

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS**

PAULO AUTRAN LEITE LIMA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO*
DE COMPÓSITOS BASEADOS EM QUITOSANA,
FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA PARA A ENGENHARIA
TECIDUAL ÓSSEA**

Orientador: Professor Dr. **LUÍS EDUARDO ALMEIDA**

Co-orientadora: Professora Dra. **GLÓRIA DULCE DE ALMEIDA SOARES**

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

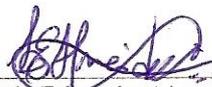
FEVEREIRO DE 2012

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
COMPÓSITOS BASEADOS EM QUITOSANA, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA
PARA A ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Paulo Autran Leite Lima

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

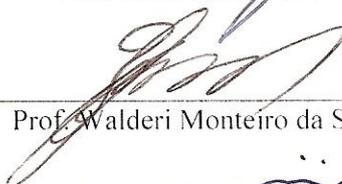
Aprovada por:



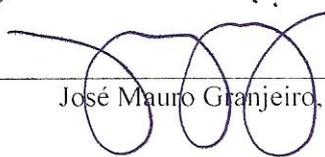
Prof. Luís Eduardo Almeida, Dr.



Prof. Euler Araujo dos Santos, Dr.



Prof. Walderi Monteiro da Silva Júnior, Dr.



José Mauro Granjeiro, Dr.



Prof.ª Iara de Fátima Gimenez, Dr.ª.

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL

FEVEREIRO DE 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

L732p Lima, Paulo Autran Leite
Preparação, caracterização e avaliação *in vitro* de compósitos baseados em quitosana, fibroína e hidroxiapatita para a engenharia tecidual óssea / Paulo Autran Leite Lima ; orientador Luís Eduardo Almeida. – São Cristóvão, 2012. xi, 95 f.

Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais)– Universidade Federal de Sergipe, 2012.

1. Engenharia de materiais. 2. Quitosana. 3. Fibroína. 4. Hidroxiapatita. 5. Avaliação *in vitro* I. Almeida, Luís Eduardo, orient. II. Título.

CDU: 620:612.751

*... ao meu pai, por me proporcionar educação,
humanidade, dignidade...*

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me guiar e por proporcionar paciência e sabedoria em todos os momentos. Aos meus pais, **Autran Gonçalves Lima** e **Vania Maria Leite Lima**, por me oferecerem o suporte necessário durante minha estadia longe de casa. Por me aconselharem a manter o foco durante os estudos e me ajudarem com mensagem de afeto e amor. À **Telma das Virgens Santos**, que durante muito tempo cuida de mim como uma mãe e por ter colocado-me em suas orações durante todo o tempo. Ao amigo prof. Dr. **Walderi Monteiro da Silva Júnior**, por ter me mostrado como é ser um pesquisador. Tenha certeza que senhor servirá de referência durante toda minha vida acadêmica. Ao meu orientador e amigo prof. Dr. **Luís Eduardo Almeida**, por ter acreditado em mim, mesmo eu sendo de outra área, por me dar referência e apoio em momentos cruciais durante doutorado. À profa. Dra. **Glória Dulce de Almeida Soares**, pelo carinho e apoio, pela oportunidade de realizar meu estágio de doutoramento no Rio de Janeiro e no exterior. Obrigado também por acreditar em mim. À profa. Dra. **Karine Anselme**, pela simpatia, gentileza e por proporcionar que minha pesquisa tivesse novas direções. À profa. Dra. **Ledjane Silva Barreto**, por me proporcionar todo o apoio e carinho necessários durante minha permanência no estágio de doutoramento no Rio de Janeiro e em Mulhouse. À **Débora dos Santos Tavares**, pela amizade e pelo companheirismo. Tenha certeza que foi muito bom conhecê-la. Aos meus verdadeiros amigos, **Leonardo Meriguetti**, **Danielle de Medeiros Carneiro**, **Marizete Correia Carneiro**, **Walter Leite Nunes**, **Sérgio Prado Leite**, **Fabiano de Melo Macedo**, **Arthur Augusto Barreto Monteiro**, **Carlos José Oliveira de Matos**, **André Santos Faro**, que por muitas vezes deixaram seus compromissos para me darem conforto, apoio, companhia, carinho e conselhos durante meus dois anos longe de casa. Por fim, à **Universidade Federal de Sergipe (UFS)**, à **Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)**, à *Université de Haute Alsace (UHA)*, ao *Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M)*, ao **CNPq**, à **CAPES** e o projeto **CAPES-COFECUB**, pelo financiamento e pelo apoio laboratorial necessário para realização dessa pesquisa.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.).

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
COMPÓSITOS BASEADOS EM QUITOSANA, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA
PARA A ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Paulo Autran Leite Lima

Fevereiro/2012

Orientadores: Luis Eduardo Almeida

Glória Dulce de Almeida Soares

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Compósitos híbridos de quitosana (CHI), fibroína (SF) e hidroxiapatita (HA) são biocompatíveis e atrativos para aplicações na engenharia tecidual óssea. O objetivo desse trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar o comportamento *in vitro* de compósitos 3D de CHI, CHI/SF, CHI/SF/HA. Os biomateriais foram produzidos a partir de uma solução de CHI, CHI/SF e CHI/SF/HA em ácido acético e após a realização dos processos de produção foram submetidos a testes *in vitro* com células STRO+1A, MC3T3-E1 e SaOS-2 por 07, 14 e 21 dias. Os arcabouços foram caracterizados por difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, e submetidos a testes para verificação da porosidade, tamanho de poro e ângulo de contato. A viabilidade e a atividade celular foram avaliadas por redução de MTT e pela detecção da atividade de fosfatase alcalina. Foi possível preparar arcabouço 3D com matriz baseada em quitosana, fibroína e hidroxiapatita e houve interação entre esses materiais, sendo constatado através da caracterização físico-química. Ambos os compósitos foram considerados atóxicos e capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação celular, podendo ser utilizados na terapia do reparo de defeito ósseo.

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.).

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF
CHITOSAN, FIBROIN AND HYDROXYAPATITE COMPOSITES FOR BONE
TISSUE ENGINEERING

Paulo Autran Leite Lima

February/2012

Advisors: Luis Eduardo Almeida

Glória Dulce de Almeida Soares

Department: Materials Science and Engineering

Hybrid composites with chitosan (CHI), fibroin (SF) and hydroxyapatite (HA) are biocompatible and attractive for bone engineering applications. The objective of this work was to prepare, to characterize and to evaluate *in vitro* cells behavior in contact with CHI, CHI/SF and CHI/SF/HA scaffolds. The biomaterials were produced from a CHI, CHI/SF, CHI/SF/HA solution in acetic acid and, after the production process, they were submitted the *in vitro* tests with STRO+1A, MC3T3-E1 and SaOS-2 cells for 07, 14 and 21 days. The scaffolds were characterized by X-ray diffraction, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. In addition, tests of porosity, pore size and contact angle were performed. Cell viability and activity were assessed by MTT reduction and alkaline phosphate activity detection. It was possible to prepare scaffolds 3D based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite and the interaction between this materials were observed by physicochemical characterization. The composites were considered non-toxic and they were capable to promote cell adhesion, proliferation and differentiation. Additionally, they may be used in the therapy of bone defect repair.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm.....	Micrometro
3D.....	Três dimensões
ABNT.....	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ala.....	Alanina
ALP.....	Atividade de fosfatase alcalina
ATCC.....	American Type Culture Collection
Ca.....	Cálcio
CBPF.....	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
Cels.....	Células
CHI.....	Quitosana
CNRS.....	Centro Nacional de Pesquisa Científica
DRX.....	Difração de raios-X
DSC.....	Calorimetria exploratória diferencial
EDS.....	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA.....	Etilenodiaminotetracético
EtOH.....	Etanol
EUA.....	Estados Unidos da América
FTIR-ATR.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada
GAGs.....	Glicosaminoglicanos
Gly.....	Glicina
GPa.....	Gigapascal
h.....	Hora
HA.....	Hidroxiapatita
HCl.....	Ácido clorídrico
HMDS.....	Hexametildisilazano
IS2M.....	Instituto de Ciências dos Materiais de Mulhouse
ISO.....	International Organization for Standardization
JCPDS.....	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
kDa.....	Quilodalton

kGy.....	Quilogray
kV.....	Quilovolt
LIN.....	Laboratório de Instrumentação Nuclear
M.....	Molar
m/v.....	Massa/volume
mA.....	Miliampere
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
min.....	Minuto
mm.....	Milímetro
mM.....	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
MPa.....	Megapascal
MSCs.....	Células tronco mesenquimais
MTT.....	3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaOH.....	Hidróxido de sódio
nm.....	Nanômetro
nmol/L.....	Nanomol por litro
P.....	Fósforo
PLLA.....	Ácido poli-L lático
PO ₃ ⁴⁻	Fosfato
rpm.....	Rotações por minuto
Ser.....	Serina
SF.....	Fibroína
TG.....	Análise termogravimétrica
Tyr.....	Tirosina
Val.....	Valina
θ.....	Teta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Sistema esquelético.....	02
1.2. Biomateriais e arcabouços para a engenharia tecidual óssea.....	04
1.3. Quitosana.....	08
1.4. Fibroína.....	11
1.5. Hidroxiapatita.....	15
1.6. Arcabouços quitosana, fibroína e hidroxiapatita.....	17
1.7. Testes em cultura celular.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Geral.....	22
2.2. Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Preparação dos arcabouços.....	24
3.2. Caracterização físico-química.....	25
3.2.1. Difração de raios-X (DRX).....	25
3.2.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR).....	25
3.2.3. Análise termogravimétrica (TG).....	26
3.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	26
3.2.5. Porosidade e tamanho de poro.....	26
3.2.6. Ângulo de contato.....	27
3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	27
3.3. Avaliação biológica.....	28
3.3.1. Processo de esterilização.....	28
3.3.2. Teste de citotoxicidade.....	28
3.3.3. Cultura celular.....	29
3.3.4. Ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).....	30

3.3.5. Ensaio da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	31
3.3.6. Teste de concentração de colágeno.....	31
3.4. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Dimensão e peso médio das amostras.....	34
4.2. Caracterização físico-química.....	35
4.2.1. Difração de raios-X (DRX).....	35
4.2.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR).....	37
4.2.3. Análise termogravimétrica (TG).....	38
4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	40
4.2.5. Porosidade e tamanho de poro.....	42
4.2.6. Ângulo de contato.....	43
4.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	45
4.3. Avaliação biológica.....	47
4.3.1. Teste de citotoxicidade.....	47
4.3.2. Teste em cultura celular.....	49
5. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema esquelético

O esqueleto humano, também chamado de endoesqueleto, é uma estrutura viva que desempenha as funções de suporte, movimento, proteção, estoque de minerais e formação de células do sangue (hematopoiese). Ele cresce juntamente com as demais estruturas do corpo e é capaz de se adaptar e de se reparar quando lesionado [1,2].

Os ossos possuem formas e tamanhos diferentes podendo ser classificados como: longos, curtos, planos e irregulares. Os longos são representados pela maioria dos ossos dos membros superiores e inferiores e possuem uma metáfise e epífise tubular com paredes espessas [3]. Os curtos apresentam aproximadamente o mesmo comprimento em todas as direções, como por exemplo, os ossos do carpo [4]. Os planos são ossos pouco delgados que formam o teto da cavidade craniana [5] e por fim, os irregulares, que são estruturas de formas variadas e que não se encaixam em nenhuma das categoriais anteriores, as vértebras são exemplos de ossos irregulares [6].

A resistência e a rigidez do osso, em combinação com seu leve peso, dão aos vertebrados sua mobilidade, destreza e força. O endoesqueleto possui uma complexa rede vascular e diversos tipos de células ósseas que formam e reabsorvem a matriz óssea. Como os demais tecidos musculoesqueléticos, o osso é composto por células mesenquimatosas e por uma matriz extracelular, porém ao contrário dos outros tecidos, a matriz óssea sofre mineralização [2,7].

A matriz extracelular ou matriz óssea é formada por componentes orgânicos, minerais inorgânicos e líquidos. O componente da matriz inorgânica contribui com

cerca de 70% do peso ósseo *in natura*. As macromoléculas orgânicas contribuem com cerca de 20% desse peso, e a água, com 8 a 10%. O arcabouço orgânico é constituído de fibras colágenas e sais minerais e a parte inorgânica é composta principalmente de cálcio e fósforo. As fibras colágenas promovem resistência à tração e à torção e os minerais permitem que o tecido resista à compressão, combinação que confere ao osso boa relação entre a resistência mecânica e a tenacidade [7,8]. A figura abaixo mostra um corte histológico do tecido ósseo apresentando os componentes da matriz óssea.

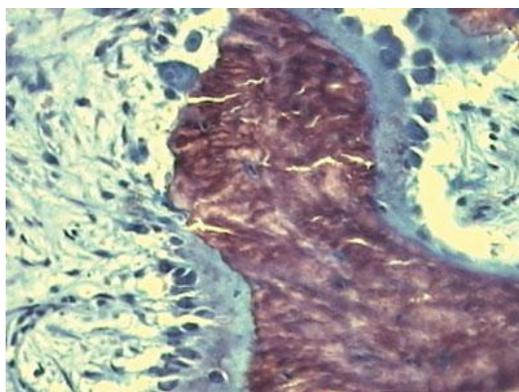


Figura 01 – Corte histológico do tecido ósseo. A cor amarela clara é característica dos minerais inorgânicos, a cor azul, fibras colágenas e, a cor vermelha, os componentes líquidos (sangue e água).

Fonte: [9].

Quando essa estrutura não pode ser reparada fisiologicamente ou o tempo de recuperação tecidual é extenso, torna-se indicada a utilização de enxertos ou biomateriais para restabelecer funções parciais ou normais da biomecânica, além de promover aumento da qualidade de vida do paciente e ajudar na sua reabilitação [10,11].

1.2 Biomateriais e arcabouços para a engenharia tecidual óssea

Milhares de procedimentos cirúrgicos ortopédicos são realizados para repor ou substituir tecidos que foram lesionados por doenças ou traumas. Para esses casos, o tratamento convencional é a enxertia, cujo objetivo é transplantar tecido de uma área para outra do mesmo paciente (auto-enxerto) ou de um indivíduo para outro (aloenxerto). Apesar de esses métodos permitirem a melhora da qualidade de vida do paciente, existem limitações em ambas as técnicas. O auto-enxerto pode causar quadro alérgico, hematomas e risco de infecção na região doadora e o aloenxerto pode gerar rejeição do transplante e a possibilidade do paciente contrair infecção cruzada ou doença do doador [12-14].

Sendo assim, a utilização de biomateriais tem sido amplamente estudada como substituto do tratamento convencional do tecido ósseo lesionado. Biomaterial é qualquer substância (sintética ou natural) que possui combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas viável para ser utilizado como dispositivo médico ou em contato com sistemas biológicos objetivando tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [15].

A engenharia tecidual óssea objetiva desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou aumentem a função da área lesada. Sendo uma área multidisciplinar, seu estudo é baseado no conhecimento das áreas da saúde, engenharia mecânica, ciência dos materiais e disciplinas correlatas das engenharias e das ciências da saúde [16].

Os arcabouços porosos de três dimensões são utilizados para fornecer um ambiente apropriado para a regeneração da região lesionada atuando como um modelo e um estimulador biofísico permitindo que as células se organizem e se desenvolvam em um ambiente semelhante ao tecido original. A combinação entre as células, o arcabouço e o estímulo celular causado por esse material é fundamental para o sucesso do implante [17,18].

Em geral, as interações celulares com a superfície do material podem ser controladas por três rotas distintas. Primeiramente, sabe-se que a química da superfície do substrato desempenha um importante papel no comportamento celular sobre a superfície do material. A adição de ligantes ou seqüências de peptídeos específicos pode ajudar na ligação de certos tipos de células. Em segundo lugar, observa-se que as células são capazes de investigar e responder ativamente a alterações na mecânica do substrato. Por fim, a topografia da superfície do material pode direcionar o crescimento, a adesão, a diferenciação e a expressão gênica dessas células [19,20].

Uma grande variedade de biomateriais e inúmeras técnicas são utilizadas para a produção de arcabouços porosos com o intuito de mimetizar diferentes áreas do corpo. Porém, esses materiais devem respeitar cinco requisitos básicos na engenharia tecidual. Eles devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, apresentar boas propriedades mecânicas, arquitetura similar a área em tratamento e tecnologia de produção otimizada [21-25]. A figura 02 ilustra esquematicamente a área de atuação da engenharia tecidual óssea.

A biocompatibilidade é o primeiro critério a ser analisado. Para ser biocompatível, o implante deve fornecer um ambiente adequado para que as células possam se aderir, migrar na superfície do material e através dele. Somado a isso, após sua implantação, o material deve apresentar resposta inflamatória insignificante a fim de minimizar o efeito de rejeição pelo paciente [26].

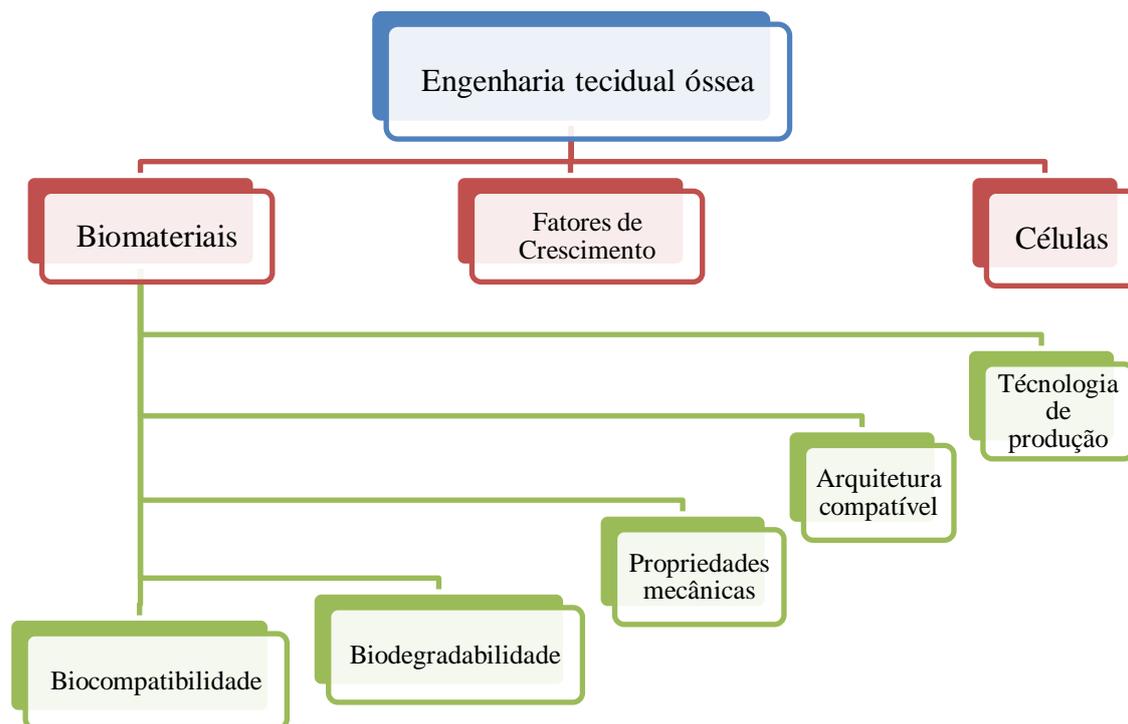


Figura 02 – Esquema da atuação da engenharia tecidual óssea.

Outro importante fator é fazer com que o material permita que as células o substituam gradualmente. Para ser biodegradável, o implante deve permitir que as células produzam sua própria matriz extracelular, que o subproduto da degradação não seja tóxico, e que as partículas liberadas não interfiram no funcionamento de outros órgãos e tecidos [27,28].

Em termos de propriedade mecânica, o biomaterial deve apresentar características semelhantes à região na qual será implantado, devendo possuir resistência adequada para permitir seu manuseio durante o tratamento cirúrgico. A produção de arcabouços com propriedade mecânica adequada é um grande desafio para a engenharia óssea, pois ele deve ter integridade mecânica suficiente para funcionar a partir do momento da implantação, ajudando o processo de remodelação óssea. Outro ponto importante a ser observado é que o material deve associar uma boa propriedade mecânica a uma taxa de porosidade que auxilie a vascularização capilar local e a migração celular para o interior do arcabouço [23-25].

Bons arcabouços devem apresentar poros interconectados e alta porosidade para assegurar a penetração celular e a difusão de nutrientes para a célula, promover subsídios para a formação de uma nova matriz extracelular, facilitar a saída dos resíduos celulares e dos produtos de degradação do arcabouço sem a interferência de outros órgãos e tecidos vizinhos. Em relação ao tamanho de poro, ele deve ser grande o suficiente para que a célula possa colonizar o interior do material e pequeno bastante para promover a fixação celular. O tamanho do poro pode variar dependendo do tipo da célula e do tecido para qual o material está sendo projetado [29].

