

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Márcia de Araújo Rebelo

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLD* COM POTENCIAL
PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

Sorocaba/SP

2015

Márcia de Araújo Rebelo

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLD* COM POTENCIAL
PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP

2015

Ficha Catalográfica

Rebelo, Márcia de Araújo
R234d Desenvolvimento e caracterização de scaffold com potencial
para aplicação na regeneração de tecido ósseo / Márcia de Araújo
Rebelo. – 2015.

104 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2015.

1. Materiais biomédicos. 2. Materiais biocompatíveis. 3.
Engenharia tecidual. I. Lima, Renata, orient. II. Chaud, Marco
Vinícius, co-orient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Márcia de Araújo Rebelo

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLD COM POTENCIAL
PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 23/02/2015

Banca examinadora:



Profa. Dra. Renata de Lima

Universidade de Sorocaba



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Universidade de Campinas



Profa. Dra. Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva

Universidade Federal de São Carlos

*Dedico este trabalho à minha família por serem
a base de tudo que sou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por manter a minha fé e ser meu grande companheiro em todos os momentos.

Aos meus pais Acácio e Iraci pelo grande exemplo de caráter, por me ensinarem que devemos manter os nossos princípios, não forjados em religião, mas em exemplos diários de amor e respeito a todos os seres vivos. Agradeço a vocês, meu pais amados, pelo ensinamento de que devemos construir a nossa própria história, conquistando os nossos ideais com humildade e dedicação.

Ao meu marido Roberto pelo amor incondicional e por sempre me apoiar nas minhas escolhas de vida.

À minha filha Marília por compreender que a busca pelo conhecimento exigia, muitas vezes, a minha ausência. Agradeço a você minha filha, que mesmo sem perceber, foi a grande incentivadora para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos irmãos Cristina e Luis Carlos, que mesmo indiretamente, sempre me incentivaram e apoiaram.

A minha orientadora Profa. Dra. Renata Lima, por me aceitar tão prontamente e por toda ajuda durante a elaboração desta Dissertação.

Ao meu orientador, paraninfo e Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud por permitir o meu ingresso nesse mundo tão apaixonante da pesquisa científica. Agradeço pelo apoio, por compartilhar comigo o vasto conhecimento e sabedoria que tem. Obrigada por acreditar que eu sempre podia mais do que pensava. Como sempre digo, foi um grande privilégio fazer parte da sua equipe.

Ao Prof. Dr. José de Oliveira Martins, pelos momentos de dedicação ao realizar as análises microtomográficas e de fluorescência de Raios-X. Obrigada pela paciência em explicar sobre os aspectos técnicos das análises, aumentando desta forma, o meu entendimento sobre as avaliações. Obrigada pela grande contribuição na qualidade desta Dissertação.

Aos meus professores da graduação, em especial, à Profa. Dra. Yoko Franco Oshima, por ser ter despertado em mim a vontade de fazer iniciação científica.

Ao meu orientador de iniciação científica Prof. Dr. Marcos Reigota, por me mostrar que o conhecimento pode ser adquirido de forma suave e tranquila.

Obrigada por me desacelerar diversas vezes e por acreditar no meu potencial como pesquisadora.

À equipe do Laboratório de Saúde da Uniso Valéria Orsi, Rosenéia Tagliafero, Evandro Campos, José Anduca, Gustavo Alexandre e Marcia das Mercedes por sempre estarem prontos para ajudar, mesmo nos momentos em que estavam cheios de trabalho. Obrigado por me mostrar que sempre podemos contar com os amigos.

A minha amiga e grande companheira de laboratório Thais Francine Ribeiro Alves, exemplo de dedicação e competência. Obrigada por todos os momentos que estive ao meu lado no desenvolvimento deste projeto. Obrigada por compartilhar as alegrias quando um experimento dava certo e naqueles momentos em que eu achava que nem deveria ter saído da cama.

A Tatiane Pasquôto pela ajuda nos experimentos biológicos e por ser um exemplo na paixão pela biologia.

À Uniso por ter me acolhido durante a graduação e por possibilitar a realização do mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Sorocaba pela análises biológicas.

Ao Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da Universidade de Sorocaba por disponibilizar o equipamento de microscopia óptica em 2D.

A Capes pelo incentivo financeiro.

A Fapesp pelo apoio financeiro durante a pesquisa.

O valor da conquista está baseado em alcançá-la
pelos seus próprios méritos.

Que haja transformação e que ela comece comigo.

(Autores desconhecidos)

RESUMO

Scaffolds são suportes tridimensionais porosos, temporários, usados para mimetizar a estrutura da matriz extracelular e estimular respostas celulares específicas em nível celular/molecular para regeneração de tecido orgânico. Os biomateriais que compõem os *scaffolds* conferem requisitos físico-químicos e arquitetônicos necessários para a estabilidade física, química e biológica da estrutura, resultando em uma estrutura com porosidade, resistência mecânica adequada e biocompatibilidade. O objetivo desse estudo foi desenvolver e avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas (*in vitro*) dos *scaffolds*. Os *scaffolds* foram obtidos por liofilização das dispersões poliméricas aquosas de quitosana (Ch2), quitosana/alginate de sódio sem tratamento (ChNaAlg4), tratados com CaCl₂ (Ch/NaAlg4B) e quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita (Ch/NaAlg4/Hap). Os *scaffolds* contendo hidroxiapatita foram preparados nas proporções 1:1:0,2, 1:1:0,4 e 1:1:0,6. A quitosana utilizada neste estudo apresentou grau de desacetilação de 81%. Todas as dispersões poliméricas apresentaram comportamento não-Newtoniano (pseudoplástico) e propriedade tixotrópica. A porosidade, interconectividade e tamanho dos poros variou em função da composição dos *scaffolds*, ficou respectivamente entre 88-98%, 23,671-35,554 mm³ e 25-1425 μm. O *scaffold* Ch/NaAlg4B apresentou maior resistência a tração (4,47±0,9 kg/seg⁻¹), flexibilidade (2,11±0,25 kg/seg⁻¹) e elasticidade (1,78±0,01 kg/seg⁻¹). O *scaffold* Ch2 apresentou maior resistência a perfuração (1,45±0,30 kg/seg⁻¹). O perfil de intumescimento dos *scaffolds* variou em função do pH e da quantidade de eletrólitos contidos no fluido. A maior capacidade de intumescimento dos *scaffolds* em água, HCl (pH 4,4) e FSS (pH 6,80) foi, respectivamente, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e Ch2. Em meio alcalino (pH 9,8) a capacidade de intumescimento dos *scaffolds* não apresentou diferença estatística (p>0,05). O teor de umidade após a liofilização dos *scaffolds* variou entre 8-11%. Os resultados da DSC indicam a formação de um novo composto para os *scaffolds* contendo Hap. Os espectros FTIR apresentaram ausência do grupamento amino (1175 cm⁻¹) nos *scaffolds* Ch/NaAlg4 e contendo Hap o que sugere a formação de um complexo Ch-NaAlg. Os ensaios de MTT, após 96 h, apresentaram proliferação celular entre 105-110% e células sem alterações morfológicas. O teste de bioatividade *in vitro* apresentou espessamento das paredes do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e redução da porosidade e interconectividade dos poros. Os *scaffolds* obtidos por liofilização das dispersões poliméricas de Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B e contendo Hap (Ch/NaAlg4/Hap), apresentaram estrutura com elevado grau de porosidade e interconectividade entre os poros. As propriedades mecânicas mostraram, simultaneamente, resistência à tração, perfuração, flexibilidade e elasticidade. O *scaffolds* testados induziram a proliferação celular e as células permaneceram sem alterações morfológicas. A análise dos resultados indicam que estes *scaffolds* podem ser uma alternativa promissora para a regeneração do tecido ósseo.

Palavras chave: Scaffold – Biomaterial – Regeneração óssea – Quitosana – Alginate de sódio – Hidroxiapatita

ABSTRACT

Scaffolds are porous three-dimensional support, temporary, used to mimic the structure of the extracellular matrix and stimulating specific cellular responses at the cellular level / molecular organic tissue for regeneration. The biomaterials that make up the scaffolds provide physical, chemical and architectural requirements for physical stability, chemical and biological structure, resulting in a structure with porosity, adequate mechanical strength and biocompatibility. The aim of this study was to develop and evaluate the physicochemical and biological properties (in vitro) of scaffolds. The scaffolds were obtained by lyophilization of the aqueous polymer dispersions of chitosan (Ch₂) chitosan/sodium alginate without treatment (ChNaAlg₄), treated with CaCl₂ (Ch/NaAlg₄B) and chitosan/sodium alginate/hydroxyapatite (Ch/NaAlg₄/HAP). The scaffolds containing hydroxyapatite were prepared in the proportions 1:1:0.2, 1:1:0.4 and 1:1:0.6. The chitosan used in this study had deacetylation degree of 81%. All polymer dispersions showed non-Newtonian behavior (pseudoplastic) and thixotropic property. The porosity, interconnectivity and pore size varied depending on the composition of scaffolds, respectively was between 88-98%, from 23.671 to 35.554 mm³ and 25-1425 microns. The scaffold Ch/NaAlg₄B showed higher tensile strength (4.47±0.9 kg/sec⁻¹), flexibility (2.11±0.25 kg/sec⁻¹) and elasticity (1.78 ± 0.01 kg/sec⁻¹). The scaffold Ch₂ showed higher puncture resistance (1.45±0.30 kg/sec⁻¹). The swelling profile of scaffolds varied depending on the pH and the amount of electrolyte contained in the fluid. The higher the swelling capacity of the water scaffolds HCl (pH 4.4) and FSS (pH 6.80) were respectively Ch/NaAlg₄B, Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0.4), Ch/NaAlg₄/ Hap (1:1:0.6) and Ch₂. In an alkaline medium (pH 9.8) the swelling capacity of scaffolds showed no statistical difference (p>0.05). The moisture content after lyophilization of scaffolds ranged from 8-11%. The DSC results indicate the formation of a new composite scaffolds for containing Hap. The FTIR spectrum showed the absence of the amino group (1175 cm⁻¹) in scaffolds Ch/NaAlg₄ and containing Hap which suggests the formation of a complex NaAlg-Ch. The MTT assay after 96 h showed 105-110% between cell proliferation and cell morphology without changes. The bioactivity test in vitro showed wall thickening scaffold Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0.6) and reduced porosity and pore interconnectivity. The scaffolds obtained by lyophilization of the polymer dispersions of Ch₂, Ch/NaAlg₄, Ch/NaAlg₄B and containing Hap (Ch/NaAlg₄/Hap) presented structure with high porosity and interconnectivity between the pores. The mechanical properties showed the same time, tensile strength, perforation, flexibility and elasticity. The scaffolds tested induced cell proliferation, and cells were no morphological changes. The results indicate that these scaffolds may be a promising alternative for the regeneration of bone tissue.

Keywords: Scaffold - Biomaterial - Bone regeneration - Chitosan - Sodium Alginate - Hydroxyapatite

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do <i>scaffold</i> e das etapas de regeneração do tecido ósseo	23
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química unitária do alginato	30
Figura 3 – Representação esquemática da ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons Ca^{2+} situados entre os grupos com carga negativa	31
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura molecular da quitina (4a) e quitosana (4b)	33
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química da hidroxiapatita ($Ca_5(OH)(PO_4)_3$)	35
Figura 6 - Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem na superfície da hidroxiapatita após a implantação do <i>scaffold</i> : (1) solubilização da Hap na superfície da estrutura; (2) precipitação da solução de Hap; (3) equilíbrio entre os fluidos corpóreos e a superfície da estrutura; (4) precipitação da solução de Hap; (5) adesão celular; (6) proliferação celular; (7) início da formação de novo osso; (8) Osso recém formado.	36
Figura 7 - Processo de remodelação óssea	39
Figura 8 - Ilustração do início do processo de regeneração óssea após implantação do <i>scaffold</i>	41
Figura 9 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização das matérias-primas, desenvolvimento e avaliação dos <i>scaffolds</i>	43
Figura 10 - Composição mássica das formulações de quitosana (Ch), alginato de sódio (NaAlg) e quitosana/alginato e sódio (Ch/NaAlg)	44
Figura 11 - Representação esquemática das etapas para preparação das dispersões de Ch, NaAlg, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	46
Figura 12 - Representação esquemática da obtenção e tratamento dos <i>scaffolds</i> ...	47
Figura 13 - Sistema baseado no Dispositivo de Enslin-Neff	52
Figura 14 - Imagem fotográfica dos <i>scaffolds</i> Ch2 (a), Ch/NaAlg4 (b) e Ch/NaAlg4B (c)	57
Figura 15 – Imagem fotográfica do <i>scaffold</i> Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) em diferentes formas	58
Figura 16 - Curva potenciométrica da quitosana (média massa molar) ($n=3$)	59

Figura 17 - Medida da viscosidade (cP) em função da velocidade de rotação (rpm) das formulações Ch2 (a), NaAlg1 (b) Ch/NaAlg4 (c), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (d), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (e) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (f) ($n=3$).....61

Figura 18 - Determinação do comportamento viscoelástico (tensão de cisalhamento (D/cm^2) em função da taxa de cisalhamento (1/sec)) das formulações Ch2 (a), Ch/NaAlg4 (b), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (c), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (d) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (e) ($n=3$)63

Figura 19 - Imagens dos *scaffolds* Ch2 (I), NaAlg4 (II), NaAlg4B (III), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI). Imagens fotomicrográficas-2D da superfície dos *scaffolds* (a), Imagens μ CT-3D: *scaffold* (b), corte transversal (c) e corte longitudinal (d)66

Figura 20 – Incorporação da Hap à matriz polimérica (Ch/NaAlg) do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) Imagens μ CT-3D (a) e fotomicrografia-2D (b).....67

Figura 21 - Relação entre a frequência (%) e o raio (μm) dos poros (a) e imagens escaneadas μ CT (b) dos *scaffolds* Ch2 (I), Ch/NaAlg4 (II), Ch/NaAlg4B (III), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI). Continua.....69

Figura 22 - Ensaio de propriedades mecânicas de tração, perfuração, flexibilidade e elasticidade dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$).....72

Figura 23 - Quantificação de íons de Ca^{2+} nos *scaffolds* Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6).75

Figura 24 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ C \pm 1$) em Água ($n=3$).....76

Figura 25 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ C \pm 1$) em HCl 0,01M (pH 4,4) ($n=3$).....77

Figura 26 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ C \pm 1$) em NaOH 0,01M (pH 9,8) ($n=3$).....78

Figura 27 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/ NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ C \pm 1$) em FSS (pH 6,9) ($n=3$).....79

Figura 28 - Capacidade de intumescimento (volume de meio absorvido ($\mu L/mg$) em função da água, HCl 0,01M, NaOH 0,01M e FSS dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap

(1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$).....80

Figura 29 - Teor de umidade residual dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) após liofilização. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$).....82

Figura 30 - DSC das matérias primas Ch (média massa molar), NaAlg (baixa viscosidade) (a), dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B (b), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (c).....83

Figura 31 - Espectros FTIR da Ch (a), NaAlg (b), Hap (c), dos *scaffolds* Ch2 (d), Ch/NaAlg4 (e), Ch/NaAlg4B (f), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (g), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (h) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (i)85

Figura 32 - Viabilidade celular utilizando o teste MTT para os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e controle no período de 24 h e 96 h. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=6$)87

Figura 33 - Imagens fotográficas das células após contato com os *scaffolds* Ch/NaAlg4B e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e do controle no período de 24 horas (a) e 96 horas (b).....87

Figura 34 - Bioatividade *in vitro* - Imagem μCT -3D, aumento da densidade das paredes poliméricas em corte transversal (a), porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^{-3}), poros abertos (%), volume total de poros (mm^{-3}) (b) e polidispersidade dos poros (c) do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre porosidade, diâmetro dos poros e regeneração óssea	27
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para determinação da viscosidade e avaliação do comportamento viscoelástico das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6).....	48
Tabela 3 - Parâmetros utilizados para avaliação das propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i>	50
Tabela 4 - Resultado da avaliação física dos <i>scaffolds</i> ($n=3$)	56
Tabela 5 - Características dimensionais, de massa e volume (cm^3) dos <i>scaffolds</i> Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=7$)	57
Tabela 6 - Viscosidade (cP) das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=3$)	60
Tabela 7 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^{-3}), poros abertos (%) e volume total de poros (mm^{-3}) dos <i>scaffolds</i> Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	64
Tabela 8 - Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=3$)	71

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AL: Alginato

Al: Alumínio

Arg: Arginina

Asp: Aspartato

bmm: Baixa massa molecular

bv : Baixa viscosidade

Ca²⁺: Íon cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

Ca-P: Fosfato de cálcio

Ch: Quitosana

COO⁻: Grupamento carboxílico

DA: Desacetilação

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSC: Calorimetria diferencial exploratória

EtOH: Etanol

FSS: Fluído salivar simulado

G: Gulurônicos

GlcN: 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose

GlcNAc: 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose

Gli: Glicina

Grau de desacetilação: %GDA

H⁺: íons de hidrogênio

H₂O: Água

Hap: Hidroxiapatita

HCl: Ácido clorídrico

HPO₄²⁻ = Hidrogenofosfato

KBr: Brometo de potássio

M: Manurônicos

M: Molar

MEC: Matriz extracelular

Mg²⁺: Íon magnésio
MM: Massa molecular
MO Medula óssea
mmm: Média massa molecular
MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na⁺: Íon sódio
NaAlg: Alginato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
NH₂: Grupamento amino
NH₃⁺: Grupamento amino protonado
OH: Hidroxila
P: Fósforo
PCL: Policarpolactona
PGA: Poli-ácido-glicólico
pH: Potencial hidrogeniônico
pKa: Constante de equilíbrio
PLA: Poli-ácido-láctico
PLGA: Poli-láctico-co-glicólico
PLLA: Poli-ácidoL-Láctico
RMN: Ressonância magnética nuclear
RNA: Ácido ribonucleico
SBF: Fluído corporal simulado
Si: Silício
β -TCP: Beta – trifosfato de cálcio
TCP: Fosfato tricálcio
μCT: Microtomografia computadorizada

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

°C: Grau Celsius
μ: Micro
μL: Microlitro
μm: Micrômetro
2D: Duas dimensões

3D: Três dimensões
cm²: Centímetro quadrado
cm³: Centímetro cúbico
cP: Centipoise
eV: Eletron volts
g: Grama
h: Hora
kV: Quilo volts
mA: Miliampere
mg: Miligrama
min: Minuto
mL: Mililitro
mm/s: Milímetro por segundo
mm³: Milímetro cúbico
nm: Nanômetro
°: Grau
rpm: Rotações por minuto
v/m: Volume/massa
v/v: Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

‰: Porcentagem
®: Marca registrada
™: Trademark
<: Menor que
>: Maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Propriedades necessárias dos biomateriais	23
2.1.1	Biocompatibilidade	23
2.1.2	Biodegradação	24
2.1.3	Propriedades mecânicas	25
2.2	Características físicas dos <i>scaffolds</i>	25
2.2.1	Porosidade e interconectividade entre os poros	26
2.2.2	Diâmetro dos poros	26
2.3	Biomateriais utilizados na fabricação de <i>scaffolds</i>	27
2.3.1	Polímeros	28
2.3.2	Cerâmicas	34
2.4	Aplicações biomédicas dos <i>scaffolds</i>	36
2.4.1	Tecido ósseo	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	Delineamento Experimental	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1	Material	44
5.2	Métodos	44
5.2.1	Preparação dos <i>scaffolds</i> de quitosana, alginato de sódio e quitosana/alginato de sódio	44
5.2.2	Preparação dos <i>scaffolds</i> de quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita (Ch/NaAlg4/Hap)	46
5.2.3	Determinação do grau de desacetilação da quitosana (média massa molar)	47
5.2.4	Viscosidade e avaliação do comportamento viscoelástico	48
5.2.5	Caracterização dos <i>scaffolds</i>	49
5.2.6	Porosidade e interconectividade dos poros	49
5.2.7	Superfície dos <i>scaffolds</i>	49
5.2.8	Potencial zeta	49
5.2.9	Propriedades mecânicas	50
5.2.10	Ensaio de tração	50
5.2.11	Ensaio de perfuração, flexibilidade e elasticidade	51
5.2.12	Fluorescência de raios-X	51
5.2.13	Eficiência de intumescimento	51
5.2.14	Teor de umidade residual	52
5.2.15	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	53
5.2.16	Espectroscopia Infravermelho (FTIR)	53
5.2.17	Viabilidade, proliferação celular e morfologia celular	53
5.2.18	Bioatividade <i>in vitro</i>	54
5.2.19	Análise estatística	55

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1	Características macroscópicas de integridade estrutural dos <i>scaffolds</i>	56
6.2	Determinação do grau de desacetilação da quitosana (média massa molar)	58
6.3	Medida da viscosidade e comportamento viscoelástico	59
6.4	Porosidade, interconectividade e tamanho dos poros	63
6.5	Propriedades mecânicas	71
6.6	Determinação do teor de íons de Cálcio	74
6.7	Eficiência de intumescimento dos <i>scaffolds</i>	75
6.8	Avaliação do teor de umidade residual	81
6.9	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	82
6.10	Espectroscopia Infravermelho (FTIR)	83
6.11	Ensaio da viabilidade celular e proliferação celular por MTT	86
6.12	Análise da morfologia celular	87
6.13	Bioatividade <i>in vitro</i>	88
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration: physical characterization studies	103
	APÊNDICE B – Scaffold and Tissue Regenerations: a review	104

1 INTRODUÇÃO

Tecidos orgânicos lesionados ou doentes podem ser reparados ou substituídos por cirurgia reconstrutiva. No entanto, os procedimentos cirúrgicos com esta finalidade enfrentam obstáculos que limitam sua aplicação, tais como escassez de doadores, dispositivos biomédicos pouco eficientes e necessidade do uso de imunossupressores para evitar rejeição do tecido ou órgão implantado.

O desenvolvimento de dispositivos biológicos que substitua ou regenere a função do tecido lesionado é um dos principais desafios da engenharia tecidual. Estas estruturas devem ter a capacidade de imitar as condições fisiológicas do tecido orgânico afetado por trauma, deformidades ou pela ocorrência de osteonecrose, patogênese que ocorre após intervenção cirúrgica nos maxilares em pacientes que fizeram uso de bisfosfanato. Tais ferimentos comprometem a capacidade natural de remodelagem óssea pela perda da vascularização e estabilidade mecânica local.

A fabricação de arcabouços tridimensionais (*scaffolds*) que mimetizam o microambiente celular *in vivo*, e as propriedades estruturais e mecânicas do tecido lesionado, influenciam diretamente a formação e remodelação do novo tecido. O *scaffold*, biologicamente ideal, deve ter formato tridimensional com poros interconectados e resistência mecânica que favoreçam a reparação do tecido orgânico.

O sucesso de um projeto relacionado à obtenção de *scaffold* depende da técnica de fabricação escolhida e do conhecimento anatômico e fisiológico do tecido ou órgão afetado pela doença.

A técnica utilizada na fabricação de *scaffold* está diretamente relacionada ao tamanho e grau de interconectividade dos poros. Os biomateriais que compõem os *scaffolds* conferem requisitos químicos e arquitetônicos necessários para a manutenção da estabilidade física e química do *scaffold*, resultando em uma estrutura com resistência mecânica adequada, biocompatível e biodegradável.

Desta forma, o desafio é projetar e desenvolver sistemas tridimensionais, compostos por materiais biologicamente compatíveis que favoreçam o transporte de nutrientes, que possuam propriedades mecânicas adequadas e que forneça um microambiente que preserve e estimule a proliferação da fenotipagem celular específica.

No presente estudo foi utilizado o alginato de sódio, polieletrólito aniônico, quitosana, polieletrólito catiônico, e hidroxiapatita uma biocerâmica derivada do fosfato de cálcio. Estes biomateriais são capazes de formar compósitos sem alterar as propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade, mas são capazes de aumentar a resistência mecânica devido a forte interação eletrostática entre as cadeias poliméricas e nucleação da biocerâmica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Scaffolds são matrizes ou suportes tridimensionais porosos, temporários, biodegradáveis usados na engenharia de tecidos para mimetizar a estrutura da matriz extracelular (MEC) e estimular respostas celulares específicas em nível molecular. Este modelo de dispositivo biológico fornece condições biofísicas e bioquímicas adequadas, tanto para propagação celular ou molecular de sinalização específica como para permanecer integrado ao tecido hospedeiro, sem risco de rejeição pelo tecido original (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; PARK et al., 2011).

Os requisitos biológicos, químicos e arquitetônicos dos materiais utilizados na fabricação dos *scaffolds* são biocompatibilidade, biodegradação, resistência mecânica adequada, estrutura tridimensional, poros interconectados de maneira uniforme e capacidade para moldar em formas ou dimensões diferentes (SUARÉZ-GONZÁLEZ et al., 2010). Em condições propícias, a reparação tecidual é favorecida pela característica bioativa dos materiais que compõem o *scaffold*. A estrutura tridimensional e a interconexão dos poros possibilita a infiltração de vasos sanguíneos provenientes dos tecidos adjacentes para o interior do *scaffold*. A vascularização infiltrativa permite a difusão de nutrientes e a migração de células progenitoras para o local de implantação do *scaffold* (INUI et al., 2010; KOCK; VAN DONKELAAR; ITO, 2012; CHEN; LIANGA; THOUASB, 2013). Nessas condições, os complexos celulares e moleculares, tais como os fatores de crescimento, aderem à superfície dos poros do *scaffold*, formando um biofilme celular capaz de iniciar a reparação tecidual específica (SPECTOR, 2006; KLEIN et al., 2009).

Os biomateriais conferem requisitos químicos e arquitetônicos necessários para a manutenção da estabilidade física e química do *scaffold*, resultando em uma estrutura com resistência mecânica adequada, biocompatível e biodegradável. Na literatura são citados diversos compostos biocompatíveis (naturais ou sintéticos) com potencialidade para preparação de *scaffolds* os mais frequentemente citados são: alginatos (SUARÉZ-GONZÁLEZ et al., 2010), colágenos (SHOULDERS; RAINES, 2009), fibroína (LU et al., 2011), poli-ácido-L-Láctico (PLLA) (INUI et al., 2010), poli-láctico-co-glicólico (PLGA) (MAKADIA; SIEGEL, 2011), quitina (JAYAKUMAR et al., 2011), hidroxiapatita, quitosana (HAN et al., 2010). No entanto, o *scaffold* não deve ser apenas um molde arquitetônico com função de preenchimento, o mesmo deve ser capaz de gerar sinais específicos como correntes elétricas, conformações

moleculares e agregação celular responsável pela remodelação de um novo tecido (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008).

Figura 1 - Representação esquemática do *scaffold* e das etapas de regeneração do tecido ósseo



Fonte: <Disponível em : <http://www.fractuur.eu/index.php?id=116>> Acesso em 24 de fev 2015.

2.1 Propriedades necessárias dos biomateriais

Biomaterial pode ser definido como substância ou combinação de substâncias, exceto fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos com a finalidade de tratar, formar ou substituir tecidos, órgãos e melhorar funções do corpo (BHAT; KUMAR, 2013).

