



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

P²CEM

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS (P²CEM)**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS
BASEADOS EM QUITOSANA, POLIDOPAMINA E HIDROXIAPATITA PARA
APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**

GABRIELA SANTOS ANDRADE

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

Fevereiro/2024

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS
BASEADOS EM QUITOSANA, POLIDOPAMINA E HIDROXIAPATITA PARA
APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

GABRIELA SANTOS ANDRADE

TESE SUBMETIDA AO 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 DOUTORA EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS EDUARDO ALMEIDA

COORIENTADOR: PROF. DR. GEORGE RICARDO SANTANA ANDRADE

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

Fevereiro/2024

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

A553p Andrade, Gabriela Santos
Produção e caracterização de arcabouços tridimensionais baseados em quitosana, polidopamina e hidroxiapatita para aplicações na engenharia tecidual óssea / Gabriela Santos Andrade ; orientador Luís Eduardo Almeida. - São Cristóvão, 2024.
96 f.: il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Quitosana 2. Hidroxiapatita. 3. Dopamina. I. Almeida, Luís Eduardo orient. II. Título.

CDU 66.017

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS BASEADOS
EM QUITOSANA, POLIDOPAMINA E HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÕES NA
ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Gabriela Santos Andrade

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 CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada por:



Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida



Profa. Dra. Edna Aragão Farias Cândido



Profa. Dra. Patrícia Severino



Prof. Dr. Euler Araújo dos Santos



Profa. Dra. Cristiane Xavier Resende

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL

Fevereiro/2024

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca
tem medo e nunca se arrepende"*

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Esta foi uma jornada em busca de conhecimento e aprimoramento. Ela me trouxe, sobretudo, gratidão. Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me guiado em todos os momentos e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas. Aos meus pais **Rosana Costa Santos Andrade** e **Auro Conceição Andrade**, por todo o amor e por sempre estarem ao meu lado, dando o suporte necessário para enfrentar qualquer barreira. À minha irmã, **Thais Santos Calheiros**, que mesmo distante sempre se fez presente nestes últimos anos e a **Jaime Norambuena**, pelas imagens feitas para meu trabalho com tanto carinho. Muito obrigada!

Ao meu orientador, **Dr. Luís Eduardo Almeida** e coorientador, **Dr. George Ricardo Santana Andrade**, pela paciência e compreensão, além de todo o conhecimento compartilhado, foi um grande privilégio. Além disso, agradeço aos professores do Laboratório de Biomateriais, **Dra. Cristiane** e **Dr. Euler**, pelas contribuições e apoio durante estes anos. À **CNPq**, **FAPITEC** e **CAPES** pela estrutura laboratorial e apoio financeiro que possibilitaram a realização dessa pesquisa. Os espaços laboratoriais do **Condomínio de Laboratórios Multiusuários do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (CLMDCEM)**, **Núcleo de Energias Renováveis e Eficiência Energética de Sergipe (SergipeTec)**, o **Centro Multiusuário de Nanotecnologia (NUPEG)**, **Centro de Laboratórios de Química Multiusuário (CLQM)** e **Laboratório de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania (LaBICeL)** pelo suporte nas análises de caracterização e ensaio *in vitro*.

Aos meus colegas de laboratório e UFS, em especial a **Ana Júlia**, **Douglas**, **Héricles**, **Jander**, **Jéssica**, **Manu**, **Mário** e **Michael**, por todos os momentos compartilhados, que amenizaram as dificuldades e trouxeram alegria para minha rotina. Aos amigos de fora da Universidade, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse trilhar neste caminho, minha eterna gratidão. Vocês são muitos, mas vou tentar citar os que estiveram tão presentes (ainda que à distância) e compreensivos nestes anos: **Alan**, **Arthur**, **Chico**, **Gerson**, **Isabela**, **Kenya**, **Lai**, **Luana**, **Natália**, **Sérgio**, **Tábata** e todos meus **alunos/pacientes**. Muito obrigada! Por fim, à **Karianine** e **Tiago**, já que sem vocês eu possivelmente não teria conseguido chegar neste momento. Por terem me ajudado a enxergar além do que eu conseguia ver, sou grata por toda a assistência, competência e empatia.