Estudos apontam que, arcabouços com porosidade média de 100 μm são ideais para materiais biocerâmicos, pois eles ajudam a manter a vascularidade e a viabilidade celular a longo prazo [29]. Outros autores orientam que poros acima de 50 μm podem acelerar o processo de substituição do material pelo tecido ósseo [30] e alguns relatos estabelecem que poros entre 200 e 500 μm favoreçam a colonização de osteoblastos [29,30].

Por fim, o arcabouço deve ser reproduzível, o processo de produção deve apresentar viabilidade clínica e comercial, o custo efetivo e o tempo de produção devem ser baixos, além de estabelecer protocolos da sua forma de armazenamento e utilização (indicação da necessidade ou não de submissão à cultura celular *in vitro* antes do uso *in vivo*) [20].

1.3. Quitosana

A quitosana (CHI) é um copolímero linear de β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e β -(1-)-2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose, proveniente da reação de desacetilação alcalina da quitina, um dos principais componentes estruturais do exoesqueleto de artrópodes e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. A transformação de quitina em quitosana é justificada pela área biomédica devido à baixa solubilidade da quitina em solução aquosa ou em solventes orgânicos, tornando-se complexa a sua aplicação prática. Em contra partida, a quitosana é uma variante artificial que possui excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade com baixa toxicidade e imunogenicidade, além de boa atividade antimicrobiana [31]. As estruturas da quitina e da quitosana são representadas na figura 03.

A diferença entre esses dois polímeros é a porcentagem de grupos funcionais acetilados ($-\text{NHCOCH}_3$). Para a quitina se transformar em quitosana é necessário converter esses grupos em grupos aminos ($-\text{NH}_2$) através da reação de hidrólise. As condições utilizadas para realizar essa reação química vão determinar o peso molecular do polímero e o seu grau de desacetilação, assim como, suas propriedades biológicas

[33]. A tabela 01 apresenta a relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana.

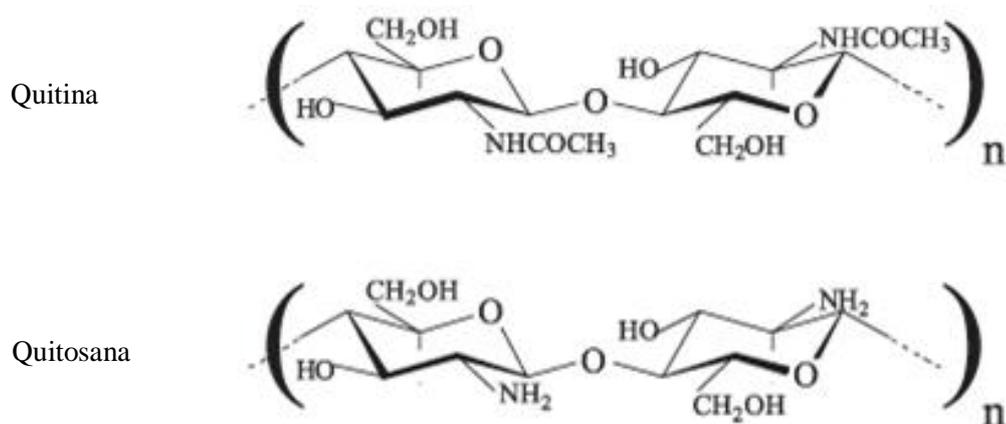


Figura 03 – Representação da estrutura química da quitina e da quitosana.

Fonte: [32].

Na forma cristalina, a quitosana é insolúvel em solução aquosa com pH maior que 7,0, entretanto, em solução ácida, ela atua como agente quelante ao interagir com polímeros e metais, é capaz de funcionalizar moléculas biológicas como DNA e proteínas, e apresenta baixo custo de obtenção [34,35].

A escolha de vários autores em utilizar a quitosana como base de arcabouço 3D na engenharia tecidual é que esse material possui propriedades biológicas, físicas e químicas que podem ser controladas e também pela sua facilidade de modelação para obtenção de um produto final [36-39].

É possível formar uma estrutura apresentando porosidade interconectada a partir de uma solução de CHI através das técnicas de congelamento e liofilização. A conectividade entre os poros é de fundamental importância para estudos que visam

mimetizar o sistema esquelético, pois, como já foi explanado, as células locais precisam crescer, se multiplicar por toda a região do material para formar uma nova matriz extracelular e necessitam de suporte nutricional para o seu desenvolvimento no interior do arcabouço. Somado a isso, o tamanho dos poros e a suas conectividades são de fundamental importância para a angiogênese [40,41].

Tabela 01 – Relação entre parâmetros estruturais e propriedades da quitosana.

Propriedade	Características estruturais
Solubilidade	↑ Grau de desacetilação
Cristalinidade	↓ Grau de desacetilação
Biodegradabilidade	↓ Grau de desacetilação, ↓ Peso molecular
Viscosidade	↑ Grau de desacetilação
Biocompatibilidade	↑ Grau de desacetilação
Mucoadesão biológica	↑ Grau de desacetilação, ↑ Peso molecular
Analgesia	↑ Grau de desacetilação
Antimicrobiana	↑ Grau de desacetilação, ↑ Peso molecular
Antioxidante	↑ Grau de desacetilação, ↓ Peso molecular
Homeostática	↑ Grau de desacetilação

Nota: ↑ diretamente proporcional a propriedade; ↓ inversamente proporcional a propriedade.

Fonte: [33].

Autores relatam que o tamanho médio de poro em arcabouços a base de quitosana pode ser controlado e que a porosidade e a interconectividade influenciam nas propriedades mecânicas do material. De modo geral, valores em torno de 100 µm promovem, através de testes *in vitro*, uma alta taxa de adesão, espriamento e viabilidade celular, grande atividade de diferenciação celular, baixa taxa de citotoxicidade e apresentam um bom módulo de compressão [41-44].

A degradabilidade apresenta um importante papel no desempenho a longo prazo do biomaterial. Alguns materiais aplicados em medicina devem ser absorvíveis pelo organismo, pois eles podem afetar os processos de reprodução e crescimento celular e regeneração tecidual [27].

Arcabouços utilizados para a engenharia tecidual óssea devem apresentar taxas de degradação relativamente lentas, assim como devem manter suas propriedades mecânicas até a regeneração do tecido. Porém, deve-se observar que, fisiologicamente, o tempo de reparo ósseo no ser humano pode variar de alguns dias a meses, dependendo do tipo de lesão. Alto grau de desacetilação ($\geq 85\%$) exibe uma taxa de degradação relativamente lenta que pode durar por vários meses. Em contra partida, materiais a base de quitosana com baixa desacetilação se degradam com maior facilidade [45,46].

A lisozima é uma enzima primária responsável pela degradação *in vivo* da quitosana. Ela atua atacando os resíduos acetilados desse copolímero. O produto final da degradação são os oligossacarídeos (carboidratos) com tamanhos variados e facilmente reabsorvíveis pelo organismo [47].

1.4. Fibroína

A fibra da seda produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*) é composta basicamente de dois tipos de proteína, a sericina e a fibroína. A sericina é quimicamente uma proteína não filamentosa que contém impurezas naturais como gordura, cera e sais inorgânicos, e a fibroína (SF) é um polímero natural semicristalino biocompatível com

boas propriedades mecânicas devido à existência da estrutura folha- β [48,49]. A composição do casulo do bicho-da-seda é apresentada na tabela 02.

O processo de extração da fibroína consiste basicamente em separá-la da sericina [51]. A figura 04a mostra a micrografia da parte exterior do casulo onde observa-se um duplo filamento e uma rede interconectada. A união dessas fibras (fibroína) ocorre através da sericina. Essa proteína é também responsável por conectar vários filamentos pares entre si reforçando a parte externa do casulo, melhorando as propriedades mecânicas e protegendo contra agentes externos. O diâmetro médio de um filamento é de 5,3 μm e do duplo filamento com a sericina, 12,4 μm .

Tabela 02 – Composição da seda do *Bombyx mori*.

Componentes	%
Fibroína	70-80
Sericina	20-30
Cera	0,4-0,8
Carboidratos	1,2-1,6
Material inorgânico	0,7
Pigmento	0,2
Total	100

Fonte: [50].

A figura 04b mostra a parte interna do casulo e também é observada uma rede de duplo filamento cruzado, porém a sericina não aparece conectando os pares de filamento entre si. Os filamentos internos estão presentes em maior número e diâmetro.

A média do valor do filamento é de 13,3 μm e do filamento duplo com a sericina, 27,6 μm .

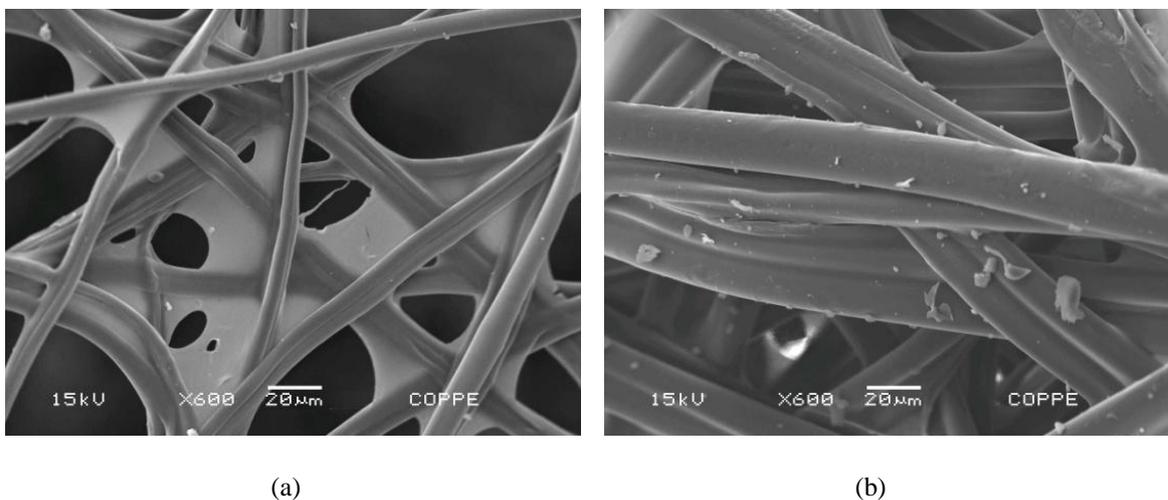


Figura 04. Micrografias do casulo do bicho-da-seda: (a) parte externa; (b) parte interna.

Nanofibrilas de fibroína são compostas por três componentes protéicos: uma grande proteína, conhecida como cadeia pesada da fibroína (cadeia-H) com peso molecular de 370 kDa que é ligada, via pontes de dissulfeto, a uma cadeia protéica chamada de cadeia leve (cadeia-L; 25 kDa), e uma pequena glicoproteína, a proteína P25 (30 kDa), que é associada ao complexo através de interações hidrofóbicas não covalentes [52,53].

A taxa molar de cadeia-H:cadeia-L:P25 é de 6:6:1, a cadeia-H é hidrofóbica e contém blocos de $(\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser})_n$ e $(\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr})_n$ que são conhecidos pela forma cristalina anisotrópica folha- β e por conferirem a proteína boa propriedade mecânica. A cadeia-L é hidrofílica e relativamente elástica, e a proteína P25 tem a função de manter a integridade do complexo. Todos os 20 aminoácidos podem ser encontrados na estrutura da fibroína, sendo que os principais são: glicina

(Gly, 45,9%); alanina (Ala, 30,3%); serina (Ser, 12,1%); tirosina (Tyr, 5,3%); valina (Val, 1,8%); e 4,7% dos outros aminoácidos restantes [54,55].

A fibroína possui uma boa combinação de força e resistência, devido a sua estrutura cristalina β , e bons módulos de elasticidade e de compressão graças à cadeia-L. O controle dessas propriedades em arcabouços 3D está relacionado à sua forma de preparação. Deve-se observar a influência da concentração da fibroína, o tamanho e a distribuição dos poros no material e de que forma ela será utilizada. Essas propriedades somadas a biocompatibilidade, a baixa taxa de degradação e ao baixo custo de processamento conferem a fibroína características de um biomaterial competitivo [56]. A tabela 03 mostra uma comparação entre as propriedades mecânicas da fibroína com outros polímeros naturais e sintéticos.

Tabela 03 – Comparação das propriedades mecânicas da SF a outros polímeros.

Material	Resistência a tração (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	% Alongamento
Fibroína + sericina	500	5-12	19
Fibroína s/ sericina	610-690	15-17	4-16
Colágeno	0,9-7,4	0,0018-0,016	2-68
Osso	160	20	3
Kevlar (49 fibras)	3600	130	2,7
Borracha sintética	50	0,001	850

Fonte: [54].

Em relação à biocompatibilidade de materiais que contem fibroína em sua composição, foi observado, através de teste *in vitro* e *in vivo*, que a proteína apresentou

resposta inflamatória igual ou menor a materiais utilizados tradicionalmente na engenharia tecidual óssea [53,57].

Ainda não é bem compreendida a relação entre as variáveis taxas de concentração e de degradação desse polímero. Estudos mostram que arcabouços porosos contendo fibroína podem se degradar em um tempo médio de 06 meses a depender da quantidade de folha- β contida no material. As enzimas proteolíticas, como a quimotripsina, agem decompondo regiões cristalinas dessa molécula e acredita-se que os fragmentos restantes são absorvidos por endocitose [58,59].

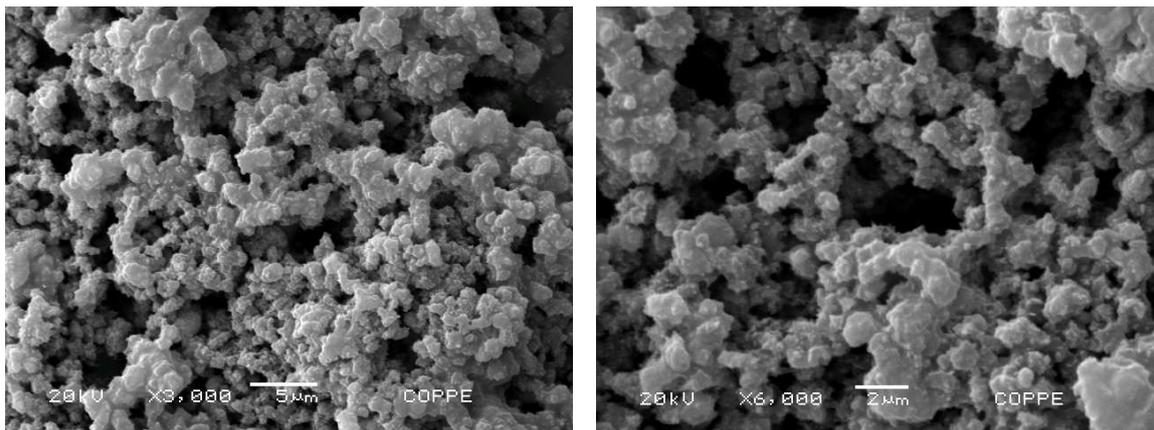
1.5. Hidroxiapatita

Os fosfatos de cálcio são os principais constituintes do tecido biológico duro. Por serem leves, quimicamente estáveis, de composição similar à fase mineral óssea (biocompatíveis) e osteocondutores, são utilizados como enxerto na engenharia tecidual. *In natura*, os fosfatos de cálcio biológicos existem em diferentes formas e fases, dependendo da temperatura, umidade e presença de impurezas [60,61].

O osso humano é composto por cerca de 70% de fase mineral, sendo que a hidroxiapatita (HA), com uma razão Ca/P de 1,67, é o fosfato de cálcio mais encontrado e estável em ambiente fisiológico. Por apresentar uma composição química próxima a matriz inorgânica do sistema esquelético, a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_8(\text{OH})_2$, possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Implantes com esse mineral favorecem o crescimento ósseo (osteocondutividade), estabelecem ligações de natureza química com o endoesqueleto (bioatividade) e permitem a proliferação celular [16,31].

A síntese da hidroxiapatita tem baixo custo, fácil reprodução industrial e vem sendo realizada por diferentes métodos, incluindo: precipitação em solução aquosa, reações do estado sólido, métodos hidrotérmicos, processo sol-gel, e micro emulsão [62]. Dentre essas técnicas, a precipitação em solução aquosa é uma das mais citadas na literatura.

Esse método consiste na utilização de soluções aquosas que contenha Ca^{2+} e PO_4^{3-} , como por exemplo, soluções de acetato de cálcio hidratado, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e de dihidrogenofosfato de sódio diidratado, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A manutenção do pH em torno de 6,5 e da temperatura em 70°C é de suma importância para a obtenção desse fosfato de cálcio. Em geral, o processo de síntese dura por volta de 3 h [63,64]. As figuras 05a e 05b mostram micrografias de hidroxiapatita com granulometria de $150 \mu\text{m}$ sintetizada por esse processo.



(a)

(b)

Figura 05. Micrografias de hidroxiapatita com uma granulometria de $150 \mu\text{m}$ sintetizada pelo método de precipitação aquosa: (a) aumento de 3000x; (b) aumento de 6000x.

Apesar de excelentes propriedades biológicas, as propriedades mecânicas desse material são diferentes das apresentadas pelo tecido ósseo. A hidroxiapatita apresenta um alto módulo de elasticidade (~ 120 GPa) em comparação ao osso (< 30 GPa para ossos trabeculares), possui alta dureza, baixa resistência a fratura e suas partículas são instáveis em contato com soluções salinas ou sangue, com isso, elas podem se soltar do material e migrar para outros tecidos através da corrente sanguínea causando danos em outros órgãos [30,65].

A reabsorção dessa cerâmica é lenta e a biodegradação pode ocorrer por: dissolução físico-química; desintegração física em pequenas partículas devido ao ataque químico nos limites de grão; e fatores biológicos (fagocitose) [66].

1.6. Arcabouços quitosana, fibroína e hidroxiapatita

Como foi explicado anteriormente, todos os materiais apresentados possuem pontos positivos e negativos para aplicação como biomaterial. A proposta da engenharia de materiais aliada aos conhecimentos da química, física e biologia é produzir materiais que possam manter suas boas propriedades mecânicas em associação com os seus benefícios biológicos, conferindo ao implante uma boa utilização em cirurgias ortopédicas e que, posteriormente, possa reduzir o tempo de reabilitação do paciente [16-20].

Objetivando resolver o problema de propriedade mecânica e migração de partículas da hidroxiapatita, alguns autores relataram que a integração dessa cerâmica

com biopolímeros pode resolver essa deficiência, formando materiais híbridos com base de materiais poliméricos [65].

Um dos primeiros compósitos híbridos relatados foi um material que associava a hidroxiapatita com o colágeno, visto que são os dois principais componentes encontrados na matriz óssea. Os autores observaram que o compósito apresentava microestrutura similar ao tecido humano e que, após testes *in vivo*, houve reabsorção osteoclástica do material e boa osteocondutividade [14,67].

Atualmente, o colágeno ainda é bastante utilizado em biomateriais destinados ao reparo do tecido ósseo. Esse biopolímero apresenta grande elasticidade, porém, sua resistência à tração é baixa. Além disso, ela é extraída de tecido animal ou produzida por métodos transgênicos, o que dificulta o controle das infecções cruzadas, e possui um custo elevado, tornando-se necessário obter fontes alternativas que substituam essa matriz orgânica [63,68].

A quitosana vem sendo relatada como uma boa matriz para arcabouços 3D, pois além de suas boas propriedades biológicas, ela apresenta boa flexibilidade adesiva, ideal para uma matriz polimérica que se objetiva associar a hidroxiapatita. A fragilidade dessa cerâmica pode ser minimizada pela incorporação de quitosana em virtude da sua propriedade plástica e adesiva. Alguns autores observaram que compósitos dessa natureza foram mecanicamente flexíveis e podiam ser facilmente moldáveis com formatos desejáveis [66,69].

Por outro lado, associar fibroína com hidroxiapatita pode resolver o problema de migração das partículas do mineral, pois o resultado da interação desses materiais é a ligação entre os *clusters* de hidroxiapatita com as fibrilas de fibroína. Mesmo assim, compósitos de HA-SF são de complexa modelação e flexibilidade sendo sua utilização como substituto ósseo dificultada [70].

A implementação de quitosana e fibroína como matriz orgânica em arcabouços que contem hidroxiapatita pode ser atrativa para a engenharia de tecido ósseo, pois o material vai aliar biocompatibilidade com boa força mecânica, modelagem e flexibilidade. Adicionalmente, a produção desses arcabouços é barata, pois os três materiais são de fácil obtenção [69,70].