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis, bioativos, bioespecíficos, ou de superfícies biomiméticas, estão sendo estudados pela capacidade de promover uma resposta celular específica e evitar respostas inflamatórias, trombose ou infecções associadas ao *scaffold*. Deste modo, os *scaffolds* são capazes de não apenas substituir, mas também propiciar a recuperação do tecido lesionado (BACÁKOVÁ et al., 2000; HEILSHORN et al., 2003; KAMATH et al., 2008). Algumas propriedades particulares dos biomateriais são descritas a seguir.

2.1.1 Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é uma propriedade fundamental do material, empregado na fabricação de *scaffolds*, baseada nas reações que ocorrem na superfície dos

mesmos. Os requisitos necessários para a biocompatibilidade do *scaffold* são complexos e variam de acordo com as aplicações biomédicas. No curto prazo, essa propriedade é influenciada pela capacidade da superfície do dispositivo biológico aderir ao tecido adjacente e, a longo prazo, pelas características químicas do material (CHEN; LIANG; THOUASB, 2013).

A capacidade do material, biologicamente compatível, em mimetizar peptídeos e proteínas do tecido nativo é chamada de modulação interna. Ao ser implantado, o *scaffold* formará uma interface com o tecido lesionado resultando em um complexo célula-biomaterial. Para evitar a apoptose celular do tecido adjacente, o complexo célula-biomaterial deve ocorrer num período entre 24 e 48 horas após a implantação do *scaffold* (HUANG; CHEN; INGBER, 1998).

A fixação do *scaffold* no tecido orgânico ocorre pela formação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou ligações iônicas entre as moléculas da MEC e os grupos funcionais do biomaterial (BACÁKOVÁ et al., 2000; PÉREZ et al., 2013). Nesses casos, fibronectina, vitronectina, colágeno ou laminina (proteínas pró-adesivas) devem adsorver à superfície do biomaterial, ligando-se na sequência específica dos aminoácidos teciduais (Arg-Gli-Asp) pelos receptores de integrina (GARCÍA; VEGA; BOETTIGER, 1999; HUMPHRIES et al., 2000).

A hidrofiliabilidade da superfície do *scaffold* é um fator importante que influencia a biocompatibilidade do material com a MEC adjacente. Essa característica facilita a penetração dos nutrientes para o interior do *scaffold* e a exsudação dos metabólitos. Uma forma de melhorar a hidrofiliabilidade é envolver a superfície dos poros do *scaffold* com componentes naturais da MEC. Entre esses componentes o colágeno do tipo I é um dos mais utilizados (LI et al., 2005; HEIDARI et al., 2011). Além dos componentes da MEC, o alginato de sódio e a quitosana são incorporados às formulações de *scaffolds* para melhorar a hidrofiliabilidade de superfície.

2.1.2 Biodegradação

Biodegradação é o fenômeno no qual um material é degradado ou solubilizado, nos fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação. Os produtos de degradação do *scaffold* devem ser atóxicos, facilmente absorvidos ou excretados pelas vias metabólicas (TABATA, 2009; SULTANA; WANG, 2011).

A velocidade de degradação deve ser compatível com o tempo necessário para restauração do novo tecido e restabelecimento das funções fisiológicas e

anatômicas naturais. Quando o processo de biodegradação ultrapassar o tempo de restauração tecidual, ocorrerá o aparecimento de uma resposta inflamatória indesejável, comprometendo a estrutura e as funções biológicas do tecido recém formado. O período de tempo para a auto restauração do tecido orgânico é dependente, principalmente, das características físico-químicas do tecido lesionado (ANDERSON; LANGONE, 1999; LU et al., 2011; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; FRANÇOIS, 2010).

2.1.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas, tais como modulação da força e resistência à tração, devem ser as mais próximas possíveis do tecido substituído. Onde a resistência mecânica do *scaffold* for inferior à do tecido lesionado pode ocorrer a deformação do material implantado. Tecidos como cartilagens e ossos requerem propriedades mecânicas diferentes dos tecidos moles. O *scaffold* deve ser capaz de suportar tração, pressão e tensões elásticas a que cada tecido é submetido ao exercer a função orgânica específica (MIKOS et al., 1993; HIRAOKA et al., 2003). Portanto, é condição essencial do biomaterial que compõe o *scaffold* apresentar resistência mecânica e dureza, suficientemente adequada, para manter a estrutura e garantir a integridade dos poros durante o processo de biodegradação e reparação tecidual (LEONG; CHEAH; CHUA, 2003).

2.2 Características físicas dos scaffolds

Para obtenção de características físicas compatíveis com o tecido orgânico onde os *scaffolds* serão implantados, diferentes técnicas têm sido utilizadas para a preparação de estruturas porosas e mecanicamente resistentes. As características físicas, químicas e biológicas do material devem ser consideradas na escolha do processo de fabricação do *scaffold*. As técnicas mais utilizadas para a fabricação de *scaffolds* são: “freeze drying” (SULTANA; WANG, 2011), “melt moulding/particulate-leaching” (OHA et al., 2003), “gas foaming/salt leaching” (YOON; KIM; PARK, 2003), “solvent casting” (SUH et al., 2002), “eletrospinning” (IFKOVITS; SUNDARARAGHAVAN; BURDICK, 2009), “soft lithography” (VOZZI et al., 2003) e “3D-bioplotting” (AKBARZADEH, 2015). A variedade dos processos de fabricação e do biomaterial utilizado na preparação dos *scaffolds* têm resultado em estruturas

fisicamente porosas, mecanicamente resistentes e biologicamente compatíveis (LANGER; VACANTI, 1993).

2.2.1 Porosidade e interconectividade entre os poros

O *scaffold* deve possuir microestrutura porosa capaz de aumentar a superfície de fixação e facilitar a distribuição uniforme das células dos tecidos adjacentes. A interconectividade dos poros proporciona um microambiente hidrodinâmico favorável à infiltração de células e vasos sanguíneos, bem como à difusão fisiológica de oxigênio e nutrientes para proliferação celular, eliminação dos metabólitos e dos subprodutos que adentram os poros. Essas propriedades permitirão a deposição da nova MEC nos espaços de interconexão entre os poros, favorecendo a regeneração do tecido lesionado (SPAANS et al., 1998; TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005).

2.2.2 Diâmetro dos poros

A natureza diversa das arquiteturas dos tecidos orgânicos requer dimensão de poros em faixas específicas, semelhante às especificidades de cada tecido. A dimensão dos poros do *scaffold* deve ser compatível com o tamanho do fenótipo celular de interesse. A taxa de poros entre 75-90% da estrutura favorece a fixação celular (MIKOS et al., 1993; RANUCCI et al., 2000). A taxa de superfície área/volume dos poros do material depende do diâmetro médio e da densidade de cada poro. Entretanto, o diâmetro das células em suspensão na MEC limita o diâmetro mínimo dos poros, os quais podem variar de um para outro tipo de célula. Dependendo da aplicação prevista, o tamanho do poro deve ser cuidadosamente controlado. O diâmetro dos poros nos *scaffolds* é influenciado pelas técnicas e pelos processos de fabricação. O efeito das dimensões dos poros sobre a regeneração do tecido foi demonstrada, experimentalmente, por estudos que indicam diâmetro ótimo de 5 µm para neovascularização, 5-15 µm para crescimento de fibroblastos, próximo de 20 µm para crescimento de hepatócitos, 20-125 µm para regeneração de pele de mamíferos adultos, 40-100 µm para crescimento de osteóide e 100-350 µm para regeneração óssea. Tecido fibrovascular requer poros maiores que 500 µm para vascularização rápida e para sobrevivência de células transplantadas (YANG et al., 2001).

O diâmetro, bem como o número de poros, são parâmetros importantes na produção de um microambiente favorável à adesão e proliferação celular, transporte de nutrientes e eliminação de resíduos metabólicos (LI et al., 2005). A Tabela 1 apresenta a relação entre porosidade, diâmetro ótimo dos poros para regeneração do tecido ósseo.

Tabela 1 - Relação entre porosidade, diâmetro dos poros e regeneração óssea

Diâmetro dos poros (μm)	Porosidade (%)	Crescimento tecidual	Referência
Tipo I: 2–6 μm	33,5	Sem crescimento de tecido ósseo	KLAWITTER; HULBERT, 1971
Tipo II: 15–40 μm	46,2	Sem crescimento de tecido ósseo ou fibroso	KLAWITTER; HULBERT, 1971
Tipo III: 30–100 μm 80% poros <100 μm	46,9	50 μm sem crescimento ósseo, osteóide ou fibroso.	KLAWITTER; HULBERT, 1971
Tipo IV: 50– μm 63% poros <100 μm	46,9	20 μm sem crescimento ósseo durante 11 semanas, 50 μm sem crescimento ósseo, osteóides ou tecido fibroso por 22 semanas,	KLAWITTER; HULBERT, 1971
Tipo V: 60–100 μm 37% < 100 μm	48,0	600 μm sem crescimento ósseo durante 11 semanas e 1.500 μm sem crescimento ósseo, osteóide ou tecido fibrosos durante 22 semanas.	KLAWITTER; HULBERT, 1971
Aproximadamente 100 μm	35,3	Sem diferença estatística comparada ao grupo controle	WHANG et al., 1999
Aproximadamente 200 μm	51,0	Sem diferença estatística comparada ao grupo controle	WHANG et al., 1999
Aproximadamente 350 μm	73,9	Estatisticamente significativa, maior crescimento ósseo que todos os grupos.	WHANG et al., 1999

Fonte: Adaptada de (YANG et al., 2001)

2.3 Biomateriais utilizados na fabricação de *scaffolds*

Na terminologia médica, biomaterial é definido como matéria-prima que, em contato com o tecido vivo, não causa reações adversas ou rejeição imunológica. Nessa abordagem, os biomateriais podem ser divididos de acordo com a sua origem (natural ou sintético) ou composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (BHAT; KUMAR, 2013):

- a) Entre os sintéticos, os biomateriais metálicos são aplicados para fixação de fraturas ósseas, juntas artificiais e próteses; em geral são utilizados quando há necessidade de suportar carga elevada. Os polímeros sintéticos são aplicados como implantes ou dispositivos biomédicos usados em prótese facial, válvulas cardíacas e partes do rim. As cerâmicas são utilizadas como implantes dentários e material de preenchimento. Os compósitos são uma combinação de polímero e cerâmica e devido a baixa densidade e alta resistência mecânica são mais empregados na fabricação de próteses;
- b) Os biomateriais de origem natural (animal ou vegetal) como colágeno, gelatina, alginato, ácido hialurônico, entre outros são mais empregados na fabricação de *scaffolds* para crescimento e proliferação celular. A principal propriedade é a semelhança com a MEC, com importante aplicação na engenharia de tecidos. A aplicação destas matérias-primas são limitadas em regiões que suportam carga mecânica elevada. No entanto, podem sofrer modificações químicas para melhorar a resistência mecânica.
- c) Os semi-sintéticos ou híbridos são preparados por combinação de compostos orgânicos e inorgânicos para formar novos materiais com propriedades multifuncionais, como por exemplo o polivinilálcool-vidro bioativo e fosfato de cálcio-PLLA, ambos utilizados para regeneração do tecido ósseo (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999; JOSÉ; PRADO, 2005).

Cada tipo de biomaterial realiza uma interface diferente através de ligações químicas com as células orgânicas. As cerâmicas formam o complexo célula-biomaterial por ligação iônica, os metais por ligação metálica e os polímeros aderem ao tecido orgânico, principalmente, por ligação covalente (ALLAN, 1999).

O biomaterial para uso regenerativo deve ser fabricado com matéria prima que apresente maior biocompatibilidade, bioreabsorção e biodegradação controlada.

2.3.1 Polímeros

Os polímeros são compostos por uma longa cadeia de repetição de monômeros, cuja característica e reatividade determinam as suas propriedades física, químicas e biológicas. As cadeias poliméricas são formadas por ligações covalentes que variam em tamanho e forma. No entanto, podem coexistir como rearranjos cristalinos (ALLAN, 1999; BHAT; KUMAR, 2013).

A versatilidade dos polímeros e sua semelhança mecânica com as estruturas do tecido orgânico, faz com que esses biomateriais sejam os mais utilizados em bioengenharia, exceto na ortopedia. A reação inflamatória provocada por estes biomateriais é mínima, mesmo quando utilizados em procedimento cirúrgicos de repetição (KIM et al., 2008; TIGLI et al.; 2009). Cabe destacar que as propriedades dos polímeros dependem da composição, estrutura e arranjo das macromoléculas constituintes (BHAT; KUMAR, 2013).

Polímeros naturais apresentam melhor interação com os sistemas biológicos, devido às propriedades bioativas e hidrofílicas destes compostos, tais como proteínas (fibroína, colagenio, gelatina, fibrinogênio, elastina, queratina, actina e miosina), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrano, quitosana e glicosaminoglicanos) e polinucleótidos (DNA, RNA) (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; MACAYA; SPECTOR, 2012).

A biocompatibilidade dos polímeros naturais está associada à formação de uma rede polimérica que contém 99% de água. Essa característica confere a esses materiais a capacidade de mimetizar um ambiente semelhante aos tecidos naturais. No entanto, os polímeros naturais precisam ser associados a outros biomateriais para melhorar as propriedades biomecânicas (RATNER; BRYANT, 2004). Em contrapartida, os polímeros naturais apresentam características fisiológicas mais favoráveis, tais como bioadesão seletiva, propriedades semelhantes à MEC, bem como atividade biológicas específicas (TABATA, 2009; PARK et al., 2011; ZHANG, HU; ATHANASIO, 2009).

Entre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis encontram-se os representantes da classe de poliésteres alifáticos sintéticos (poli- α -hidroxi ácidos), dos quais fazem parte o poli-ácido-glicólico (PGA), poli-ácido-láctico (PLA), poli-ácido-láctico-co-ácido glicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) e seus derivados (MIDDLETON; TIPTON, 2000). Os polímeros sintéticos são mais versáteis por apresentarem maior flexibilidade para alteração das suas propriedades químicas e massa molecular, favorecendo a biocompatibilidade, reprodutibilidade e controle das propriedades mecânicas. No entanto, devido às características hidrofóbicas apresentam menor taxa de biodegradação (TABATA, 2009; ZHANG; HU; ATHANASIO, 2009; PARK et al., 2011). A combinação de polímeros naturais e sintéticos podem melhorar as propriedades do *scaffold* permitindo biodegradação controlada e melhorando a compatibilidade biológica (CIARDELLI et al., 2005).

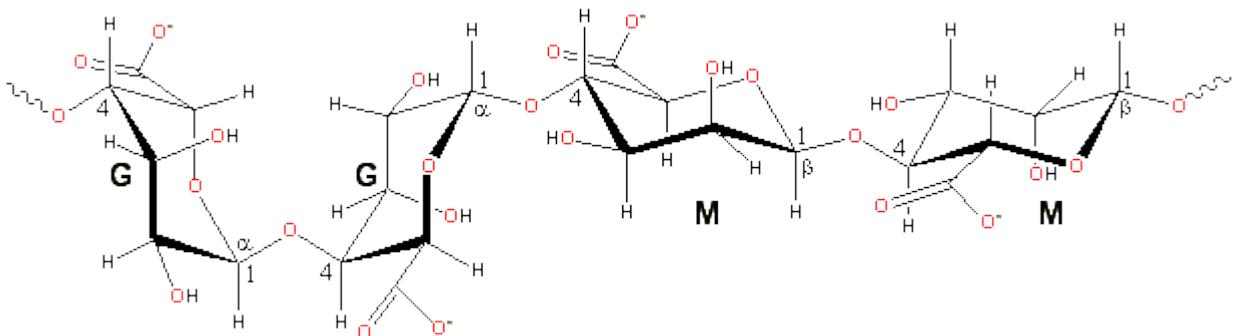
A biodegradação dos polímeros ocorre por cisões hidrolíticas na sua cadeia principal originando produtos na forma de oligômeros ou monômeros solúveis e não tóxicos. Os principais processos de biodegradação ocorrem por dois mecanismos: (i) hidrólise ou digestão enzimática da cadeia principal, promovendo erosão gradativa do polímero, (ii) quebra das ligações de reticulação, gerando fragmentos solúveis em água, os quais são transportados para fora do local de implantação (TABATA, 2009).

Tecidos ósseos e cartilagosos exigem propriedades mecânicas diferentes dos tecidos moles. O *scaffold* deve ser capaz de suportar as tensões elásticas, tração e pressão a que cada tecido é submetido. Quando a resistência mecânica do *scaffold* é baixa, ocorre deformação da estrutura no local de implantação (MIKOS et al., 1993; HIRAOKA et al., 2003).

a) Alginato

O alginato (AL) é um copolímero aniônico linear (Figura 2) constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4. O material varia extensamente em termos da proporção de resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), bem como na estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos M-G (blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G). A razão dessas duas unidades influencia as propriedades físicas desse polissacarídeo. O AL é extraído de algas marinhas castanhas ou marrons (*Phaeophyceae*) pelo tratamento com soluções alcalinas, geralmente hidróxido de sódio (NaOH). O filtrado resultante é precipitado com Cloreto de Cálcio (CaCl_2) ou Cloreto de Sódio (NaCl), podendo ser transformado em ácido algínico com ácido clorídrico (HCl) diluído (PURCELL; SINGH; KIPKE, 2009; LEE; MOONEY, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química unitária do alginato

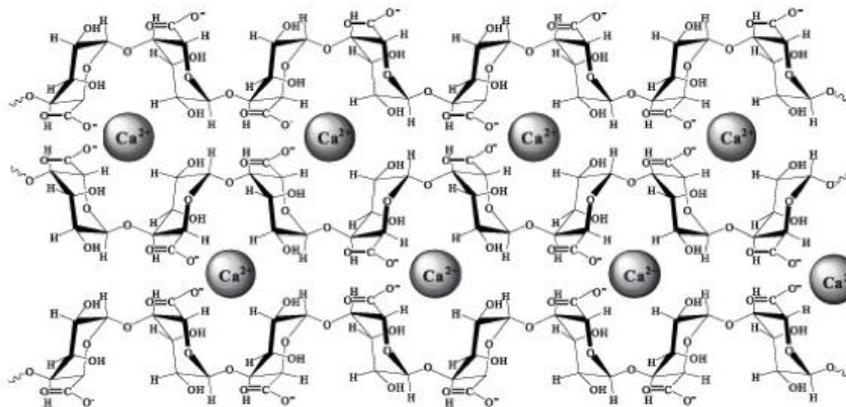


Fonte: <Disponível em: www1.lsbu.ac.uk/water/hyalg.htm> Acesso em 11 set 2014.

O AL é um biopolímero muito utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética pelo fato de ser biocompatível, hidrofílico e biodegradável em condições biológicas normais (SANKALIA et al. 2007, SAETHER et al., 2008).

O hidrogel de AL reticulado é obtido pelo método de geleificação ionotrópica. Quando íons bivalentes, geralmente Ca^{2+} ou Mg^{2+} , entram em contato com a dispersão de alginato de sódio, ocorre a dissociação do sódio, que migra para a solução de eletrólito e os íons de Ca^{2+} , por afinidade, se ligam aos blocos gulurônicos disponíveis no interior da cadeia, formando uma estrutura tridimensional descrita como modelo “caixa de ovos” (Figura 3). A quantidade de Ca^{2+} utilizada pode influenciar a associação intercadeias, podendo ser temporária ou permanente, sendo que níveis altos de Ca^{2+} resultam em precipitação, favorecendo a associação permanente (GEORGE; ABRAHAM, 2006; LEE; MOONEY, 2012).

Figura 3 – Representação esquemática da ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons Ca^{2+} situados entre os grupos com carga negativa



Fonte: (KAWAGUTI; SATO, 2008)

A taxa de geleificação é um parâmetro crítico para a uniformidade e resistência do hidrogel de AL, sendo que a geleificação lenta melhora essa propriedade. A temperatura também é um parâmetro que concorre no controle do processo de geleificação, temperaturas mais baixas retardam a formação de ligações cruzadas no hidrogel de AL reticulado ionicamente (KUO; MA, 2001; DRURY, DENNIS; MOONEY, 2004)

O pH de estabilidade varia entre 5,0 e 10,0, em ambientes muito ácidos ocorre descarboxilação da cadeia polimérica (SANKALIA et al. 2007, SAETHER et al, 2008). A viscosidade das soluções de AL aumenta à medida que o pH diminui, no

limite de 3,0 a 3,5. A manipulação da massa molecular pode controlar a viscosidade do hidrogel por meio da combinação do AL de baixa e alta massa molecular (KONG; LEE; MOONEY, 2002).

O AL é um polieletrólito aniônico capaz de formar complexos com a quitosana (polieletrólito catiônico) e manter as propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O complexo quitosana-alginato confere maior resistência mecânica ao gel devido a forte interação entre as cadeias poliméricas (HAMMAN, 2010).

O *scaffold* composto por AL oferece fácil controle para formação de uma estrutura tridimensional capaz de formar um novo tecido, devido a semelhança com a MEC. O hidrogel de alginato possui características osteoindutivas capazes de beneficiar a regeneração do tecido ósseo. Em combinação com a hidroxiapatita (Hap) pode aumentar a aderência de células de osteossarcoma (LANGER; VACANTI, 1993; LIN; YE, 2004).

Scaffold de alginato-gelatina-hidroxiapatita foi obtido por Berhardt e colaboradores (2009) através do processo de geleificação ionotrópica. A estrutura com poros tubulares obtida possui potencial para apoio celular, fornecimento de nutrientes e formação de vasos sanguíneos. A proliferação e diferenciação osteogênica avaliada *in vitro* usando células de estroma, apresentou aumento da fosfatase alcalina após 2 semanas (BERHARDT et al, 2009).

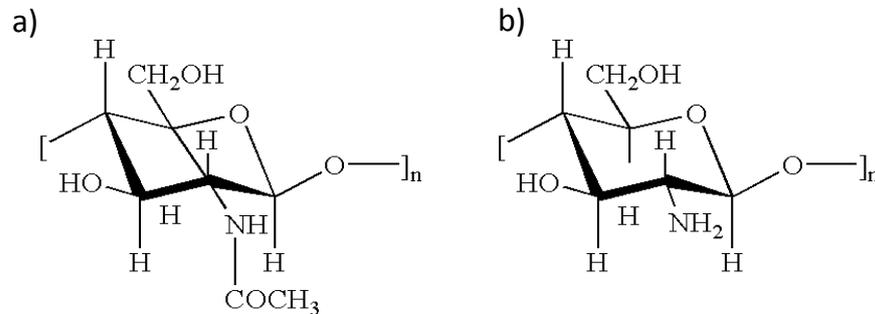
b) Quitosana

A quitosana (Ch) é um polissacarídeo obtido da quitina, encontrado no exoesqueleto de insetos e parede celular de alguns fungos. A principal fonte são as carapaças de crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta). A utilização desse subproduto da indústria pesqueira reduz o acúmulo de quitina (Figura 4a) nos locais onde são gerados ou estocados, reduzindo o impacto ambiental. A Ch apresenta vantagens econômicas por ser extraída de fontes renováveis e do baixo custo de extração (RAVI KUMAR, 2000).

A molécula de Ch (Figura 4b) é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$. A proporção das duas unidades na Ch depende do tratamento alcalino. No estado sólido, a Ch é um polímero

semicristalino, que na difração de raio-X apresenta três tipos de cristais: α , β e γ . Entre eles o tipo α é o mais comum (RAVI KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura molecular da quitina (4a) e quitosana (4b)



Fonte: <Disponível em: www.intophen.com> Acesso em 11 set 2014

A Ch possui estrutura molecular química similar à da celulose, diferenciando apenas pela presença dos grupamentos funcionais amino (NH₂). Essa diferença confere a esse polímero características importantes de atoxicidade, biocompatibilidade, bioadesão, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana (KEAN; THANOU, 2010)

A Ch sofre degradação enzimática, sem gerar produtos metabólitos, por diferentes enzimas, como por exemplo, lisozima, di-N-acetilquitobiase, N-acetil-beta-D-glucosaminidase e quitotriosidade, as quais estão presentes nas mucosas e outros fluidos fisiológicos (BERGER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; STRAND et al., 2010)

As propriedades estruturais e funcionais da Ch possibilitam uma grande variedade de aplicações na agricultura, no tratamento de água, na indústria alimentícia, na indústria cosmética, e de forma acentuada na área biomédica. A versatilidade na utilização desse biopolímero se deve, em grande parte, à possibilidade de modificação da sua estrutura química pela inserção de diferentes grupos funcionais na molécula. Essas modificações podem aumentar a estabilidade química e física, bem como favorecer a solubilidade da Ch em meio aquoso (PILLAI et al., 2009).

A Ch é uma base fraca insolúvel em água, solventes orgânicos e alcalinos, a solubilidade aumenta em soluções ácidas diluídas abaixo do seu pKa (5,9 – 6,7). As unidades de glucosamina quando diluídas, formam um polímero catiônico devido a protonação dos grupamentos NH₂ (GEORGE; ABRAHAM, 2006; ZHANG, 2010).

A estrutura física e conformacional da Ch são influenciadas pelo pH. Se o pH do meio diminui (<6,0) os grupamentos amino (NH₂) em toda extensão da cadeia polimérica irão atuar como polieletrólitos, ocasionando a repulsão eletrostática. Esse processo de protonação enfraquece a resistência mecânica e química do hidrogel, mas favorece o grau de intumescimento. Em pH mais elevado (>6,5) os grupamentos NH₂ serão desprotonados o que reduz o grau de intumescimento dos hidrogéis (DASH et al., 2011).

A massa molecular (MM) e grau de desacetilação (%GD) são os principais responsáveis pelas propriedades físico-químicas e biológicas da Ch. A quantidade de grupamentos NH₂ presentes na estrutura influencia diretamente a solubilidade e viscosidade de soluções de Ch. Para a determinação do grau de desacetilação muitos métodos têm sido propostos, tais como; espectroscopia de raios-X, espectroscopia na região do infravermelho (IR), espectroscopia UV-Vis, espectrometria de massa (MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e titulação potenciométrica (RAVI KUMAR, 2000; HIDALGO; SUÁREZ; FERNÁNDEZ, 2008; WU; ZIVANOVID, 2008; ZHANG, 2010)

A Ch apresenta uma similaridade estrutural com os glicosaminoglicanos e com o ácido hialurônico presentes na cartilagem articular, sendo um dos biomateriais mais indicados na produção de *scaffold* para regeneração articular (GARCIA CRUZ, 2008).

2.3.2 Cerâmicas

Cerâmica é um material inorgânico, não metálico e cristalino com elevada resistência mecânica e baixa ductilidade. Algumas cerâmicas contendo sais de cálcio (fosfato de cálcio) são consideradas bioativas por estimularem a formação, precipitação e deposição de fosfatos de cálcio no tecido ósseo (LIVINGSTON; DUCHEYNE; GARINO, 2002; MATASSI et al., 2011).