RESUMO

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS BASEADOS EM QUITOSANA, POLIDOPAMINA E HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Gabriela Santos Andrade

2024

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Coorientador: Prof. Dr. George Ricardo Santana Andrade

Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Arcabouços tridimensionais devem servir como um ambiente temporário para o crescimento celular, com biodegradabilidade em taxas controladas, além de propriedades mecânicas adequadas para a área onde for aplicado. A quitosana (CHI) possui propriedades promissoras e suas características podem ser melhoradas com a adição de hidroxiapatita (HA) e polidopamina (PDA). A HA é uma cerâmica bioativa cuja composição é similar à fase mineral óssea. Até onde se sabe, o PDA ainda não foi investigado em adição à CHI e HA para produção de arcabouços. O recobrimento de PDA pode ser promissor, devido a sua biocompatibilidade, estímulo à adesão celular e degradação relativamente lenta. Portanto, este estudo teve como objetivo produzir e caracterizar arcabouços 3D de CHI e HA recobertos com PDA e testar aspectos de sua aplicabilidade na engenharia tecidual óssea. Primeiramente, foram preparados arcabouços de CHI com diferentes recobrimentos de PDA, nas concentrações de 1, 2, 3 e 4 mg/mL; e nos períodos de 0,5h, 1h, 3h, 6h, 12h e 24h. Os arcabouços contendo CHI e PDA foram comparados ao de CHI não revestido usando os resultados obtidos por FTIR, MEV e teste de compressão. Após a padronização do recobrimento, foram testados arcabouços incluindo HA em sua composição. Os grupos foram produzidos com diferentes formulações dos três materiais, comparando-se a presença ou ausência de recobrimento. Além das caracterizações acima citada, foram realizadas análises por EDS, porosidade, DRX, TGA, DSC e ensaios *in vitro* de degradação e citotoxicidade. Verificou-se interação entre CHI e PDA, maior potencial de resistência a cargas compressivas nos grupos com maior concentração de PDA. A interação dos polímeros com a HA também foi sugerida pelos resultados obtidos com FTIR. Eles apresentaram resistência adequada a cargas compressivas em áreas que não requerem alta descarga de peso. Sua microestrutura apresentou padrões heterogêneos de porosidade e sua superfície tornou-se mais rugosa com a inclusão de HA e PDA. Além disso, CHI/HA/PDA (50/50) exibiu poros interconectados com canais longos em sua microestrutura. O ensaio de citotoxicidade por MTT demonstrou a viabilidade celular dos grupos, apresentando comportamento similar ao grupo controle negativo ($p > 0,05$) e potencial biocompatível. Essas informações parecem ser favoráveis para o emprego destes materiais para a engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: arcabouços 3D, quitosana, hidroxiapatita, polidopamina.

ABSTRACT

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.)

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS BASED ON CHITOSAN, POLYDOPAMINE AND HYDROXYAPATITE FOR BONE TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Gabriela Santos Andrade

2024

Advisor: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Co-advisor: Prof. Dr. George Ricardo Santana Andrade

Department: Materials Science and Engineering

Three-dimensional scaffolds should serve as a temporary environment for cell growth, with biodegradability at controlled rates, as well as mechanical properties like the area where they are applied. Chitosan (CHI) has promising properties, and its characteristics can be improved with the addition of hydroxyapatite (HA) and polydopamine (PDA). HA is a bioactive ceramic whose composition corresponds to the mineral phase of bones. To the best of our knowledge, PDA has not yet been investigated in addition to CHI and HA to produce scaffolds. PDA coating can be promising, due to its biocompatibility, cell adhesion and relatively slow degradation. Therefore, this study aimed to prepare and characterize 3D chitosan (CHI) and hydroxyapatite (HA) scaffolds coated with polydopamine (PDA) and test aspects of their applicability in bone tissue engineering. The present research also studies different concentrations of dopamine polymerization and contact time for scaffolds coating. First, CHI scaffolds were prepared with different coatings (1, 2, 3 and 4 mg/mL) within periods of 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h and 24h. They were compared with the uncoated CHI scaffold FTIR, SEM and compression test. After the coating standardization, groups including HA were tested. The groups were produced with different formulations of the three materials, comparing the presence or absence of PDA coating. In addition to the above characterizations, EDS, porosity analysis, XRD, TGA, DSC, *in vitro* degradation and cell viability assay were performed. It was found the interaction between CHI and PDA and more uniform layer for the groups with the highest coating concentration. These also showed greater potential for resistance to compressive loads. The interaction of the polymers and HA was also suggested. They exhibited suitable resistance to compressive loads at areas that do not require high stress load. Its microstructure showed heterogeneous porosity patterns and its surface became rougher with the inclusion of HA and PDA. Also, CHI/HA/PDA (50/50) displayed interconnected pores with long channels microstructure. MTT cytotoxicity assay demonstrated the groups cell viability, the scaffolds similar behavior to negative control group ($p > 0.05$) reveals their biocompatible potential. This information appears to be favorable for the materials employment, under these conditions, for bone tissue engineering.