1.7. Testes em cultura celular

Testes *in vitro* também são chamados de testes de segurança, pois avaliam o risco toxicológico das substâncias químicas usadas na fabricação de qualquer produto para utilização humana. A engenharia de materiais visa preparar novos produtos e colocá-los em teste para que possam ser comercializados com o máximo de segurança ao consumidor. O esquema da figura 06 mostra a importância desses testes na viabilização do produto para o comércio.

O comportamento celular em contato com materiais pode ser estudado com vários tipos de células. Entretanto, para avaliar o efeito da composição dos arcabouços em diferentes estágios de diferenciação celular osteoblástica são utilizadas três tipos de

células: células osteogênicas imaturas STRO+1A [71,72]; células pré-osteoblásticas de rato MC3T3-E1 [73,74]; e, células de osteoblastos maduros SaOS-2 [75,76].

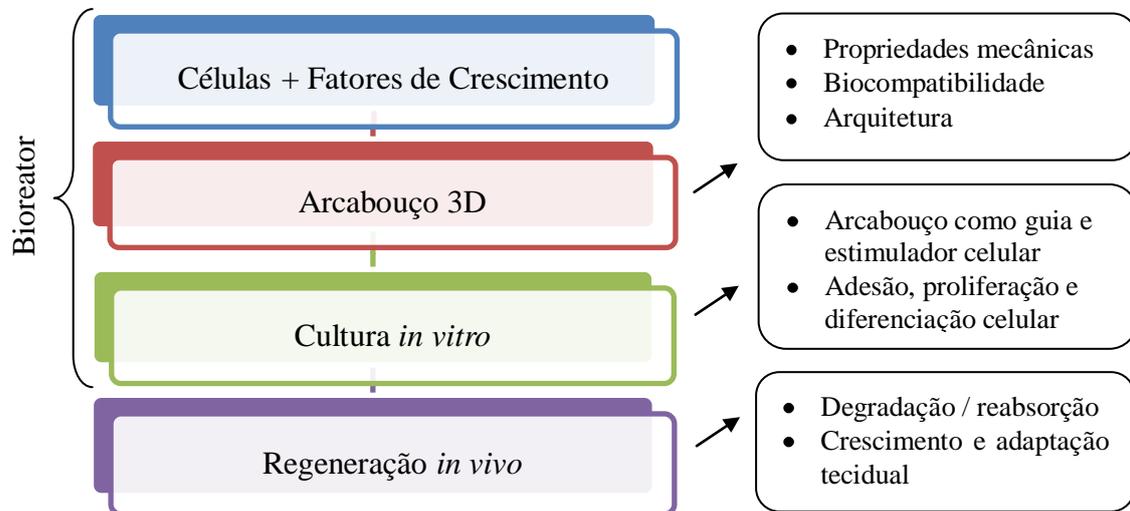


Figura 06. Esquema das etapas para validação de um biomaterial.

Fonte: [43].

Até o momento, poucos trabalhos analisam a relação entre a quitosana, a fibroína e a hidroxiapatita como arcabouço aplicável à engenharia tecidual óssea. Sendo assim, espera-se que esse novo material apresente boa osteocondutividade, servindo como guia e estimulador celular, além de ajudar na proliferação e diferenciação de células de linhagem osteoblástica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a adesão, proliferação e diferenciação de células cultivadas em compósitos a base de quitosana, fibroína e hidroxiapatita.

2.2 Específicos

- Produzir compósitos contendo quitosana, fibroína e hidroxiapatita;
- Caracterizar físico-química e morfologicamente esses materiais;
- Analisar a citotoxicidade dos arcabouços visando aplicações *in vitro*;
- Observar o comportamento celular em cultura tridimensional em ambiente estático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção dos arcabouços

A fibroína (SF) extraída do casulo do *Bombyx mori* foi adquirida da Huzhou Xintiansi Bio-tech Co Ltd. (China), a quitosana (CHI), proveniente da casca do caranguejo, grau de desacetilação 85%, da Sigma-Aldrich (EUA), e a hidroxiapatita (HA) não sinterizada e com granulometria < 120 µm foi cedida pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF (Brasil).

Os compósitos foram produzidos a partir de uma solução de ácido acético (1 % v/v), respeitando as seguintes condições:

- Grupo I / Controle (CHI): dissolvendo 2 % (m/v) de quitosana;
- Grupo II (CHI/SF): dissolvendo 2 % (m/v) de quitosana e 2 % (m/v) de fibroína;
- Grupo III (CHI/SF/HA): dissolvendo 2 % (m/v) de quitosana, 1 % (m/v) de fibroína e 1 % (m/v) de hidroxiapatita.

Para garantir boa homogeneização, a suspensão permaneceu sob agitação por 01 dia e depois, em banho ultra-som (Ultrasonic Cleaner Thornton 750USC, Unique, Brasil), por 10 min. Subseqüentemente, essa suspensão foi colocada em molde cilíndrico de politetrafluoretileno (altura, 40 mm e diâmetro 90 mm), congelada por 24 h em freezer a -20°C e liofilizada (Liotop L108, Liobras, Brasil) por 24 h. As amostras secas foram removidas dos moldes, neutralizadas em uma solução 0,1% de NaOH aquoetanólica (8:2) durante 3 h, lavadas por 30 min com água ultrapura (UHQ,

Purelab, EUA), reticuladas (utilizando trifosfato pentassódico, 2,5% (m/v)) por 3 h e lavadas por 30 min com água ultrapura. Por fim, os compósitos foram congelados de novo por 24 h e reliofilizados por 24 h.

3.2. Caracterização físico-química

3.2.1. Difração de raios-X (DRX)

A estrutura e a cristalinidade dos materiais foram analisadas pela técnica de difração de raios-X. Foi utilizado um difratômetro modelo XRD-6000 com radiação monocromática $\text{CuK}\alpha$ (Shimadzu, Japão) e tubo operacional com voltagem e corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente. Os espectros de DRX foram obtidos variando 2θ de 5 a 80° e com uma velocidade de varredura de 3°/min.

3.2.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A caracterização química dos compósitos feita por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier usando o modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR) foi obtida utilizando um espectrômetro modelo Spectrum 100 (Perkin Elmer, EUA) operando em um intervalo de 2000-650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.3. Análise termogravimétrica (TG)

Para analisar as mudanças de massa devido à interação com a atmosfera, vaporização e decomposição, foi utilizado a análise termogravimétrica (TG) através do analisador termogravimétrico TGA 851^e (Mettler-Toledo, Suíça) com uma variação de temperatura entre 0-1000°C e taxa de aquecimento de 10°C/min.

3.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os processos físicos e químicos envolvendo variação de energia foram estudados utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) através do analisador Mettler-Toledo DSC 822^e (Mettler-Toledo, Suíça) na faixa de temperatura de 0-600°C e taxa de aquecimento de 10°C/min.

3.2.5. Porosidade e tamanho de poro

A porosidade das amostras foi mensurada por deslocamento de líquido. O hexano foi escolhido como líquido de deslocamento, pois o mesmo permeia os arcabouços sem deformar a matriz. Sendo assim, o material foi imerso em um volume conhecido de hexano (V_1) em um cilindro graduado por 5 minutos. O volume total do hexano mais material impregnado com esse líquido foi chamado V_2 . O material impregnado foi removido do cilindro e o volume residual de hexano foi denominado de V_3 [77]. Com isso, a porosidade das amostras foi obtida por:

Para avaliar o tamanho médio dos poros, foi utilizada a técnica de porosimetria por intrusão de mercúrio a baixa pressão, através do porosímetro de mercúrio Autopore IV (Micromeritics, França).

3.2.6. Ângulo de contato

A técnica de ângulo de contato a base de água destilada foi utilizada para determinar a molhabilidade (ou hidrofiliabilidade) dos compósitos. O teste foi realizado através do goniômetro DSA-100 (Krüss, Alemanha) com um tamanho de gota de 2,5 µL. A forma da gota sob a superfície do arcabouço foi gravada usando a câmera acoplada ao sistema e o valor do ângulo foi aferido após o contato da gota com a amostra.

3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A composição morfológica, topográfica e a microestrutura das amostras foram examinadas pós-revestimento com camada de ouro por microscopia eletrônica de varredura, JSM-6460LV (Jeol, Japão), operando a 15 kV e 20 kV. A composição química dos compósitos foi observada através da espectroscopia de energia dispersiva (Noran System Six, EUA) acoplada ao MEV.

Para a análise da superfície das amostras após a cultura celular, foi realizada a metodologia para fixação de células através do HMDS. As amostras foram retiradas

cuidadosamente do meio de cultura, lavadas com PBS três vezes, colocadas em contato com fixador eletrônico (solução 4% de glutaraldeído e 0,2% de paraformaldeído em tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2%) por 24 h. Subseqüentemente, elas foram lavadas com tampão NaK_2P 0,175% (solução aquosa de NaH_2PO_4 0,0455 mol/L e K_2HPO_4 0,175 mol/L) por 2h. Após esse processo, as amostras foram desidratadas com lavagens sucessivas em álcool etílico 50, 70, 80, 95 e 100% (2x, 5 min cada). Para finalizar o processo de desidratação, os compósitos foram submetidos a tratamento com uma solução HMDS:EtOH (1:1) e uma solução de HMDS pura com banhos de 30 min cada.

3.3. Avaliação biológica

3.3.1. Processo de esterilização

Os compósitos foram esterilizados no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro por processo de irradiação gama (cobalto 60) com dose de 25 KGy/min e tempo de irradiação de 718 min, de acordo com a ABNT ISO 13485:2004 [78].

3.3.2. Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado seguindo os padrões ISO 10993-5:1999 [79] e 10993-12:1996 [80] para avaliação biológica de dispositivos médicos. Foram utilizadas células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1; CRL-2594-ATCC) [81] cedidas pelo Instituto de Ciências dos Materiais de Mulhouse (IS2M) pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa Científica – CNRS (França). As análises toxicológicas

foram obtidas a partir do *kit* de ensaio toxicológico *in vitro* – baseado em resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) e pelo método colorimétrico utilizando 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina – MTT (Sigma-Aldrich, EUA).

3.3.3. Cultura celular

Foram utilizados três tipos de células para avaliar o efeito da composição dos arcabouços em diferentes estágios de diferenciação celular na linhagem osteoblástica. Células STRO+1A [82], por serem células humanas mesenquimais que são capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos ou adipócitos; células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1; CRL-2594-ATCC) [81] derivada de células imortalizadas de calvária, por corresponderem a células osteogênicas imaturas; e, células de osteosarcoma humano (SaOS-2; HTB-85-ATCC) [83] foram usadas por exibirem características de osteoblastos maduros.

As células STRO+1A e MC3T3-E1 foram cultivadas em meio de cultivo do tipo Iscove's (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (VWR International, EUA), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). As células SaOS-2 foram cultivadas em meio de cultivo do tipo McCoy (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (VWR International, EUA), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram expandidas em atmosfera umidificada (37°C e 5% de CO₂) em incubadora Hera Cell 150 (Heraeus, Alemanha).

As amostras foram colocadas em meio de cultura com soro por 48h para adesão de proteína e para evitar que elas flutuassem durante o teste de cultura celular. Subseqüentemente, elas foram centrifugadas (Centrifuga B311 – Jouan, França) durante 10 min a 3500 rpm para eliminar eventuais partículas soltas no material.

Foram utilizadas 5×10^5 células em 150 μ L de meio e inoculadas no centro do material. Em seguida, elas foram colocadas na incubadora de CO₂ por 2 h para adesão celular. Posteriormente, foi adicionado meio de cultivo com 10^{-8} M de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA), substância que auxilia no processo de mineralização das células. As amostras foram recolocadas na incubadora de CO₂, os meios foram trocados a cada 02 dias e as análises foram realizadas no 7º, 14º e 21º dias de cultivo.

3.3.4. Ensaio do 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT)

A viabilidade celular foi obtida através do método colorimétrico utilizando o MTT (Sigma-Aldrich, EUA). Nesse método, o MTT é acumulado nas células por endocitose, logo, as células mortas não são sensíveis ao teste. A redução do anel tetrazólico ocorre nas mitocôndrias e resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais.

Nesse ensaio, uma solução de 5 mg/mL de MTT foi diluída 10x em tampão fosfato salino – PBS (Sigma-Aldrich, EUA) e colocada em contato com as amostras e incubada a 37°C por 3 h. Após a retirada dessa solução, foi colocado isopropanol (Carlos Erba Reagents, França) em meio ácido (300 μ L de HCl/100 mL de isopropanol) durante 10 min. A absorbância foi lida em 570 nm pelo leitor de placa Elisa – EL_{X800UV}

(Bio-Tech Instruments, EUA) e o número de células foi obtido por uma correlação linear entre absorbância e concentração celular (de 10^4 a 10^5 cels/mL).

3.3.5. Ensaio da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A diferenciação celular foi avaliada pela atividade de fosfatase alcalina. As amostras foram permeabilizadas com 0,5% de triton X-100 e incubadas com solução de 20 mM de p-nitrofenilfosfato, 100 mM de dietanolamina 98% e 10 mM de cloreto de magnésio hexahidratado durante 30 min à 37°C. A reação enzimática foi finalizada após a adição de uma solução 0,1 M de ácido etilenodiaminotetracético – EDTA e 1 M de hidróxido de sódio. A absorbância foi lida em 405 nm pelo leitor de Elisa – EL_{X800UV} (Bio-Tech Instruments, EUA) e todos os reagentes utilizados durante o processo foram provenientes da Sigma-Aldrich. A atividade ALP foi calculada a partir de uma curva padrão (de 0 a 3200 nmol/L) e os resultados foram expressos em nanomols de p-nitrofenol sintetizado por 10^4 células.

3.3.6. Teste de concentração de colágeno

Para determinar a concentração de colágeno produzida pelas células STRO+1A e SaOS-2 em contato com os materiais, foi utilizado o *kit Procollagen Type-I C-Peptide (PIP) EIA* (Takara, Japão). As análises foram realizadas com os meios de cultura coletados nos tempos de 7, 14 e 21 dias.

3.4. Análise estatística

Todos os resultados foram coletados a partir de testes em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão. Foi constatado, através do teste de Shapiro-Wilk, que as amostras seguiam a distribuição normal. Sendo assim, a significância estatística dos dados foi avaliada pela análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey. Assumiu-se a probabilidade de incorrer em erro tipo I (erro alfa) menor que 5% para todas as análises ($p < 0,05$) e os cálculos foram realizados por meio do *software* Origin.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Dimensões e peso médio das amostras

Nos três grupos, os *scaffolds* tiveram as seguintes especificações:

- Diâmetro = 90 mm
- Espessura = 40 mm
- Área de base = 64 mm²
- Área lateral = 113 mm²
- Área total = 240 mm²
- Volume = 25 mm³

Os biocompósitos foram preparados com essas dimensões visando sua utilização em cultura celular com placas de cultura de 24 poços.

Como pode ser visto na figura abaixo, a média de peso do grupo I (CHI) é de $9,3 \pm 0,6$ mg, do grupo II, $17,4 \pm 1,1$ mg e do grupo III, $18,4 \pm 1,1$ mg. Observou-se diferença significativa quando comparado o grupo I com os demais grupos ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado pela composição do grupo I, 2 % (m/v) de quitosana dissolvidos em uma solução 1 % (m/v) de ácido acético, enquanto que no grupo II (CHI/SF), foram dissolvidos 2 % (m/v) de quitosana e 2 % (m/v) de fibroína e, no grupo III (CHI/SF/HA), 2 % (m/v) de quitosana, 1 % (m/v) de fibroína e 1 % (m/v) de hidroxiapatita, dobrando o peso final do material.

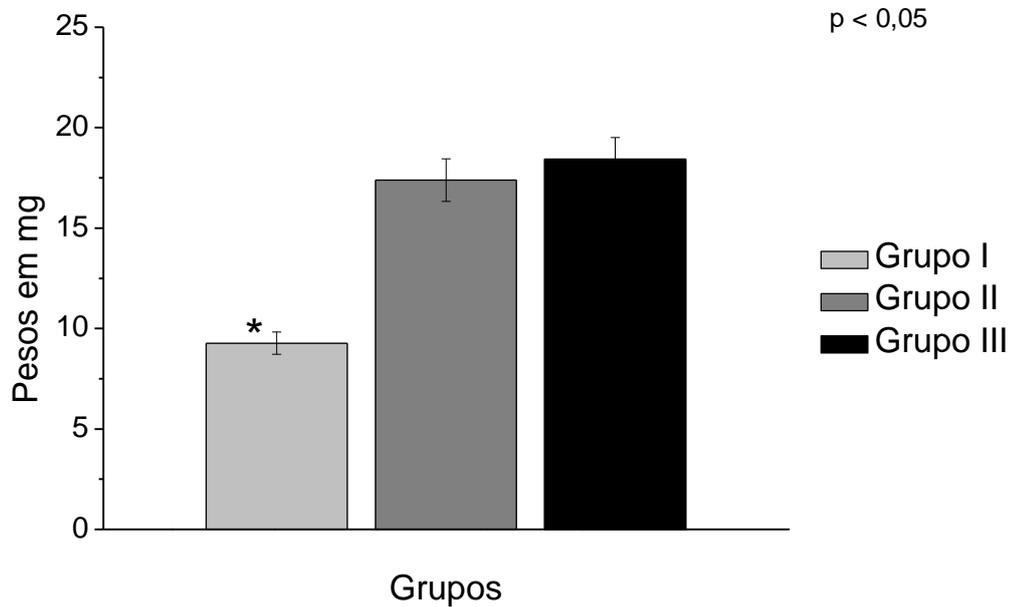


Figura 07. Representação gráfica da média e do desvio padrão do peso (em mg) dos grupos I, II e III (* estatisticamente diferente).

4.2. Caracterização físico-química

4.2.1. Difração de raios-X (DRX)

Na figura 08 são apresentados os padrões de DRX dos materiais e dos três grupos da pesquisa. Segundo Kim *et al.* [69], a quitosana é um copolímero semicristalino que apresenta um pico definido em torno de 20° quando submetida à análise de DRX. No difratograma do grupo I, essa região pode ser visualizada claramente em $19,6^\circ$ (*). Quando adicionado a fibroína ao compósito (grupo II), observa-se que o material se torna mais amorfo, com isso, esse pico apresenta-se menos intenso e passa a ser sobreposto por outro em $20,6^\circ$. Essa região juntamente com o pico em $24,3^\circ$ (**) refere-se à estrutura cristalina β -sheet da fibroína. Dados similares foram

relatados por Du *et al.* [65], que encontraram picos em $20,3^\circ$ e em $24,6^\circ$ referentes a essa estrutura. De acordo com Choi *et al.* [84] e com Feng *et al.* [85], o halo amorfo formado em ambos os grupos é característico da presença da quitosana e da fibroína nesses biomateriais. No grupo III, são observados pequenos picos em $31,8^\circ$, $32,2^\circ$ e $32,9^\circ$ (***) que correspondem ao padrão da hidroxiapatita pura (JCPDS 9-432) indicando que a quitosana e a fibroína não altera a estrutura cristalográfica da hidroxiapatita nesse compósito.

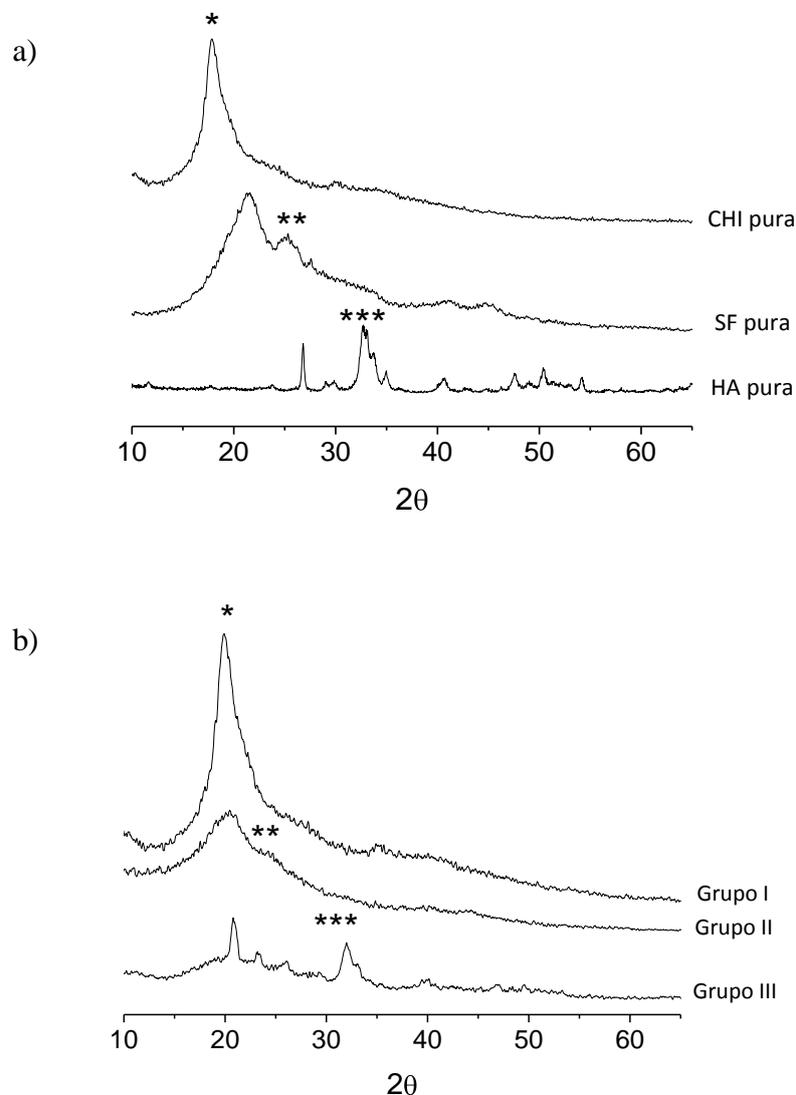


Figura 08. Difratomogramas de DRX: a) CHI, SF e HA puras e b) grupos I, II e III (* pico da estrutura cristalina da quitosana; ** pico da estrutura β -sheet da fibroína; *** picos característicos de hidroxiapatita).