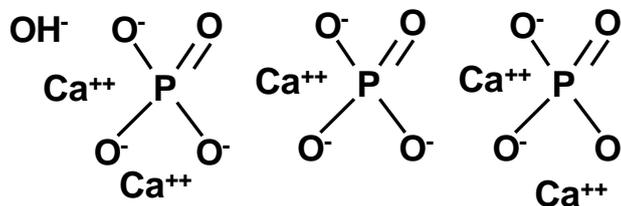
As cerâmicas derivadas do fosfato de cálcio (Ca-P), como a hidroxiapatita (Hap) e o trifosfato de cálcio (TCP), têm despertado grande interesse em aplicações biomédicas. A semelhança química com o tecido ósseo confere a esses materiais características biomiméticas necessárias para aplicação na reparação óssea (CAMPOS et al., 2005; NAGEM FILHO et al., 2006; PEÑA; ALVARADO, 2010; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

As (bio)cerâmicas aumentam a reatividade na superfície dos *scaffolds* potencializando o seu efeito sobre a formação óssea. Após as (bio)cerâmicas serem implantadas *in vivo*, as proteínas contidas nos fluídos corporais serão adsorvidas espontaneamente na superfície do biomaterial, formando uma interface material-tecido. A integração material-tecido estimulará a fixação, proliferação e migração celular. Essas reações desempenham um papel fundamental na regeneração do tecido ósseo (ASHWORTH et al., 1996; DUCHEYNE; QIU, 1999; PULEO; NANCI, 1999).

a) Hidroxiapatita

A Hap (Figura 5) é um constituinte mineral do osso e dentes de todos os vertebrados ocupando cerca de 30 a 70% da massa destas estruturas. A Hap apresenta características vantajosas no uso de substituto ósseo, tanto no preenchimento de cavidades após a extração de tumores ou cistos, como no revestimento de próteses dentárias e ortopédicas (FOOK, 2010; OLIVEIRA, 2010).

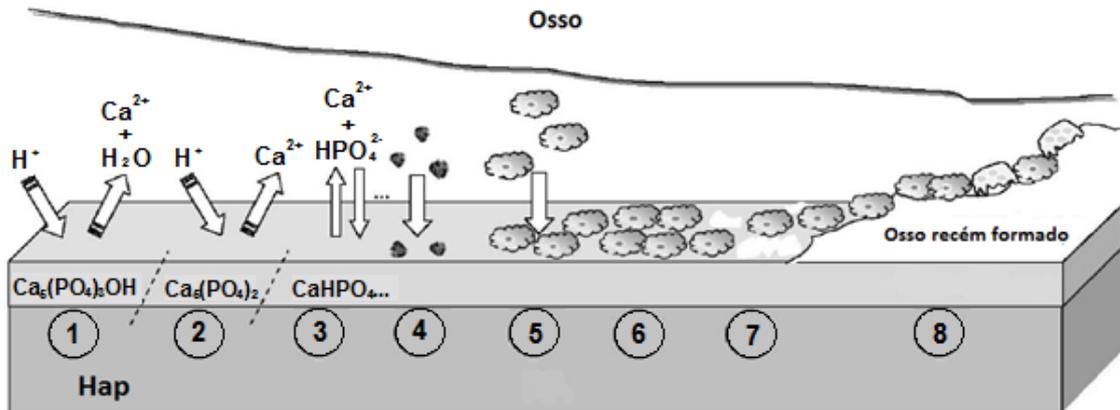
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química da hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$)



Fonte: <Disponível em: www.lookchem.com> Acesso em 11 set 2014.

A Hap é um biomaterial compatível com o tecido ósseo, possui a capacidade de se ligar quimicamente ao osso sem a necessidade da interposição de qualquer outro tecido. A capacidade de osteointegração e bioatividade da Hap favorece o crescimento ósseo (Figura 6) (NAGEM FILHO et al., 2006; VERMA; KATTI; KATTI, 2010).

Figura 6 - Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem na superfície da hidroxiapatita após a implantação do *scaffold*: (1) solubilização da Hap na superfície da estrutura; (2) precipitação da solução de Hap; (3) equilíbrio entre os fluidos corpóreos e a superfície da estrutura; (4) precipitação da solução de Hap; (5) adesão celular; (6) proliferação celular; (7) início da formação de novo osso; (8) Osso recém formado.



Fonte: (DOROZHKIN, 2010)

A estrutura cristalina da Hap confere a esse biomaterial resistência mecânica, uma das suas mais importantes propriedades, juntamente com a capacidade de adsorver proteínas em sua superfície. Nos organismos vivos, sua facilidade de substituições catiônicas e aniônicas faz da Hap uma reserva de cálcio e fósforo, além de ser um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais. Apesar de todas essas propriedades, o uso da Hap em implantes ósseos é limitada pela baixa taxa de degradação, que conseqüentemente interfere no processo de reabsorção e remodelagem óssea (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A degradação da Hap pode ocorrer por absorção mediada por osteoclastos ou dissolução química, devido a formação da superfície osteocondutiva. A degradação e reabsorção das partículas da Hap ocorrem à medida que um novo tecido ósseo é formado no interior dos poros do *scaffold* (OLSSON; PIPPI; TOGNOLI, 2008).

2.4 Aplicações biomédicas dos *scaffolds*

Os *scaffolds* não devem ser apenas moldes arquitetônicos com funções de preenchimento. Esses dispositivos precisam ser capazes de gerar sinais específicos como correntes elétricas, favorecer conformações moleculares e agregação celular para a remodelação do novo tecido (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Assim, além da escolha do biomaterial adequado, o sucesso no desenvolvimento de *scaffolds*

está vinculado ao conhecimento das características dos tecidos orgânicos onde serão inseridos. Entre esses, morfologia, biologia celular, hemodinâmica, bioquímica, propriedades biomecânicas e interações específicas célula-matriz tecidual (STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007).

Os tecidos orgânicos são constituídos por células dispostas em uma MEC, composta em grande parte por colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas. Cada tecido orgânico contém tipos celulares específicos que podem secretar proteínas responsáveis pelas funções mecânicas. A interação entre as células específicas e os componentes da MEC fornecem os elementos bioquímicos necessários para a manutenção e funções específicas dos diferentes tecidos. Os componentes proteicos são muitas vezes fibrosos e conferem ao tecido resistência mecânica e maior força de tensão. As proteoglicanas são responsáveis por manter a hidratação e fornecer resistência à compressão. O colágeno e a elastina são proteínas encontradas em abundância na maioria dos tecidos responsáveis, respectivamente, pela sustentação e elasticidade. A fibronectina, a laminina e a vitronectina são encontradas em menor quantidade e são responsáveis pela adesão celular e organização da MEC (THOMAS; ANGLARET, 1999; BURG et al 2000; STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007).

Os tecidos e as células que compõem os órgãos apresentam características biológicas e morfológicas distintas. Os osteoblastos, por exemplo, estão localizados sobre a superfície óssea em um arranjo de células cúbicas, já os hepatócitos estão localizados no fígado e se organizam em estruturas hexagonais. As células locais interagem com o *scaffold* sintetizando uma nova MEC e degradando o polímero por cisão hidrolítica ou enzimática (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

A incorporação de células sinalizadoras na superfície do *scaffold* aumenta a eficácia do suporte, seja por orientar a diferenciação dos fenótipos contidos nessas células, ou por estimular a migração das células específicas do tecido adjacente. Células sinalizadoras extraídas do tecido autólogo e cultivadas *in vitro* têm apresentado resultados promissores no processo de diferenciação e proliferação celular (CHEN; LIANGA; THOUASB, 2013).

A combinação de quitosana e alginato devido a sua formação química complexa confere ao *scaffold* resistência mecânica e ambiente favorável a proliferação de osteoblastos. O estudo *in vivo* mostrou que essa estrutura possui alto grau de compatibilidade, podendo ser preparada em pH fisiológico. Esta característica

pode fornecer um ambiente favorável a incorporação de proteínas sem que ocorra a desnaturação (LI et al., 2005).

2.4.1 Tecido ósseo

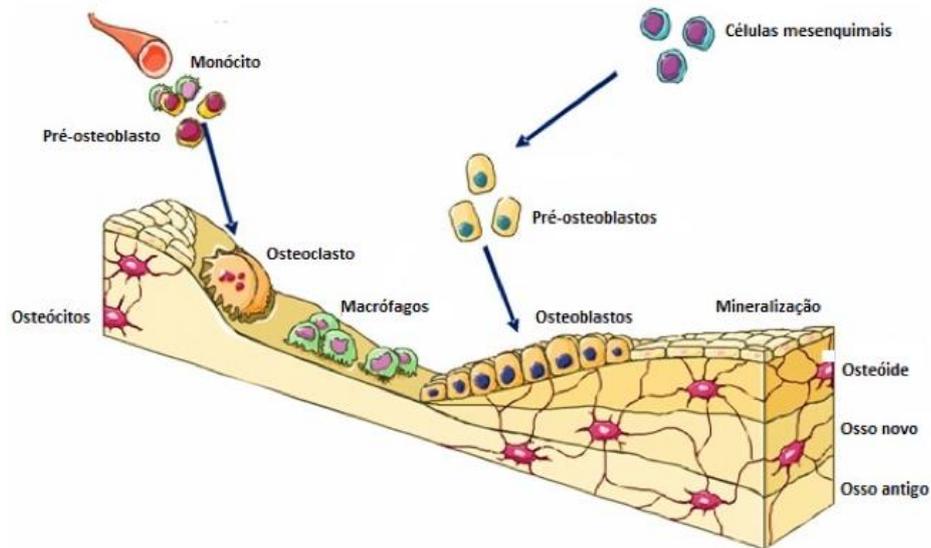
O osso além de ser uma reserva mineral de Ca-P, é um tecido conjuntivo especializado que possui funções de suporte para a fixação dos músculos, locomoção, proteção de órgãos vitais e tecidos moles. A estrutura óssea é dividida em três regiões: externa, córtex e esponjosa. A região externa, densa e rígida, recobre a córtex e a camada esponjosa (MOHAMED, 2008)

O tecido ósseo é constituído principalmente por Ca-P sob a forma de placas ou agulhas finas de cristais de Hap inorgânica. Os constituintes não colagenosos contêm proteínas e proteoglicanos específicas do tecido conjuntivo ósseo. Em volume o osso é composto por 36% de material inorgânico, 36% de material orgânico e 28% de água (MOHAMED, 2008; HAMADA et al., 2012).

As células que compõe o tecido ósseo são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos encontram-se no interior da matriz óssea, possuem formato achatado e são essenciais para a manutenção da matriz óssea (MOHAMED, 2008). Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), participam da mineralização óssea por ter a capacidade de concentrar o Ca-P. Essas células, quando estimuladas, assumem formato cubóide e em caso de pouca atividade, tornam-se achatados (MUSCHLER, NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004). Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas e são originados por percursoros mononucleados da medula óssea. As células osteoclásticas secretam ácido (H^+), colagenase e outras hidrolases que atuam localmente na digestão da matriz orgânica e na dissolução dos cristais de sais de cálcio (BONNUCI, 1981).

O tecido ósseo está em constante remodelação (Figura 7). A massa total do osso depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea. Apesar de possuir a capacidade intrínseca de reparação, a consolidação de lesões neste tecido está condicionada ao suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica e tamanho do sítio lesionado. Nas regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, desta forma, há formação de cicatriz fibrosa (SALGADO et al., 2005; KIM et al., 2006; DIMITRIOU et al., 2011).

Figura 7 - Processo de remodelação óssea



Fonte: <Disponível em: www.lookchem.com> Acesso em 11 dez 2014.

Modalidades de tratamento convencionais utilizadas na reconstrução do tecido ósseo, como utilização de implantes autólogos, aloenxertos e xenoenxertos, por sua vez, apresentam resultados muitas vezes aquém do esperado. Não obstante, a incapacidade em restaurar a integridade do esqueleto pode levar a comorbidades associadas, consultas médicas frequentes, diminuição na qualidade de vida e aumento dos custos médicos (GUTIERRES et al., 2006).

Para o sucesso clínico do *scaffold* como substituto ósseo é necessário que o biomaterial utilizado apresente propriedades que favoreçam a reparação óssea. A reconstrução óssea é dependente de mecanismo como osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção (GUTIERRES et al., 2006; KHALED et al., 2011; DANTAS et al., 2011):

- a) Osteogênicos – O biomaterial que compõem o *scaffold* favorece o acondicionamento das células osteoblásticas capazes de formar um novo tecido ósseo (GUTIERRES et al., 2006).
- b) Osteoindução – O biomaterial confere ao *scaffolds* a capacidade de induzir a diferenciação de células mesênquimais em osteoblasto ou condroblastos, resultando na formação e remodelação do tecido ósseo no local do enxerto. Isto ocorre devido à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) entre seus componentes. A osteoindução necessita da presença do tecido ósseo pré-

existente como fonte de células osteoprogenitoras que irão proliferar e se diferenciar através da osteogênese (OLSSON et al., 2008).

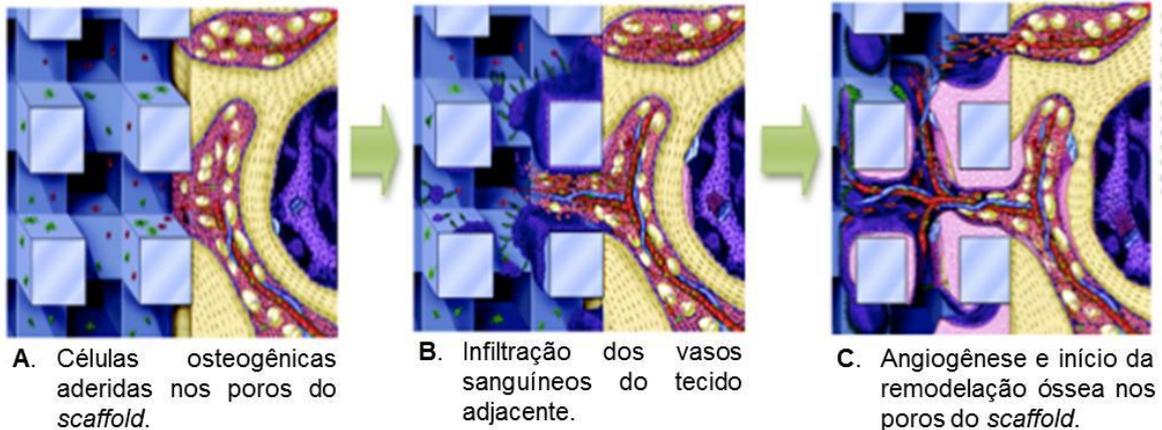
- c) Osteocondução – O biomaterial oferece ambiente favorável a fixação das células progenitoras e contribui para penetração dos vasos sanguíneos do tecido adjacente, disponibilizando os componentes necessários para a ocorrência da neoformação óssea em sua superfície (PEÑA; ALVARADO, 2010; DANTAS et al., 2011).
- d) Osteopromoção – O biomaterial osteopromotor é caracterizado pelo uso de meios físicos que funcionam como isolantes anatômicos. A estrutura do suporte impede a ação de fatores inibitórios durante o processo de seleção e proliferação dos osteoblastos e de outros tipos celulares (DANTAS et al., 2011).

Uma estratégia relevante para a reparação óssea é o desenvolvimento de *scaffold* combinando polímeros com material (bio)cerâmico. O resultado deste compósito é um *scaffold* com tenacidade e flexibilidade de polímero e resistência mecânica da cerâmica. As vantagens desses compósitos incluem aumento do potencial osteogênico provenientes dos íons de cálcio e fosfato contidos na (bio)cerâmica e a redução da migração mineral pela presença da matriz polimérica (PERKA et al.; 2001; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; MATASSI et al., 2011).

Colágenos, Ch, Hap e TCP são os biomateriais mais utilizados na preparação dos *scaffold* para regeneração óssea. Estes materiais são selecionados por suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras, biocompatibilidade e por proporcionar estabilidade mecânica que afeta diretamente vascularização, angiogênese e regeneração óssea (Figura 8) (FINKEMEIER, 2002; GIANNOUDI; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; BHUMIRATANA et al., 2010; MIESZAWSKA et al., 2011).

O processo de implantação do *scaffold* no tecido lesionado favorece a restauração natural da integridade do tecido quando há um ambiente hormonal, metabólico e mecânico apropriado. Os materiais para suporte ósseo estimulam a regeneração tecidual a partir dos osteoblastos (GREENWALD et al., 2001).

Figura 8 - Ilustração do início do processo de regeneração óssea após implantação do *scaffold*



Fonte: MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004

Levando-se em consideração todos os aspectos apresentados, desenvolver um *scaffold* combinando as características favoráveis dos polímeros (bioadesão, atoxicidade, flexibilidade e moldagem em diferentes formatos) com material (bio)cerâmico que confere resistência mecânica favorável e aumenta a taxa de biodegradação durante a formação de um novo tecido ósseo é altamente relevante.

Neste estudo, *scaffolds* constituído por quitosana, quitosana+alginate tratados ou não com solução de CaCl_2 , e, quitosana+alginate+hidroxiapatita foram desenvolvidos baseados nas características físico-químicas e biológicas necessárias para a regeneração do tecido ósseo. A técnica escolhida para produção da estrutura com alto grau de porosidade foi a liofilização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver e caracterizar *scaffolds*, preparados com biomateriais de importância biológica.

3.2 Objetivos Específicos

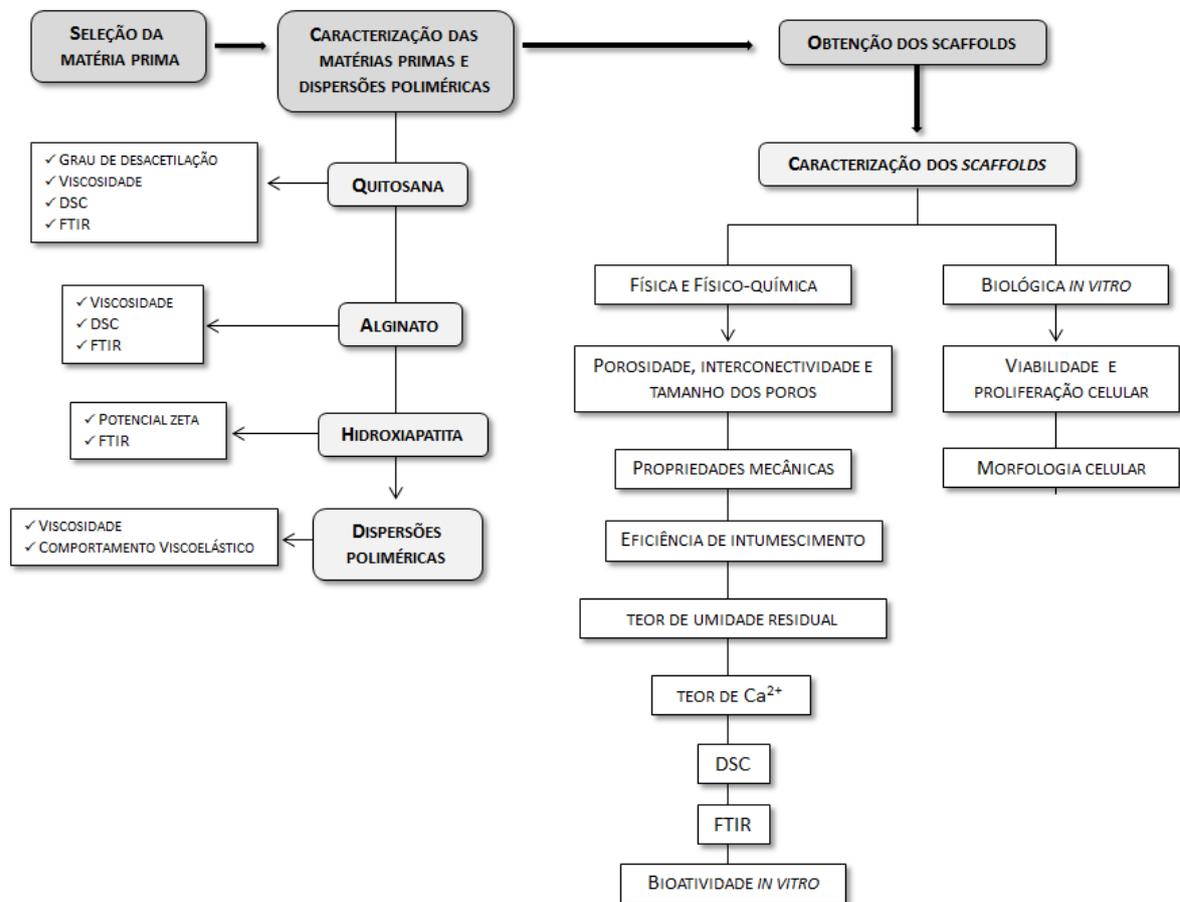
Os *scaffolds* serão avaliados pelos ensaios abaixo descritos.

- ✓ Eficiência de intumescimento
- ✓ Propriedades mecânicas
- ✓ Porosidade total (%), volume total dos poros (mm^{-3}), densidade das conectividades (mm^{-3})
- ✓ Calorimetria exploratória diferencial (DSC)
- ✓ Espectroscopia infravermelho com transformada de fourier (FTIR)
- ✓ Bioatividade *in vitro*
- ✓ Viabilidade, proliferação e morfologia celular

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas etapas de caracterização das matérias primas, preparação e caracterização dos *scaffolds* (Figura 9). As análises de caracterização foram baseadas na identificação de propriedades físicas, físico-químicas e biológicas de *scaffolds* destinados à regeneração do tecido ósseo.

Figura 9 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização das matérias-primas, desenvolvimento e avaliação dos *scaffolds*



Fonte: Elaboração própria

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

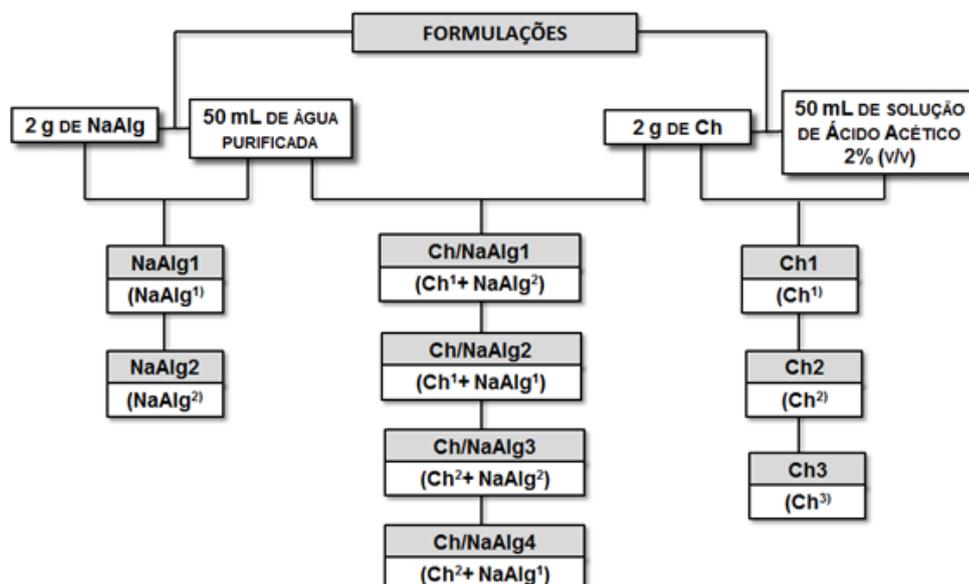
Quitosana de baixa massa molar, quitosana de média massa molar (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), alginato de sódio de baixa viscosidade (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \geq 90\%$) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), quitosana (Sintética Importadora e Distribuidora Química e Farmacêutica Ltda, Capivari, Brasil), alginato de sódio de alta viscosidade (Vetec química fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). As matérias primas utilizadas eram de grau de pureza para uso farmacêutico exceto a quitosana proveniente da Sintética.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparação dos *scaffolds* de quitosana, alginato de sódio e quitosana/alginato de sódio

Os *scaffolds* foram obtidos pela liofilização das dispersões aquosas de quitosana (Ch), alginato de sódio (NaAlg) e quitosana/alginato de sódio (Ch/NaAlg). As formulações que deram origem às dispersões aquosas dos polímeros são representadas na Figura 10.

Figura 10 - Composição mássica das formulações de quitosana (Ch), alginato de sódio (NaAlg) e quitosana/alginato e sódio (Ch/NaAlg)

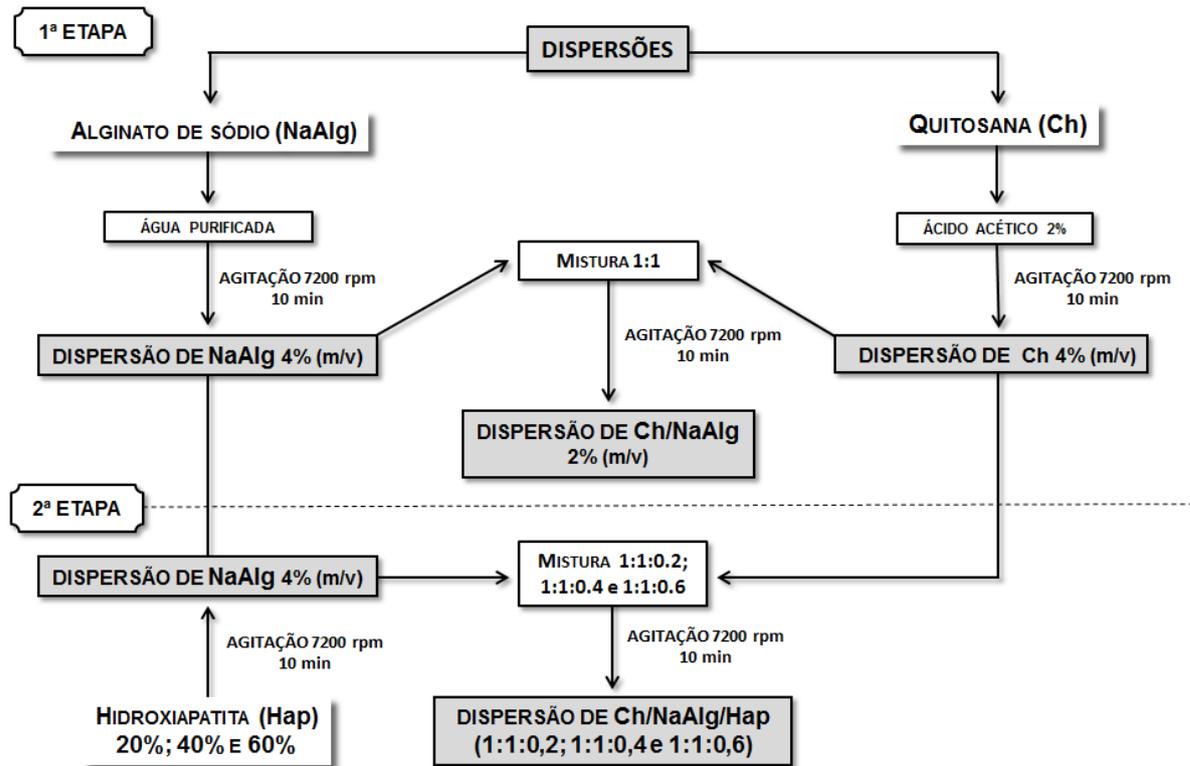


Ch^1 (baixa massa molar, Sigma Aldrich Co) e Ch^2 (média massa molar, Sigma Aldrich Co); Ch^3 (Sintética Importadora e Distribuidora Química e Farmacêutica Ltda); NaAlg^1 (baixa viscosidade, Sigma Aldrich Co); NaAlg^2 (alta viscosidade, Vetec química fina Ltda)

Fonte: elaboração própria

As dispersões aquosas contendo Ch (Ch1-Ch3) e NaAlg (NaAlg1 e NaAlg2) foram obtidas sob agitação mecânica (7200 rpm, 10 min) usando elemento dispersor 25G (Ultra Turrax IKA - T-25D, Staufen, Germany). A formulação Ch3 foi filtrada através de membrana de nitrato de celulose (0,8 μm) para eliminação de material insolúvel no ácido acético 2% (v/v). As dispersões Ch/NaAlg (Ch/NaAlg1 - Ch/NaAlg4) foram obtidas a partir da mistura das formulações de Ch e NaAlg na razão de 1:1 (m/m). As misturas foram homogeneizadas usando elemento dispersor 25G, nas mesmas condições anteriores. A Figura 11 mostra esquematicamente as etapas para preparo das dispersões de Ch, NaAlg e Ch/NaAlg. Para obtenção dos *scaffolds* cerca de 3 g de cada formulação foi transferida para molde cilíndrico com capacidade volumétrica para 7 cm^3 , congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Ultra-freezer Cold Lab, Piracicaba, Brasil) e liofilizadas (Thermo Fisher Scientific – modulyoD 115, Massachusetts, USA) (pressão inicial 999 mbar - pressão final aproximada de 53 mbar). Uma amostra dos *scaffolds* obtidos de Ch2, Ch/NaAlg2 e Ch/NaAlg4 foram removidos dos moldes e imersos, durante 60 min, em etanol 96% (v/v). Os *scaffolds* tratados com etanol receberam a denominação de Ch2A, Ch/NaAlg2A e Ch/NaAlg4A. Os *scaffolds* obtidos das formulações Ch/NaAlg2 e Ch/NaAlg4 foram imersos em solução de CaCl_2 0,2M (7,3 mg Ca^{2+}), durante 10 min e, sucessivamente, lavados em água purificada até pH 6,2. Os *scaffolds* tratados com CaCl_2 receberam a denominação de Ch/NaAlg2B e Ch/NaAlg4B. A eliminação do etanol (Ch2A, Ch/NaAlg2A e Ch/NaAlg4A) e da água (NaAlg2B e Ch/NaAlg4B) foram feitas por evaporação à temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$) até massa constante. A Figura 11 mostra esquematicamente a obtenção dos *scaffolds* e as subsequentes imersões em etanol 96% (v/v) ou solução CaCl_2 0,2M. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo a luz.