Keywords: 3D scaffolds; chitosan; hydroxyapatite; polydopamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Representação da estrutura química da CHI. Fonte: Autoria própria.	11
Figura 02: Representação esquemática das possíveis rotas de polimerização do PDA. Fonte: Autoria própria, baseada em [48], [51], [52].....	13
Figura 03: Representações da hidroxiapatita, com a célula unitária da cerâmica. Fonte: Adaptado de Cipreste e colaboradores [56].	14
Figura 04: a) Amostras com secagem em estufa; b) Amostras com secagem em estufa a vácuo; c) Amostras com secagem por liofilização.....	25
Figura 05: Etapas de produção dos arcabouços de CHI/HA, com o posterior recobrimento de PDA.	25
Figura 06: Espectros obtidos no FTIR dos pós da CHI, PDA e HA.....	33
Figura 07: Espectros obtidos no FTIR do grupo I. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.	34
Figura 08: Espectros obtidos no FTIR do grupo II. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.	35
Figura 09: Espectros obtidos no FTIR do grupo III. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.	36
Figura 10: Espectros obtidos no FTIR do grupo IV. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.	37
Figura 11: Micrografias (100x e 200x) do arcabouço de quitosana sem recobrimento (a).	40
Figura 12: Micrografias (200x) do GI (b), arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.	41
Figura 13: Micrografias (200x) do GII (c), arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.	42
Figura 14: Micrografias (200x) do GIII (d), arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.	43
Figura 15: Micrografias (200x) do GIV, arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.	44
Figura 16: Ensaio de compressão das amostras de CHI pura e com recobrimentos de PDA. (*) ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey evidenciou diferença estatística entre a amostra de CHI e com o recobrimento do GIV 12h e GIV 24h ($p \leq 0,05$). Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).	46

Figura 17: Curva da relação entre compressão (MPa) e deformação (mm/mm) dos arcabouços de CHI sem recobrimento, GIV 12h e GIV 24h. * Ensaio finalizado em 50% de compressão para CHI, e em 80% para as demais curvas.	46
Figura 18: Espectro obtido pelo FTIR dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).	50
Figura 19: Imagens obtidas pelo MEV (100x e 200x) dos arcabouços a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).	53
Figura 20: Imagem obtida pelo MEV em 50x, referente ao grupo CHI/HA/PDA (50/50) (g), num corte sagital do arcabouço pós fratura, para visualização da camada de PDA depositada na superfície do material (borda localizada à esquerda).	54
Figura 21: Resultados obtidos por EDS dos grupos de arcabouços a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).	55
Figura 22: Análise da porosidade dos arcabouços em relação a contagem de poros (a); área total dos poros em % (b); diâmetro médio dos poros em μm (c).	58
Figura 23: Ensaio de compressão dos grupos. (*) ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey evidenciou diferença estatística entre os grupos: CHI (100) e CHI/PDA (100) ($p = 0,03637$), CHI/PDA (100) e CHI/HA (50/50) ($p = 0,0221$). Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).	60
Figura 24: (a) Padrão de difração de DRX com identificação do halo amorfo contido na CHI (*) e PDA (**, ***). (b) Picos e planos cristalinos da HA (*). (c) Padrão de difração de DRX dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).	62
Figura 25: Análise termogravimétrica por TGA dos materiais puros de CHI, PDA e HA (a). Análise por TGA dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25) (b) e DTG (c).	65
Figura 26: Termograma por DSC dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).	68
Figura 27: Variação da perda de massa dos arcabouços (%) em função do tempo de imersão na solução de PBS. (*) $p < 0,05$ para a análise intragrupo: CHI (100), 28 dias $\neq$ dos demais períodos; CHI/PDA (100), 7 dias $\neq$ 21 e 28 dias. (**) Análise entre grupos para CHI (100) e CHI/PDA (100) em relação aos demais grupos.	70
Figura 28: (a) Análise da viabilidade celular obtida em porcentagem, comparando-se os grupos aos controles. (b) Análise das absorbâncias ($\lambda = 570 \text{ nm}$) dos grupos por Box Plot, evidenciando diferença significativa para o controle positivo em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Análise	

feita por ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey. Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$)..... 73

Figura S1: Espectros de FTIR com destaque às bandas de ligação dos materiais, da etapa I (1, 2, 3 e 4 % de PDA) e da etapa II, com os grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25). 84

Figura S2: Análise termogravimétrica por TGA com picos do DTG dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25). 86