4.2.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Resende [31] e Manjubala *et al.* [87] demonstraram que a quitosana apresenta banda nas regiões de 1657 cm^{-1} (referente ao modo vibracional da amida I), de 1603 cm^{-1} (amina), de 1425 cm^{-1} (frequência de vibração do grupo carboxílico), de 1319 cm^{-1} (amida III), de 1084 cm^{-1} , de 897 cm^{-1} e de 1033 cm^{-1} (alongamento de C-O) [31,87]. Dados semelhantes foram encontrados no grupo I e podem ser apreciados na figura abaixo.

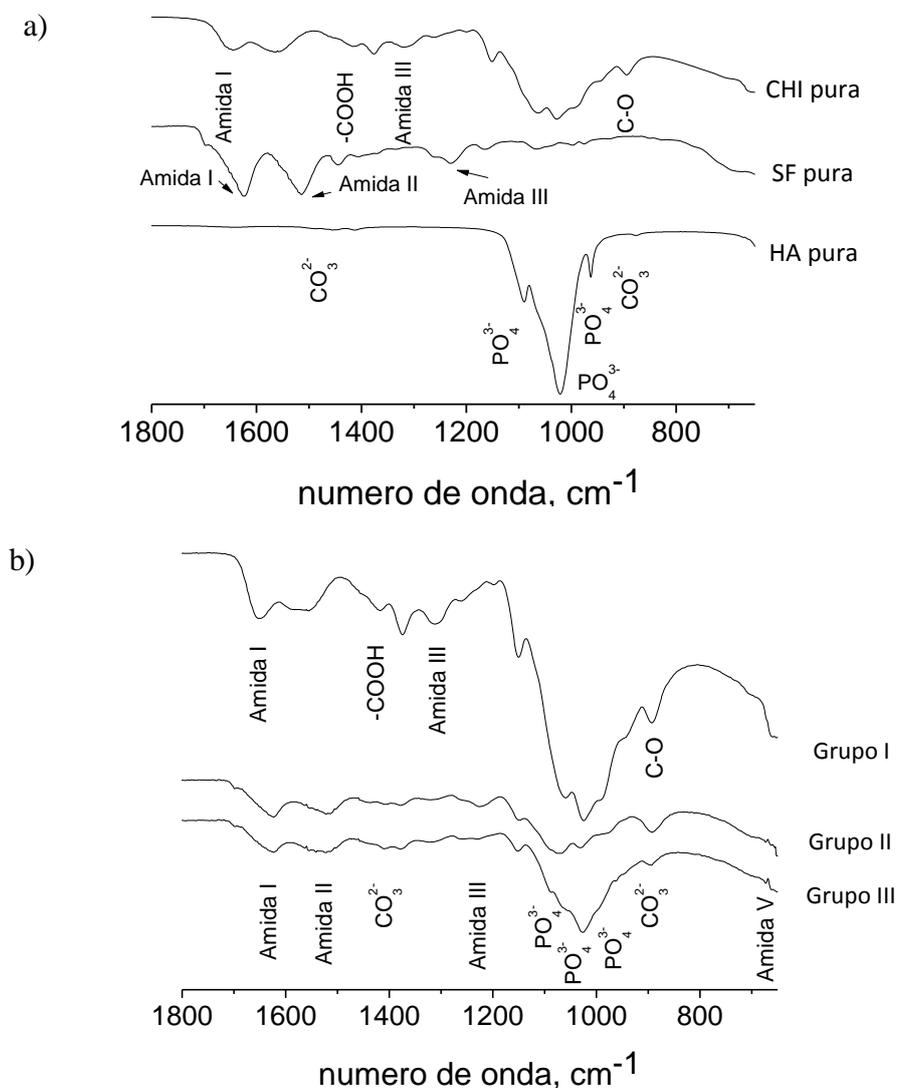


Figura 09. Espectro no FTIR (em modo ATR): a) CHI, SF e HA puras e b) grupos I, II e III.

No grupo II, essas bandas não são facilmente detectadas ou aparecem discretamente. Uma das razões é que a fibroína possui absorção em regiões próximas, dificultando a análise. A fibroína possui bandas de absorção em quatro áreas específicas associadas com diferentes grupos vibracionais. As bandas de amida I, II, III e V são atribuídas ao estiramento da C=O, a deformação de NH, a flexão de O-C-N e a cristalinidade da proteína, respectivamente. Na figura 09, observam-se bandas de absorção a 1627 cm^{-1} (amida I), a 1516 cm^{-1} (amida II), a 1230 cm^{-1} (amida III) e a 650 cm^{-1} (amida V). Esses dados corroboram com os encontrados por Wang e Li [70].

Bandas de hidroxiapatita referentes ao grupo fosfato a 1096 cm^{-1} , a 1033 cm^{-1} e a 961 cm^{-1} e ao grupo carbonato a 1410 cm^{-1} e a 890 cm^{-1} são verificados no espectro do grupo III. Esses dados foram similares aos encontrados por Wang *et al.* [86].

A interação química entre componentes inorgânicos e orgânicos em compósitos contendo hidroxiapatita foi estudada por alguns autores [70,88,89]. Eles concluíram que, provavelmente, essa interação ocorre entre os íons Ca^{2+} e as cargas negativas de grupos funcionais em matrizes orgânicas como amida I, amida II e amina, justificando a sua viabilidade de produção.

4.2.3. Análise termogravimétrica (TG)

As curvas de TG dos três grupos são exibidas na figura 10. Observa-se que, no grupo I há uma perda de peso contínua de 4,5% entre as temperaturas de $44,6^{\circ}\text{C}$ até $156,8^{\circ}\text{C}$. Perda de peso entre 50 e 120°C está atribuída à evaporação das moléculas de

água [89,90]. Também pode ser avaliado que entre 157,6°C e 801,4°C há redução de 67,5% da massa do compósito. Segundo Sivakumar *et al.* [90], essa porcentagem perdida pode estar atribuída à decomposição térmica de macromoléculas orgânicas, já que elas se degradam na faixa de temperatura entre 240-550°C. Os 27,9% restante do biomaterial que resistiu a temperaturas superiores a 802,4°C até sua total degradação a 923,9°C pode ser correlacionado a alguma alteração química sofrida pelo material durante seu processo de produção.

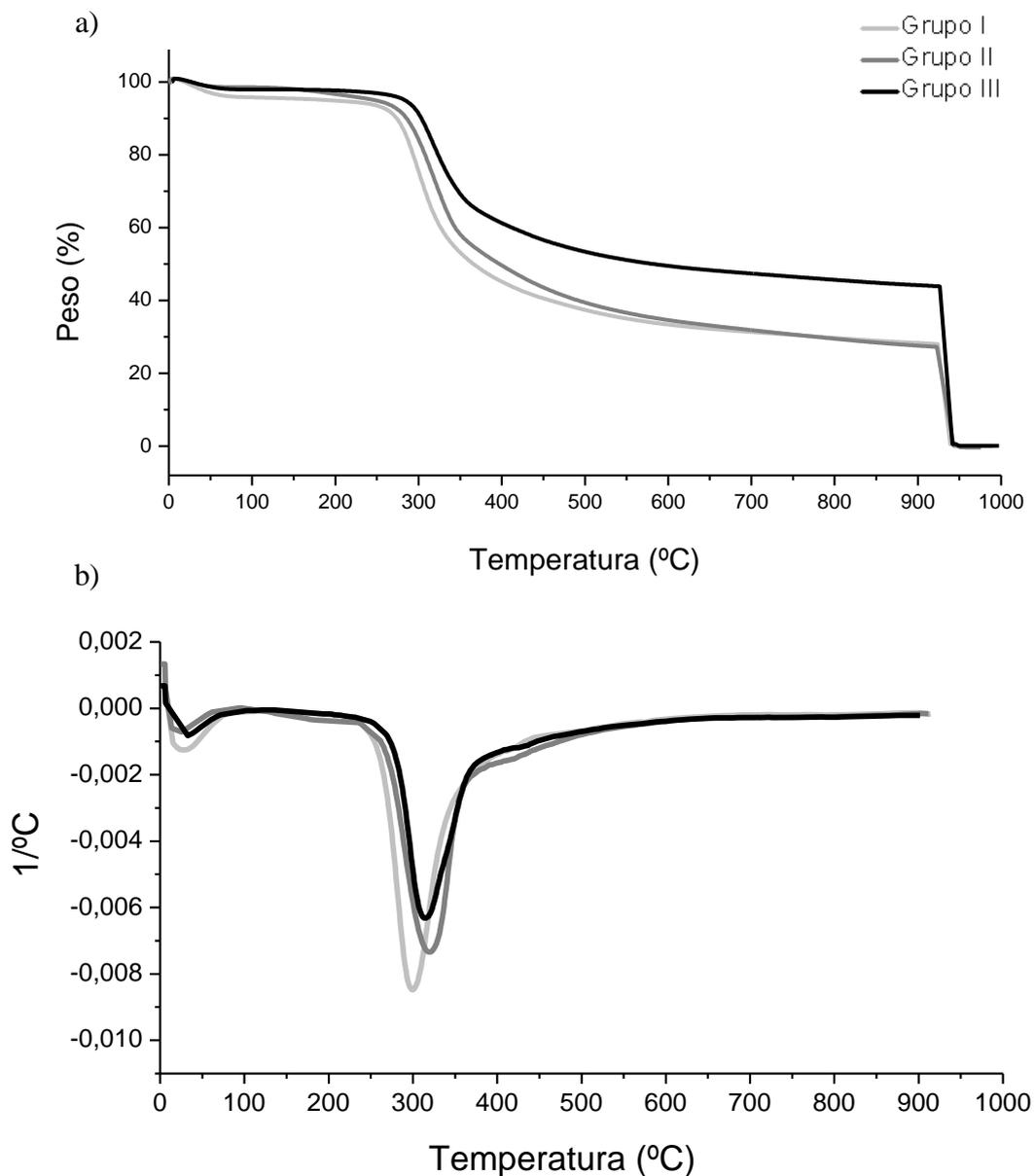


Figura 10. a) TG e b) DTG dos grupos I, II e III.

O grupo II apresenta um comportamento semelhante ao controle, já que a composição desses grupos é de material orgânico. Há uma perda contínua de peso (3,2%) entre as temperaturas de 44,7°C até 212,1°C. Entretanto, foi observado que o grupo que contém fibroína apresenta uma perda de massa inicial menor que no grupo controle podendo estar atribuída à característica hidrofóbica dessa proteína [91]. Após 212,2°C, o biomaterial perdeu 69,2% do peso até 801,2°C, restando 27,5% até a degradação total em 923,8°C. Da mesma forma, possíveis alterações químicas no compósito podem ter ocorrido durante o processo de produção, justificando sua alta temperatura de degradação final.

Por fim, é possível analisar que mesmo com a adição da hidroxiapatita (grupo III) o comportamento de degradação do arcabouço 3D foi semelhante aos demais grupos. Houve 2,2% de perda de água entre as temperaturas de 44,6–149,1°C e 54,1% foi decomposto entre 149,1–800,6°C.

4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Em todos os grupos podemos observar um pico endotérmico por volta de 100°C (figura 11), característico da desidratação dos compósitos [92]. No grupo I, observa-se um grande pico exotérmico a 300°C que está relacionado a um complexo processo de desidratação dos anéis de sacarídeos e despolimerização e desacetilação das unidades dos polímeros [93]. Esses dados corroboram com os achados de Nogueira *et al.* [92] e de Kweon *et al.* [93] que apresentaram dados similares aos apresentados nesse estudo.

No grupo II, foi observado o mesmo fenômeno exotérmico da quitosana encontrado no grupo controle, porém de forma mais branda, e surgiu um pico endotérmico por volta de 317°C, gerado pela decomposição da fibroína [94]. O termograma por DSC mostrou uma forma mista desses dois componentes e esses dados são semelhantes aos resultados de Moraes *et al.* [94], que realizaram a preparação e a caracterização de filmes à base de quitosana e fibroína.

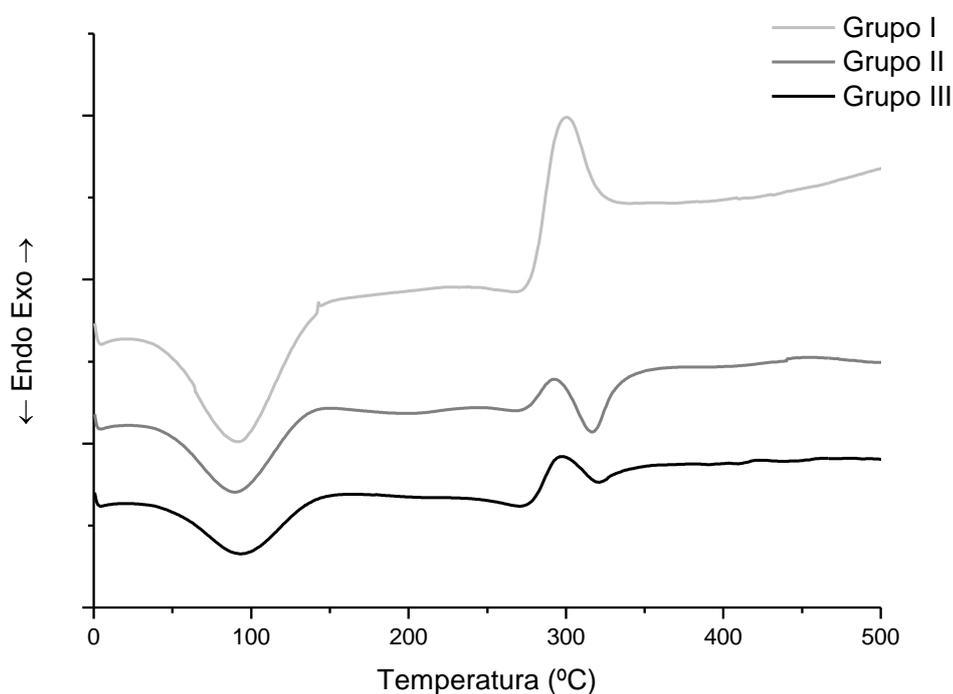


Figura 11. Termograma de DSC dos grupos I, II e III.

A hidroxiapatita não apresentou nenhum efeito significativo para alterar o teste calorimétrico, mantendo os principais picos dos materiais orgânicos. Sabe-se que o pico endotérmico em torno de 100°C está relacionado à perda de água pela hidroxiapatita [95]. Gay *et al.* [96] ao pesquisar compósitos densos de nanohidroxiapatita com ácido

poli-L lático (PLLA) concluíram que a hidroxiapatita, com 25 e 50% da massa total do compósito, não alterou os fenômenos térmicos gerados pelo PLLA.

4.2.5. Porosidade e tamanho de poro

Como foi relatado anteriormente, estruturas com alta porosidade interconectada são importantes para implantes ósseos em 3D, pois facilitam a proliferação celular dentro do material e também ajudam no transporte de nutrientes e na retirada de metabólitos locais. Porém, o tamanho de poro pode variar com o processamento aplicado e com os objetivos do estudo [17,30].

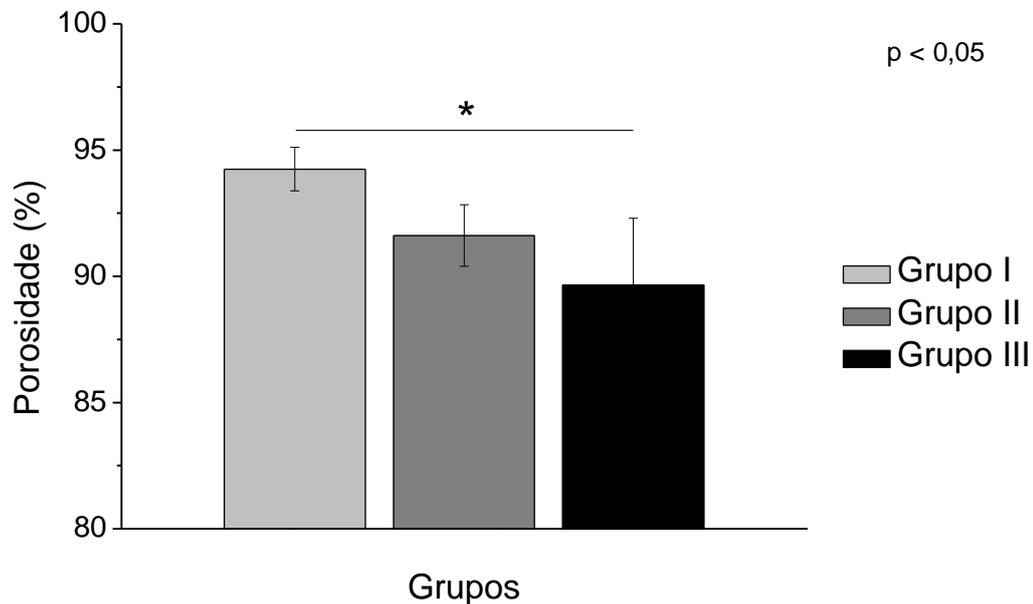


Figura 12. Percentual de porosidade por deslocamento de líquido dos grupos I, II e III.

Nesse estudo, a porosidade foi mensurada por deslocamento de líquido. Observa-se que o grupo controle apresentou porosidade média de $94,2 \pm 0,9\%$, o grupo II, de $91,6 \pm 1,2\%$ e o grupo III, de $89,7 \pm 2,6\%$ (Figura 12). Apesar de o grupo II

apresentar uma porosidade inferior ao grupo I, há diferença estatística somente entre os grupos I e III ($p < 0,05$).

Possivelmente, isso pode ser explicado pela adição da hidroxiapatita que tende a reduzir a porosidade da matriz orgânica contendo quitosana ou essa diferença pode estar relacionada ao processo de produção do grupo controle, já que ele é formado por apenas 2% (m/v) de quitosana, enquanto que os demais grupos apresentam 4% (m/v) divididos entre quitosana, fibroína e/ou hidroxiapatita na composição total do material.

Kim *et al.* [69] produziram arcabouços com diferentes composições de quitosana, fibroína e hidroxiapatita e perceberam que com aumento da porcentagem em massa da hidroxiapatita os poros tendiam a se fechar, reduzindo a porosidade.

Os tamanhos dos poros obtidos foram aferidos através da porosimetria por intrusão de mercúrio. O grupo I apresentou uma faixa entre 75 e 100 μm , o grupo II, entre 50 e 100 μm e o grupo III entre 50 e 75 μm . Sopyan *et al.* [29] e Chang *et al.* [98] verificaram que os biomateriais com tamanho de poro entre 50 e 150 μm tendem a manter a vascularidade e a viabilidade celular a longo prazo, além de acelerar o processo de substituição do material pelo tecido ósseo.

4.2.6. Ângulo de contato

Segundo Shalumon *et al.* [99], os materiais podem ser considerados hidrofílicos, quando o ângulo de contato está entre 0-30°, com baixo poder hidrofílico, de 30-90°, e hidrofóbicos, quando a angulação é superior a 90°. Sabe-se que, quanto maior a

hidrofilicidade de um *scaffold* (menor ângulo de contato), melhor é a sua resposta frente à atividade celular e à adsorção de proteínas.

O ângulo de contato do grupo controle revela um valor de ângulo θ de $71,4 \pm 2,7^\circ$, demonstrando que esse biomaterial apresenta características hidrofílicas. Amaral *et al.* [100] e Gupta e Jabrail [101] afirmaram que um alto grau de desacetilação favorece a hidrofilicidade da quitosana justificando o comportamento desse grupo.