Figura 11 - Representação esquemática das etapas para preparação das dispersões de Ch, NaAlg, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)



Fonte: elaboração própria

As formulações de Ch e NaAlg após o tratamento com etanol e CaCl_2 , respectivamente, foram preparadas seguindo o planejamento fatorial de 2^2+2 . As formulações de Ch/NaAlg após o tratamento com etanol e CaCl_2 , respectivamente, foram preparadas seguindo o planejamento fatorial de 3^2+2 .

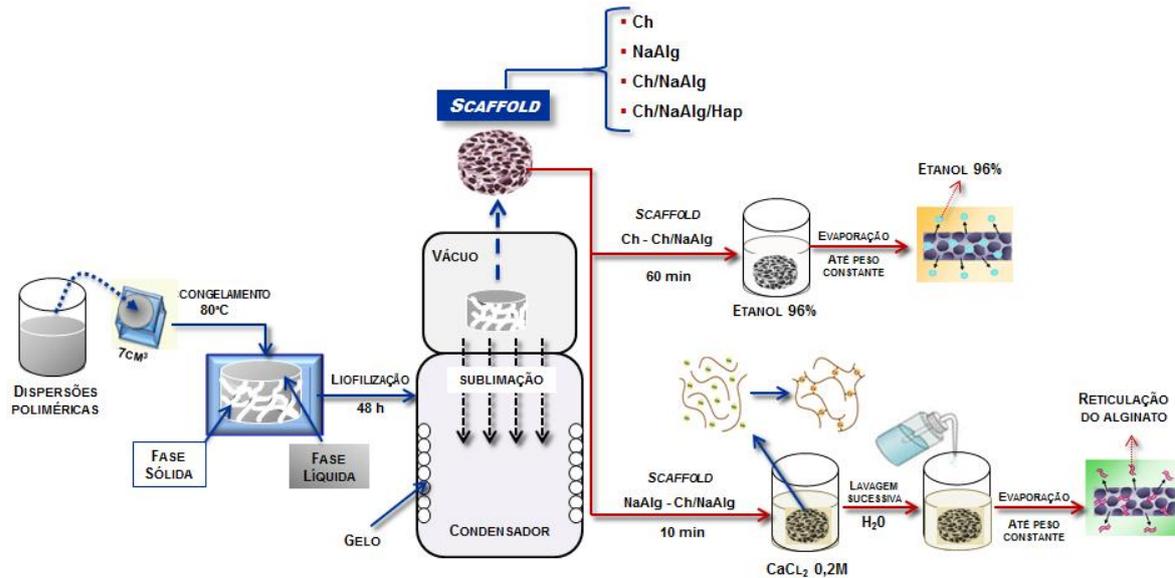
5.2.2 Preparação dos *scaffolds* de quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita (Ch/NaAlg4/Hap)

Para preparação dos *scaffolds* com hidroxiapatita (Hap) foi selecionado a dispersão Ch/NaAlg4. A Hap foi incorporada na formulação nas razões (m/m) de 1:1:0,2 (80 mg Ca^{2+}); 1:1:0,4 (160 mg Ca^{2+}); e 1:1:0,6 (320 mg Ca^{2+}), Ch:NaAlg:Hap.

A Hap foi padronizada em tamis (mesh 60) e adicionada lentamente à dispersão aquosa de NaAlg sob agitação mecânica (7200 rpm, 10 min.). A dispersão de Ch foi adicionada à mistura de NaAlg/Hap nas mesmas condições até completa homogeneização. Para obtenção dos *scaffolds* cerca de 3 g de cada formulação foi transferida para molde cilíndrico com capacidade volumétrica para 7 cm^3 , congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizadas. Os *scaffolds* obtidos receberam a denominação

de Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As etapas para preparação das dispersões contendo Hap estão esquematicamente representadas na Figura 11. A Figura 12 mostra esquematicamente a obtenção dos *scaffolds* contendo Hap.

Figura 12 - Representação esquemática da obtenção e tratamento dos *scaffolds*



Ch (quitosana) - NaAlg (alginato de sódio) – Hap (Hidroxiapatita)

Fonte: Elaboração própria

5.2.3 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (média massa molar)

O grau de desacetilação foi obtido por titulação potenciométrica conforme descrito por Hidalgo e colaboradores (2008). Resumidamente, 0,2 g de Ch foi dispersa em 20 mL de ácido acético 1,5% (v/v) e mantida sob agitação mecânica (7200 rpm, 10 min) usando elemento dispersor 25G. A dispersão de Ch, mantida sob agitação constante, foi titulada com NaOH 0,1M. Após cada 5 mL da solução de NaOH 0,1M adicionado o potencial hidrogeniônico da dispersão de Ch foi medido e registrado. O grau de desacetilação foi calculado usando a equação 1.

$$\%GDA = 161 \times [\text{NaOH}] \times (\text{P2} - \text{P1}) / m \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde,

161 = Massa molar da unidade N-glucosamina em $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

P1 = Valor do potencial hidrogeniônico do primeiro ponto de inflexão

P2 = Valor do potencial hidrogeniônico do segundo ponto de inflexão

m = Massa de quitosana usada na dispersão (g)

[NaOH] = Concentração da solução de NaOH 0,1M padronizada

5.2.4 Viscosidade e avaliação do comportamento viscoelástico

O *spindle* foi previamente selecionado, por tentativa e erro, até que a medida do erro relativo (% torque) fosse maior do que 10 e menor que 100% (Viscosímetro rotativo digital - Brookfield – DVI Prime, Massachusetts, USA). Quando o % torque era superior a 100% o tamanho do *spindle* era reduzido. Inversamente, se leitura era inferior a 10% o tamanho do *spindle* era aumentado. A viscosidade das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) para as diferentes velocidades de rotação foi registrada após a seleção do *spindle*. Os parâmetros utilizados para a determinação da viscosidade estão descritos na Tabela 2. Para cada velocidade de rotação as medidas de viscosidade foram realizadas com intervalos de 10 min durante 110 min. Nesse intervalo de tempo a temperatura foi mantida em 23 °C, com auxílio de banho-maria (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA). O comportamento viscoelástico foi avaliado usando modo de oscilação forçada para modificar a taxa de cisalhamento (Tabela 2). O registro dos resultados para viscosidade (cP), taxa de cisalhamento (1/sec) e tensão de cisalhamento (D/cm²) foi realizado através do software *Wingather* 3.0.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para determinação da viscosidade e avaliação do comportamento viscoelástico das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6).

FORMULAÇÕES	SPINDLE	VELOCIDADE DE ROTAÇÃO (rpm)										
		TEMPO (min)										
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Ch2	SC4-29	0,5	1	2	2,5	4	5	4	2,5	2	1	0,5
NaAlg1	RV3	2,5	5	10	20	50	100	50	20	10	5	2,5
Ch/NaAlg4	SC4-28	1	5	10	20	50	100	50	20	10	5	1
Ch/AlgNa4/Hap (1:1:0,2)	SC4-29	0,5	1	2	2,5	4	5	4	2,5	2	1	0,5
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)	SC4-29	0,5	1	2	2,5	4	5	4	2,5	2	1	0,5
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	SC4-29	0,5	1	2	2,5	4	5	4	2,5	2	1	0,5

Ch – quitosana, NaAlg - alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita.

Fonte: Elaboração própria

5.2.5 Caracterização dos *scaffolds*

Para avaliação das propriedades físicas, físico-químicas, bioatividade, viabilidade, morfologia e capacidade de proliferação celular, os *scaffolds* foram previamente selecionados considerando integridade e uniformidade da estrutura.

5.2.6 Porosidade e interconectividade dos poros

As características morfométricas de porosidade, interconectividade dos poros e polidispersividade do tamanho dos poros dos *scaffolds* foi determinada por microtomografia computadorizada (μ CT). A imagem dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foi capturada por microtomógrafo X-Ray (Brucker-micro CT - SkyScan 1174, Kontich, Bélgica) com scanner de alta resolução, com 28 μ m pixel e tempo de integração de 1,7s. A fonte de raios-X foi de 34 keV de energia e 790 mA de corrente. O raio X foi filtrado através de filtro Al. As projeções foram adquiridas em uma faixa de 180° com um passo angular de 1° de rotação. Modelos virtuais em 3D representativos de várias regiões dos *scaffolds* foram criados, visualizados e registrados. Os dados foram tratados matematicamente pelo software CT Analyser v. 1.13.5.

5.2.7 Superfície dos *scaffolds*

A superfície da estrutura porosa dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foi analisada por microscopia (Zeiss – Axio Vert A1, Jena, Germany) com aumento 10x. Para captura das imagens as amostras, com altura de 1 mm e raio 6 mm (113,04 mm³), foram dispostas sobre lâminas de vidro para microscopia.

5.2.8 Potencial zeta

Os valores de potencial zeta para a Hap e formulações Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) foram obtidos a partir da derivação da mobilidade eletroforética utilizando Zetasizer (BrookHaven - NanoBrook-90 Plus, Nova York, USA). A Hap e as formulações foram dispersas em água purificada na proporção de 1:30 e vertidas em cubeta de vidro (1cm²). O

tratamento matemático dos dados foi realizado pelo software Particle Solutions v. 3.0.

5.2.9 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foram avaliadas utilizando texturômetro (Stable Micro Systems - TA-XT Plus, Surrey, Reino Unido) e os resultados foram registrados pelo software Exponente Texture Analysys. Para avaliação das propriedades mecânicas (tração, perfuração, flexibilidade e elasticidade) foi utilizado *scaffold* com altura de 3 mm e raio de 6 mm (339,12 mm³). Os parâmetros utilizados para avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds* estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*

Parâmetros	Tração	Perfuração	Flexibilidade	Elasticidade
Aparate	<i>Mini Tensile Grips</i> <i>Part Code. A/MTG</i> <i>Batch n 13101</i>	<i>Film Support Rigg</i> <i>Part Code.</i> <i>HDP/FSR</i> <i>Batch n 13085</i>	<i>Film Support Rigg</i> <i>Part Code.</i> <i>HDP/FSR</i> <i>Batch n 13085</i>	<i>Film Support Rigg</i> <i>Part Code.</i> <i>HDP/FSR</i> <i>Batch n 13085</i>
Test Mode	<i>Tension</i>	<i>Compression</i>	<i>Compression</i>	<i>Compression</i>
Pre-Test Speed	<i>1 mm/s</i>	<i>2 mm/s</i>	<i>1 mm/s</i>	<i>1 mm/s</i>
Test Speed	<i>2 mm/s</i>	<i>1 mm/s</i>	<i>1 mm/s</i>	<i>1 mm/s</i>
Post-Test Speed	<i>10 mm/s</i>	<i>10 mm/s</i>	<i>10 mm/s</i>	<i>10 mm/s</i>
Target Mode:	<i>Distance</i>	<i>Distance</i>	<i>Distance</i>	<i>Distance</i>
Distance	<i>10 mm</i>	<i>10 mm</i>	<i>5 mm</i>	<i>5 mm</i>
Trigger Type	<i>Auto</i>	<i>Auto</i>	<i>Auto</i>	<i>Auto</i>
Trigger Force	<i>5g</i>	<i>5g</i>	<i>5g</i>	<i>5g</i>

Fonte: Elaboração própria

5.2.10 Ensaio de tração

Para avaliar a tensão e alongamento na ruptura, as extremidades dos *scaffolds* de Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), ChAlgNa/Hap

(1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foram fixadas por presilhas (Mini Tensile Grips). As presilhas foram recobertas com fita de papel plastificado para minimizar o efeito dos seus sulcos sobre a resistência dos *scaffolds*.

5.2.11 Ensaio de perfuração, flexibilidade e elasticidade

Para avaliar a resistência à compressão os *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foram fixados entre duas placas perfuradas (orifício de 10 mm) e fixadas à plataforma do equipamento.

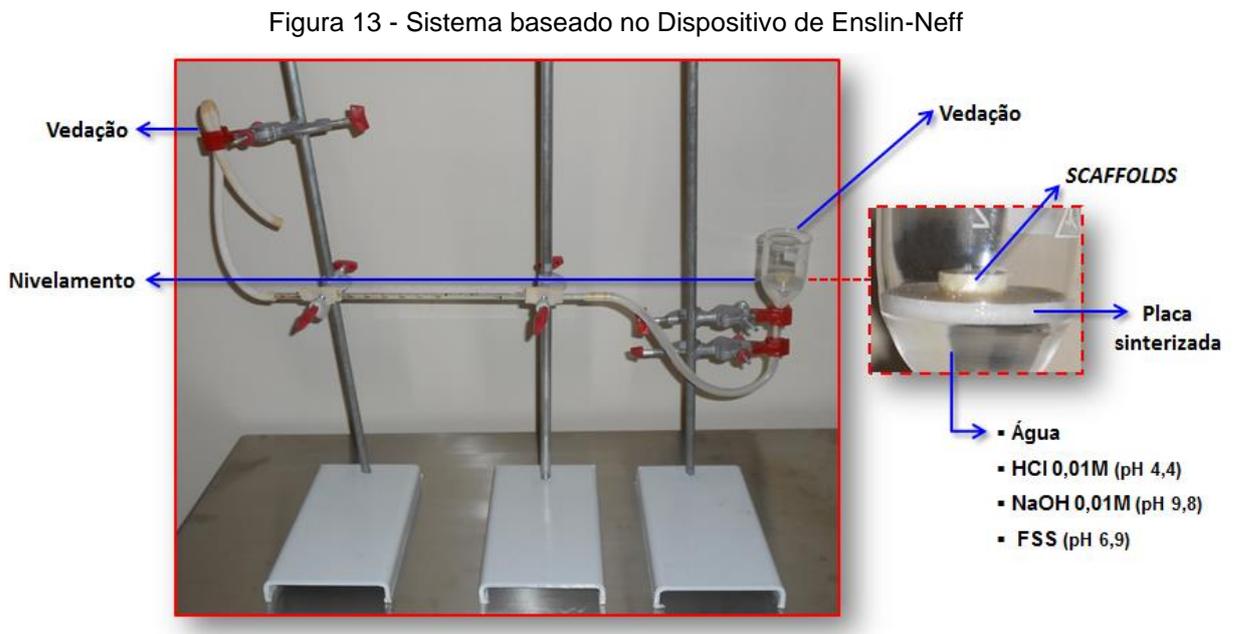
5.2.12 Fluorescência de raios-X

A análise do teor de íons de Cálcio (Ca^{2+}) presente nos *scaffolds* Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) foi realizada em espectrômetro de fluorescência de raios-X (Hamamatsu Photonics – L6731-01, Hamamatsu, Japão), que opera com uma fonte de raios-X com anodo de Tungstênio. Os dados de fluorescência foram obtidos usando-se a seguinte configuração experimental para a fonte de raios-X: tensão de operação de 25 kV e corrente de 99 μA , colimador de Al de 2,0 mm na saída da fonte e tempo de aquisição de 900 s. O detector usado na aquisição dos dados de fluorescência foi fabricado pela empresa Amptek Inc. (Bedford Ma, U.S.A) e consiste de um detector de Si(Li) do tipo “drift detector”, com área de 25 mm^2 , 500 μm de espessura e janela de Berílio de 12,5 μm . Esse equipamento consegue detectar elementos com número atômico na faixa do elemento Mg^{2+} ($Z=12$) até Férmio ($Z=100$). O conjunto todo fornece espectros com alta resolução em energia ($E < 140$ eV), permitindo a identificação dos elementos presentes na amostra, através da medida da energia dos raios-X emitidos. Para análise dos dados de fluorescência foi utilizado o software XRF-FP™ fornecido pela Amptek (Versão 5.2.9).

5.2.13 Eficiência de intumescimento

A eficiência de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6), por absorção, foi avaliado em água (pH 6,8), HCl 0,01M (pH 4,4), NaOH 0,01M (pH 9,8) e fluido salivar artificial (FSS) (pH 6,9) preparado conforme descrito por Porto; Almeida (2013). Para determinação da eficiência de intumescimento foi utilizado um

sistema adaptado do dispositivo Enslin-Neff (Figura 13) (HUNG, et al. 2014). Durante o procedimento, o funil foi vedado para evitar a evaporação do solvente. O perfil de intumescimento foi determinado pelo volume de meio absorvido (μL) por massa (mg) da amostra em função do tempo até que o volume absorvido se mantivesse constante após 3 leituras consecutivas (ponto de equilíbrio). Para avaliar o percentual de intumescimento a massa inicial e após o intumescimento dos *scaffolds* foram registradas.



Fonte: elaboração própria

5.2.14 Teor de umidade residual

O teor de umidade residual dos *scaffolds* Ch₂, Ch/NaAlg₄, Ch/NaAlg_B, Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,6) foi avaliado por gravimetria em balança analítica acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha (Shimadzu - MOC-63U, Kyoto, Japan). As condições de secagem foram mantidas em modo "slow", 60°C, variação de peso de 5%, e precisão de 0,001 g. Para os testes as amostras foram colocadas em cadinho de alumínio e expostas a radiação infravermelha até massa constante. Durante o tempo de secagem a posição das amostras dentro do cadinho foi alterada para uniformizar a secagem. O teor de umidade residual foi registrado.

5.2.15 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para caracterização termoanalítica foi analisado o perfil térmico dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) usando técnica DSC (Thermal Analyzer TA 60W - Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japan). Nas análises foi utilizado cadinho de alumínio hermeticamente fechado com aproximadamente 2 mg de amostra, como referência foi utilizado capsula vazia. Atmosfera do forno com gás nitrogênio e vazão dinâmica entre 20 – 50 mLmin⁻¹. Razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, na faixa de temperatura de 25 a 350 °C.

5.2.16 Espectroscopia Infravermelho (FTIR)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos da Ch, NaAlg, Hap e dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,4) e Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,6) foi realizada em Espectroscopia infravermelho com transformada de fourier (FTIR) (Shimadzu, FTIR IRAffinity-1S, Kyoto, Japan) usando modos de transmitância. A massa aproximadamente 2 mg da amostra foi misturada a 300 mg de KBr para formação da pastilha. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda 4000 a 400 cm⁻¹ após 160 varreduras, com resolução de 2 cm⁻¹. Os espectros foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos.

5.2.17 Viabilidade, proliferação celular e morfologia celular

Para análise da viabilidade e proliferação celular por brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram utilizadas células 3T3 (fibroblasto de ratos – ATCC[®] CL-173), obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BRJ:0017). As células foram descongeladas, colocadas em garrafas de cultura contendo meio Eagle modificado por Dubbecco (DMEM Gibco – Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, foram mantidas sob atmosfera controlada em incubadora de CO₂ (TECNAL – TE-399, Piracicaba, Brasil) a 37 °C e 5% de CO₂. Após o crescimento as células foram tripsinizadas e 100 µL de cultura foram transferidos para placas de 96 poços (0,5x10⁵ células/mL). Após 24 h as células estavam aderidas e o estudo foi iniciado. As células foram expostas a uma amostra (1 mm²) de *scaffold* (Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2),

Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)) distribuída em cada poço e, ao controle negativo. As placas permaneceram sob atmosfera controlada em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂; durante 24 e 96 h. O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS estéril. Uma alíquota de 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço. As placas permaneceram sob atmosfera controlada em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, durante 2 h. A solução de MTT foi retirada e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa permaneceu em repouso, durante 5 min e a leitura foi realizada em sistema Elisa (Robonik- Readwel Touch, Navi Mundai, India) e comprimento de onda de 450 a 540 nm. A avaliação da viabilidade celular foi realizada após 24 e 96 h de incubação. A análise da morfologia celular foi realizada por microscopia (Zeiss – Axio Vert.A1, Jena, Germany) e a captura das imagens das células foi realizada por fotografia (Nikon – Coolpix, São Paulo, Brasil) 24 e 96 h após incubação das células com os *scaffolds* e do controle negativo.

5.2.18 Bioatividade *in vitro*

A bioatividade do *scaffold* foi avaliada *in vitro* pela deposição da apatita na superfície dos poros. A deposição da apatita foi avaliada pelo aumento da espessura das paredes do *scaffold*. Para essa avaliação, foram selecionados os *scaffolds* contendo Ca²⁺ (Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)). Os *scaffolds* foram imersos em 35 mL de Fluido Corporal Simulado (SBF), preparada de acordo com Abe e colaboradores (1990) e mantido durante 14 dias a 37 °C. A espessura da parede dos *scaffold* foram determinadas por microtomógrafo X-Ray com scanner de alta resolução, com 28 mM pixel e tempo de integração de 1,7s. A fonte de raios-X aplicada foi de 34 keV de energia e 790 mA de corrente. O raio X foi filtrado através de filtro Al e as projeções foram adquiridas em uma faixa de 180° com um passo angular de 1° de rotação. Modelos virtuais em 3D representativos de várias regiões do *scaffold* foram criados, visualizados e registrados. Os dados foram tratados matematicamente pelo software CT Analyser v. 1.13.5.

5.2.19 Análise estatística

A determinação da significância das propriedades mecânicas da capacidade de intumescimento (%) expressos em média e desvio padrão para $n=3$ e viabilidade e proliferação celular $n=6$, foram realizadas pela análise de variância (ANOVA). Se detectada uma diferença significativa, num conjunto de dados, o teste Tukey foi utilizado para comparar as diferenças significativas entre os grupos. Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Características macroscópicas de integridade estrutural dos *scaffolds*

A Tabela 4 mostra os resultados ($n=3$) referentes a massa final dos *scaffolds*, massa de água eliminada, diâmetro, altura e aspectos físicos relacionados a integridade estrutural dos *scaffolds* Ch1-Ch3, NaAlg1 e NaAlg2, Ch/NaAlg1-Ch/NaAlg4, tratados com etanol 96% (v/v) (Ch2A, Ch/NaAlg2A e Ch/NaAlg4A) ou CaCl_2 0,2M (Ch/NaAlg2B Ch/NaAlg4B).

Tabela 4 - Resultado da avaliação física dos *scaffolds* ($n=3$)

Amostra	Massa após Liofilização (g)	Massa de água eliminada (g)	Diâmetro (mm)	Altura (mm)	Volume (cm^3)	Aspecto Físico
Ch1	0,23	2,84±0,03	7,0±0,57	7,0±0,29	1.246±0,23	(+)
Ch2	0,15	2,90±0,03	12,0±0,57	11,0±0,57	5.412±0,43	(+++)
Ch2A	-	-	7	6,0±0,93	871±0,09	(-)
Ch3	-	-	-	-	-	NF
NaAlg1	0,14	2,92	10,0±1,0	10,0±0,58	3.265±0,68	(+)
NaAlg2	0,13	2,92±0,04	7,0±0,58	7,0±0,29	1.246±0,29	(-)
Ch/NaAlg1	-	-	-	-	-	NF
Ch/NaAlg2	0,28±0,13	2,78±0,04	8,0±0,58	8,0±1,0	1.296±0,28	(++)
Ch/NaAlg2A	-	-	4,0±0,58*	4,0±0,58*	145±0,06	(-)
Ch/NaAlg2B	-	-	5,0±0,58**	4,0±0,10**	339±0,10	(+)
Ch/NaAlg3	-	-	-	-	-	NF
Ch/NaAlg4	0,14±0,14	2,91±0,01	11,0±1,0	14,0±0,58	5.192±0,22	(+++)
Ch/NaAlg4A	-	-	6,0±0,58*	6,0±0,58*	647±0,16	(-)
Ch/NaAlg4B	-	-	9,0**	11,0±0,58**	2.882±0,15	(+++)

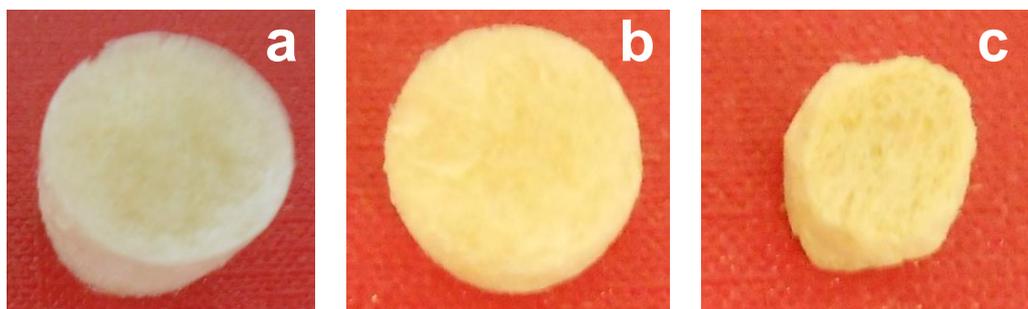
Ch – quitosana, NaAlg – alginato de sódio, (-) insatisfatório, (+) razoável, (++) satisfatório, (+++) ótima *Scaffolds* tratados com etanol (A) ou CaCl_2 (B). *Resultados obtidos após imersão em etanol,** Resultados obtidos após imersão em CaCl_2 . NF – não houve formação de *scaffold*.