LISTA DE TABELA

Tabela 01: Divisão dos grupos da Etapa I (padronização do PDA).....	22
Tabela 02: Divisão dos grupos da Etapa II (contendo os três materiais).	23
Tabela 03: Deslocamento (Δ) das bandas de interesse de cada grupo de recobrimento.	38
Tabela 04: Deslocamento (Δ) das bandas de interesse de cada arcabouço.	51
Tabela 05: Dados do estudo de porosidade dos arcabouços (média $\pm$ desvio padrão).	56
Tabela 06: Ensaio de compressão dos arcabouços em triplicata.....	59
Tabela 07: (a) Dados referentes ao primeiro evento térmico com suas respectivas perdas de massa (%). (b) Dados do segundo evento térmico com as variações de temperatura, bem como as perdas de massa (%).	66
Tabela 08: Ensaio de degradação <i>in vitro</i> dos arcabouços.....	69
Tabela 09: Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos arcabouços.	74
Tabela S1: Regiões das bandas de absorção dos arcabouços (etapa II) e seus deslocamentos (Δ).	85

LISTA DE SIGLAS, NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS

AINEs.....	Anti-inflamatórios não esteroides
[Ca(OH) ₂]....	Hidróxido de cálcio
CA.....	Cálcio
CHI.....	Quitosana
cm.....	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DA.....	Dopamina
DMEM.....	Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium
DOPA.....	3,4 hidroxifenilalanina
DP.....	Desvio padrão
DRX.....	Difração de raios-X
DSC.....	Calorimetria de varredura diferencial
EDS.....	Espectroscopia de energia dispersiva
EUA.....	Estados Unidos da América
FTIR...	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GAGs.....	Glicosaminoglicanos
h.....	Hora
HA.....	Hidroxiapatita
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
ISO.....	International Organization for Standardization
KBr.....	Brometo de potássio
kN.....	Quilonewton
KOH.....	Hidróxido de potássio
kPa.....	Quilopascal
kV.....	Quilovolt
L929.....	Células fibroblásticas de rato
mA.....	Miliampere
m/v.....	Massa/volume
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
Mg.....	Magnésio

mg/mL.....	Miligrama/Mililitro
min.....	Minuto
mm.....	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
MPa.....	Mega Pascal
MSCs.....	Células-tronco mesenquimais
MTT.....	3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N.....	Newton
NaOH.....	Hidróxido de sódio
P.....	Fósforo
PBS.....	Tampão fosfato-salino
Polidopamina.....	PDA
PTFE.....	Politetrafluoretileno
SBF.....	Fluido corporal simulado
TE.....	Engenharia Tecidual
TGA.....	Análise termogravimétrica
Tris.....	(tris(hidroximetil)aminometano)
v/v.....	Volume/volume
Å.....	Angstrom
α	Alfa
β	Beta
°C.....	Grau Celsius
μ m.....	Micrometro
θ	Teta
λ	Lambda
Δ	Delta
3D.....	Três dimensões

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
2.1. Tecido Esquelético	6
2.2. Regeneração óssea	7
2.3. Engenharia tecidual	8
2.5. Quitosana	11
2.6. Polidopamina.....	12
3.4. Hidroxiapatita	14
2.5. Modificação de superfícies com PDA na Engenharia Tecidual e sua interação com CHI e HA	15
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Materiais	22
4.2. Divisão e identificação dos grupos.....	22
4.2.1. Etapa I.....	22
4.2.2. Etapa II.....	23
4.3. Síntese da hidroxiapatita por via úmida	23
4.4. Produção dos arcabouços tridimensionais.....	24
4.5. Recobrimento com Polidopamina.....	24
4.6. Caracterização físico-química e mecânica	26
4.6.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	26
4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) .	26
4.6.3. Porosidade.....	26
4.6.4. Ensaio de compressão	27
4.6.5. Difratometria de raios X (DRX)	27
4.6.6. Análise termogravimétrica (TGA)	27
4.6.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	27
4.7. Processo de esterilização	28
4.8. Avaliação <i>in vitro</i>	28
4.8.1. Ensaio de degradação <i>in vitro</i>	28
4.8.2. Avaliação de citotoxicidade	28
4.9. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

5.1. Etapa I	31
5.1.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32
5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
5.1.3. Ensaio de compressão	45
5.1.4. Considerações sobre a padronização do recobrimento com PDA.....	48
5.2. Etapa II.....	49
5.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
5.2.3. Análise de porosidade	56
5.2.4. Ensaio de compressão	59
5.2.5. Difratometria de raios X (DRX)	61
5.2.6. Análise termogravimétrica (TGA)	64
5.2.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	68
5.2.8. Ensaio de degradação <i>in vitro</i>.....	69
5.2.9. Avaliação de citotoxicidade	72
6. CONCLUSÕES	76
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
8. ANEXO SUPLEMENTAR.....	80
.....	80

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos são desenvolvidos mundialmente buscando estratégias de reparo tecidual após lesões que gerem defeitos ósseos. Certas condições levam a grande perda óssea, como traumas severos ou tumores, podendo requerer intervenção médica quando o corpo não é capaz de se regenerar [1]. Para tais casos, comumente são implementados métodos como uso de biofilmes, fixadores externos de Ilizarov, e os tratamentos mais tradicionais, com transplantes de tecido ósseo alógeno ou autólogo [2].