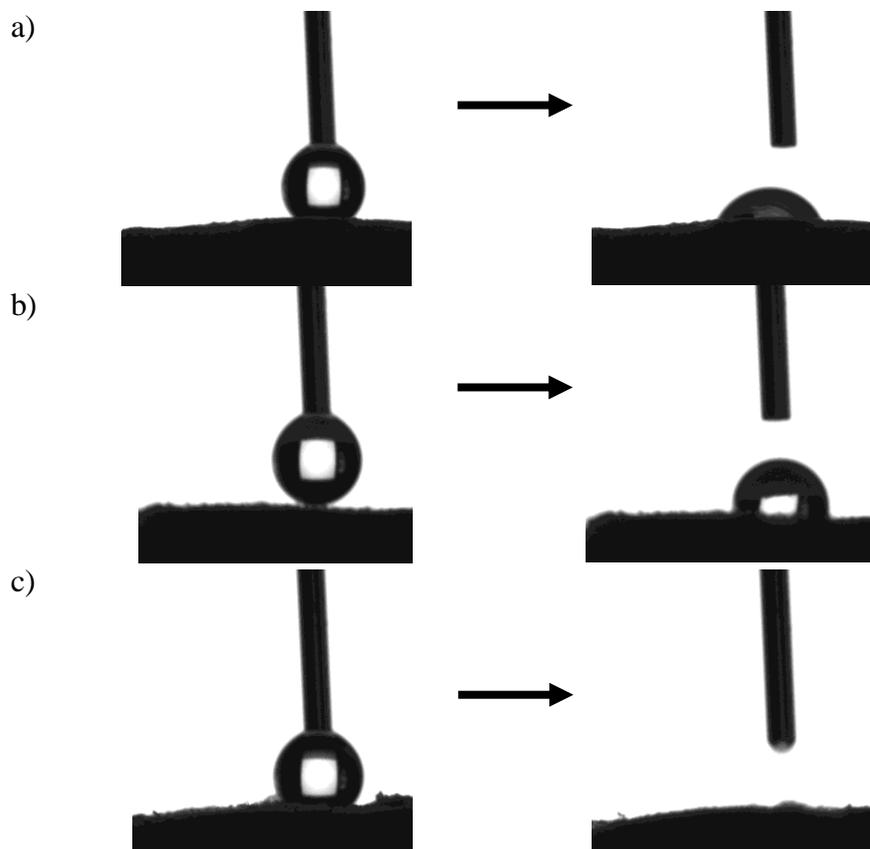


Figura 13. Imagens do ângulo de contato: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III.

Quando adicionado fibroína ao composto, o ângulo de contato aumenta para $99,8 \pm 1,1^\circ$ tornando o material hidrofóbico. Semelhante ao colágeno, a fibroína é pouco

solúvel em água devido à presença de teores elevados de cadeias hidrofóbicas, esse fato está de acordo com os resultados de Hardy *et al.* [52] e de Wenk *et al.* [53].

O grupo III apresentou um ângulo de contato de 0°. Isso é explicado pelo fato da hidroxiapatita ser um material inorgânico e, assim como o tecido ósseo, apresenta alto comportamento hidrofílico [102]. A figura 13 exibe as imagens do teste realizado para detecção do ângulo de contato dos grupos.

4.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Arcabouço 3D é uma das ferramentas fundamentais para guiar a formação tecidual *in vitro* e *in vivo*. As ciências da saúde e da engenharia buscam aperfeiçoar implantes sintéticos que apresentem boa degradabilidade e porosidade para regeneração tecidual [103].

Durante o processo de produção dos grupos, a técnica de liofilização em alto vácuo foi utilizada com o intuito de gerar materiais com alta porosidade e interconectividade entre os poros [97]. A morfologia dos grupos é observada por MEV na figura 14 e indica uma estrutura porosa com interconexão tridimensional em todas as partes dos arcabouços analisados.

A matriz do compósito também apresentou uma morfologia altamente anisotrópica em várias camadas com aberturas internas. Essa estrutura em múltiplas camadas é uma característica morfológica formada pela separação de fase de uma

solução polimérica. Quando a temperatura do ponto de congelamento dessa solução é mais baixa do que a do solvente, a cristalização desse solvente ocorre primeiro e expulsa o polímero do local, formando uma fase de agregação polimérica. Depois que os cristais do solvente são sublimados, surgem os poros em forma de multicamada. Esse comportamento também foi verificado por Kim *et al.* [69].

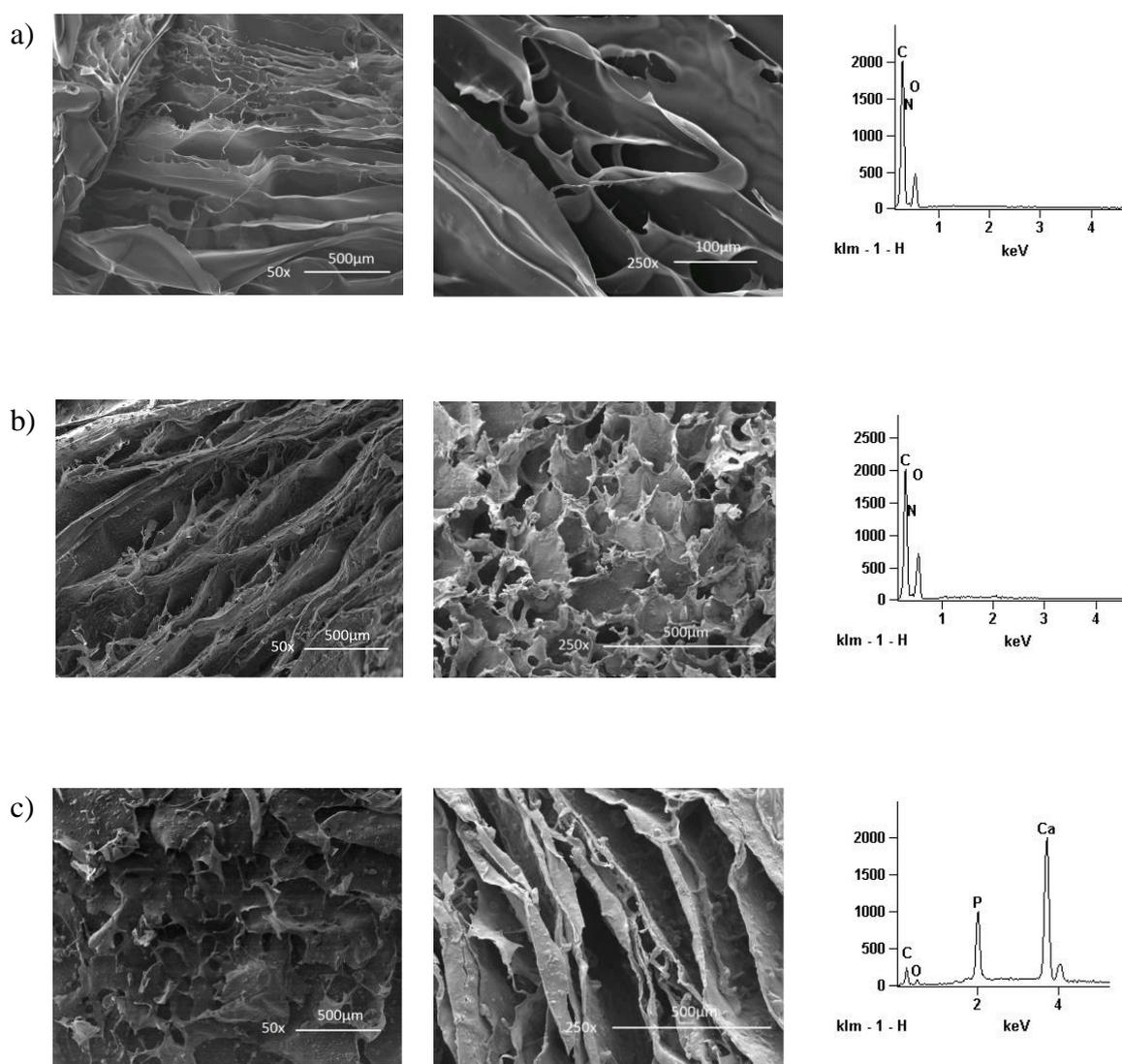


Figura 14. Micrografias e EDS dos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III.

É possível analisar que a hidroxiapatita não afeta na cristalização do solvente de forma significativa e que o resultado do EDS exhibe a presença dos elementos característicos dos materiais utilizados.

4.3. Avaliação biológica

4.3.1. Teste de citotoxicidade

Diversos estudos comprovam que a quitosana, a fibroína e a hidroxiapatita são materiais considerados atóxicos [16,31,33,48,53,57]. Entretanto, durante a preparação de qualquer compósito, modificações químicas e estruturais podem ser realizadas para torná-los viáveis na utilização *in vitro* e *in vivo*, gerando um produto final com novos níveis de toxicidade. Sendo assim, testes de citotoxicidade foram realizados seguindo os padrões ISO 10993-5:1999 [79] e ISO 10993-12:1996 [80] para avaliação biológica de dispositivos médicos.

A análise toxicológica a partir do *kit* de ensaio toxicológico *in vitro* baseado em resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) revela que os grupos não apresentam diferença significativa em relação ao grupo “controle” (nesse caso, entende-se por “controle” o grupo que possuía células inoculadas diretamente na placa de cultura com meio de cultura sem extrato dos materiais estudados), como pode ser observado na figura 15. A resazurina é efetivamente reduzida na mitocôndria, sendo assim, quanto maior a absorvância observada, menor atividade metabólica mitocondrial, como pode ser observada no grupo fenol. Saad-Hossne *et al.* [104] relataram que, soluções aquosas de fenol funcionam como controle positivo de citotoxicidade, causando morte celular em

ensaios *in vitro*. Conclui-se com isso, que todos os compósitos sintetizados não são citotóxicos.

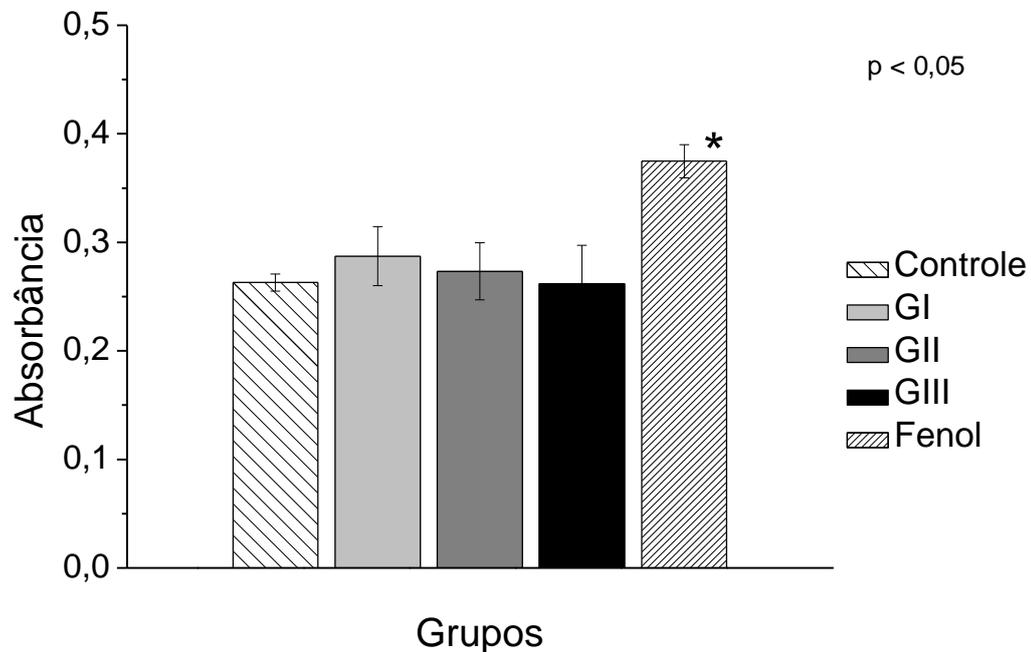


Figura 15. Teste de citotoxicidade dos grupos I, II e III utilizando células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) a partir do *kit* de ensaio toxicológico *in vitro* baseado em resazurina (* estatisticamente diferente).

O método colorimétrico utilizando MTT foi utilizado para observar o número de células com atividade após 24 h de análise. Como pode ser visto na figura 16, não observa-se diferença estatística entre os grupos I, II e III. Porém, há diferença significativa entre eles e os grupos “controle” e fenol. Essa redução da viabilidade celular pode ser explicada pela utilização de reticulante no material.

Sabe-se que o objetivo da reticulação é gerar ligações cruzadas que melhorem as propriedades mecânicas, aumentem o tempo de degradação e que alterem as propriedades químicas e a biocompatibilidade do material [31]. A utilização de

trifosfato pentassódico em baixas concentrações é reportada por diversos autores que visam obter arcabouços para a engenharia tecidual óssea. Entretanto, resíduos do reticulante podem induzir a redução da viabilidade celular [105-108], justificando os resultados obtidos com essas amostras. Mesmo assim, o número de células viáveis encontrado nesse teste está dentro da média de materiais considerados não citotóxicos, corroborando com os resultados obtidos anteriormente com o teste de resazurina.

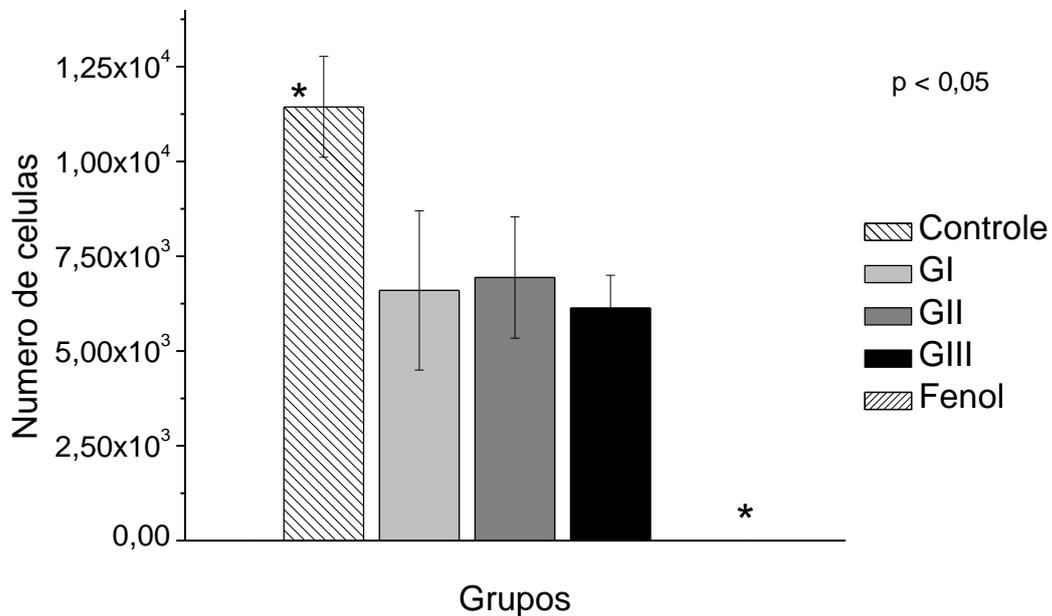


Figura 16. Teste de citotoxicidade dos grupos com células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) a partir do método colorimétrico utilizando MTT (* estatisticamente diferente).

4.3.2. Teste em cultura celular

A viabilidade e a proliferação celular em função do tempo em um arcabouço 3D são indicadores de compatibilidade e de adequação celular para aplicações na engenharia tecidual óssea [109]. Para avaliar o efeito da composição dos biomateriais

produzidos em diferentes estágios de diferenciação celular na linhagem osteoblástica foram utilizados três tipos de células: STRO+1A [82], MC3T3-E1 [81] e SaOS-2 [83].

Os resultados das micrografias indicam que, os arcabouços 3D permitem a fixação, o espriamento e a proliferação de todas as células testadas, mantendo sua morfologia característica para a fase de diferenciação e tempo de maturação, como mostrado nas figuras 17, 18 e 19.

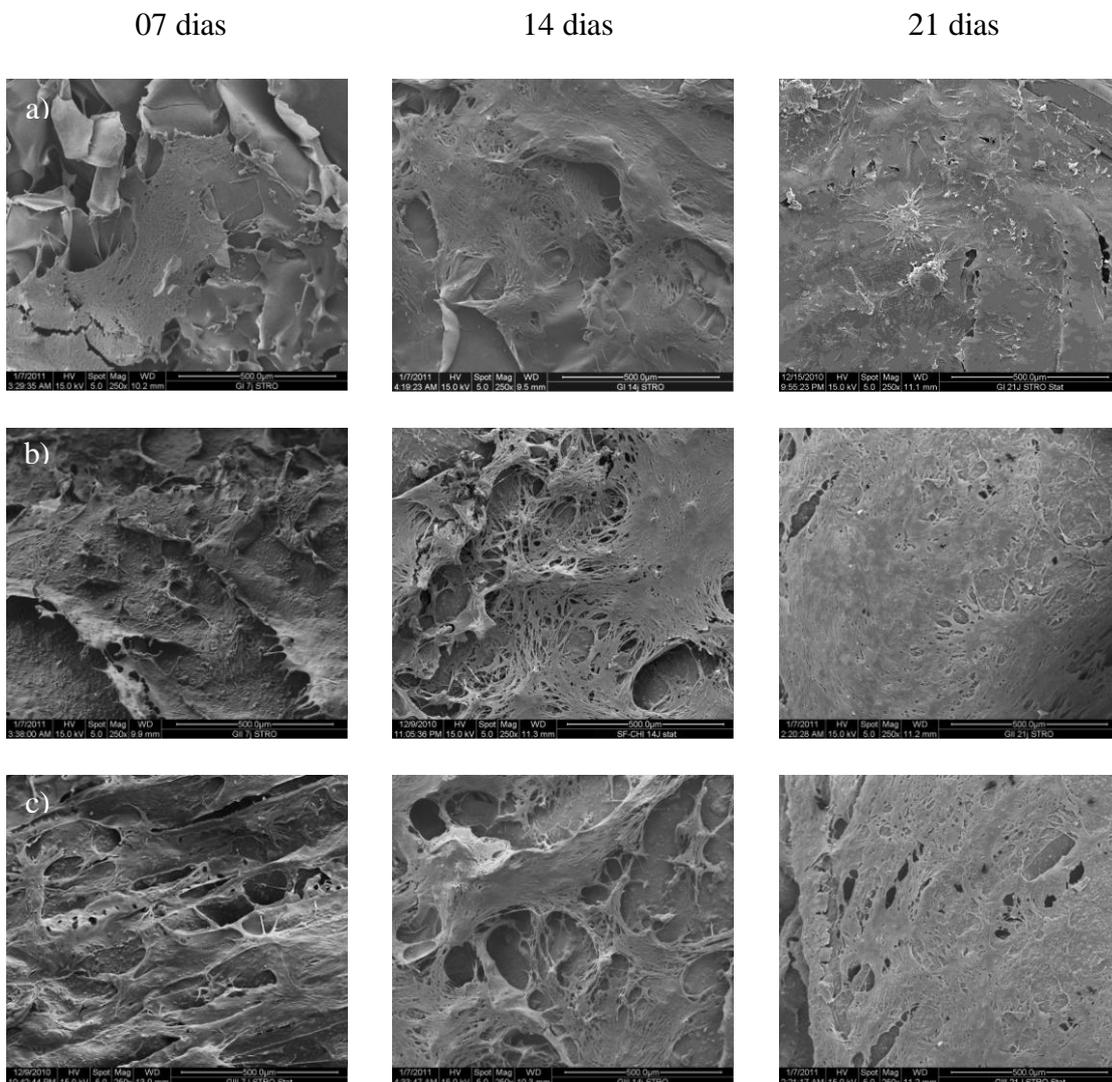


Figura 17. Micrografias de células STRO+1A na superfície dos arcabouços 3D durante 7, 14 e 21 dias nos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III.

Como pode ser avaliado na figura 17, as células STRO+1A apresentam sua forma característica com filopódios em múltiplas direções aderindo a superfície dos materiais.

Após 07 dias de cultura, as células apresentam uma morfologia típica com uma boa configuração de espraiamento com lamelopódios conectando células vizinhas e iniciando a formação contínua da camada celular sobre a superfície dos arcaçouços. Essa camada torna-se mais visível durante o 14º dia, e após o último tempo (21 dias), praticamente toda a superfície do material está coberta por essas células.