Fonte: Elaboração própria

As formulações preparadas com Ch3, NaAlg2 e Ch/NaAlg3 não formaram *scaffolds*. Os *scaffolds* provenientes das formulações Ch1, NaAlg1 e Ch/NaAlg1 foram mecanicamente frágeis. Os *scaffolds* Ch2A, Ch/NaAlg2A, Ch/NaAlg4A e Ch/NaAlg2B perderam a porosidade após o tratamento com etanol 96% (v/v) ou CaCl_2 0,2M. Os resultados obtidos permitiram selecionar as formulações Ch2 (Figura 14–a), Ch/NaAlg4 (Figura 14–b) e Ch/NaAlg4B (Figura 14-c) para continuidade do estudo. A análise estrutural, como primeiro requisito de seleção dos *scaffolds*, foi

baseada na arquitetura e uniformidade estrutural, requisitos básicos necessários para que a estrutura tridimensional mantenha a integridade durante a formação do novo tecido (SUARÉZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

Figura 14 - Imagem fotográfica dos *scaffolds* Ch2 (a), Ch/NaAlg4 (b) e Ch/NaAlg4B (c)



Ch – quitosana, NaAlg – alginato de sódio

Fonte: Elaboração própria

A Tabela 5 mostra os resultados ($n=7$) referentes a massa final dos *scaffolds*, massa de água eliminada, diâmetro, altura e aspectos físicos relacionados à integridade estrutural da avaliação das dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). A incorporação da Hap na formulação NaAlg4 resultou em *scaffolds* com boas características macroscópicas e facilidade em remover do molde. A imagem fotográfica (Figura 15) do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) mostra a versatilidade para moldagem dos mesmos em diferentes formas.

Tabela 5 - Características dimensionais, de massa e volume (cm^3) dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=7$)

<i>Scaffold</i>	Massa após Liofilização (g)	Massa de água eliminada (g)	Diâmetro (mm)	Altura (mm)	Volume (cm^3)
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2)	0,20	2,84±0,02	15,0	16,0±0,04	2.870
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)	0,19	2,88±0,02	15,0	15,0±0,16	2.667
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	0,20	2,84±0,02	15,0	16,0±0,04	2.810

Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

Figura 15 – Imagem fotográfica do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) em diferentes formas



Ch – quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita
 Fonte: Elaboração própria

As matérias primas escolhidas (NaAlg e Ch) apresentam como vantagem o uso de água para obtenção das dispersões poliméricas. Desta forma, oferece proteção ao tecido orgânico adjacente ao *scaffold* e suporte favorável à adesão celular pela presença de grupamentos amino protonados (NH_3^+) oriundas da Ch (LI et al., 2005). O AL oferece fácil controle para formação de uma estrutura tridimensional capaz de formar um novo tecido, devido a semelhança com a MEC (LANGER; VACANTI, 1993) e possui características osteoindutivos capazes de beneficiar a regeneração do tecido ósseo (LIN; YEH, 2004). A incorporação da Hap favorece o crescimento de osteoblastos e funciona como uma reserva de Ca^{2+} e P e (TAZI et al., 2012). *Scaffold* contendo Ch e Hap aumentaram significativamente o crescimento de células osteoblásticas (DOROZHKIN, 2010).

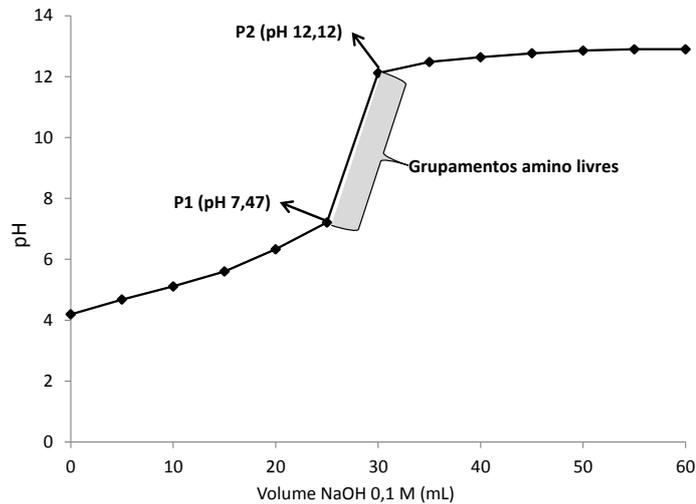
Com a finalidade de entender o mecanismo de formação dos *scaffolds* foi determinado o grau de desacetilação da Ch (média massa molar) e propriedades viscoelásticas das dispersões de Ch2 4% (m/v), NaAlg1 4% (m/v), Ch/NaAlg4 2% (m/v), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6).

6.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (média massa molar)

Na Figura 16 o primeiro e o segundo ponto de inflexão (P1 e P2) foram obtidos, respectivamente, em valor de pH 7,47 e 12,12. O volume de NaOH utilizado para alcançar os pontos de inflexão (P1 e P2) foi utilizado na equação 1 para calcular o percentual do grau de desacetilação (%GD) da Ch. O resultado mostra

que o *GD* foi aproximadamente 81%, correspondente aos grupamentos NH_2 livres na estrutura molecular de Ch. O resultado está em acordo com o laudo do fornecedor que indicava um grau de desacetilação entre 75 e 85%.

Figura 16 - Curva potenciométrica da quitosana (média massa molar) ($n=3$)



Fonte: Elaboração própria

A titulação potenciométrica é um método robusto para determinação do grau de desacetilação de Ch (HIDALGO; SUÁREZ; FERNÁNDEZ, 2008). A construção da curva potenciométrica permitiu a determinação dos pontos de inflexão P1 e P2, sendo P1 correspondente a massa de NaOH 0,1M necessário para neutralização do pH ácido (7,47) e P2 correspondente a massa NaOH necessária para reagir com os H^+ livres dos grupamentos NH_2 (pH 12,12). O *GD* acima de 50% diferencia a Ch da quitina e influencia tanto as propriedades biológicas como as físico-químicas (WU; ZIVANOVIC, 2008).

6.3 Medida da viscosidade e comportamento viscoelástico

A Tabela 6 mostra a viscosidade das formulações (Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4); Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)) obtida com a melhor relação entre o *spindle* e a velocidade de rotação (rpm). A viscosidade de uma dispersão polimérica mede a resistência interna oferecida ao movimento relativo de diferentes partes desse fluido. A distribuição de tamanho das macromoléculas, concentração do polímero, número de conformações estruturais, massa molar e a possibilidade de emaranhamentos temporários das cadeias

poliméricas, são os responsáveis pelas diferenças de viscosidade (CASSU; FELISBERTI, 2005).

Tabela 6 - Viscosidade (cP) das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=3$)

Formulação	Spindle	Velocidade de rotação (rpm)	Viscosidade (cP)
Ch2	SC4-29	20	24.083±0,03
NaAlg1	RV3	20	700±0,01
Ch/NaAlg4	SC4-28	100	2.436±0,03
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2)	SC4-29	1	732.666±1,17
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)	SC4-29	10	652.000±9,64
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	SC4-29	5	104.666±0,58

Ch – quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

A viscosidade obtida pelas formulações Ch2 e NaAlg1, estão de acordo com o esperado, visto que a Ch é de média massa molar e o NaAlg de baixa viscosidade. A formulação Ch/NaAlg4 foi obtida pela incorporação da dispersão de Ch2 na dispersão de NaAlg1, essa mistura resultou na complexação espontânea dos grupamentos carboxílicos (COO^-) (aniônicos) do NaAlg com os grupamentos NH_3^+ (catiônicos) da Ch.

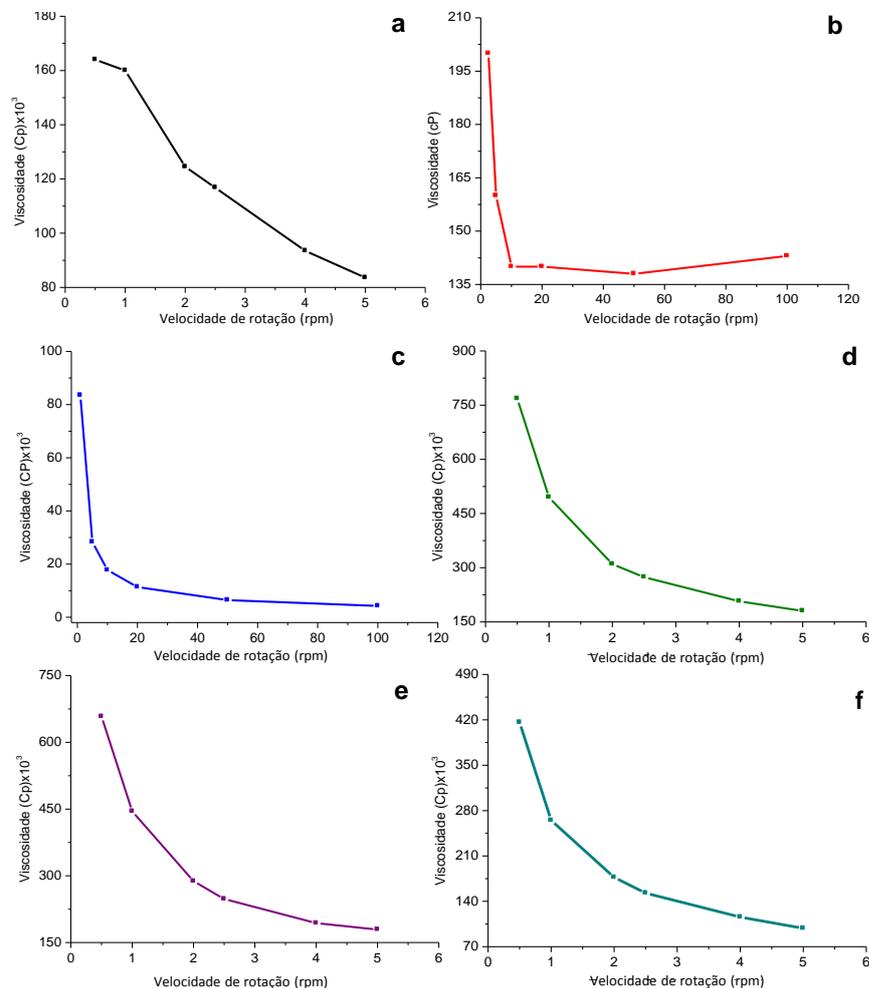
A baixa densidade das cargas dos polieletrólitos distribuídas ao longo da cadeia polimérica interfere na formação dos complexos catiônicos-aniônicos (HAMMAM, 2010), e conseqüentemente na viscosidade das formulações contendo compostos de carga elétrica diferente. A formulação Ch/NaAlg4 demonstrou uma redução da viscosidade, provavelmente ocasionada pela razão entre a massa molar do NaAlg em relação a massa molar da Ch. Desta forma, os grupamentos COO^- disponíveis não foram suficientes para interagir com todos os grupamentos NH_3^+ da Ch.

A viscosidade das formulações Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4); Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) foi decrescente em função do aumento da concentração de Hap (Tabela 6). Elhendawi e colaboradores (2014), observaram que a redução das interações intermoleculares, entre os grupos NH_3^+ da Ch com os contra-íons HPO_4^{2-} da Hap, ocorreu com o aumento da concentração de Hap na formulação, resultando na redução da viscosidade.

A Figura 17 (a-f) mostra a medida da viscosidade (cP) das formulações Ch2, NaAlg1, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4);

Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) em função da velocidade de rotação (rpm). A análise dos resultados mostra que a viscosidade diminuiu em função do aumento da velocidade de rotação para todas as formulações. Os resultados evidenciaram um sistema não-Newtoniano, de comportamento pseudoplástico também chamado de “shear-thinning”, resultante da orientação sistemática das ligações químicas assimétricas em direção do fluxo provocado pelo gradiente de velocidade (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Figura 17 - Medida da viscosidade (cP) em função da velocidade de rotação (rpm) das formulações Ch2 (a), NaAlg1 (b) Ch/NaAlg4 (c), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (d), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (e) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (f) ($n=3$)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

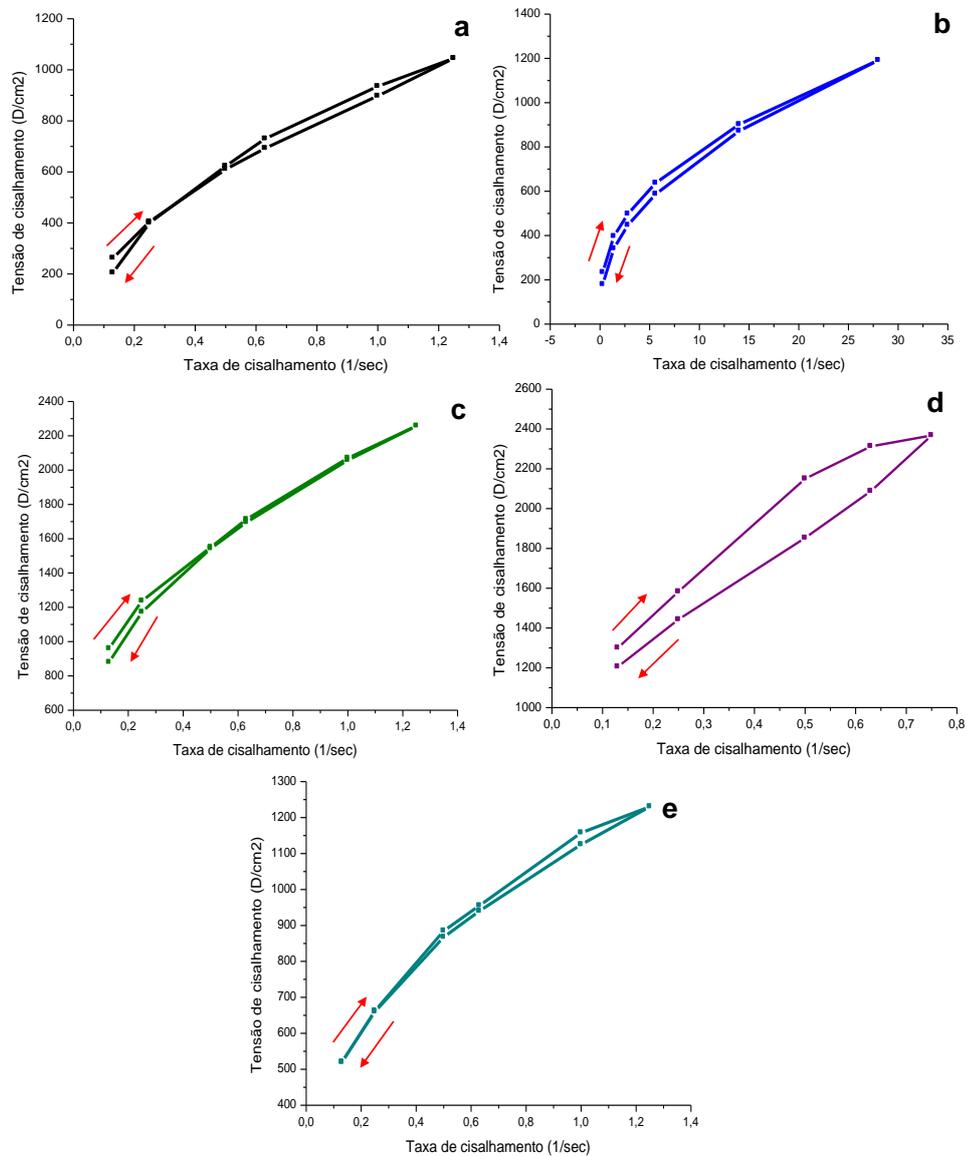
Fonte: Elaboração própria

A Figura 18 (painéis a-e) mostra o comportamento viscoelástico das formulações Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4); Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). Em condições estáticas, a viscosidade e as conformações estruturais estão em equilíbrio.

A característica de elasticidade de um polímero é avaliada pelo equilíbrio entre as moléculas, quando esse equilíbrio é interrompido pela aplicação de uma força externa, as interações intermoleculares são reduzidas, promovendo um relaxamento das cadeias poliméricas e diminuição da viscosidade. A diminuição da força externa, recupera as propriedades coesivas das dispersões coloidais, caracterizando a tixotropia da dispersão polimérica (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Os resultados observados na Figura 18 (painéis a-e) mostra um comportamento viscoelástico tixotrópico para as formulações Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4); Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). A capacidade de reversibilidade das formulações contribui para as aplicações de moldagem, extrusão, ou preparação de *scaffolds* e sistemas de liberação controlada (WANG et al., 2011)

Figura 18 - Determinação do comportamento viscoelástico (tensão de cisalhamento (D/cm²) em função da taxa de cisalhamento (1/sec)) das formulações Ch2 (a), Ch/NaAlg4 (b), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (c), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (d) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (e) (*n*=3)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

6.4 Porosidade, interconectividade e tamanho dos poros

A Tabela 7 mostra a porosidade (%), poros fechados (%), poros abertos (%), volume de poros abertos (mm⁻³) e volume total de poros (mm⁻³) dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). O volume de poros abertos representa a interconectividade entre os poros dos *scaffolds*, as quais estão relacionadas ao percentual de poros fechados/abertos e o volume total de poros (mm⁻³). O resultado da porosidade obtido por μ CT variou entre 88 e 98% e a interconectividade dos

poros variou entre 23,67 e 35,55 mm⁻³. A porosidade pode ser definida como uma porcentagem de espaços vazios em estruturas sólidas (DOROZHKIN, 2010). Nos *scaffolds* a porosidade aumenta a área de superfície, aumenta o espaço para fixação das células e favorece a ligação química entre o *scaffold* e o tecido adjacente. Do ponto de vista estrutural, um alto grau de porosidade é responsável pela regulação da bioatividade dos *scaffolds*, pois influencia diretamente a permeabilidade estrutural, responsável por controlar a velocidade inicial da regeneração tecidual (DOROZHKIN, 2010).

Tabela 7 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm⁻³), poros abertos (%) e volume total de poros (mm⁻³) dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)

Propriedades	Ch2	Ch/NaAlg4	Ch/NaAlg4B	Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2)	Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)	Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)
Porosidade (%)	88	91	88	97	97	98
Poros fechados (%)	0,28	0,00	0,20	0,02	0,03	0,01
Volume de poros abertos (mm ⁻³)	32,64	30,77	29,6	34,1	23,67	35,55
Poros abertos (%)	88	91	88	97	97	98
Volume total de poros (mm ⁻³)	32,66	30,78	29,61	34,1	23,67	35,55

Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

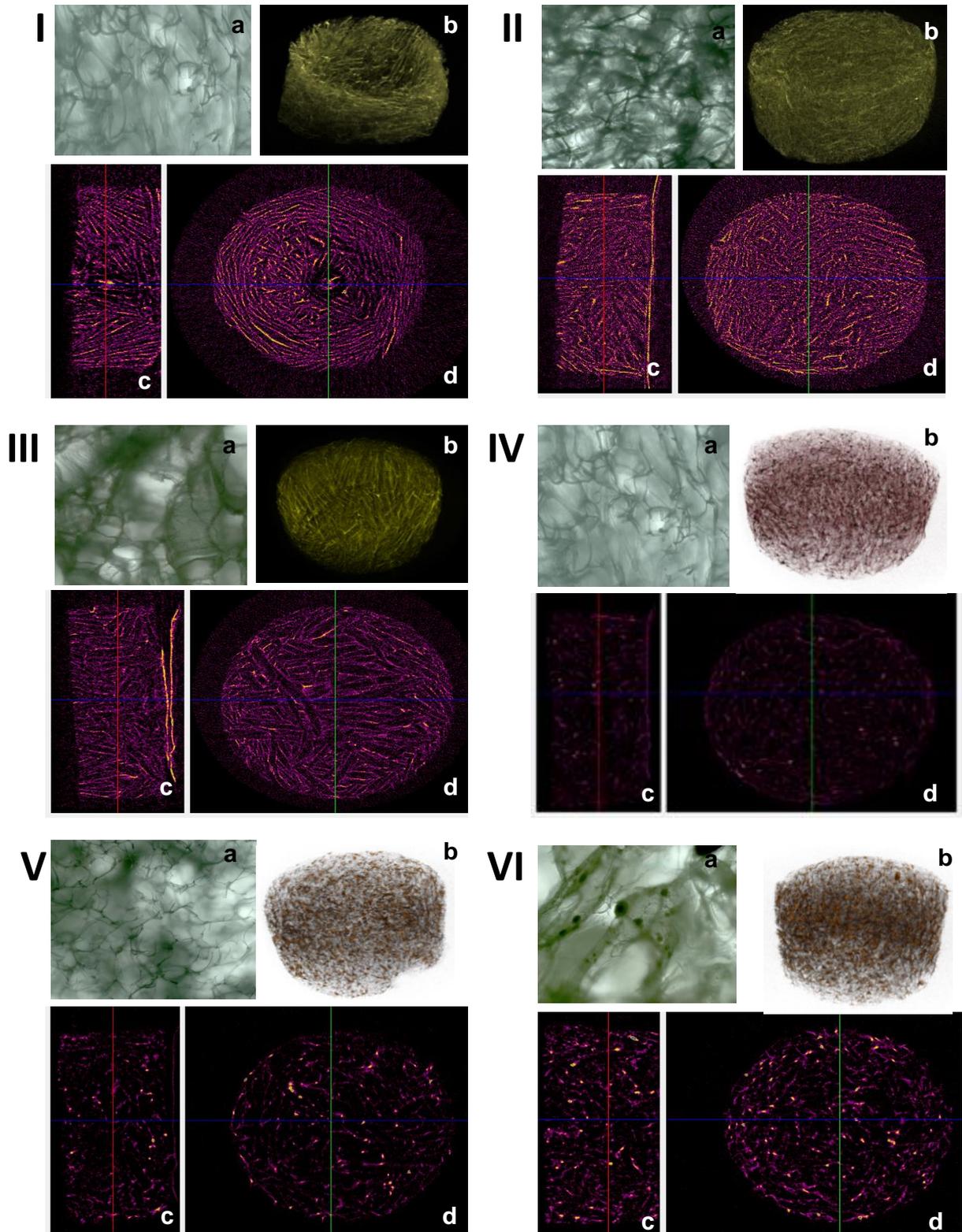
Fonte: Elaboração própria

A interconectividade dos poros formada pelo volume de poros abertos proporciona um microambiente hidrodinâmico favorável à infiltração de células e vasos sanguíneos, difusão fisiológica de oxigênio e nutrientes para proliferação de células, eliminação dos metabólitos e dos subprodutos que adentram nos poros. Estas características facilitam a deposição da nova matriz extracelular nos espaços de interconecção entre poros (TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005).

A Figura 19 (I-VI) mostra as imagens dos *scaffolds* Ch2 (I a-d), Ch/NaAlg4 (II a-d), Ch/NaAlg4B (III a-d), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV a-d), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V a-d) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI a-d). O painel “a” da figura obtida por microscopia óptica mostra a superfície dos *scaffolds* em 2 dimensões (2D). Os painéis de “b-d” foram obtidas em 3 dimensões (3D) por μ CT e representam os *scaffolds* (b), os cortes transversais (c) e os cortes longitudinais (d). Os espaços vazios dos *scaffold* Ch2 observados na figura 19I (b-d) são representativos de estruturas lamelares e não de poros. Nas imagens dos *scaffolds* de Ch/NaAlg4 (19II

b-d) e Ch/NaAlg4B (19III b-d) é possível observar uma diferença entre a densidade das paredes formadas pelas cadeias poliméricas após a imersão em CaCl_2 0,2M (Ch/NaAlg4B), redução da porosidade e da interconectividade entre os poros (Tabela 8). O aumento da densidade das paredes do *scaffold* Ch/NaAlg4B ocorre devido a migração dos íons de Ca^{2+} para a cadeia polimérica do NaAlg. Esse fenômeno de migração pode ser explicado, conforme descrito por Hammam (2010), pela mudança na estrutura linear na cadeia polimérica do NaAlg. A presença de Ca^{2+} foi confirmada por fluorescência de Raios-X (Figura 23). O aumento da densidade das paredes poliméricas dos *scaffolds* contendo Hap também pode ser observado na Figura 19 IV-VI (b-d). A interação química de Hap com grupamentos COO^- do NaAlg (SUARÉZ-GONZÁLES et al., 2010) e grupamentos NH_2 e hidroxilas (OH) da Ch resultam na nucleação dos cristais de Hap (DOROZHKIN, 2010). A Figura 20 mostra a Hap incorporada na matriz do *scaffold* de Ch/NaAlg4.

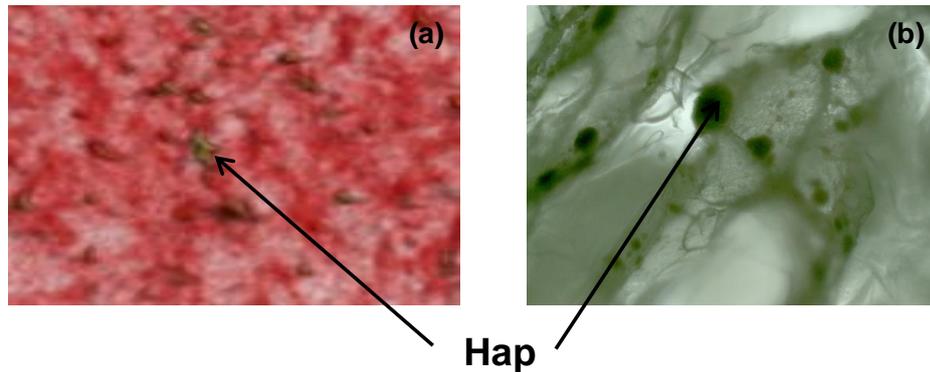
Figura 19 - Imagens dos *scaffolds* Ch2 (I), NaAlg4 (II), NaAlg4B (III), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI). Imagens fotomicrográficas-2D da superfície dos *scaffolds* (a), Imagens μ CT-3 D: *scaffold* (b), corte transversal (c) e corte longitudinal (d)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

Figura 20 – Incorporação da Hap à matriz polimérica (Ch/NaAlg4) do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) Imagens μ CT-3D (a) e fotomicrografia-2D (b)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita
 Fonte: Elaboração própria

A variação de porosidade entre os *scaffolds*, assim como a densidade das paredes está, provavelmente, relacionada às interações intermoleculares entre os biomateriais e tratamento posterior com CaCl_2 0,2M ou incorporação de Hap. Hsieh e colaboradores (2010) observaram que a porosidade diminuiu em função do aumento da concentração e da velocidade de homogeneização em *scaffolds* de Ch. O tratamento com CaCl_2 diminuiu a porosidade e a interconectividade entre os poros. Resultado semelhante foi obtido por Hana e colaboradores (2010) com redução de 90 para 79% de porosidade em *scaffolds* compostos por NaAlg e Hap. Os *scaffolds* contendo Hap apresentaram maior porosidade (97-98%) que os *scaffolds* sem Hap. A proporção de Hap nas formulações não alterou a porosidade. No entanto a interconectividade entre os poros foi reduzida para o *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4).

O potencial zeta da Hap foi de -12,47mV enquanto o potencial zeta das formulações Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) foi, respectivamente, de +32,80 mV, +27,93 mV e +29,66 mV, esses resultados confirmam a nucleação da Hap na rede polimérica Ch-NaAlg.