Tais métodos possuem limitações, os pacientes podem ter rejeição imunológica na técnica alógena e risco de contaminação cruzada. Há também a limitação da quantidade disponível de tecido autólogo, com a necessidade de outra cirurgia para retirada de tecido, causando dor e inflamação local, além dos altos custos nos procedimentos [3], [4]. Como tratamento alternativo, tem sido proposto o uso de biomateriais, como arcabouços porosos tridimensionais, que servem como um ambiente bioativo temporário para adesão e proliferação celular [5].

Biomaterial pode ser qualquer material que atue como matriz, suporte, ou como estimulador para o crescimento tecidual, quando em contato com o sistema biológico [6]. Alguns requisitos são essenciais para a seleção de biomateriais direcionados ao tecido ósseo. Eles devem ser biocompatíveis, dando suporte para atividade celular e causando o mínimo de resposta inflamatória quando forem aplicados. Precisam garantir a osteocondução, adesão celular e proliferação, além da formação da matriz extracelular. Portanto, arcabouços derivados de biomateriais devem possuir poros interconectados que permitam a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), garantindo a sua nutrição e oxigenação, com posterior deposição celular e mineralização eficiente [4], [7].

Após a aplicação de um arcabouço deve haver também a biodegradabilidade em taxas controladas, permitindo a sua substituição pela neoformação óssea. Os produtos da degradação não devem gerar toxicidade local nem sistêmica, o que poderia levar à rejeição imunológica do paciente. É preciso também observar as propriedades mecânicas do arcabouço, que devem ser adequadas à área onde ele for aplicado [4], [8], [9].

A engenharia tecidual se propõe a produzir materiais com a capacidade de promover suporte para a regeneração de tecidos, como a pele, ossos e ligamentos. Para tal, são utilizados biomateriais produzidos em forma de filmes, grânulos, pastilhas ou arcabouços porosos tridimensionais [10]. Estes arcabouços, tradicionalmente, são usados para fornecer um ambiente bioativo para adesão e proliferação celular. Eles oferecem estabilidade estrutural para a

regeneração tecidual, além de simular a função do tecido nativo. Dentre os materiais utilizados, estão os polímeros, cerâmicas, ou compósitos, que representam a combinação de mais de um tipo de material [3], [11].

A quitosana (CHI) é um exemplo de polímero linear, obtido pela desacetilação alcalina da quitina, um polissacarídeo abundante na natureza. Ela se encontra no exoesqueleto de crustáceos e insetos, e na parede celular de fungos e bactérias. Após sua desacetilação, forma-se a CHI, um copolímero composto por unidades β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e β -(1-2)-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose [12], [13]. A CHI representa um importante biomaterial devido a suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade bactericida. Além disso, sua estrutura química é similar a dos glicosaminoglicanos (GAGs), um dos principais componentes da matriz extracelular da cartilagem e do osso [14], [15].

Uma limitação para a aplicação da CHI na engenharia tecidual óssea é a sua baixa resistência mecânica. Além disso, ela apresenta uma taxa de degradação elevada, o que pode interferir na estabilidade da estrutura do material, diminuindo a sua adesão e diferenciação celular [16]. Estas características podem ser modificadas quando a associam com outros polímeros ou cerâmicas que levem ao aumento da resistência à compressão, degradação e osteointegração [17].

O polidopamina (PDA) é sintetizado a partir da polimerização espontânea da dopamina (DA). A sua utilização na engenharia tecidual foi inspirada no estudo de mexilhões que conseguem forte adesão a diversos substratos na presença de água. Uma das proteínas presentes nesses animais, a *mytilus foot protein 5*, é rica em 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (ou L-dopa), de onde o neurotransmissor DA é derivado [18]. A presença abundante dos aminoácidos L-dopa e L-lisina dos mexilhões garantem a resistência e adesão a pedras, mesmo em ambiente de agitação marinha, e o PDA possui estrutura similar a estas proteínas adesivas, o que indica bom potencial para um biomaterial osteointegrador [19], [20]. O PDA representa um polímero de interesse para a área biomédica por apresentar, além das propriedades adesivas e biocompatibilidade, boa atividade bactericida e demonstrar toxicidade insignificante às células [21]. Sua utilização tem sido direcionada para a produção de superfícies de revestimento biocompatível [22].

