana, Centro de Biomateriales Peniche, Hazel; Universidad de la Habana, Centro de Biomateriales Rigo, Eliana Cristina; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Básicas Rosa, Fabiana; Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais |
| Keyword: | Biomateriais, Compósitos, Hidroxiapatita, Quitosana, Nanoestruturas |

SCHOLARONE™
Manuscripts

Anexo III – Comprovante de submissão do artigo II

19/11/2018

ScholarOne Manuscripts



Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

- Home
- Author

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Manuscript ID

ABMVZ-2018-11151

Title

Tissue response after implantation of nanostructured hydroxyapatite and chitosan particles for the repair of critical bone defect

Authors

Almeida, Renata

Peniche, Carlos

Rigo, Eliana

Daltro, Ana Flávia

Ribeiro, Iorrana

López, Guillermo

Barbosa Júnior, Aryon

Rosa, Fabiana

Date Submitted

19-Nov-2018

[Author Dashboard](#)



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil.

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>