A Figura 21 mostra a relação entre percentual frequência (%) em função do raio (μm) dos poros (painel a) dos *scaffold* as imagens escaneadas (μ CT) representando a porção de massa e de poros dos *scaffolds* (painel b). O tamanho e a polidispersidade dos poros foi calculado matematicamente pelo software CTVox – versão 2.6 e CTan – versão 1.13.5. Nesse cálculo são contabilizados os espaços vazios encontrados e dimensionado o raio (μm). O raio dos poros para os *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e

Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) variou respectivamente entre 25-600 μm , 25-350 μm , 25-350 μm , 25-900 μm , 25-1050 μm e 25-1425 μm . Jin e colaboradores (2012) observaram uma redução do tamanho dos poros com o aumento da concentração de Hap em *scaffold* de Ch/NaAlg4/Hap. A análise dos resultados apresentados na Figura 21 (painel a) mostra que a polidispersão dos poros foi maior nos *scaffolds* contendo Hap e menor no *scaffold* tratado com CaCl_2 (Ch/NaAlg4B). A incorporação da Hap causou um aumento na polidispersão na faixa entre micro e miliporos. Li e colaboradores (2005), obteve tamanho de poros entre 100-300 μm em *scaffolds* de Ch (4,8% m/v) e Ch/NaAlg (4,8% m/v), em nossos resultados o tamanho dos poros para *scaffold* Ch2 (4% m/v) e Ch/NaAlg4 (2% m/v) foi, respectivamente, de 25-600 μm e 25-350 μm .

A polidispersão dos poros nos *scaffolds* está diretamente relacionada com a modulação do crescimento celular. A microporosidade 100-200 μm proporciona um espaço para arranjo de células entre 10-30 μm , que migram do tecido adjacente para o interior do *scaffold*. Poros com aproximadamente 200 μm favorecem a migração de células mesênquimais. Poros >100 μm aumentam a capacidade de colonização das células e contribui para a modulação celular que dá início o processo de diferenciação celular (DOROZHKIN, 2010; VENKATESAN; KIM, 2010).

Figura 21 - Relação entre a frequência (%) e o raio (μm) dos poros (a) e imagens escaneadas μCT (b) dos scaffolds Ch2 (I), Ch/NaAlg4 (II), Ch/NaAlg4B (III), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI). Continua

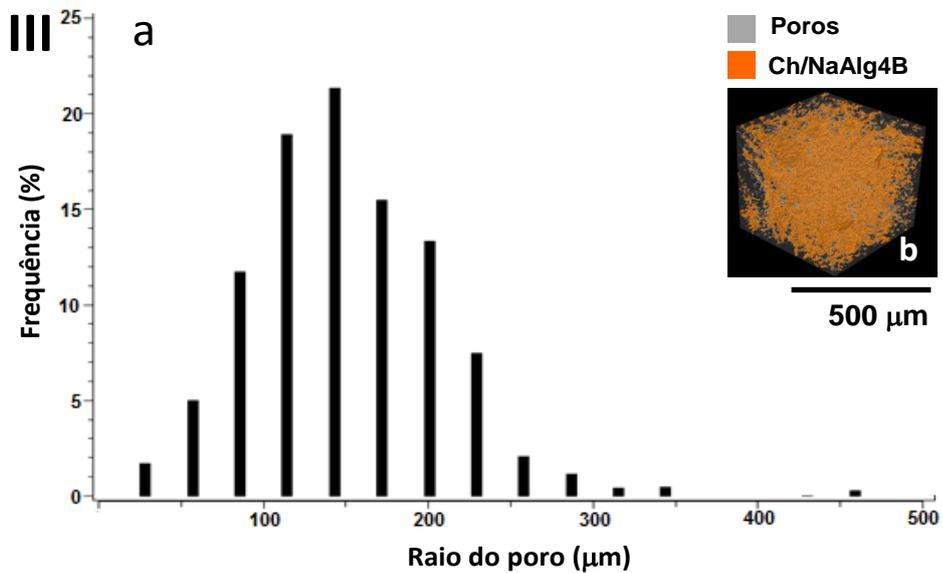
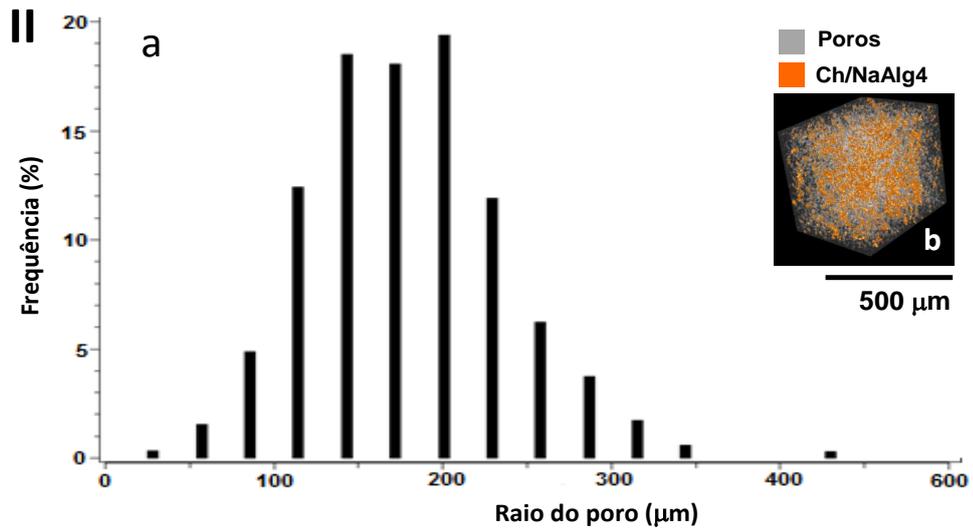
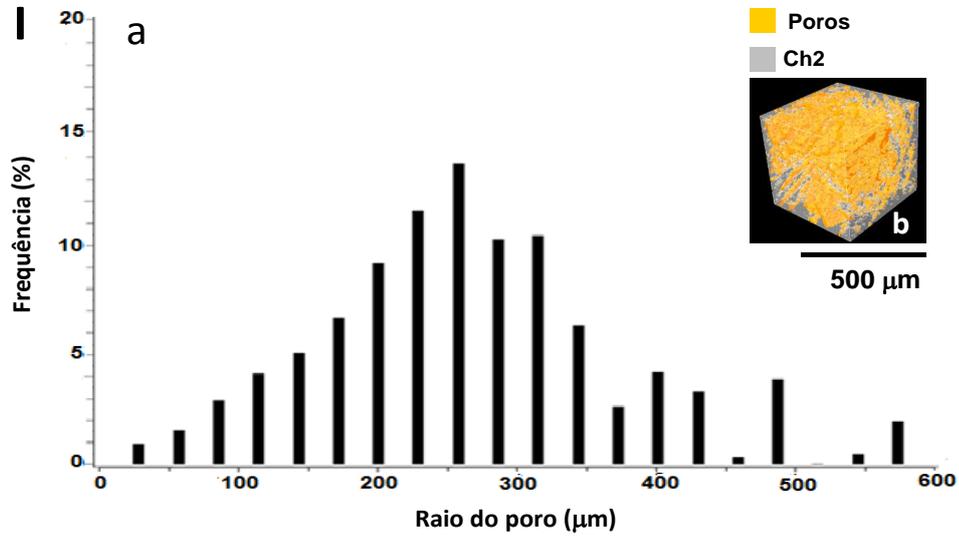
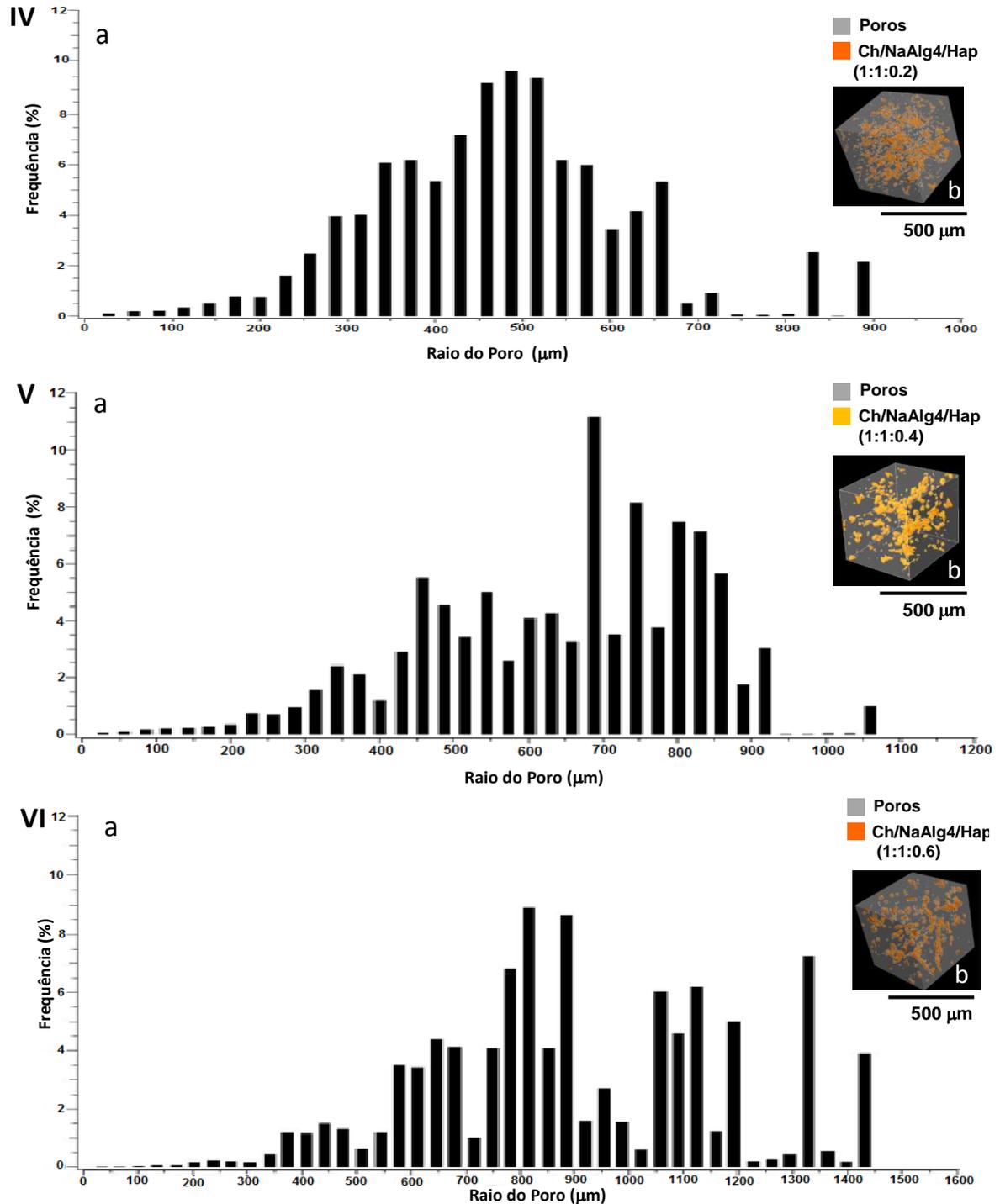


Figura 21 - Relação entre a frequência (%) e o raio (μm) dos poros (a) e imagens escaneadas μCT (b) dos scaffolds Ch2 (I), Ch/NaAlg4 (II), Ch/NaAlg4B (III), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (IV), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (V) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (VI).



;

Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

6.5 Propriedades mecânicas

A avaliação das propriedades de resistência mecânica dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) à tração e perfuração, flexibilidade e elasticidade, são apresentados na Tabela 8 e Figura 22. As propriedades mecânicas de um material são avaliadas a partir da aplicação de uma deformação ou de tensão. Quando uma tensão ou deformação é constante, os ensaios são classificados como estáticos (CASSU; FELISBERTI, 2005).

Tabela 8 - Propriedades mecânicas dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) ($n=3$)

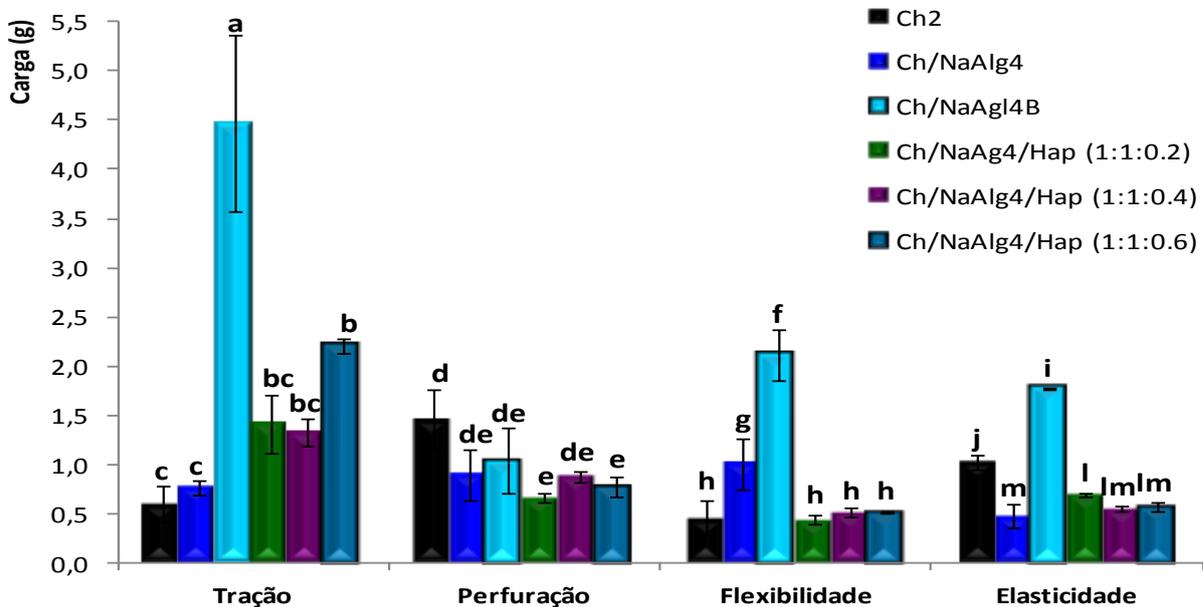
Scaffolds	T (Kg s⁻¹)	P (Kg s⁻¹)	F (Kg s⁻¹)	E (Kg s⁻¹)
Ch2	0,60 ± 0,18	1,45 ± 0,30	0,46 ± 0,17	1,03 ± 0,08
Ch/NaAlg4	0,76 ± 0,07	0,89 ± 0,26	1,01 ± 0,26	0,48 ± 0,11
Ch/NaAlg4B	4,47 ± 0,89	1,04 ± 0,33	2,11 ± 0,25	1,78 ± 0,01
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2)	1,41 ± 0,30	0,66 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,69 ± 0,01
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)	1,33 ± 0,14	0,88 ± 0,06	0,51 ± 0,05	0,55 ± 0,03
Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)	2,21 ± 0,07	0,77 ± 0,10	0,51 ± 0,01	0,57 ± 0,05

Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

P – perfuração, T – tração, F – flexibilidade, E – elasticidade

Fonte: Elaboração própria

Figura 22 - Ensaio de propriedades mecânicas de tração, perfuração, flexibilidade e elasticidade dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$).



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

As propriedades mecânicas representam um papel importante nos *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo. O comportamento durante a tração (alongamento) é um parâmetro importante para definir a resistência mecânica dos *scaffolds* para regeneração óssea (LI et al., 2005).

A Tabela 8 e Figura 22 mostram que os *scaffolds* Ch/NaAlg4B conferiram maior resistência durante a alongamento e ruptura ($4,47 \pm 0,9$ kg/seg). A ruptura envolve a quebra das ligações entre as cadeias poliméricas, o resultado apresentado pelo *scaffold* Ch/NaAlg4B é justificado pela reticulação das cadeias poliméricas do NaAlg com Ca^{2+} . A ligação cruzada proporciona ao *scaffold* maior imobilidade das cadeias poliméricas e conseqüente aumento da resistência para ruptura (KONG; LEEA, 2002). Os resultados mostram uma diferença na resistência à alongamento e ruptura para os *scaffolds* contendo Hap. No entanto, essa diferença não é estatisticamente significativa ($p>0,05$), mostrando que o aumento na concentração de Hap não altera a resistência à alongamento e ruptura. Os *scaffolds* de Ch-Ch/NaAlg4-Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4), embora apresentem valores absolutos

diferentes de resistência à elongação e ruptura não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A análise estatística do ensaio de resistência mecânica dos *scaffolds* à perfuração (Tabela 8 – Figura 22) mostra que há diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os *scaffolds* de Ch2, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e entre os demais *scaffolds* não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na resistência à perfuração. A formação de estrutura laminar dos *scaffolds* Ch2, ao invés de poros, conferiu a estrutura do *scaffold* uma maior resistência à perfuração. Esse resultado pode ser explicado pela continuidade das cadeias poliméricas de Ch, outro fator que contribui para esse resultado é a massa molar da Ch utilizada, que contribui para o aumento da resistência mecânica. (VENKATESAN; KIM, 2010). A diferença na resistência à perfuração apresentada pelos *scaffolds* também pode ser atribuída à porosidade, pois os *scaffolds* contendo Hap apresentaram porosidade semelhante (97-98%) e igual resistência à perfuração. Os *scaffolds* de menor porosidade (Ch2, Ch/NaAlg4 e Ch/NaAlg4B) apresentaram maior resistência mecânica em números absolutos.

No ensaio de flexibilidade (Tabela 8 – Figura 22) os resultados mostram uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os *scaffolds* Ch/NaAlg4 e Ch/NaAlg4B com os demais *scaffolds*. No entanto, nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) foi observada entre os *scaffolds* de Ch2, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). A análise dos resultados mostra que o tratamento com CaCl_2 melhora significativamente a flexibilidade dos *scaffolds* de Ch/NaAlg4. Esses resultados podem ser explicados pela formação de uma rede tridimensional de NaAlg que melhora as propriedades de relaxação das cadeias poliméricas (HAMMAM, 2010).

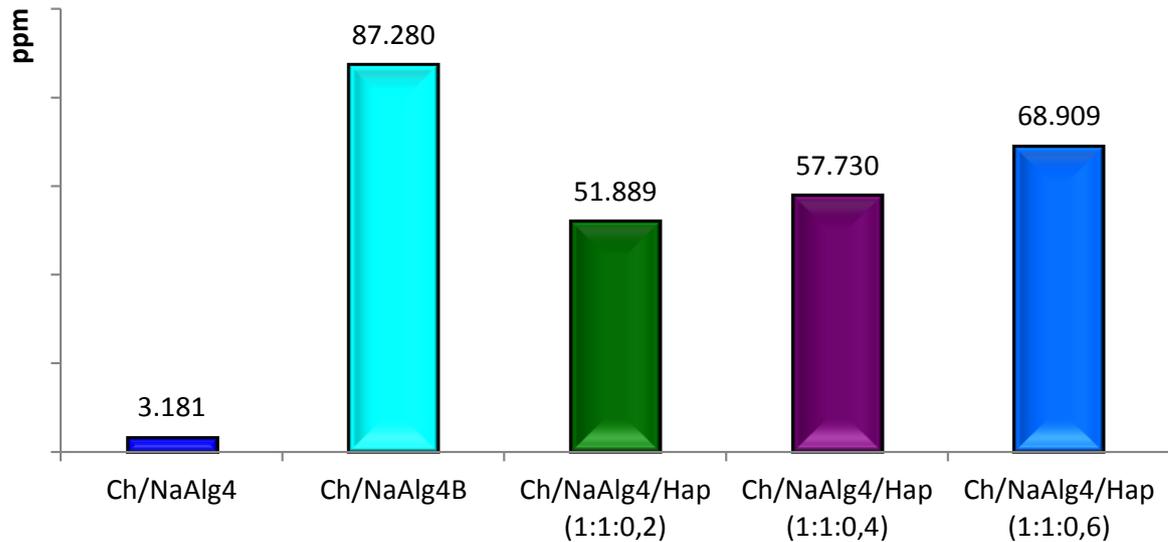
O ensaio de elasticidade mede a capacidade do *scaffold* retornar ao seu formato original após a aplicação de uma determinada tensão. A Tabela 8 e Figura 22 mostram o resultado da resistência dos *scaffolds* à elasticidade (resiliência). A análise dos resultados mostra uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os *scaffolds* Ch2 e Ch/NaAlg4B com os demais *scaffolds*. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os *scaffolds* de Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). A diferença na concentração de Hap não altera as propriedades mecânicas de elasticidade entre os *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap.

A resiliência é um conceito referente à propriedade de que são dotados alguns materiais de acumular energia quando submetido a um estresse sem ocorrer ruptura. De forma geral é a capacidade que o material tem em absorver energia quando é deformado elasticamente, podendo ou não haver uma deformação residual causada pela histerese do material. Acima de certa tensão, os materiais começam a se deformar elasticamente, ou seja, ocorrem deformações permanentes. O ponto no qual estas deformações permanentes começam a se tornar significativas é chamado de limite de escoamento ou limite de cedência. A magnitude dos limites de escoamento é a medida da resistência do material à deformação plástica. Durante a deformação plástica, a tensão necessária para continuar a deformar um material aumenta até um ponto máximo, chamado de limite de resistência à tração. Isto corresponde à maior tensão que o material pode resistir, se esta tensão for aplicada e mantida o resultado será ruptura ou fratura (limite de ruptura) (ALMEIDA et al., 2014)

6.6 Determinação do teor de íons de Cálcio

O teor de íons Ca^{2+} nos *scaffolds* presente nas formulações foi quantificado (ppm) por fluorescência de raios-X e é apresentado na Figura 23. A análise dos resultados mostra a presença de Ca^{2+} em todas as formulações avaliadas. O teor de Ca^{2+} é maior no *scaffold* tratado com CaCl_2 (Ch/NaAlg4B). O teor de Ca^{2+} incorporado na forma de Hap aumenta com a massa de Hap adicionada. No entanto, essa correlação não é diretamente proporcional. Embora a massa de Ca^{2+} incorporada pela imersão do *scaffold* em CaCl_2 0,02 M seja menor que a massa de Ca^{2+} nas formulações de Hap, o teor de Ca^{2+} fixado no *scaffold* Ch/NaAlg4B foi, respectivamente, 1,68, 1,51 e 1,27 vezes maior que nos *scaffolds* de Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). No entanto, a incorporação de Hap, acrescenta além do Ca^{2+} , fósforo (P) à formulação (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). A presença desses dois elementos químicos nos *scaffolds* é uma vantagem para a regeneração do tecido ósseo (MOHAMED, 2008). A presença de Ca^{2+} livre na formulação sugere uma influência mais significativa desse elemento na resistência mecânica dos *scaffolds*.

Figura 23 - Quantificação de íons de Ca^{2+} nos *scaffolds* Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6).



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

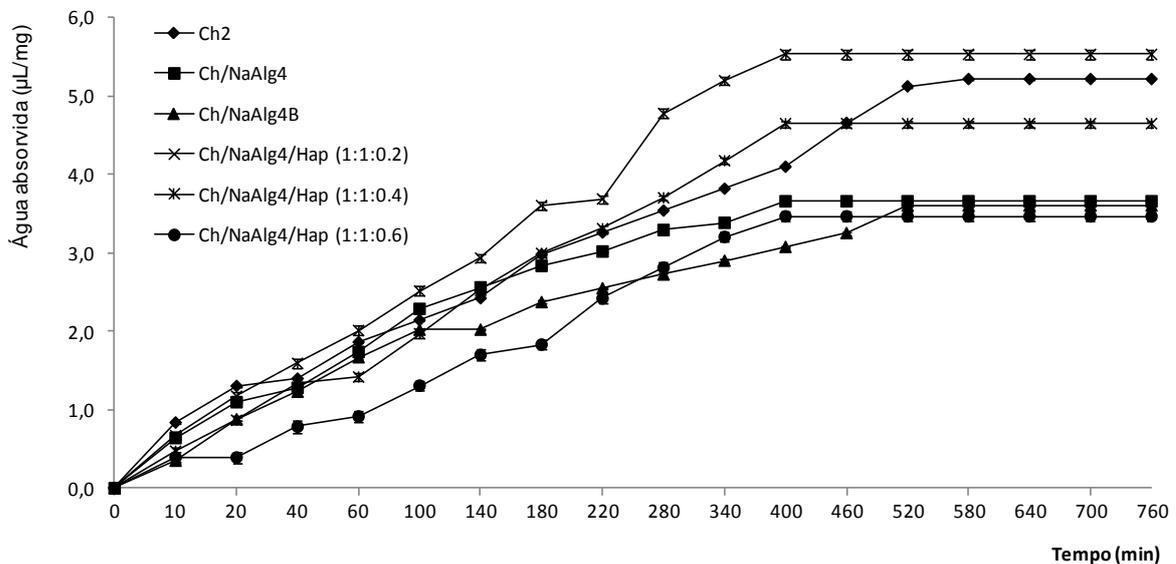
Fonte: Elaboração própria

6.7 Eficiência de intumescimento dos *scaffolds*

A hidrofiliabilidade da superfície do *scaffold* é um fator importante para a biocompatibilidade do material com a MEC adjacente. A hidrofiliabilidade do *scaffold* facilita a penetração dos nutrientes para seu interior, influencia a adesão, divisão, proliferação celular (LI et al., 2005). O intumescimento de um polímero é dependente do grau de interação entre as moléculas do polímero e do solvente (AOUADA et al., 2009)

As Figuras 24–27 mostram a relação do volume de meio absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$) pelos *scaffolds* em função do tempo. O estudo de intumescimento foi realizado em água e soluções de HCl 0,01M, NaOH 0,01M e FSS. A Figura 24 mostra o volume de água absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$), durante 760 min. Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e Ch/NaAlg4 foi alcançado em 400 min. O equilíbrio hidrofílico do *scaffold* de Ch₂ e Ch/NaAlg4B foi alcançado após 520 min. No tempo de saturação de cada *scaffold* a capacidade de intumescimento obedeceu a seguinte ordem Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) > Ch₂ > Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4). Para os demais *scaffolds* não houve diferença na quantidade de água absorvida no tempo de saturação.

Figura 24 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$) em Água ($n=3$)

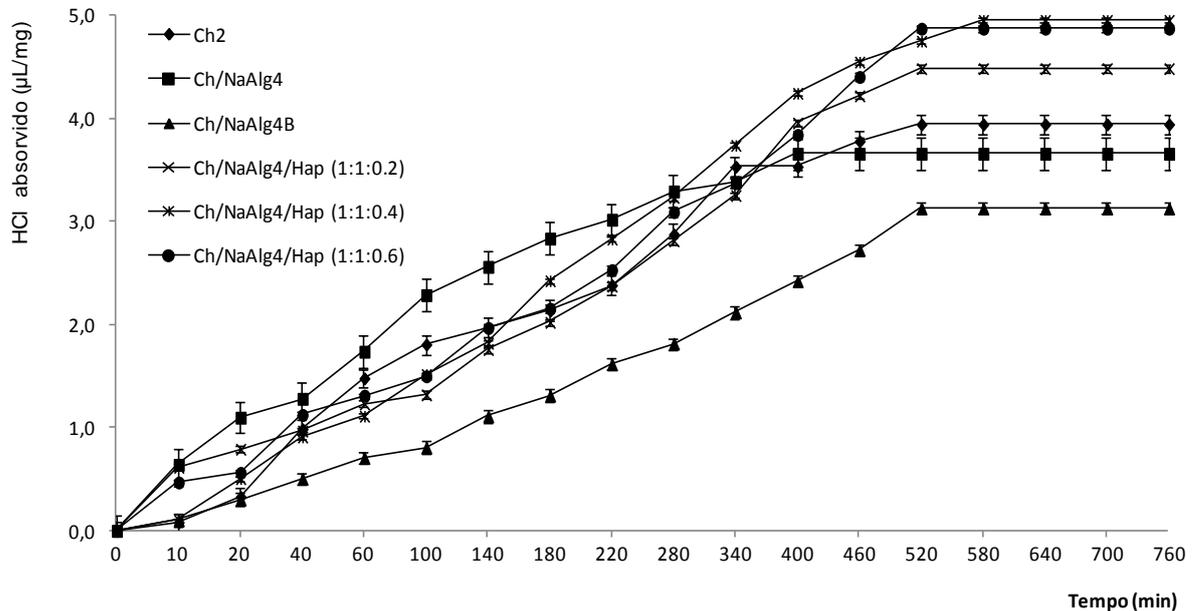


Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

A Figura 25 mostra o volume de HCl 0,01M (pH 4,4) absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$), durante 760 min. Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) foi alcançado após 580 min. O equilíbrio hidrofílico dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e Ch/NaAlg4B foi alcançado após 520 min, enquanto para os *scaffolds* Ch/NaAlg4 e Ch2 o tempo foi, respectivamente, de 400 e 520 min. No tempo de saturação não houve diferença na capacidade de intumescimento para os *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4). O volume de solução de HCl 0,01M (pH 4,4) absorvida pelos *scaffolds* de Ch/NaAlg4 e Ch2 foram semelhantes. O *scaffold* de Ch/NaAlg4B foi o que apresentou a menor capacidade de intumescimento em meio ácido.