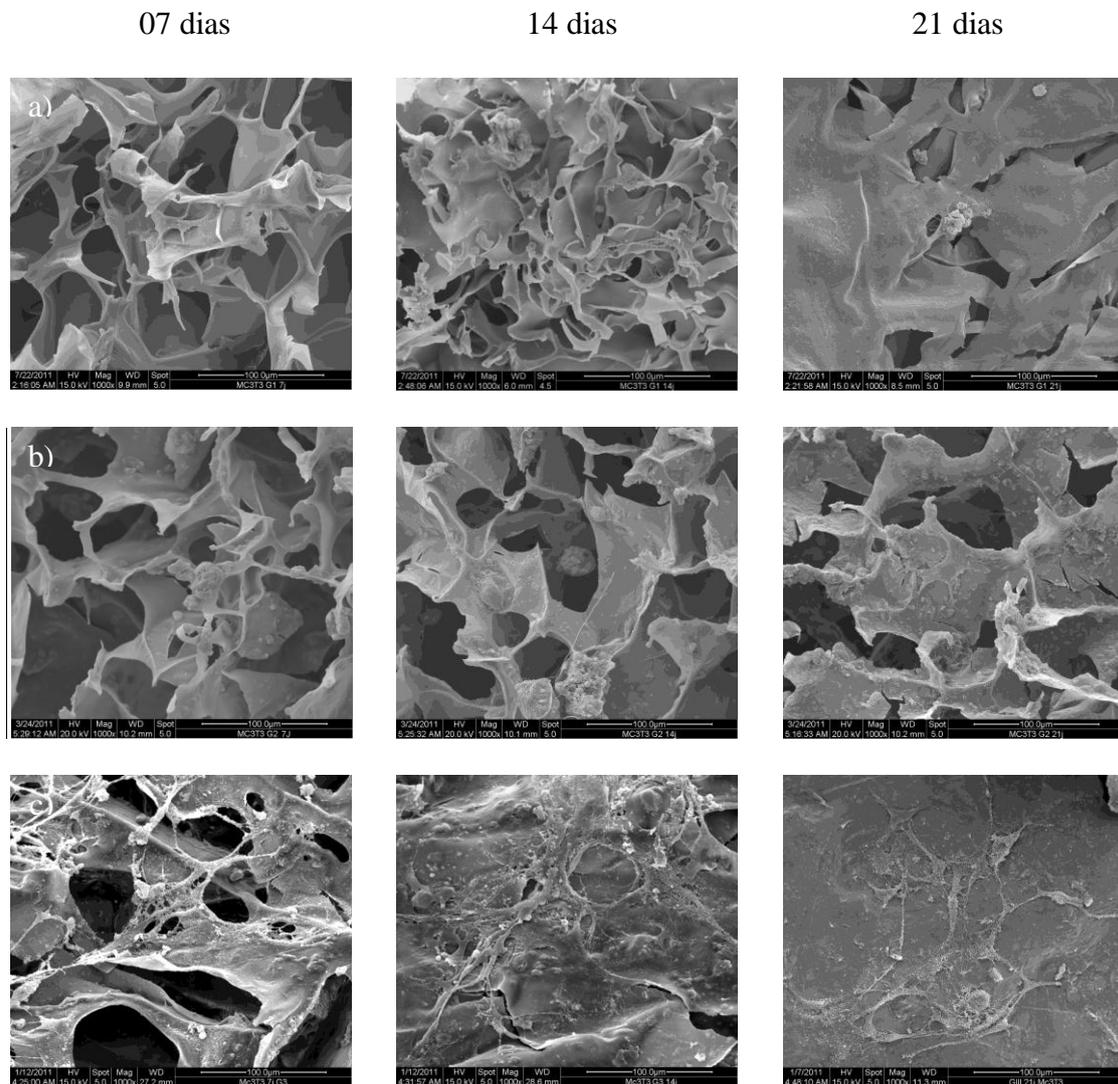


Figura 18. Micrografias de células MC3T3-E1 na superfície dos arcaçouços 3D durante 7, 14 e 21 dias nos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III.

As células de calvária de rato MC3T3-E1 foram selecionadas por corresponderem a células osteogênicas imaturas que apresentam seu bom nível de diferenciação (superior as células STRO+1A) e por sua boa capacidade de formar matriz extracelular mineralizada. Na figura 18, pode-se observar que, com 07 dias de cultura há regiões com células interagindo com o material.

Diferentemente do que acontece com as STRO+1A, não há formação de filme no 14º dia, exceto no grupo III. Provavelmente, uma explicação para isso é que as MC3T3-E1 priorizam a mineralização em detrimento da formação do “tapete” celular. A formação dessa camada de células é observada nos grupos I e III, sendo que, no grupo com hidroxiapatita, após 21 dias já se observam células sobrepostas em crescimento e com vários pontos de mineralização. Outra possibilidade é que, como as células MC3T3-E1 são menores que a STRO+1A, elas podem ter migrado para o interior do arcabouço não formando o “tapete” celular na superfície do material. Como no grupo III os poros são menores, as células não entraram com facilidade favorecendo a formação desse “tapete”. Ensaios utilizando cortes histológicos nas amostras deverão ser feitos para comprovar tal hipótese.

Células de osteosarcoma humano (SaOS-2) foram utilizadas por exibirem características de osteoblastos maduros. Como mostrado na figura 19, as células estão aderidas e espreiadas nos compósitos, apresentando uma configuração de formato arredondado com filopódios em múltiplas direções, aderindo à superfície dos biomateriais.

Durante o 7º dia, observa-se colônias de células interagindo com o material e entre si. Com o passar do tempo, vê-se que o número de células em todos os grupos aumenta, principalmente nos grupos II e III. No 21º, nota-se aumento da proliferação celular e surgimento de grandes massas celulares mineralizadas em todos os grupos.

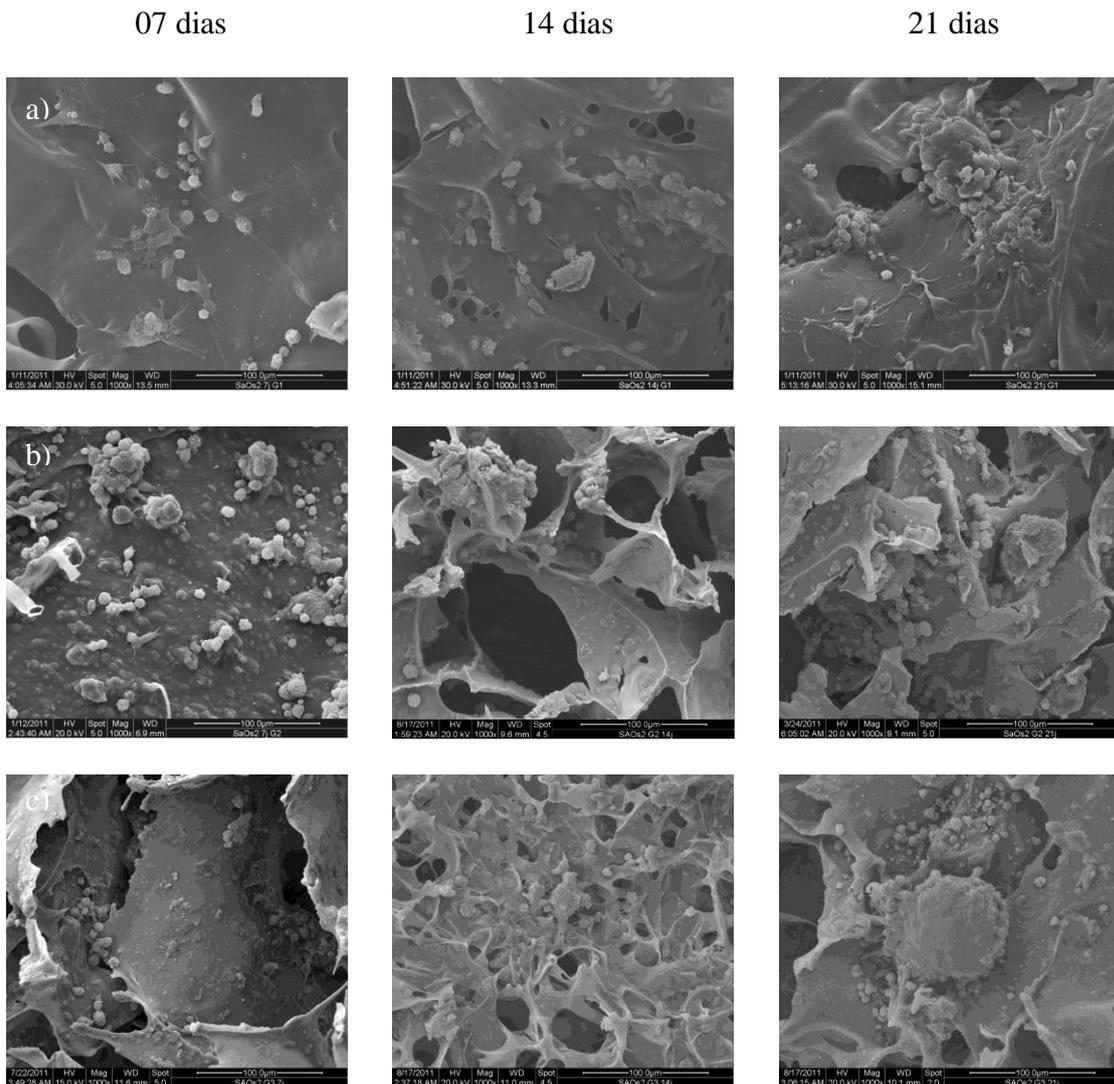


Figura 19. Micrografias de células SaOS-2 na superfície dos arcabouços 3D durante 7, 14 e 21 dias nos grupos: a) Grupo I; b) Grupo II; c) Grupo III.

Laurencin *et al.* [110] afirmaram que as células, principalmente as humanas, podem se anexar e se organizar por volta de fibras de pequenos diâmetros. Essa abordagem pode explicar o comportamento das células utilizadas em contato com os

arcabouços produzidos. Células bem organizadas podem proporcionar uma colonização mais eficiente nesses tipos de materiais porosos sendo de grande importância para a abordagem biomédica e da engenharia tecidual óssea.

O teste de viabilidade por MTT foi desenvolvido para traçar uma relação linear entre absorbância e concentração celular. Os dados de proliferação celular avaliados por MTT mostram crescimento progressivo do número de células em todos os grupos durante os 21 dias de cultura (figuras 20, 21 e 22).

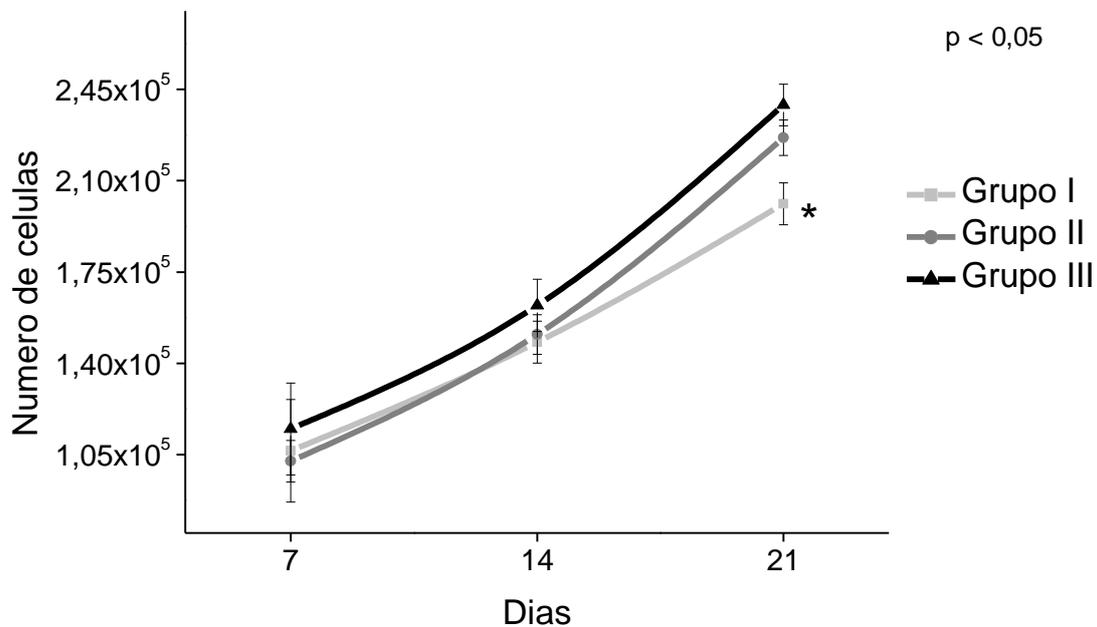


Figura 20. Ensaio do MTT mostrando número de células do tipo STRO+1A nos grupos I, II e III durante 21 dias de cultura (* estatisticamente diferente).

Em relação ao comportamento dos materiais em contato com as células STRO+1A (figura 20), observa-se diferença significativa entre o grupo I e os demais grupos no 21º dia de cultura ($p < 0,05$). Fato que pode estar associado à presença da fibroína no grupo II e a presença da fibroína e da hidroxiapatita no grupo III.

Quando estudado o comportamento das células MC3T3-E1, nota-se que elas crescem progressivamente nos compósitos e que o número de células durante os tempos analisados foram semelhantes ao das células STRO+1A. Entretanto, no 7º dia, o grupo II apresenta um menor número de células quando comparados aos outros grupos durante o mesmo período ($p < 0,05$). No 14º e no 21º dia, o grupo controle apresenta menor número de células em relação aos grupos contendo fibroína e hidroxiapatita. A figura 21 exibe o ensaio do MTT mostrando número de células de MC3T3-E1 nos grupos de estudo durante os 21 dias de cultura.

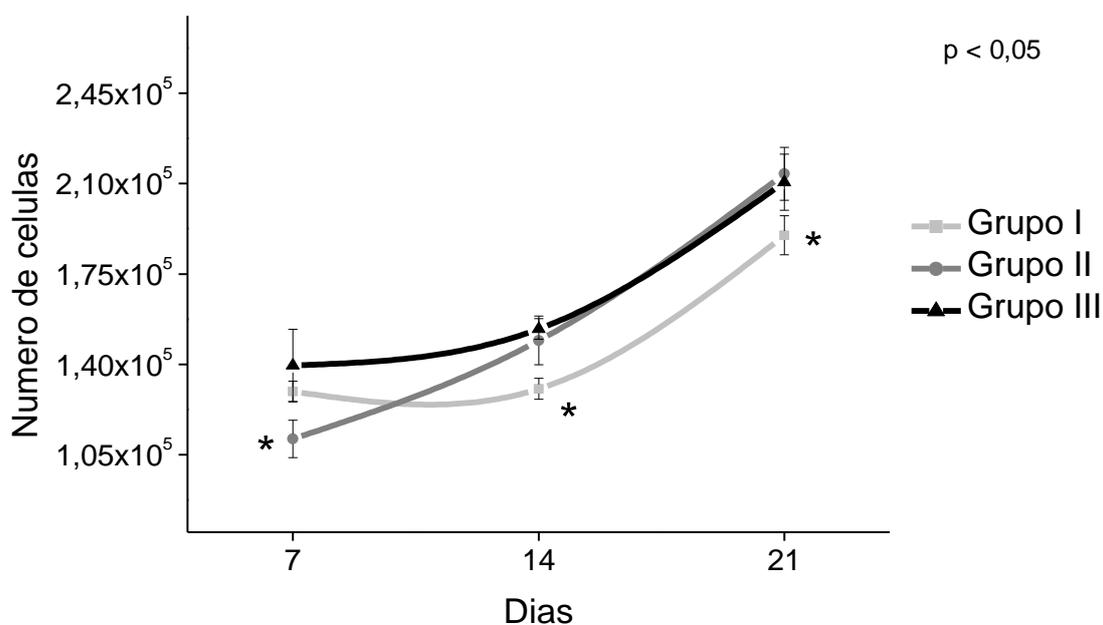


Figura 21. Ensaio do MTT mostrando número de células do tipo MC3T3-E1 nos grupos I, II e III durante 21 dias de cultura (* estatisticamente diferente).

A tendência de proliferação celular também é seguida pelas células de osteosarcoma humano SaOS-2, como pode ser acompanhado na figura 22. Contudo, no primeiro dia de análise, o grupo III apresenta um maior número de células e há diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). No 14º dia, os grupos II e III são estatisticamente diferentes, porém o grupo II torna-se semelhante ao grupo III no 21º dia de análise ($p > 0,05$).

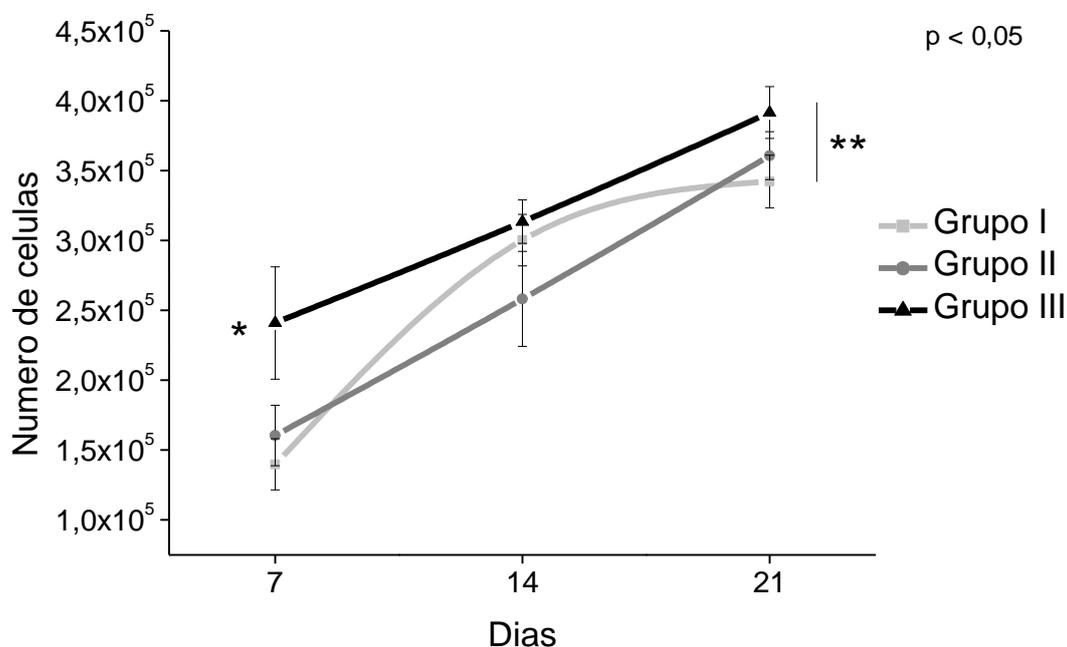


Figura 22. Ensaio do MTT mostrando número de células do tipo SaOS-2 nos grupos I, II e III durante 21 dias de cultura (* GIII \neq GI/GII; ** GI \neq GIII, estatisticamente diferente).

Ao analisar o grupo II, percebe-se que o mesmo sempre iniciou com número de células abaixo ou semelhante ao grupo controle, apesar de existir diferença estatística apenas em contato com as células MC3T3-E1. Este fato pode ser explicado pela característica hidrofóbica gerada pela fibroína nesse compósito retardando inicialmente o processo de adesão celular [54,55]. Contudo, durante os demais dias de coleta (14 e 21

dias) ocorre o aumento progressivo da proliferação celular e esse grupo passa a ser semelhante ao grupo III contendo hidroxiapatita, que é relatado na literatura como um material cerâmico que auxilia no processo de adesão e proliferação celular [60,61].

Diversos estudos *in vitro* foram realizados com filmes a base de fibroína. De acordo com os dados obtidos, essa matriz polimérica é comparável a filmes de colágeno em relação à taxa de crescimento celular em contato com células de rato L-929 [111] e à formação óssea quando utilizado com células SaOS-2 [112]. Além disso, foi constatado que compósitos de fibroína dão suporte à formação óssea a partir de células-tronco adultas [56].

Em relação aos tipos celulares estudados, as células SaOS-2 apresentam o melhor comportamento de proliferação celular em todos os grupos e em todos os tempos de análise. Provavelmente, isso ocorre devido ao fenótipo dessas células cancerosas, que não possui controle do ciclo celular [113].

Fosfatase alcalina é uma enzima utilizada como marcador precoce de diferenciação de osteoblastos. Embora seu papel exato não seja claro, sabe-se que ela desempenha um papel importante no processo de mineralização da matriz óssea [114]. Dados da atividade fosfatase alcalina (ALP) podem ser apreciados nas figuras 23 a 25.