A aplicação do PDA também pode ser promissora em arcabouços 3D na engenharia tecidual óssea, por conta de sua atividade osteogênica. A sua deposição em materiais ortopédicos tem auxiliado na promoção da mineralização de superfícies, assim como a adesão e proliferação de condrócitos, tornando-o também uma opção no tratamento de patologias articulares [23], [24]. Sua estrutura química contém grupos funcionais, como as hidroxilas do catecol, a amina e imina,

que podem ser utilizados na imobilização covalente de moléculas e adsorção de íons metálicos [21], [23].

Por fim, outro biomaterial utilizado na Engenharia Tecidual é a hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Trata-se de uma cerâmica bioativa cuja composição e estrutura se assemelham à fase mineral do esqueleto humano. Suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução fazem deste biomaterial um aliado à engenharia tecidual óssea [25]. Além disso, a HA possui alta estabilidade termodinâmica em condições fisiológicas de temperatura, pH e em contato com fluidos corporais [26]. Sua utilização varia entre a fabricação de grânulos, filmes, pastilhas e arcabouços porosos. Na produção de estruturas porosas, ela tem sido explorada por melhorar a integração com o tecido nativo [27].

A principal limitação para seu uso isolado, no entanto, são suas propriedades mecânicas. Por se tratar de uma cerâmica, a HA dispõe de baixa resistência ao estresse mecânico e predisposição à fratura. Neste sentido, ela tem sido estudada em adição a biomateriais de diferentes origens que auxiliem na melhora das condições mecânicas do material, podendo formar compósitos com um ou mais polímeros [26], [28].

Até o momento, não há estudos que analisem o efeito do recobrimento de PDA em arcabouço poroso 3D em matriz de CHI com HA. Neste sentido, pretende-se determinar o efeito do recobrimento de PDA em arcabouços porosos 3D de CHI/HA em diversas propriedades destes arcabouços, como a interação dos materiais, resistência mecânica e citotoxicidade, propondo uma explicação de como este polímero se liga ao arcabouço 3D.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tecido Esquelético

A estrutura óssea é multifuncional, atuando no suporte mecânico e proteção dos órgãos; na homeostase mineral e na hematopoiese, importante processo de formação e maturação de hemácias, leucócitos e plaquetas da corrente sanguínea. De forma geral, o tecido ósseo é composto por 60% de material mineral, 30% de matriz extracelular e 10% de água. O osso cortical possui função protetora e mecânica, principalmente no suporte de carga; já o osso trabecular fornece função metabólica e mecânica, embora de maneira diferente ao cortical. O papel do osso trabecular, ou esponjoso (devido a sua estrutura porosa), é de redirecionar as tensões de carga para a área cortical mais densa. Além do suporte de carga, a organização tecidual do osso saudável permite que sejam evitadas fraturas por estresse de repetição, ou fadiga [17], [29].

A matriz extracelular é sintetizada pelas células. Diferentes tecidos e órgãos são compostos por múltiplos tipos celulares, envoltos por uma matriz extracelular específica a cada tipo. As interações entre células e matriz, bem como a comunicação efetiva célula-célula dentro deste microambiente, desempenham um importante papel na determinação da função celular. Essas interações são essenciais para a manutenção da estrutura e função adequada do tecido ou órgão. As proteínas da matriz extracelular são depositadas pelas células à medida que se desenvolvem, formando estruturas teciduais ligadas [30].

A matriz extracelular óssea contém colágeno e minerais (como o cálcio e fosfato). O componente inorgânico ósseo é formado primordialmente por cristais de fosfato de cálcio, conhecidas como hidroxiapatita, sendo responsável pela rigidez e dureza do tecido. O arcabouço orgânico, por sua vez, consiste em fibras colágenas e proteínas estruturais não-colágenas, como proteoglicanos, sialoproteínas e glicoproteínas. Ele permite ao tecido ósseo resistência à compressão e elasticidade, propriedade necessária para suportar as cargas mecânicas recebidas. Há quatro tipos de células ativas incorporadas na matriz óssea mineralizada, que regulam a remodelação óssea, atuando como formadoras ou reabsorvedoras do tecido. São estas: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras [17].