Figura 25 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$) em HCl 0,01M (pH 4,4) ($n=3$)

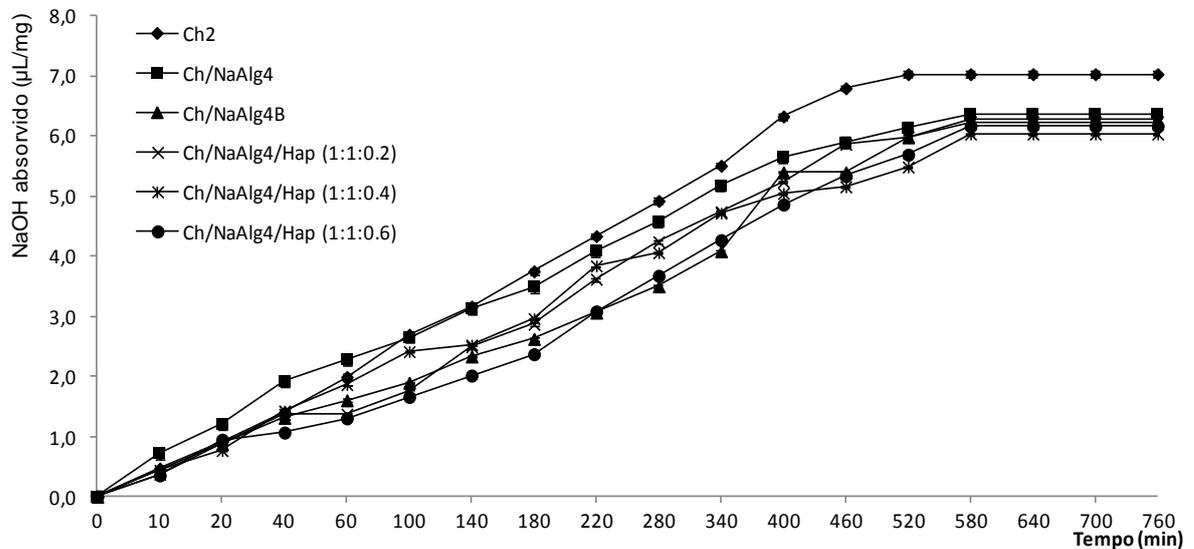


Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

A Figura 26 mostra o volume de NaOH 0,01M (pH 9,8) absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$), durante 760 min. Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico do *scaffold* Ch2 foi alcançado em 520 min e os demais após 580 min. No tempo de saturação o *scaffold* Ch2 apresentou a maior capacidade de intumescimento. Não houve diferença na capacidade de intumescimento dos demais *scaffolds* no meio alcalino. Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4). O volume da solução de NaOH 0,01M (pH 9,8) absorvida pelos *scaffolds* de Ch/NaAlg4 e Ch2 foram semelhantes. O *scaffold* de Ch/NaAlg4B foi o que apresentou a menor capacidade de intumescimento em meio alcalino.

Figura 26 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$) em NaOH 0,01M (pH 9,8) ($n=3$)

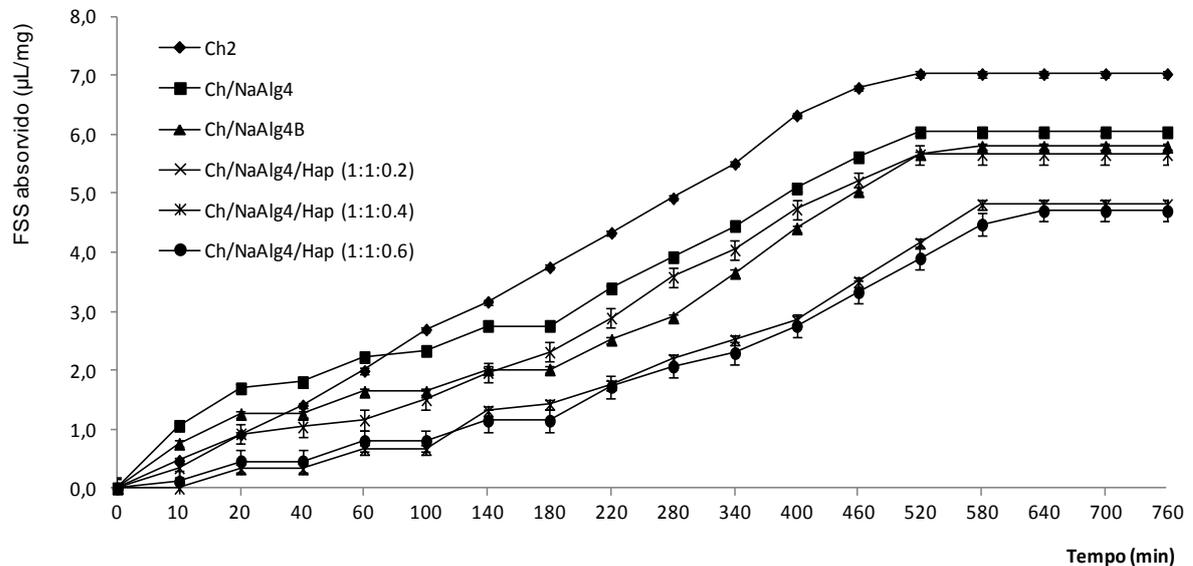


Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

A Figura 27 mostra o volume de FSS (pH 6,9) absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$), durante 760 min. Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico dos *scaffold* Ch2, Ch/NaAlg4 foi alcançado em 520 min, enquanto que para o *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) o tempo foi de 640 min e os demais após 580 min. No tempo de saturação o *scaffold* Ch2 apresentou maior capacidade de intumescimento na presença de eletrólitos seguido pelos *scaffolds* de Ch/NaAlg4 e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), bem como entre os *scaffolds* de Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6).

Figura 27 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) em FSS (pH 6,9) ($n=3$)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

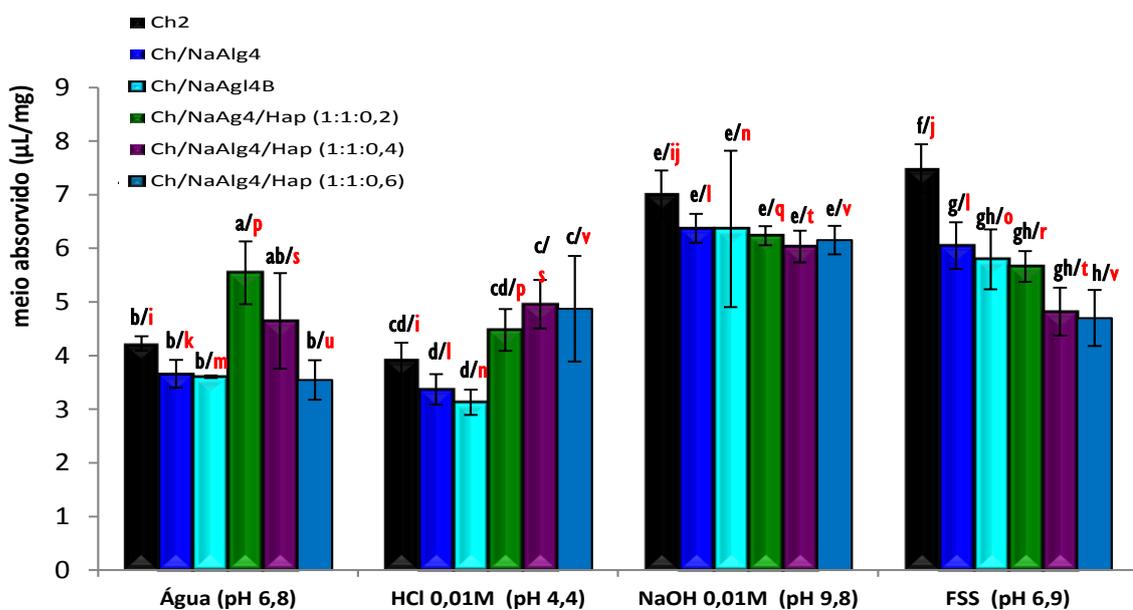
Fonte: Elaboração própria

A Figura 28 mostra que os *scaffolds* contendo Hap apresentam uma maior capacidade de intumescimento em meio aquoso exceto para a Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6), e, não existe diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre esse *scaffold* e os demais. Em meio ácido (pH 4,4) os *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) apresentaram maior capacidade de intumescimento não existindo diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Apesar de apresentarem diferenças nos valores absolutos os *scaffolds* de Ch2-Ch/NaAlg4/Hap e Ch/NaAlg4-Ch/NaAlg4B, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Em meio fortemente alcalino (pH 9,8) não foi possível observar diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na capacidade de intumescimento dos *scaffolds*. Em FSS a capacidade de intumescimento é menor para os *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e maior para Ch2. Os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,5$). Como o pH do FSS (pH 6,9) e da água eram semelhantes (pH 6,8) e o perfil de intumescimento variou em relação ao meio, é possível afirmar que o equilíbrio hidrofílico é influenciado, também, pela composição eletrolítica do meio. No FSS o equilíbrio eletrolítico é dado pela composição do meio cujo mEq para MgCl_2 , NaCl, K_2HPO_4 , CaCl_2 e KCl é respectivamente 0,86; 11,54;

1,57; 12,88 e 2,11. Esse resultado é diferente da conclusão de Li e colaboradores (2005) que relacionava o comportamento de intumescimento apenas ao pH do meio.

A capacidade de intumescimento (Figura 28) do *scaffold* Ch2 em água, HCl e NaOH variou nos valores absolutos, porém não apresentaram diferença estatística significativa ($p>0,05$). O *scaffold* Ch/NaAlg4 não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) na capacidade de intumescimento em meio ácido, alcalino e na presença de eletrólitos (FSS), no entanto, após tratamento em CaCl_2 (ChNaAlg4B) apresentou diferença estatística significativa ($p<0,5$) quando na presença de eletrólitos. O *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) apresentou diferença entre os valores absolutos de intumescimento, porém a diferença estatística significativa ocorreu apenas em água. A diferença estatística significativa ($p<0,05$) foi observada no *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) quando em meio alcalino e na presença de eletrólitos. O *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) em água-HCl e NaOH-FSS não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) apesar de ocorrer diferença na capacidade de intumescimento quando comparados os valores absolutos.

Figura 28 - Capacidade de intumescimento (volume de meio absorvido ($\mu\text{L}/\text{mg}$) em função da água, HCl 0,01M, NaOH 0,01M e FSS dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Análise estatística intragrupo (a-h) e intergrupo (i-v)

Fonte: Elaboração própria

Peppas e colaboradores (2000) concluíram que na presença de ligações cruzadas a capacidade de intumescimento do polímero é menor. O mesmo resultado foi encontrado para o *scaffold* Ch/NaAlg4B em meio ácido e na ausência de eletrólitos. Em FSS o *scaffold* de Ch/NaAlg4B apresentou uma capacidade de intumescimento semelhante a dos *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) e Ch/NaAlg4.

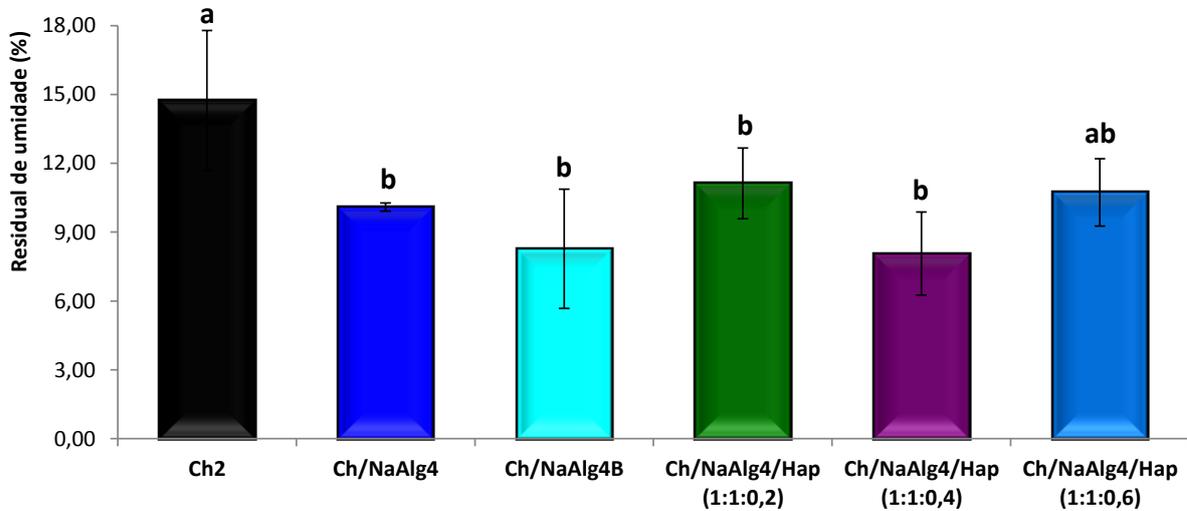
A taxa de intumescimento pode levar a perda das propriedades mecânicas e produção de tensão e compressão no tecido adjacente (LI et al., 2005). Os nossos resultados mostram que mesmo após alcançar o equilíbrio hidrofílico os *scaffolds* permanecerem estruturalmente íntegros.

6.8 Avaliação do teor de umidade residual

A Figura 29 mostra, comparativamente, o teor de umidade residual presente nos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4 Ch/AlgNa/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) após o processo de liofilização e no *scaffold* Ch/NaAlg4 após tratamento em CaCl_2 0,2M e secagem em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$) (Ch/NaAlg4B). O teor de água é um indicativo da estabilidade microbiana dos *scaffolds* (FARMACOPÉIA, 1998). A análise dos resultados mostra um teor de umidade residual maior no *scaffold* de Ch2 (14,74%). O teor de umidade nos demais *scaffolds* variou entre 8 e 11% e, no entanto, não há diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre eles.

A presença da água residual pode ser confirmada nas curvas de DSC (Figura 30), a análise dos resultados mostram que as moléculas de água estão mais fortemente ligadas nos *scaffolds* com Hap.

Figura 29 - Teor de umidade residual dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) após liofilização. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

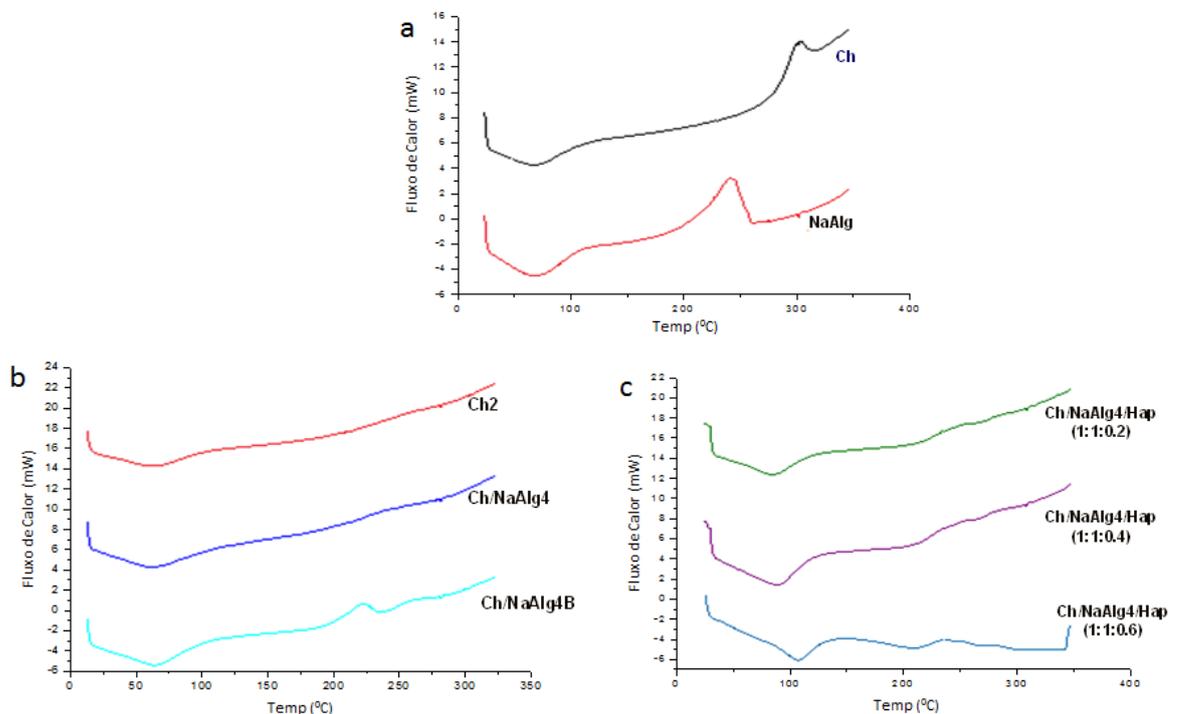
6.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC apresentadas na Figura 30 mostram que os primeiros eventos térmicos ocorreram nas temperaturas de 71 °C (Ch), 74 °C (NaAlg) (painel a), 80 °C (Ch2 e Ch/NaAlg4), 82 °C (Ch/NaAlg4B) (painel b), 83 °C (Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2)), 86 °C (Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4)) e 104 °C (Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)) (painel c) correspondente a eliminação da água residual. Os valores crescentes de temperatura podem estar relacionados com a propriedade hidrofílica de cada biomaterial ou do compósito. Na presença de Hap as interações intermoleculares entre o compósito e a água são mais intensas, o que explica a necessidade de uma temperatura mais elevada para desidratar os *scaffolds* contendo Hap. No painel “a”, os eventos exotérmicos correspondentes à degradação e carbonização da Ch e do NaAlg ocorrem, respectivamente, a 308 e 246 °C. Esses mesmos eventos exotérmicos não aparecem nas curvas DSC dos *scaffolds* Ch2 e Ch/NaAlg4, esse resultado sugere uma modificação na estrutura da Ch durante o processo de fabricação e a formação compósito de Ch–NaAlg. Quando o *scaffold* Ch/NaAlg4 é tratado com CaCl_2 (Ch/NaAlg4B) um evento exotérmico é observado na região de 246 °C, esse resultado indica a reticulação do NaAlg na presença de Ca^{2+} modificando as propriedades mecânicas e físico-químicas do *scaffolds* Ch/NaAlg4.

Nos *scaffolds* contendo Hap (Figura 30 - painel c) o evento endotérmico observado na região 220 °C é um indicativo de um estado de transição vítrea (T_g).

O ΔH de fusão de -3,1, -4,2 e -7,0 J/g, respectivamente, para os *scaffolds* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), obedece uma relação inversa entre o ΔH e a concentração de Hap. Esse resultado sugere que a nucleação dos cristais de Hap interfere na energia necessária para a Tg. O ponto de fusão da Hap (1100 °C) não pode ser observado nesse estudo (CHEMICAL BOOK, 2014).

Figura 30 - DSC das matérias primas Ch (média massa molar), NaAlg (baixa viscosidade) (a), dos *scaffolds* Ch2, Ch/NaAlg4, Ch/NaAlg4B (b), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (c)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

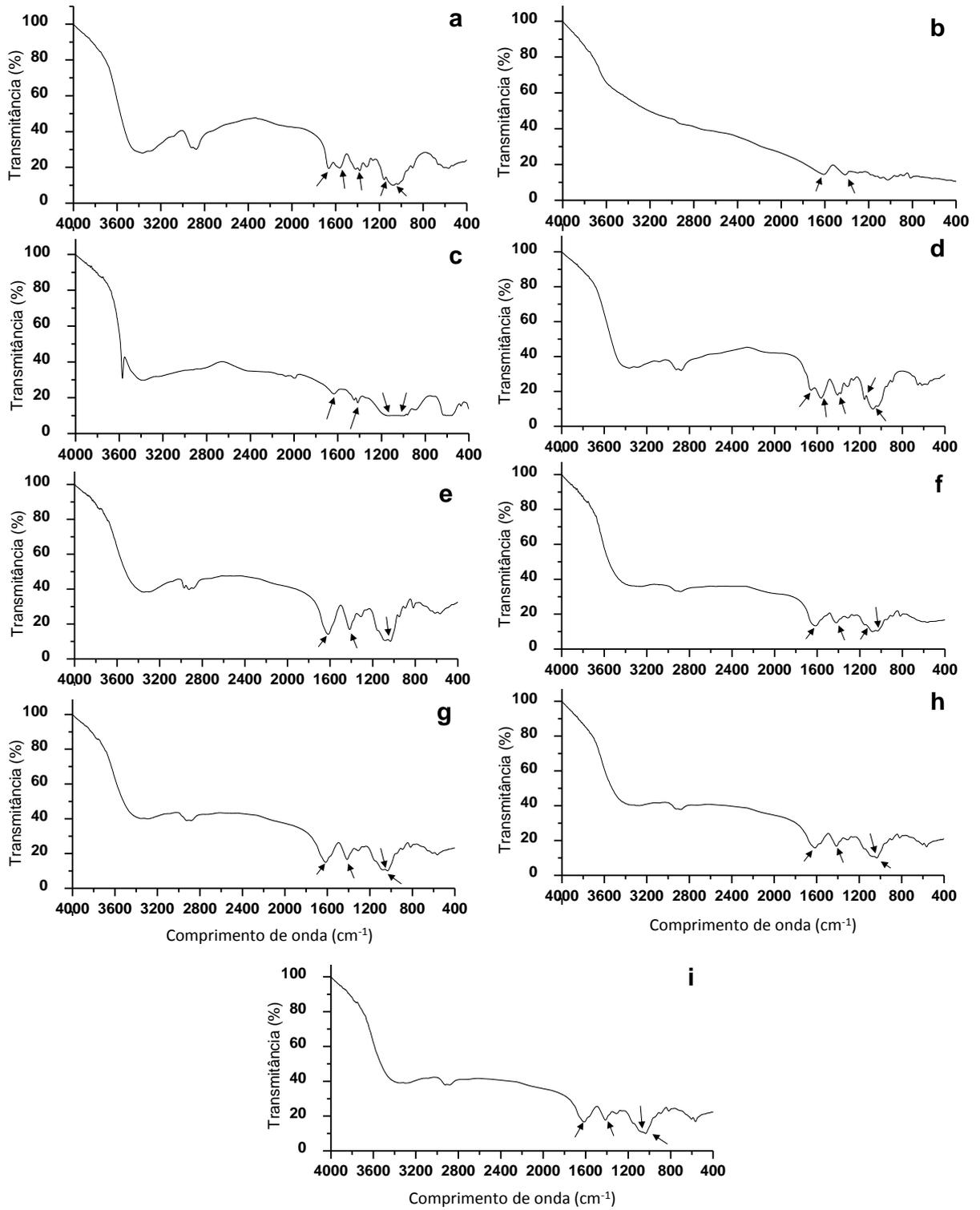
Fonte: Elaboração própria

6.10 Espectroscopia Infravermelho (FTIR)

Com a finalidade de ilustrar a interação intermolecular entre os componentes dos *scaffolds* uma medida por espectroscopia de FTIR (Figura 31) foi feita para Ch (a), NaAlg (b), Hap (c), Ch2 (d), Ch/NaAlg4 (e), Ch/NaAlg4B (f), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (f), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (g) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (h). Os picos característicos da Ch (Figura 31 – painel a) aparecem nos comprimentos de onda (cm^{-1}) em 1661 cm^{-1} (amida I), 1563 cm^{-1} (amida II), 1416 cm^{-1} (COOH), 1156 cm^{-1} (grupo amino) e 1073 cm^{-1} (C-O). Os picos característicos do NaAlg (Figura 31 – painel b) aparecem nos comprimentos de onda (cm^{-1}) em 1610 cm^{-1} (C=O) e 1415

cm^{-1} (C=O). Os picos característicos da Hap (Figura 31 – painel c) aparecem nos comprimentos de onda (cm^{-1}) em 1635 cm^{-1} (hidroxil), 1416 cm^{-1} (COOH), 1096 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} (grupamento fosfato). O *scaffold* Ch2 (Figura 31 – painel d) mostra os mesmos estiramentos apresentados pela Ch. No *scaffold* Ch/NaAlg4 (Figura 31 – painel e) os estiramentos amida I (1661 cm^{-1}), amida II (1563 cm^{-1}) e grupamento amino (1156 cm^{-1}) estão ausentes, e os grupamentos carbonil, COOH e C-O referente ao NaAlg e Ch aparecem respectivamente em 1617 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} e 1083 cm^{-1} . A Ch usada neste experimento era 81% desacetilada. O duplo pico para amida corresponde a N-desacetilação da quitina. Os resultados apresentados para Ch, NaAlg e Ch/NaAlg4 são semelhantes aos descritos por Liuyun e colaboradores (2009) e Han e colaboradores (2010). O espectro de FTIR (Figura 31 – painel f) do *scaffold* tratado com CaCl_2 (Ch/NaAlg4B) é semelhante ao espectro Ch/NaAlg4, exceto pelo aparecimento do estiramento referente ao grupamento amino (1153 cm^{-1}) característico da Ch. Para os compósitos Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (Figuras 31 – painel g), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (Figuras 31 – painel h) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (Figuras 31 – painel i) os picos referentes aos grupamentos amida da Ch e C=O do NaAlg aparecem deslocados em 1616 cm^{-1} . O estiramento referente ao grupamento COOH aparece em 1413 cm^{-1} . Os pequenos picos entre 1032 e 1075 cm^{-1} correspondem à vibração do estiramento fosfato (LIU et al., 2009; HAN et al, 2010). A ausência do grupamento amino (1175 cm^{-1}) nos *scaffolds* Ch/NaAlg4 e contendo Hap sugerem a formação de um complexo Ch-NaAlg como um resultado da interação iônica entre o grupamento COO^- do NaAlg carregado negativamente e grupamento NH^{3+} carregado positivamente (LI et al, 2005; WANG.; KHOR; LIM, 2001).