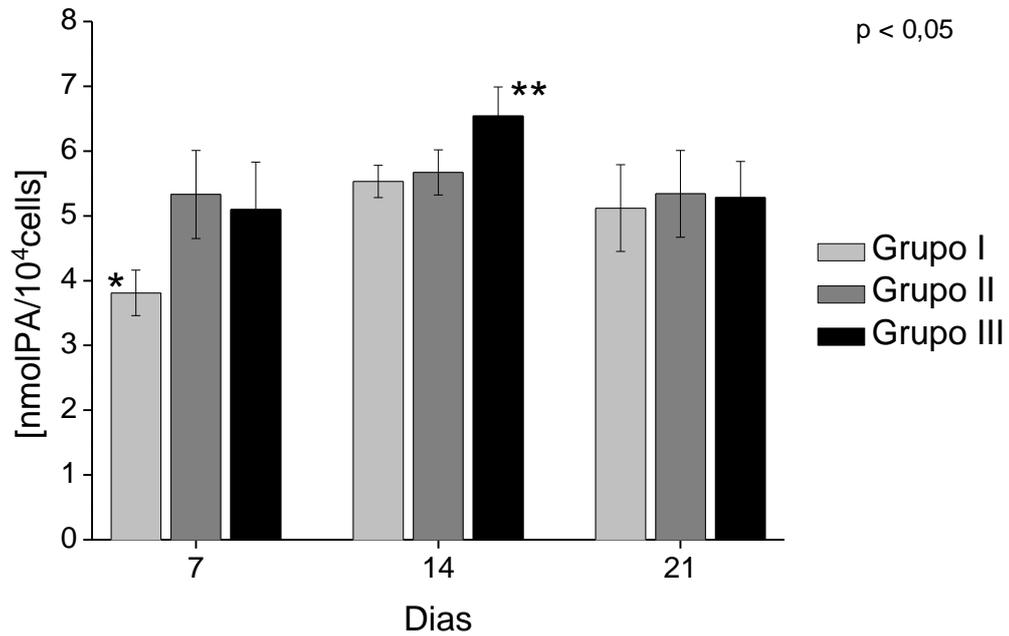


Figura 23. Ensaio do ALP mostrando atividade fosfatase alcalina das células STRO+1A nos grupos I, II e III após 7, 14 e 21 dias de cultura (* GI ≠ GII/GIII; ** GIII ≠ GI/GII, estatisticamente diferente).

Verifica-se que os arcabouços dos grupos I e III em contato com células STRO+1A apresentam maior pico de atividade enzimática no 14º dia e uma leve queda em 21 dias. Essa discreta diminuição pode está atribuída à maturação dos osteoblastos, expressando menor atividade enzimática. Já o grupo II apresenta uma atividade enzimática regular sem diferença significativa entre os dias de análise. Esses dados podem ser verificados na figura 23.

Apesar de a atividade enzimática inicial nas células MC3T3-E1 ser baixa em todos os grupos, as células em contato com o grupo controle apresenta a menor atividade e há diferença significativa ($p < 0,05$). Posteriormente, há um pico da ALP em 14 dias mantendo-se estável até o 21º dia. A figura 24 exibe esses dados.

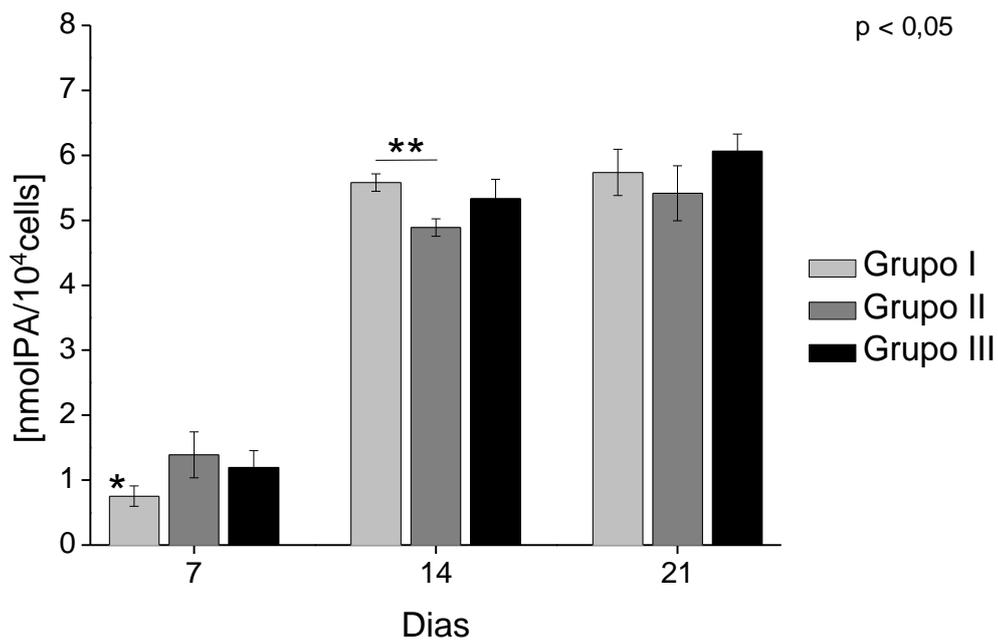


Figura 23. Ensaio do ALP mostrando atividade fosfatase alcalina das células MC3T3-E1 nos grupos I, II e III após 7, 14 e 21 dias de cultura (* GI \neq GII/GIII; ** GII \neq GI, estatisticamente diferente).

O comportamento observado nos dois últimos tempos foi semelhante aos índices de atividade de fosfatase alcalina das células STRO+1A em contato com os biomateriais. Isso pode ter ocorrido devido à utilização de um meio osteoindutor (com dexametasona), permitindo que o crescimento e a diferenciação sejam mais rápidos em células STRO+1A, que são mesenquimais, que em células MC3T3-E1, que são pré-osteoblásticas.

Nesse estudo foi adicionado dexametasona no meio de cultura celular, devido sua capacidade de estimular células de rato e de humanos a se diferenciarem em osteoblastos.

Zhang *et al.* [115] cultivaram células tronco mesenquimais (MSCs) com e sem meio osteoindutor em arcabouços de fibroína e fosfato de cálcio por 14 dias e observaram um aumento do número de células pelo ensaio de MTT e também dos níveis da atividade fosfatase alcalina naquelas que foram tratadas com o meio indutor, similar aos resultados aqui encontrados.

Vachiraroj *et al.* [116] avaliaram o comportamento de células MC3T3-E1 e MSCs por 08 dias em contato com filmes de hidroxiapatita/fibroína e hidroxiapatita/quitosana e concluíram que ambas as células apresentaram proliferação e diferenciação semelhantes nos dois compósitos. Além disso, She *et al.* [117] mostraram que arcabouços de fibroína e quitosana podem promover a proliferação de células HepG2 (linha de células de hepatoma humano) *in vitro* através de ensaios de MTT.

As células SaOS-2 apresentam taxa de atividade sempre crescente e maior em relação às outras células. Esse comportamento é relacionado ao seu fenótipo, que é mais maduro que os das outras linhagens de células estudadas. A atividade enzimática é menor no grupo I no 7º dia ($p < 0,05$). No 14º dia, o compósito contendo hidroxiapatita apresenta maior ALP ($p < 0,05$), possivelmente por influência desse material inorgânico. Após 21 dias, o comportamento entre os grupos II e III são semelhantes ($p < 0,05$). Esse resultado pode ser analisado na figura 25.

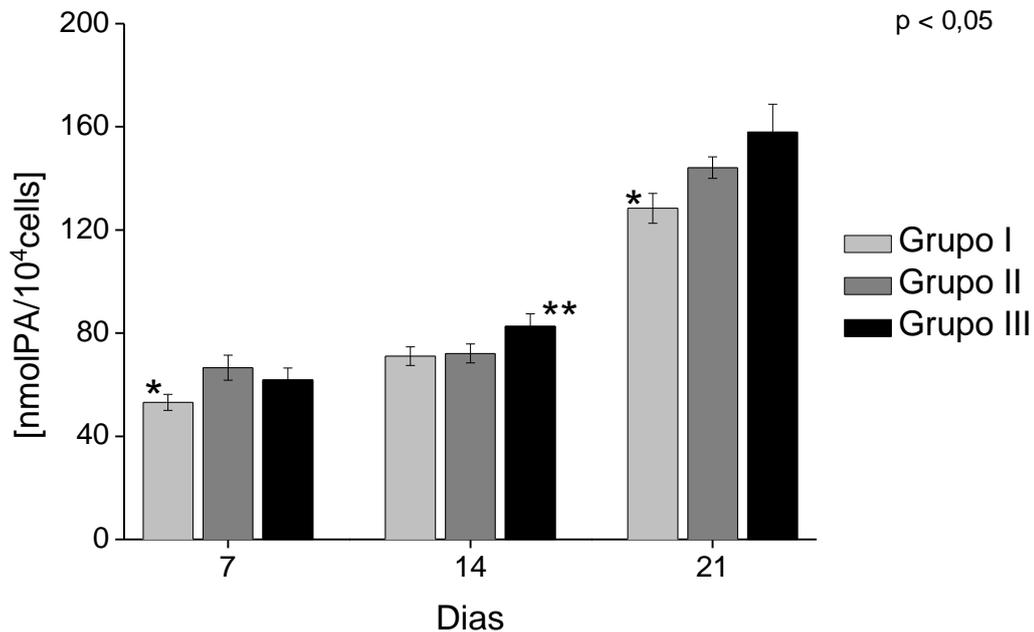


Figura 25. Ensaio do ALP mostrando atividade fosfatase alcalina das células SaOS-2 nos grupos I, II e III após 7, 14 e 21 dias de cultura (* GI \neq GII/GIII; ** GIII \neq GI/GII, estatisticamente diferente).

Compósitos à base de fibroína e quitosana têm sido estudados devido as suas propriedades biológicas favoráveis, com uma baixa resposta inflamatória, não toxicidade e boa permeabilidade ao oxigênio e a água [118]. Somado a isso, minerais à base de fosfato de cálcio em matrizes tridimensionais otimiza o processo de diferenciação osteogênica, pois o processo de precipitação-dissolução dos íons de cálcio e fósforo induz a diferenciação osteoblástica *in vitro* e *in vivo* [119].

Alguns estudos identificam que a deposição de matriz extracelular ocorre antes de a mineralização começar. Esse último estágio de diferenciação celular precede a mineralização e a atividade da enzima da fosfatase alcalina tende a diminuir [120-122], fato que pode explicar a leve queda ocorrida na atividade fosfatase alcalina das células STRO+1A no 21º dia.

Uma matriz extracelular natural é formada por várias fibrilas protéicas e fibras entrelaçadas, como colágeno, elastina, lamina e fibronectina, dentro de uma rede hidratada de cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Esse complexo estrutural serve como um arcabouço que pode suportar tensões de tração e compressão. Além de proporcionar um microambiente apropriado para as células, a matriz é responsável pela transmissão de sinais para os receptores da membrana celular que levam a informação até o núcleo através de cascatas de sinalização intracelular [123,124].

Como o colágeno produzido pelas células é um dos indicadores de formação de matriz extracelular, foi realizado o teste de concentração de colágeno para determinar sua concentração produzida pelas células STRO+1A e SaOS-2 em contato com os arcabouços. As células de calvária de rato MC3T3-E1 não foram avaliadas pela limitação do *kit* utilizado. As figuras 26 e 27 exibem os resultados encontrados.

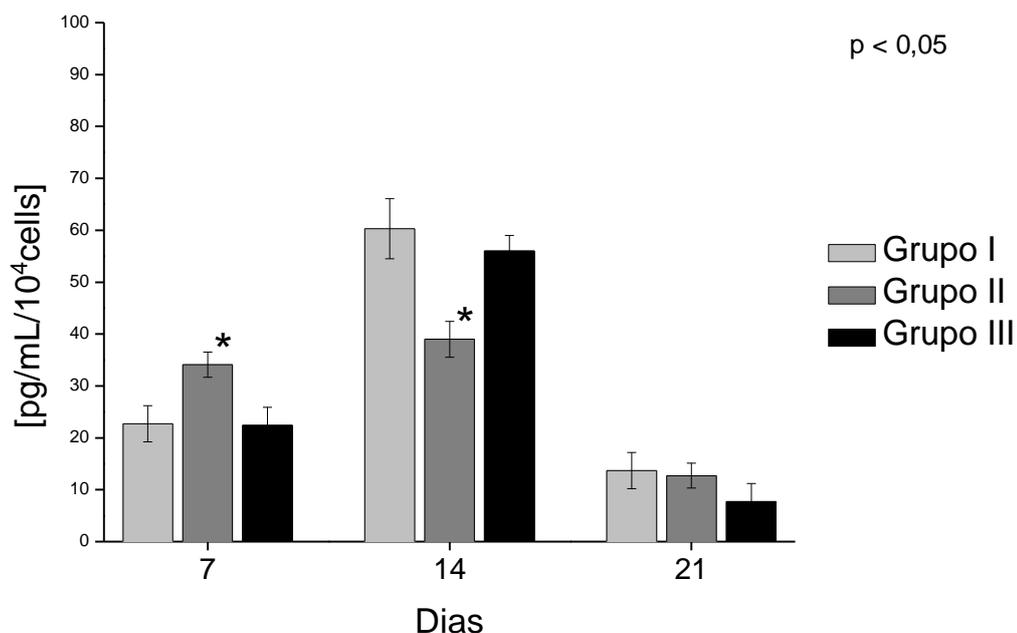


Figura 26. Teste de concentração de colágeno das células STRO+1A nos grupos I, II e III após 7, 14 e 21 dias de cultura (* GII \neq GI/GIII, estatisticamente diferente).

Como pode ser observado na figura acima, as células STRO+1A apresentam um pico de produção de colágeno com 07 dias no grupo II, sendo mantida no 14º dia. Já em contato com os grupos I e III, o pico de produção dessa proteína por essas células é no tempo de 14 dias. Após 21 dias essa produção é bastante reduzida podendo estar relacionada ao processo de mineralização celular.

Ao analisar a produção de colágeno pelas células SaOS-2, nota-se um pico de produção nos arcabouços no 7º dia, sendo que existe diferença significativa entre os grupos I e II com o grupo III. Nos dias subseqüentes, a produção de colágeno reduz, porém o grupo II mantém uma maior produção em relação aos demais e com diferença estatística ($p < 0,05$). Esses dados podem ser observados na figura 27.

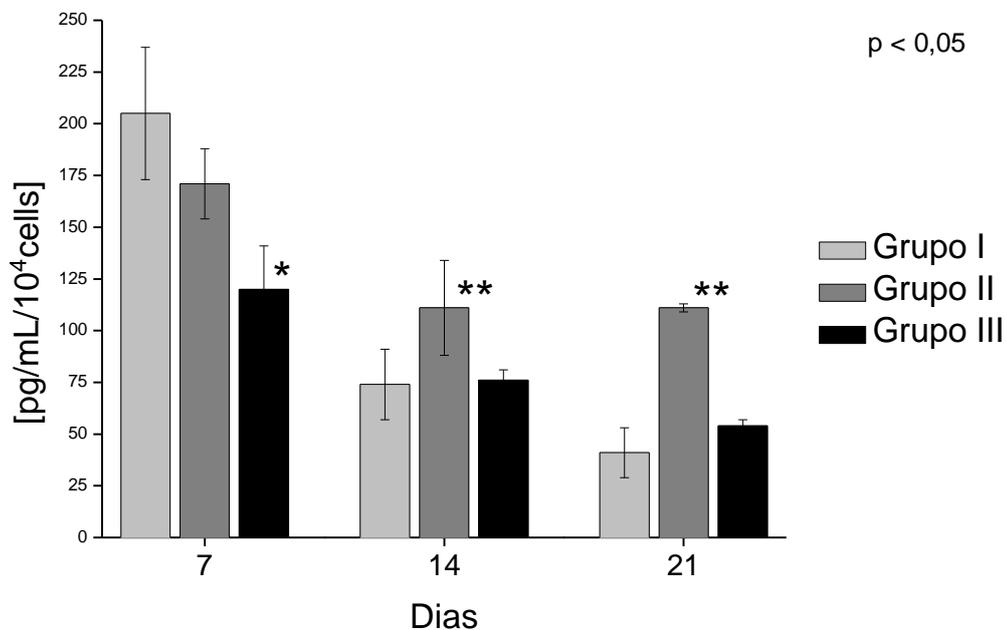


Figura 27. Teste de concentração de colágeno das células SaOS-2 nos grupos I, II e III após 7, 14 e 21 dias de cultura (* GIII \neq GI/GII, ** GII \neq GI/GIII estatisticamente diferente).

Pode-se concluir com esse teste, que os arcabouços fornecem condições para que as células pudessem fabricar sua própria matriz extracelular. Zhang [125], Abbott e Cyranoski [126] e Pampaloni *et al.* [127] versam que o sucesso da criação de uma replica artificial de um tecido ou órgão pode oferecer um grande suporte para os cuidados em saúde quando relacionados à regeneração tecidual. O objetivo de produzir um arcabouço 3D é fornecer suporte às células para que possam se reproduzir e reconstruir o tecido de forma semelhante ao tecido original.

5. CONCLUSÃO

A metodologia aqui empregada para preparar acabouços 3D foi eficaz, obtendo-se materiais com estrutura porosa interconectada baseada em quitosana, fibroína e hidroxiapatita. A caracterização físico-química dos diferentes compósitos sintetizados evidenciou a interação entre os materiais utilizados.

Todos os compósitos foram considerados não citotóxicos, sendo viáveis para aplicações *in vitro*. Esses arcabouços foram capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de três tipos de células em diferentes estágios de diferenciação celular na linhagem osteoblástica.

A fibroína exerceu um papel fundamental no comportamento físico-químico do biomaterial e, durante a avaliação *in vitro*, os arcabouços que continham essa proteína apresentaram uma melhor resposta à proliferação e diferenciação celular. Sendo que o grupo III (CHI-SF-HA) obteve a melhor resposta.

REFERÊNCIAS

- [1] MARCUS, R., FELDMAN, D., NELSON, D.A. *et al.* **Osteoporosis**. 3ed. São Francisco, Academic Press, 2008.
- [2] WEINSTEIN, S.L., BUCKWALTER, J.A. **Ortopedia de Turek: princípios e sua aplicação**. 5ed. São Paulo, Manole, 2000.
- [3] CALMAR, E.A., VINCI, R.J. “The anatomy and physiology of bone fracture and healing”, **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v.03, n.02, pp.85-93, 2002.
- [4] REDDY, R.S., COMPSON, J. “Examination of the wrist-surface anatomy of carpal bones”, **Current Orthopaedics**, v.19, n.01, pp.171-179, 2005.
- [5] BULLOUGH, P. **Orthopaedic pathology**. 5ed. Nova Iorque, Dosby, 2009.
- [6] SEIBEL, M.J., ROBINS, S.P., BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. 2ed. Nova Iorque, Academic Press, 2006.
- [7] SPENCE, A.P. **Anatomia humana básica**. 2ed. São Paulo, Manole, 1991.
- [8] HALL, B. **Bones and cartilage**. 1ed. Nova Scotia, Academic Press, 2005.
- [9] JORGETTI, V. “Biópsia óssea e análise histomorfométrica”, **Fleury: Medicina e Saúde**, v.01, n.02, pp.01-05, 2007.
- [10] DRUMOND, S.N. PANA, E.B., ALMEIDA, J.P.S. *et al.* “Total hip arthroplasty with PCA (Porous coated anatomic) prosthesis”. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.09, n.02, pp.03-10, 2001.
- [11] HORN, C.C. **Impacto da artroplastia total do quadril sobre a qualidade de vida em idosos portadores de artrose incapacitante**. Dissertação de M.Sc., Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2006.