A integridade óssea pode ser comprometida pela aparição de tumores, trauma, infecção, necrose, dentre outras causas. Um desafio no tratamento destas afecções é a manutenção da função e qualidade de vida do paciente. Os defeitos ósseos são tradicionalmente tratados com enxertia alógena ou autóloga, que costumam causar comorbidades nos pacientes, rejeição imunológica na técnica alógena, limitação da quantidade de tecido autólogo disponível e alto custo nos

procedimentos [5], [31]. Devido às limitações nos tratamentos tradicionais, tem sido proposto o uso alternativo de biomateriais para o reparo ósseo, área de estudo explorada pela engenharia tecidual.

2.2. Regeneração óssea

Uma fratura óssea ou osteotomia leva à perda da continuidade anatômica e/ou instabilidade mecânica do osso. As fraturas geralmente acontecem por causa de quedas, acidentes automobilísticos ou lesões esportivas. Outros fatores como osteopenia e osteoporose aumentam a incidência de fraturas, que podem resultar em hospitalizações e aumento na mortalidade. O impacto na saúde física e mental dos pacientes, além dos custos à saúde pública, levam à necessidade de maiores estudos sobre esta temática. Dessa forma, compreender o processo de regeneração é crucial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes [29].

Os tecidos ósseos são formados por ossificação intramembranosa, que ocorre principalmente em ossos curtos ou endocondral (principalmente em ossos longos). Na formação intramembranosa, os capilares dos tecidos próximos invadem a zona mesenquimal, resultando na diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSCs) diretamente em osteoblastos maduros. Em contraste, a regeneração endocondral envolve a ativação e ampliação de células do tecido cartilaginoso. Ao direcionar o desenvolvimento da matriz mineralizada e recrutar os vasos sanguíneos, as propriedades funcionais da matriz cartilaginosa são combinadas com a angiogênese para iniciar a chegada de osteoblastos, o crescimento ósseo longitudinal e a regeneração da medula [32].

Os mecanismos primários e secundários envolvidos no reparo de fraturas de ossos longos envolvem diferentes vias. Na cicatrização primária, quando os fragmentos da fratura são estabilizados por uma fixação interna rígida, é permitida uma reconexão direta ao osso cortical. Os osteoblastos, derivados de MSCs, são responsáveis por depositar as matrizes neoformadas denominadas osteóides nas superfícies ósseas. Já a cicatrização secundária, também conhecida como espontânea, envolve uma resposta do periósteo e dos tecidos moles adjacentes no local da fratura. Ela pode ser considerada como uma série de quatro estágios discretos que ocorrem em sequência e se sobrepõem até certo ponto. São estes estágios: resposta inflamatória, formação da cartilagem, formação de calo ósseo (ossificação endocondral) e remodelação óssea [29].

Após a lesão, o suprimento de sangue é interrompido e um coágulo sanguíneo é formado. As células progenitoras no periósteo e na medula diferenciam-se em osteoblastos para facilitar a

formação óssea intramembranosa, onde um suprimento sanguíneo intacto é preservado. No espaço da fratura onde o tecido é pouco oxigenado, as células progenitoras sofrem condrogênese. Os condrócitos hipertrofiam e suas matrizes tornam-se calcificadas, levando à apoptose dos condrócitos e invasão da matriz pelos vasos sanguíneos periosteal e medular. Esses vasos são acompanhados por células-tronco mesenquimais perivasculares que se diferenciam em osteoblastos. Os osteoblastos então formam o osso imaturo sobre a matriz calcificada. Posteriormente, o processo de remodelação prossegue com osteoclastos e osteoblastos facilitando a conversão do osso imaturo em lamelar e, eventualmente, recriando a forma anatômica adequada [29], [32].

Dentro destes aspectos fisiológicos, o manejo de defeitos ósseos de tamanho crítico continua sendo um desafio clínico-ortopédico. Os defeitos críticos são aqueles cuja extensão impede a regeneração espontânea do paciente. Mesmo com métodos de estabilização corretos, uma perda óssea com 2 a 2,5 vezes o diâmetro do osso afetado ou perda circunferencial $> 50\%$ para defeitos não segmentares dificilmente irá consolidar sem outras intervenções. Além disso, diversos fatores podem afetar negativamente a regeneração óssea. Esses fatores incluem distúrbios metabólicos e sistêmicos, comorbidades como diabetes, obesidade, artrite inflamatória, desnutrição, doença vascular periférica e hipotireoidismo [33], [34].