Figura 31 - Espectros FTIR da Ch (a), NaAlg (b), Hap (c), dos *scaffolds* Ch2 (d), Ch/NaAlg4 (e), Ch/NaAlg4B (f), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) (g), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) (h) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) (i)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Elaboração própria

6.11 Ensaio da viabilidade celular e proliferação celular por MTT

O ensaio de viabilidade com MTT permite de forma simples que seja quantificado o metabolismo deste sal pelas células cultivadas em contato com o material testado. O MTT quando metabolizado pelas células, reduz o anel tetraoxólico deste sal que resulta na formação de cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais. Os seus derivados metabólitos são transportados para fora das células por exocitose e quantificados por espectrofotometria (LIU et al., 1997).

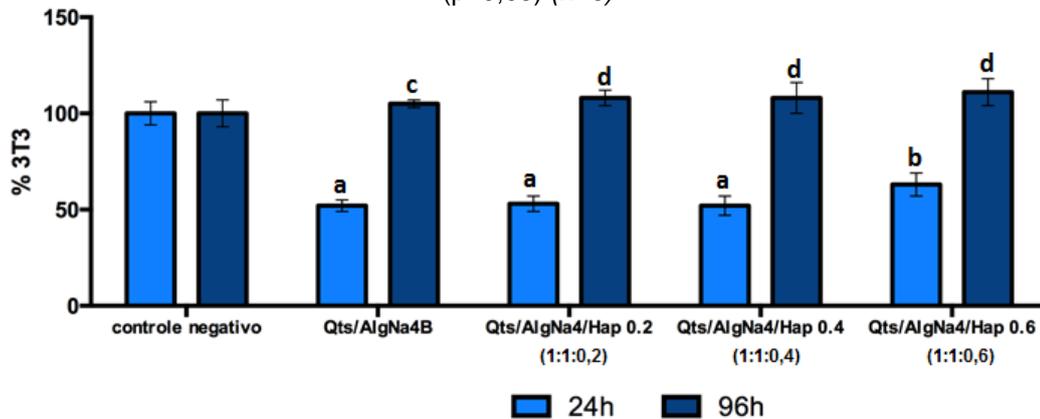
A Figura 32 mostra a viabilidade celular em função do tempo obtida pela incubação das células 3T3 com as amostras de *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e controle. Os resultados foram determinados em dois momentos, 24 h e 96 h de incubação.

A Figura 32 mostra que após 24 h do início da exposição houve uma queda na viabilidade das células 3T3. As culturas celulares contendo os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) alcançaram, respectivamente, índices de 52, 53, 52 e 63%, comparado ao controle (100%), sendo que para os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Um índice de morte celular no início do tratamento é esperado devido a adaptação das células às novas condições do teste.

Na avaliação após 96 h (Figura 32) do início do tratamento houve um aumento do índice de viabilidade celular de 105, 108, 108 e 110%, respectivamente, para os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6), sendo que os *scaffolds* contendo Hap não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Os resultados mostram uma recuperação da vitalidade celular quando comparados com as 24 h iniciais. O aumento na proliferação celular pode ser observado na Figura 33, nos tempos de 24 (painel a) e 96 h (painel b).

Diante desses resultados, podemos afirmar que a presença dos *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) estimulam a proliferação celular independente da massa de Hap que foi adicionada ao *scaffold*.

Figura 32 - Viabilidade celular utilizando o teste MTT para os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e controle no período de 24 h e 96 h. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=6$)

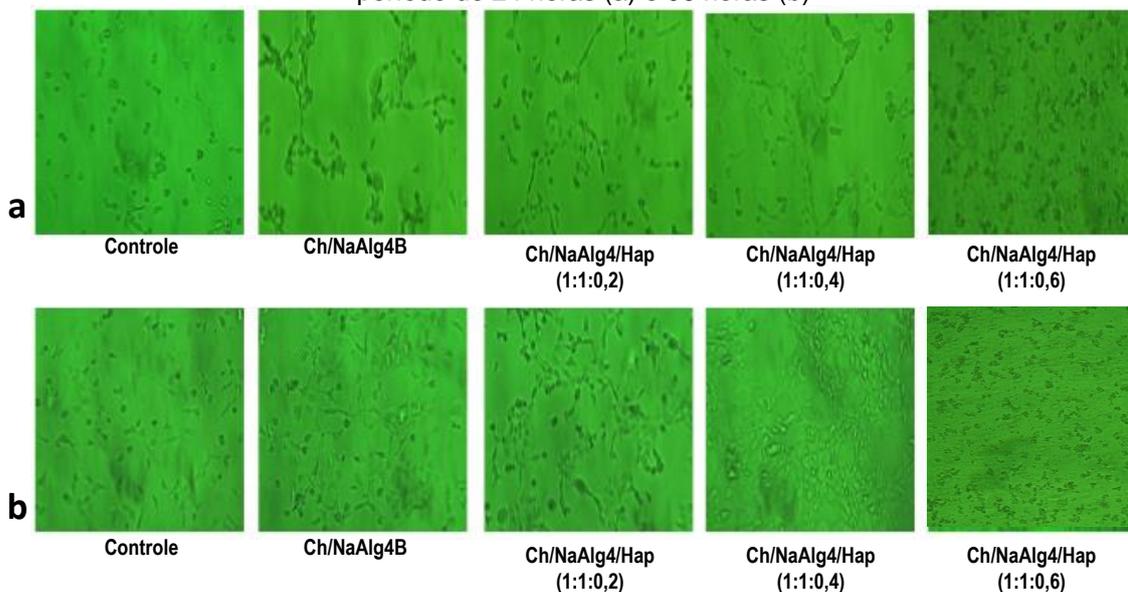


Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita, 3T3 - (fibroblastos de ratos)
 Fonte: Elaboração própria

6.12 Análise da morfologia celular

Após a finalização dos ensaios antes do tratamento com MTT as células foram analisadas em microscopia óptica para análise da morfologia celular. Neste momento foi possível a observação da quantidade de células existentes, assim como, da morfologia celular (Figura 33). Podemos observar que após 96 h (Figura 33 – painel b) existiu uma maior proliferação de todas as amostras estando as células intactas e sem alterações morfológicas.

Figura 33 - Imagens fotográficas das células após contato com os *scaffolds* Ch/NaAlg4B e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) e do controle no período de 24 horas (a) e 96 horas (b)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita
 Fonte: Elaboração própria

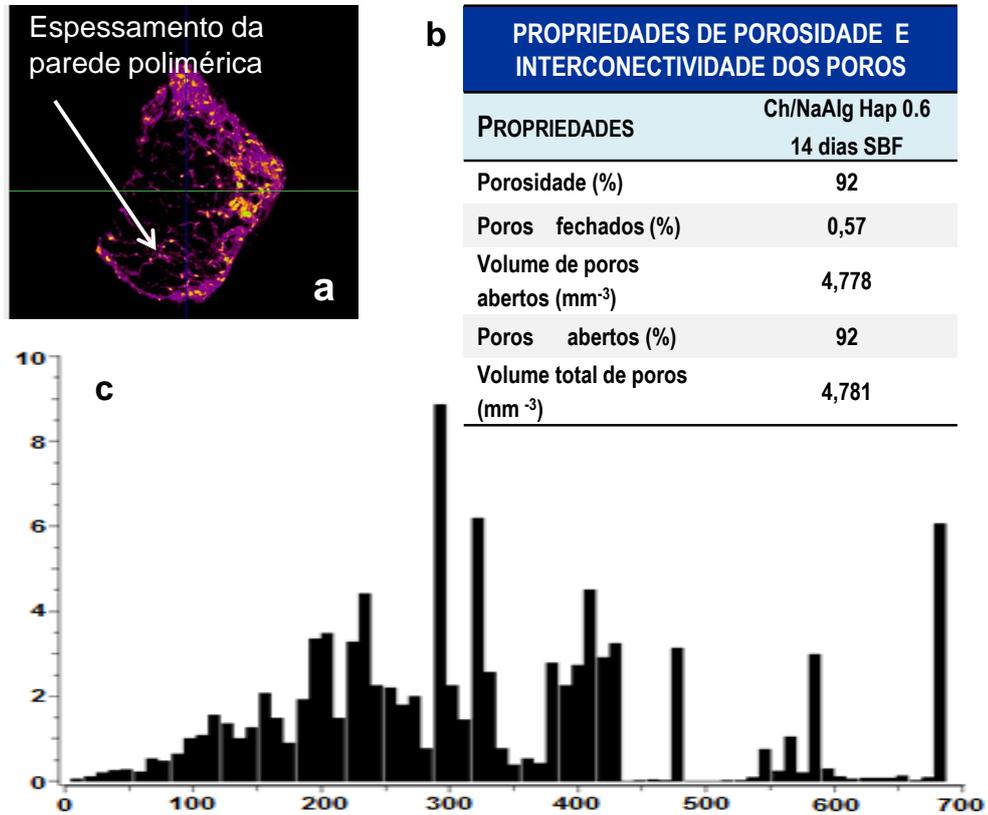
6.13 Bioatividade *in vitro*

A Figura 34 (painel a) mostra o aumento da parede polimérica do *scaffold* Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) após imersão, durante 14 dias, em SBF (37 °C) . Esse fluido assemelha-se aos constituintes iônicos, pH e da temperatura (37 °C) do plasma sanguíneo. O SBF tem a capacidade de formar camada de apatita nas paredes poliméricas e avalia a bioatividade de materiais utilizados para regeneração óssea. O fluido SBF, devido aos íons Ca^{2+} e P presentes na solução, estimulam a formação dos núcleos de fosfatos de cálcio (HU et al., 2004)

O processo de formação de apatita nas paredes poliméricas gerou uma diminuição na porosidade do *scaffold* original (Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) de 98 para 92% (Figura 34 – painel b), aumentou a faixa do diâmetro de poros de 25-350 μm para 10-680 μm (Figura 34 – painel c), provavelmente, a diminuição da porosidade está diretamente relacionada ao aumento do diâmetro dos poros, durante o processo de imersão ocorreu a perda de algumas paredes poliméricas e conseqüente aumento do tamanho dos poros.

Os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) tiveram uma retração estrutural após a secagem que impossibilitou a avaliação da porosidade, interconectividade e polidispersão dos poros.

Figura 34 - Bioatividade *in vitro* - Imagem μ CT-3D, aumento da densidade das paredes poliméricas em corte transversal (a), porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^{-3}), poros abertos (%), volume total de poros (mm^{-3}) (b) e polidispersidade dos poros (c) do scaffold Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6)



Ch - quitosana, NaAlg – alginato de sódio, Hap – hidroxiapatita

Fonte: Elaboração própria

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *scaffolds* Ch₂, Ch/NaAlg₄, Ch/NaAlg₄B, Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg₄/Hap (1:1:0,6), obtidos por liofilização das dispersões poliméricas aquosas e ácidas, apresentaram estrutura com elevado grau de porosidade e interconectividade entre os poros.

As propriedades mecânicas mostraram, simultaneamente, resistência à tração, perfuração, flexibilidade e elasticidade.

A eficiência de intumescimento dos *scaffolds* é influenciada pelo pH do meio e pela presença de eletrólitos.

A incorporação da Hap no *scaffold* Ch/NaAlg₄ resultou na formação de um novo compósito e o ΔH de fusão diminuiu em função do aumento da concentração de Hap.

Os *scaffolds* testados induziram a proliferação celular e as células permaneceram sem alterações morfológicas.

Os resultados apresentados sugerem a necessidade de reunir as propriedades de porosidade dos *scaffolds* contendo Hap com as propriedades mecânicas do *scaffold* Ch/NaAlg₄B.

A biocompatibilidade dos *scaffolds* ainda precisa ser avaliada por meio de testes *in vivo*.

8 CONCLUSÃO

A análise dos resultados indicam que os *scaffolds* Ch/NaAlg4B, Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,2), Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,4) e Ch/NaAlg4/Hap (1:1:0,6) podem ser uma alternativa promissora para a regeneração do tecido ósseo pois apresentam uma porosidade e faixa de poros adequadas para as células ósseas, são um reserva de Ca^{2+} e possuem a capacidade de estimular a proliferação celular.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1990.
- ALLAN, B. Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 1235-1240, 1999.
- ALMEIDA, N. M. G. et al. A novel dosage form for buccal administration of bupropion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, 2014. [Epub ahead of print].
- ANDERSON, J.; LANGONE J., L. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 2, p. 107-113, 1999.
- AOUADA, F. A. et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis e poliacrilamida e metilcelulose. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1482-1490, 2009.
- ASHWORTH, J. L. et al. The hydroxyapatite orbital implant: post operative pain. **Eye**, v. 10, p. 29-37, 1996.
- BACÁKOVÁ, L. et al. Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49, n. 5, p. 369-379, 2000.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. 1a. ed. Amsterdam: Elsevier, v. 3, 1989.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic**, v. 57, p. 19-34, 2004.
- BERNHARDT, A. et al. Proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on alginate-gelatine-hydroxyapatite scaffolds with anisotropic pore structure. **Journal Tissue Engineering Regeneration Medicine**, v. 3, n. 1, p. 54-62, 2009
- BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomaterials**, v. 3, n. 2, p. e24717-1 - e24717-12, 2013.
- BHUMIRATANA, S. et al. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2812-2810, 2010.
- BONNUCCI, E. New knowledge on the origin. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 158, p. 252-269, 1981.

BURG, K.J. et al. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, n.23, 2347-2359, 2000.

CAMPOS, S.D., et al. Biomaterials based on $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ prepared with sawdust or corn glucose: effects on porosity and crystallinity. **Cerâmica**, v. 52, p. 274-279, 2005.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.

CHEMICAL BOOKS: Hydroxyapatite properties Disponível em:<
http://us.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB2131094.aspx>.
Acesso em: 10 de out. 2014.

CHEN, Q.; LIANGA, S.; THOUASB, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 584-671, 2013.

CIARDELLI, G. et al. Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1961-1976, 2005.

PILLAI, C.K. S., PAUL, W., SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

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

DANTAS, T. S., et al. Bone Graft Materials and their Application in Dentistry Revista **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n.2, p. 131-135, 2011.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, 2011.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future Bone regeneration: current concepts and future. **BMC Medicine**, v. 9, n. 66, p. 1-10, 2011.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates as bioceramics: State of the Art. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 1, p. 22-107, 2010.

DRURY, J. L.; DENNISB, R. G.; MOONEYA, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels. **Biomaterials**, v. 25, p. 3187-3199, 2004.

DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p. 2287-2303, 1999.

ELHENDAWI, H. et al. Effect os synthesis temperature is the crystallization and growth of in situ prepared nanohydroxiapatite in chitosan matrix. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 3, p. 454-464, 2002.

FOOK, A. C. B. M.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. I. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como *scaffolds* para regeneração óssea. **Revista Matéria**, v. 15, n. 3, p. 392-399, 2010.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, p. 769-778, 2004.

GARCÍA CRUZ, D. M., et al. M. Blending polysaccharides with biodegradable polymers. II. Structure and biological response of chitosan/polycaprolactone blends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterial** , v. 87, n. 2, p. 544-554, 2008.

GARCÍA, A. J.; VEGA, M. D.; BOETTIGER, D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 785-798, 1999.

GEORGE, A. J.; LARKIN, D. F. Corneal transplantation: the forgotten graft. **American Journal fo Transplantation**, v. 4, n. 5, p. 678-685, 2004.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan -a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n.1, p. 1-14, 2006.

GIANNOUDI, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, v. 36S, p. S20-S27, 2005.

GREENWALD, A. S. et al. Bone graft materials. **The Journal of Bone and Joint Sugery**, v. 83, n. 2, p. 98-103, 2001.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

- HAMADA, Y. et al. The preparation of PLLA-calcium phosphate hybrid composite and its evaluation of biocompatibility. **Dental Materials Journal**, v. 31, n. 6, p. 1087-1096, 2012.
- HAMMAM, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.
- HAN, J. et al. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **International Journal of Biological**, v. 46, p. 199–205, 2010.
- HEIDARI, S. et al. The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 631-639, 2011.
- HEILSHORN, S. C. et al. Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4245-4252, 2003.
- HIDALGO, C.; SUÁREZ, Y.; FERNÁNDEZ, M. Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. **Ars Pharmaceutica**, v. 49, n. 3, p. 245-257, 2008.
- HIRAOKA, Y. et al. Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly(glycolic acid) fiber. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 6, p. 1101-1112, 2003.
- HSIEH, W.-C.; CHANG, C.-P.; LIN, S.-M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, p. 250-255, 2007.
- HU, Q. et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. **Biomaterials**, v. 25, p. 779-785, 2004.
- HUANG, S.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. Control of cyclin D1, p27Kip1, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 11, p. 3179-3183, 1998.
- HUMPHRIES, J. D. et al. Molecular basis of ligand recognition by integrin $\alpha_5\beta_1$ II Specificity of Arg-Gly-Asp binding is determined by Trp157 of the α subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20337-20345, 2000.
- IFKOVITS, J. L.; SUNDARARAGHAVAN, H. G.; BURDICK, J. A. Electrospinning fibrous polymer scaffolds for tissue engineering and cell culture. **Journal of Visualized Experiments**, v. 32, p. 1-4, 2009.

INUI, A. et al. Potency of double-layered Poly L-lactic Acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue. **International Orthopaedics**, v. 34, n. 8, p. 1327-1332, 2010.

JAYAKUMAR, R. et al. Chitin scaffolds in tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 1876-1887, 2011.

JIN, H. H. et al. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1079– 1085, 2012.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. de A. Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos: preparação de algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KAMATH, S. et al. Surface Chemistry influence implant mediated host tissue responses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 86, n. 3, p. 617-626, 2008.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribuiton and toxicityof chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KHALED, E. G. et al. Tissue engineering for bone production- stem cells, gene therapy and scaffolds. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 5, p. 289-295, 2011.

KIM, H. J. et al. Bone tissue engineering with premineralized. **Bone**, v. 42, n. 6, p. 1226-1234, 2008.

KIM, S. S. et al. A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.

KLEIN, T. J. et al. Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones. **Tissue Engineerub Part B Reviews**, v. 15, n. 2, p. 143-157, 2009.

KOCK, L.; VAN DONKELAAR, C.; ITO, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current satatus. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 3, p. 613-627, 2012.

KONG, H.-J.; LEEA, K. Y. M. D. J. Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. **Polymer**, Hyun-Joon Konga,b, Kuen Yong Leea, David J. Mooney, v. 43, p. 6239-6246, 2002.

KUMBAR, S. G. et al. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 30, p. 4100-4107, 2008.

KUO, C. K. et al. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 1, p. 64-73, 2006.

KUO, C. K. and MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 6, p. 511-521, 2001.

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

LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, Y.-H.; GRANNEMAN, J. G. Seeking the source of adipocytes in adult white adipose tissues. **Adipocyte**, v. 1, n. 4, p. 230-236, 2012.

LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterial**, v. 24, n. 13, p. 2363-2378, 2003.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3919-3918, 2005.

LIN, H. R.; YEH, Y. J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 1, p. 52-65, 2004.

LIU, J. et al. Synthesis of Chitosan-Hydroxyapatite Composites and Its Effect on the Properties of Bioglass Bone Cement. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 25, n. 4, p. 551-555, 2009.

LIUYUN, J.; YUBAO, L.; CHENGDONG, X. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 65, p. 1-10, 2009.

LIVINGSTON, T.; DUCHEYNE, P.; GARINO, J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 2002.

LU, T.; YUHUI, L.; CHEN, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 337-350, 2013.

LU, Q. et al. Degradation mechanism and control of silk fibroin. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 1080-1086, 2011.

MACAYA, D.; SPECTOR, M. Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review. **Biomedical Materials**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2012.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MATASSI, F. et al. New biomaterials for bone regeneration. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 21-24, 2011.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2335-2346, 2000.

MIESZAWSKA, A. J. et al. Clay-enriched silk biomaterials for bone formation. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 8, p. 303-3041, 2011.

MIKOS, A. G. et al. Prevascularization of porous biodegradable polymers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 716-723, 1993.

MOHAMED, A. M. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Alizae Marny Mohamed, v. 15, n. 1, p. 4-12, 2008.

MUSCHLER, G. F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 86, p. 1541-1558, 2004.

NAGEM FILHO, H. et al. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations Implant Journal**, v. 1, n. 1, p. 55-62, 2006.

OHA, S. H. et al. Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid) poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. **Biomaterials**, v. 24, p. 4011-4021, 2003.

OLIVEIRA, S. M. et al. Engineering Endochondral Bone - In Vitro Studies. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 3, p. 625-634, 2009.

OLIVEIRA, L. S. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37-44, 2010.

OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; TOGNOLI, G. K. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2403-2412, 2008.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R. G.; FRANÇOIS, B. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, p. 1863-1887, 2010.

PARK, S.-H. et al. Silk-fibrin-hyaluronic acid composite gels for nucleus pulposus tissue regeneration. **Tissue Engineering. Part A**, v. 17, n. 23-24, p. 2999-3009, 2011.

PEÑA, M. A. V.; ALVARDO, A. G. Implantes scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 20, n. 1, p. 140-154, 2010.

PEPPAS, N.A. et al. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais - híbridos orgânicos-inorgânicos bioativos. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, v. 94, p. 104-109, 1999.

PÉREZ, R. A. et al. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 471-496, 2013.

PERKA, C. et al. The use of fibrin beads for tissue engineering and subsequent transplantation. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 3, p. 359-361, 2001.

PILLAI, C. K. S.; PILLAI, W. P.; CHANDRA, P. S. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

PORTO, I.C.C.M; ALMEIDA, A.G.A. Avaliação em curto e médio prazo da sorção e da solubilidade de resinas compostas à base de metacrilato e de silorano em saliva artificial. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 42, n. 3, p. 176-181, 2013.

PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone implant interface. **Biomaterials**, v. 20, p. 2311-2321, 1999.

PURCELL, E. K. et al. Alginate composition effects on a neural stem cell-seeded scaffold. **Tissue engineering: Part C**, v. 15, n. 4, p. 541-550, 2009.

RANUCCI, C. et al. Control of hepatocyte function on collagen foams: Sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis. **Biomaterials**, v. 21, n. 8, p. 783-793, 2000.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

SAETHER, H. V. et al. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 813-821, 2008.

SALGADO, A. J. et al. Biological response to pre-mineralized starch based scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 3, p. 267-275, 2005.

SANKALIA, M. G. et al. eversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 215-232, 2007.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929-958, 2009.

SINGH, S.; WU, B. M.; DUNN, J. C. Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 3, p. 720-727, 2012.

SPAANS, C. J. et al. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and epsilon-caprolactone. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 9, n. 12, p. 675-678, 1998.

SPECTOR, M. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. **Swiss Medical Weekly**, v. 136, p. 293-301, 2006.

STEGEMANN, J. P.; KASZUBA, S.; ROWE, S. L. Review: Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 7, p. 2601-2613, 2007.

STRAND, S. P. et al. Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 975-987, 2010.

SUARÉZ-GONZÁLEZ, D. et al. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 1, p. 222-34, 2010.

SUH, S. W. et al. Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique. **ASSAIO Journal**, v. 48, n. 5, p. 460-464, 2002.

SULTANA, N.; WANG, M. **PHBV Tissue Engineering Scaffolds Fabricated via Emulsion Freezing / Freeze-drying: Effects of Processing Parameters**. International Conference on Biomedical Engineering and Technology. Singapore: [s.n.]. 2011. p. 29-34.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 2, p. S311-S324, 2009.

TAKAHASHI, Y.; YAMAMOTO, M.; TABATA, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3587-3596, 2005.

TAZI, N. et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. **AMB Express**, v. 2, n. 61, p. 1-10, 2012.

THOMAS, X.; ANGLARET, B. Cell adhesion molecules: expression and function in acute myeloid leukemia. **Bull Cancer**, v. 86, n. 3, p. 265-277, 1999.

TIGLI, S. R. et al. Comparative Chondrogenesis of Human Cell Sources in 3D Scaffolds. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2, n. 5, p. 348-360, 2009.

VANDENBUSSCHE, E. et al. Massive tears of the rotator cuff treated with a deltoid flap. **International Orthopaedics**, v. 28, n. 4, p. 226-230, 2004.

VENKATESAN, J.; KIM, S.-K. Chitosan composites for bone tissue engineering—An overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2252-2266, 2010.

VERMA, D.; KATTI, K. S.; KATTI, D. R. Osteoblast adhesion, proliferation and growth on polyelectrolyte complex - hydroxiapatite. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 368, p. 2083-2097, 2010.

VOZZI, G. et al. Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. **Biomaterials**, n. 24, p. 2533-2540, 2003.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2175-190, 2006.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 8, p. 113-1142, 2001.

WANG, Q. et al. PLGA-chitosan/PLGA-alginate nanoparticle blends as biodegradable colloidal gels for seeding human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 3, p. 520-527, 2011.

WHANG, K. et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue Engineering**, v. 5, n. 1, p.35-51, 1999.

WU, T.; ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 248-253, 2008.

YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 679-689, 2001.

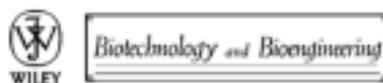
YOON, J. J.; KIM, J. H.; PARK, T. G. Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. **Biomaterials**, v. 24, p. 2323-2329, 2003.

ZHANG, J. et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1962-1987, 2010.

ZHANG, L.; HU, J.; A., A. K. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 37, n. 1-2, p. 1-57, 2009.

APÊNDICE A – Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration: physical characterization studies.

Biotechnology & Bioengineering



Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration: physical characterization studies

Journal:	<i>Biotechnology and Bioengineering</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rebelo, Márcia; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Chaud, Marco; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Balcão, Victor; University of Sorocaba, LaBNUS – Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Vila, Marta; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Aranha, Norberto; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Yoshida, Valquíria; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Alves, Thais; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba Oliveira Jr., José; University of Sorocaba, Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology of the University of Sorocaba
Key Words:	tissue engineering, tissue regeneration, chitosan scaffolds, computed tomography, porosity, permeability

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons

APÊNDICE B – Scaffold and Tissue Regenerations: a review

Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials



Journal of Biomedical
Materials Research
Part B: Applied Biomaterials

Scaffolds and Tissue Regeneration: a review
Márcia A. Rebelo¹, Thais F. R. Alves¹, Renata de Lima¹, José
M. Oliveira Jr¹, Marta M.D.C. Vila¹, Victor M. Balcão^{1,2},
Patricia Severino³ and Marco V. Chaud^{1*}

1 University of Sorocaba and Biomaterials and
Nanotechnology Laboratory. Sorocaba/SP, Brazil
2 CEB - Centre of Biological Engineering, University of
Minho, Braga, Portugal.
3 University of Tiradentes and Institute of Technology and
Research. Aracaju/SE, Brazil.

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rebelo, Marcia; University of Sorocaba. Alves, Thais; University of Sorocaba, Lima, Renata; University of Sorocaba, Oliveira Junior, Jose; University of Sorocaba. Vila, Marta; University of Sorocaba, Balcão, Victor; University of Minho, Centre of Biological Engineering; University of Sorocaba. Severino, Patricia; University of Tiradentes, ; Institute of Technology and Research, Chaud, Marco; University of Sorocaba, ; Laboratory of Biomaterial and Nanotechnology,
Keywords:	tissue engineering, biocompatibility/hard tissue, biocompatibility/soft tissue, biomechanics, extracellular matrix

SCHOLARONE™
Manuscripts