-
- [12] NARAYAN, R.J., KUMTA, P.N, SFEIR, C. *et al.* “Nanostructured ceramic in medical devices: applications and prospects”. **Journal of metals**, v.56, n.10, pp.38-43, 2004.
- [13] JANUÁRIO, D.D., CESTARI, T.M, OLIVEIRA,R.C. *et al.* “Evaluation of tissue repair, in case of bovine bone implantation mixed with bone marrow graft, in subcutaneous region of rats”. **Innovations implants journal**, v.01, n.01, pp.21-27, 2006.
- [14] SWETHA, M., SAHITHI, K., MOORTHI, A. *et al.* “Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.01, n.47, pp.01-04, 2010.
- [15] RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J. *et al.* **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2ed. São Diego, Academic Press, 2004.
- [16] ZHOU, H., LEE, J. “Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering”. **Acta Biomaterialia**, v.07, n.07, pp.2769-2781, 2011.
- [17] SHE, Z., ZHANG, B., JIN, C. *et al.* “Preparation and *in vitro* degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold”. **Polymer Degradation and Stability**, v.93, n.07, pp.1316-1322, 2008.
- [18] ALVES DA SILVA, M.L., CRAWFORD, A., MUNDY, J.M. *et al.* “Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation”. **Acta Biomaterialia**, v.06, n.03, pp.1149-1157, 2010.
- [19] BHARDWAJ, N., KUNDU, S.C., “Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications”. **Carbohydrate Polymers**, v.85, n.02, pp.325-333, 2011.
-

-
- [20] O'BRIEN, F.J. "Biomaterials and scaffolds for tissue engineering". **Materials Today**, v.14, n.03, pp. 88-95, 2011.
- [21] PENG, F., YU, X., WEI, M. "In vitro cell performance on hydroxyapatite particles/poly(L-Lactic acid) nanofibrous scaffolds with an excellent particle along nanofiber orientation". **Acta Biomaterialia**, v.07, n.06, pp.2585-2592, 2011.
- [22] MCBANE, J.E., SHARIFPOOR, S., CAI, K. *et al.* "Biodegradation and *in vivo* biocompatibility of a degradable polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications". **Biomaterials**, v.32, n.26, pp.6034-6044, 2011.
- [23] WANG, Y., DAI, J., ZHANG, Q. *et al.* "Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite". **Applied Surface Science**, v.256, n.20, pp.6107-6112, 2010.
- [24] LIN, K., CHEN, L., QU, H., *et al.* "Improvement of mechanical properties of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramic scaffolds with uniform and interconnected pore structures". **Ceramics International**, v.37, n.07, pp.2397-2403, 2011.
- [25] SUDARMADJI, N., TAN, J.Y., LEONG, K.F. *et al.* "Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in selective laser-sintered polyhedral for functionally graded scaffolds". **Acta Biomaterialia**, v.07, n.02, pp.530-537, 2011.
- [26] XU, C., SU, P., CHEN, X. *et al.* "Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering". **Biomaterials**, v.32, n.04, pp.1051-1058, 2011.
-

-
- [27] SOKOLSKY-PAPKOV, M., AGASHI, K., OLAYE, A. *et al.* “Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.04, pp.187-206, 2007.
- [28] HAFEMAN, A.E., ZIENKIEWICZ, K.J., ZACHMAN, A.L. *et al.* “Characterization of the degradation mechanisms of lysine-derived aliphatic poly(ester urethane) scaffolds”. **Biomaterials**, v.32, n.02, pp.419-429, 2011.
- [29] SOPYAN, I., MEL, M., RAMESH, S. *et al.* “Porous hydroxyapatite for artificial bone applications”. **Science and Technology of Advanced Materials**, v.08, n.01, pp.116-123, 2007.
- [30] HE, L.H., STANDARD, O.C., HUANG, T.Y. *et al.* “Mechanical behavior of porous hydroxyapatite”. **Acta Biomaterialia**, v.04, n.03, pp.577-586, 2008.
- [31] RESENDE, C.X. **Desenvolvimento de compósito dupla-camada a base de quitosana para aplicação em reconstrução tecidual**. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2010.
- [32] BATTISTI, M.V., CAMPANA-FILHO, S.P. “Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosana de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*”. **Química Nova**, v.31, n.08, pp.2014-2019, 2008.
- [33] DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R.M. *et al.* “Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical”. **Progress in Polymer Science**, v.36, n.08, pp.981-1014, 2011.
- [34] KIM, I.Y., SEO, S.J., MOON, H.S. *et al.* “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications”. **Biotechnology Advances**, v.26, n.01, p.01-21, 2008.
- [35] DI MARTINO, A., SITTINGER, M., RISBUD, M.V. “Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering”. **Biomaterials**, v.26, n.30, pp.5983-5990, 2005.
-

-
- [36] LEE, H., KIM, G. “Cryogenically fabricated three-dimensional chitosan scaffolds with pore size-controlled structures for biomedical applications”. **Carbohydrate Polymers**, v.85, n.04, pp.817-823, 2011.
- [37] TSAI, W.B., CHEN, Y.R., LIU, H.L. *et al.* “Fabrication of UV-crosslinked chitosan scaffolds with conjugation of RGD peptides for bone tissue engineering”. **Carbohydrate Polymers**, v.85, n.01, pp.129-137, 2011.
- [38] MIRANDA, S.C.C.C., SILVA, G.A.B., HELL, R.C.R. *et al.* “Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: a promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction”. **Archives of Oral Biology**, v.56, n.01, pp.01-15, 2011.
- [39] TANASE, C.E., POPA, M.I., VERESTIUC, L. “Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates”. **Materials Letters**, v.65, n.11, pp.1681-1683, 2011.
- [40] AUSTIN, K. “Scaffold design: use of chitosan in cartilage tissue”. **MMG 445 Basic Biotechnology eJournal**, v.03, n.01, pp.62-66, 2007.
- [41] TIGH, S.R., KARAKEÇILI, A., GÜMÜSDERELIOĞLU, M. “*In vitro* characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree”. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.181, n.09, pp.1665-1674, 2007.
- [42] GRIFFON, D.J., SEDIGHI, M.R., SCHAEFFER, D.V. *et al.* “Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering”. **Acta Biomaterialia**, v.02, n.03, pp.313-320, 2006.
- [43] LIU, C., XIA, Z., CZERNUSZKA, J.T. “Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering”. **Chemical Engineering Research and Design**, v.85, n.07, pp.1051-1064, 2007.
-

-
- [44] MALAFAYA, P.B., SANTOS, T.C., VAN GRIENSVEN, M. *et al.* “Morphology, mechanical characterization and *in vivo* neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures”. **Biomaterials**, v.29, n.29, pp.3914-3926, 2008.
- [45] HUANG, M., KHOR, E., LIM, L.Y. “Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation”. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.02, pp.344-353, 2004.
- [46] KOFUJI, K., QIAN, C.J., NISHIMURA, M. *et al.* “Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan”. **European Polymer Journal**, v.41, n.11, pp.2784-2791, 2005.
- [47] BERGER, J., REIST, M., MAYER, J.M. *et al.* “Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, n.01, pp.35-52, 2004.
- [48] MANDAL, B.B., GHOSH, B., KUNDU, S.C. “Non-mulberry silk sericina/poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices for potential biotechnological applications”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, n.02, pp.125-133, 2011.
- [49] WEN, X., Peng, X., FU, H. *et al.* “Preparation and *in vitro* evaluation of silk fibroin microspheres produced by a novel ultra-fine particle processing system”. **International Journal of Pharmaceutics**, v.416, n.01, pp.195-201, 2011.
- [50] MONDAL, M., TRIVEDI, K., KUMAR, S.N. “The silk proteins, sericina and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review”. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v.05, n.02, pp.63-76, 2007.
-

-
- [51] MIYAGUCHI, Y., HU, J. “Physicochemical properties of silk fibroin after solubilization using calcium chloride with or without ethanol”. **Food Science and Technology Research**, v.11, n.01, pp.37-42, 2005.
- [52] HARDY, J.G., RÖMER, L.M., SCHEIBEL, T.R. “Polymeric materials based on silk proteins”. **Polymer**, v.49, n.20, pp.4309-4327, 2008.
- [53] WENK, E., MERKLE, H.P., MEINEL, L. “Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications”. **Journal of Controlled Release**, v.150, n.02, pp.128-141, 2011.
- [54] VEPARI, C., KAPLAN, D.L. “Silk as a biomaterial”. **Progress in Polymer Science**, v.32, n.08, pp.991-1007, 2007.
- [55] HARDY, J.G., SCHEIBEL, T.R. “Composite materials based on silk proteins”. **Progress in Polymer Science**, v.35, n.09, pp.1093-1115, 2010.
- [56] ALTMAN, G.H., DIAZ, F., JAKUBA, C. *et al.* “Silk-based biomaterials”. **Biomaterials**, v.24, n.03, pp.401-416, 2003.
- [57] BHARDWAJ, N., NGUYEN, Q.T., CHEN, A.C. *et al.* “Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for *in vitro* cartilage tissue engineering”. **Biomaterials**, v.32, n.25, pp.5771-5781, 2011.
- [58] ARAI, T., FREDDI, G., INNOCENTI, R. *et al.* “Biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin fibers and films”. **Journal of Applied Polymer Science**, v.91, n.04, pp.2383-2390, 2004.
- [59] GUPTA, M.K. **Fabrication and testing of scaffolds for cell growth from ionic liquid solubilized fibroin**. Dissertação de M.Sc., Universidade Ilinóis, Ilinóis, IL, Estados Unidos, 2007.
-

-
- [60] LIOU, S.C.; CHEN, S.Y., LIU, D.M. “Phase development and structural characterization of calcium phosphate ceramics-polyacrylic acid nanocomposites at room temperature in water-methanol mixtures”. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.15, n.12, pp.1261-1266, 2004.
- [61] HU, Q., TAN, Z., LIU, Y. *et al.* “Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells”. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, n.44, pp.4690-4698, 2007.
- [62] CENGIZ, B., GOKCE, Y., YILDIZ, N. *et al.* “Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.322, n.01, pp.29-33, 2008.
- [63] KONG, X.D., CUI, F.Z., WANG, X.M. *et al.* “Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals”. **Journal of Crystal Growth**, v.270, n.01, pp.197-202, 2004.
- [64] HORNEZ, J.C., CHAI, F., MONCHAU, F. *et al.* “Biological and physic-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity”. **Biomolecular Engineering**, v.24, n.05, pp.505-509, 2007.
- [65] DU, C., JIN, J., LI, Y. *et al.* “Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: structure and properties”. **Materials Science and Engineering C**, v.29, n.01, pp.62-68, 2009.
- [66] FINISIE, M.R., JOSUÉ, A., FÁVERE, V.T. *et al.* “Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration”. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, n.04, pp.525-532, 2001.
- [67] ZHANG, P., HONG, Z., Yu, T. *et al.* “*In vivo* mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)”. **Biomaterials**, v.30, n.01, pp.58-70, 2009.
-

-
- [68] LI, Y., CAI, Y., KONG, X. *et al.* “Anisotropic growth of hydroxyapatite on the silk fibroin films”. **Applied Surface Science**, v.255, n.05, pp.1681-1685, 2008.
- [69] KIM, H.S., KIM, J.T., JUNG, Y.J. *et al.* “Preparation of a porous chitosan/fibroin-hydroxyapatite composite matrix for tissue engineering”. **Macromolecular Research**, v.15, n.01, pp. 65-73, 2007.
- [70] WANG, L., LI, C. “Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite”. **Carbohydrate Polymers**, v.68, n.04, pp.740-745, 2007.
- [71] KANTAWONG, F., BURGESS, K.E.V., JAYAWARDENA, K. *et al.* “Effect of a surface topography composite with puerariae radix on human STRO-1-positive stem cells”. **Acta Biomaterialia**, v.06, n.09, pp.3694-3703, 2010.
- [72] XIA, B., WANG, J., GUO, L. *et al.* “Effect of bone sialoprotein on proliferation and osteodifferentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*”. **Biologicals**, v.39, n.04, pp.217-223, 2011.
- [73] LEE, J.W., KANG, K.S., LEE, S.H. *et al.* “Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres”. **Biomaterials**, v.32, n.03, pp.744-752, 2011.
- [74] WHITED, B.M., WHITNEY, J.R., HOFMANN, M.C. *et al.* “Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds”. **Biomaterials**, v.32, n.09, pp.2294-2304, 2011.
- [75] WANG, X., LI, Y., XIONG, J. *et al.* “Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications”. **Acta Biomaterialia**, v.05, n.09, pp.3616-3624, 2009.
-

-
- [76] CHEN, X., LI, Y., HODGSON, P.D. *et al.* “*In vitro* behavior of human osteoblast-like cells (SaOS2) cultured on surface modified titanium and titanium-zirconium alloy”. **Materials Science and Engineering C**, v.31, n.07, pp.1545-1552, 2011.
- [77] NAZAROV, R., JIN, H.J., KAPLAN, DL. “Porous 3D scaffolds from regenerated silk fibroin”. **Biomacromolecules**, v.05, n.03, pp.718-726, 2004.
- [78] ABNT. Associação Brasileira de Normas e Técnicas. **ABNT ISO 13485:2004**. São Paulo, 2004.
- [79] ISO. International Organization for Standardization. **ISO 10993-5:1999**. Biological evaluation of medical devices, part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Genebra, 1999.
- [80] ISO. International Organization for Standardization. **ISO 10993-12:1996**. Biological evaluation of medical devices, part 12: sample preparation and reference materials. Genebra, 1996.
- [81] ATCC. American Type Culture Collection. **CRL-2594**. MC3T3-E1 Subclone 14. Virgínia, 2011.
- [82] OYAJOBİ, B.O., LOMRI, A., HOTT, M. *et al.* “Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody”. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.03, pp.351-361, 1999.
- [83] ATCC. American Type Culture Collection. **HTB-85**. SaOS2. Virgínia, 2011.
- [84] CHOI, S.Y., KIM, S.B., PAK, P.K. *et al.* “Effects of N-acylation on structure and properties of chitosan fibers”. **Carbohydrate Polymers**, v.68, n.01, pp.122-127, 2007.
-

-
- [85] FENG, X.X., ZHANG, L.L., CHEN, J.Y. *et al.* "Preparation and characterization of novel nanocomposite films formed from silk fibroin and nano-TiO₂". **International Journal of Biological Macromolecules**, v.40, n.02, pp.105-111, 2007.
- [86] WANG, L., NEMOTO, R., SENNA, M. "Microstructure and chemical states of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposites synthesized via a wet-mechanochemical route". **Journal of Nanoparticle Research**, v.04, n.06, pp. 535-540, 2002.
- [87] MANJUBALA, I., SCHELER, S., BOSSERT, J. *et al.* "Mineralization of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique". **Acta Biomaterialia**, v.02, n.01, pp.75-84, 2006.
- [88] KIKUCHI, M., MATSUMOTO, H.N., YAMADA, T. *et al.* "Gluteraldehyde cross-linked hydroxiapatite/collagen self-organization nanocomposites". **Biomaterials**, v.23, n.01, pp.63-69, 2004.
- [89] YAMAGUCHI, I., TOKUCHI, K., FUKUZAKI, H. *et al.* "Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites". **Journal of Biomedical Materials Research**, v.55, n.01, pp.20-27, 2001.
- [90] SIVAKUMAR, M., MANJUBALA, I., RAO, P.K. "Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite chitosan composite microspheres". **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.03, pp.282-288, 2002.
- [91] ACHARYA, C., GHOSH, S.K. "Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion". **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.19, n.08, pp.2827-2836, 2008.
-

-
- [92] NOGUEIRA, G.M., MORAES, M.A., RODAS, A.C.D. *et al.* “Hydrogels from silk fibroin metastable solution: formation and characterization from a biomaterial perspective”. **Materials Science and Engineering C**, v.31, n.05, pp.997-1001, 2011.
- [93] KWEON, H.Y., UM, I.C., PARK, Y.H. “Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin/chitosan blend film”. **Polymer**, v.42, n.01, pp.6651-6656, 2001.
- [94] MOARES, M.A., NOGUEIRA, G.M., WESKA, R.F. *et al.* “Preparation and characterization of insoluble silk fibroin/chitosan blend films”. **Polymers**, v.02, n.04, pp.719-727, 2010.
- [95] GOLIA, C.R., LOURENÇO, A.L., ROSITO, R., MACEDO, C.A.S. *et al.* “Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado”. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.46, n.04, pp.444-451, 2011.
- [96] GAY, S., AROSTEGUI, S., LEMAITRE, J. “Preparation and characterization of dense nanohydroxyapatite/PLLA composites”. **Materials Science and Engineering C**, v.29, n.05, pp.172-177, 2009.
- [97] MANDAL, B.B., KUNDU, S.C. “Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds”. **Biomaterials**, v.30, n.15, pp.2956-2965, 2009.
- [98] CHANG, B.S., LEE, C.K., HONG, K.S. *et al.* “Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations”. **Biomaterials**, v.21, n.12, pp.1291-1298, 2000.
- [99] SHALUMON, K.T., ANULEKHA, K.H., CHENNAZHI, K.P. *et al.* “Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, n.04, pp.571-576, 2011.
-

-
- [100] AMARAL, I.F., CORDEIRO, A.L., SAMPAIO, P. *et al.* “Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation”. **Journal of Biomaterials Science Polymer**, v.18, n.04, pp.469-485, 2007.
- [101] GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H. “Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres”. **Carbohydrate Polymers**, v.66, n.01, pp.43-54, 2006.
- [102] FRENKEL, S.R., BRADICA, G., BREKKE, J.H. *et al.* “Regeneration of articular cartilage – evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants”. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.13, n.09, pp.798-807, 2005.
- [103] HOLLISTER, S.J. “Porous scaffold design for tissue engineering”. **Natural Materials**, v.04, n.01, pp.518-524, 2005.
- [104] SAAD-HOSSNE, R., SAAD-HOSSNE, W., PRADO, R.G. “Effects of watery solution of phenol, acetic acid and glycerin in Ehrlich mouse ascites tumor: experimental study *in vitro*”. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.19, n.01, pp.54-58, 2004.
- [105] LIN, H.R., CHEN, K.S., CHEN, S.C., *et al.* “Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ”. **Materials Science and Engineering C**, v.27, n.02, pp.280-284, 2007.
- [106] LACK, S., DULONG, V., PICTON, L. *et al.* “High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism”. **Carbohydrate Research**, v.342, n.07, pp.943-953, 2007.
- [107] ZENG, W., HUANG, J., HU, X. *et al.* “Ionically cross-linked chitosan microspheres for controlled release of bioactive nerve growth factor”. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.02, pp.283-290, 2011.
-

-
- [108] WATTANACHANT, S., MUHAMMAD, K., HASHIM, D.M. *et al.* “Effect of crosslinking reagents and hydroxypropylation levels on dual-modified sago starch properties”. **Food Chemistry**, v.80, n.01, pp.463-471, 2003.
- [109] HAN, J., ZHOU, Z., YIN. *et al.* “Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, n.02, pp.199-205, 2010.
- [110] LAURENCIN, C.T., AMBROSIO, M.A., BORDEN, M.D. *et al.* “Tissue engineering: orthopedic applications”. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.01, n.01, pp.19-46, 1999.
- [111] MINOURA, N., AIBA, S., GOTOH, Y. *et al.* “Attachment and growth of cultured fibroblasts cells on silk protein matrices”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.29, n.10, pp.1215-1221, 1995.
- [112] SOFIA, S., MCCARTHY, M.B., GRONOWICZ, G. *et al.* “Functionalizes silk-based biomaterials for bone formation”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.54, n.01, pp.139-148, 2001.
- [113] LAURICELLA, M., ANNEO, A.D., GIULIANO, M. *et al.* “Induction of apoptosis in human osteosarcoma SaOS-2 cells by the proteasome inhibitor MG132 and the protective effect of pRb”. **Cell Death and Differentiation**, v.10, n.01, pp.930-932, 2003.
- [114] BOYAN, B.D., LOHMANN, C.H., DEAN, D.D. *et al.* “Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology”. **Annual Review of Materials Research**, v.31, n.01, pp.357-371, 2001.
- [115] ZHANG, Y., WU, C., FRIIS, T. *et al.* “The osteogenic properties of CaP/silk composite scaffolds”. **Biomaterials**, v.31, n.10, pp.2848-2856, 2010.
-

-
- [116] VACHIRAROJ, N., RATAVARAPORN, J., DAMRONGSAKKUL, S. *et al.* “A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on *in vitro* biocompatibility for bone substitutes”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, n.05, pp.470-477, 2009.
- [117] SHE, Z., JIN, C., HUANG, Z. *et al.* “Silk fibroin/chitosan scaffolds: preparation, characterization and culture with HepG2 cell”. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.19, n.12, pp.3545-3553, 2008.
- [118] GOBIN, A.S., FROUDE, V.E. MATHUR, A.B. “Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.74, n.03, pp.465-473, 2005.
- [119] REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J. *et al.* “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering”. **Biomaterials**, v.27, n.18, pp.3413-3431, 2006.
- [120] CHIM, H., ONG, J.L., SCHANTZ, J.T. *et al.* “Efficacy of glow discharge gas treatment as a surface modification process for three-dimensional poly (D,L-lactide) scaffolds”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.65, n.03, pp.327-335, 2003.
- [121] SALGADO, A.J., GOMES, M.E., CHOU, A. *et al.* “Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds”. **Materials Science and Engineering C**, v.20, n.01, pp.27-33, 2002.
- [122] HOLY, C.E., SHOICHET, M.S., DAVIES, J.E. “Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, n.03, pp.376-382, 2000.
-

- [123] LLUTOLF, M.P., HUNNELL, J.A. “Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering”. **Nature Biotechnology**, v.23, n.01, pp. 47-55. 2005.
- [124] ALBERTS, B., RAFF, M., ROBERTS, K. *et al.* **Biologia Molecular da célula**, 5ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.
- [125] ZHANG, S. “Beyond the petri dish”. **Natural Biotechnology**, v.22, n.02, pp.151-152, 2004.
- [126] ABBOTT, A., CYRANOSKI, D. “News feature: biology’s new dimension”. **Nature**, v.424, n.01, pp.870-872, 2003.
- [127] PAMPALONI, F., REYNAUD, E.G., STELZER, E.H.K. “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue”. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.08, n.01, pp.839-845, 2007.