Certos medicamentos como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), ciprofloxacina, e anticoagulantes também podem aumentar o tempo de cicatrização e o risco de não-consolidação. O diabetes, tabagismo e abuso de álcool, estão associados a um maior risco de pseudoartrose e aumento no tempo de cicatrização. Citocinas pró-inflamatórias ligadas a doenças inflamatórias sistêmicas podem ativar osteoclastos e interromper o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea. As doenças inflamatórias também reduzem a expressão de fatores osteoindutores. Idade avançada, estase venosa, queimaduras, radiação e obesidade também são fatores predisponentes para o comprometimento da regeneração óssea [33], [34]. Como forma de contornar tais limitações, a Engenharia Tecidual tem explorado diferentes opções de biomateriais que estimulem a regeneração óssea.

2.3. Engenharia tecidual

Em 1988, o termo engenharia tecidual (TE) foi discutido pela necessidade de uma definição abrangente para esta ciência até então emergente. Seu conceito foi então publicado por Langer e Vacanti [35], que definiram: *"Engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que aplica os*

princípios de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido". Tal definição deu origem a uma área ampla e multidisciplinar. Desde então, técnicas inovadoras têm sido desenvolvidas para a produção de arcabouços com o processamento de cerâmicas e polímeros, que podem ter origem sintética ou natural [36].

Biomateriais são dispositivos que desempenham, aumentam ou substituem uma função natural. Eles interagem com o sistema biológico, servindo como matriz, suporte, ou estimulador para o crescimento de um novo tecido. Fontes históricas indicam que os primeiros usos de biomateriais podem ter sido no Egito Antigo, desde 3000 A.C., com tendões de animais para sutura, cascas de coco para reconstrução craniana, madeira para substituir dentes, dentre outros [37]. Atualmente, metais, cerâmicas, polímeros e compósitos (combinação entre mais de um tipo de material) são utilizados com tais finalidades. Suas aplicações para a saúde são variadas, como lentes de contato, implantes dentários, peles artificiais, válvulas cardíacas, próteses articulares e arcabouços ósseos [6]. A perda de uma parte do órgão ou tecido gera efeitos deletérios na função, assim como desordens psicológicas na vida social do indivíduo. Desta forma, os biomateriais representam um campo de estudo de grande importância para a saúde [38].

Os biomateriais podem ter muitas origens e diferentes aplicações. Os derivados naturais são usados, geralmente, como substituto ou restaurador de um órgão/tecido danificado, como um sistema de liberação controlada de fármacos ou para o desenvolvimento de arcabouços ósseos. Uma de suas vantagens é que eles são facilmente encontrados, apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e são bem tolerados pelo hospedeiro. Suas biomoléculas podem oferecer suporte e guiar a proliferação e diferenciação celular, além de aumentar a interação biológica entre células [39], [40].

São considerados subgrupos destes biomateriais, os materiais proteicos (a exemplo da fibrina e do colágeno), os polissacarídeos, como alginato, quitosana e ácido hialurônico. Os proteicos possuem adesão celular natural e são flexíveis, tornando-os bons candidatos na escolha para substitutos teciduais. Os polissacarídeos, por sua vez, possuem baixo custo, não são tóxicos e são facilmente extraídos de plantas, animais e bactérias [37], [39].

As biocerâmicas, por sua vez, podem ser classificadas em naturais, quando extraídas de corais, algas, pérolas, conchas, matriz de cascas de ovos, dentes, ossos; ou sintéticas, quando produzidas artificialmente, como a hidroxiapatita, ou outros tipos de fosfatos de cálcio, biovidros, dentre outros. Sua classificação pode também ser feita com base em sua resposta celular, podendo ser bioativos, biodegradáveis ou bioinertes [37].

Os biomateriais sintéticos, por sua vez, são normalmente os polímeros sintéticos ou poliésteres, como PLA (poli(ácido láctico)) e PEG (polietilenoglicol), utilizados quando regulados e aprovados como materiais seguros para os humanos. A vantagem destes materiais está na maior facilidade em modificar suas propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas de acordo com a necessidade. No entanto, por serem consideravelmente diferentes ao tecido nativo implantado, estes materiais apresentam maior risco de rejeição imunológica e toxicidade [39], [40].

Os metais biodegradáveis também são utilizados na engenharia tecidual, predominantemente destinados a tecidos ósseos, como em próteses metálicas. No entanto, ligas funcionais de Nitinol, com propriedades elásticas podem também ser exploradas na fabricação de *stents* para cirurgias cardíacas. Dentre as vantagens da utilização de metais, estão sua alta resistência mecânica, resistência à fadiga, ductilidade; baixo custo. No entanto, eles podem possuir baixa biocompatibilidade, rigidez, alta massa específica e baixa resistência à corrosão [37].

Os compósitos são conceituados como a combinação de dois ou mais materiais sintéticos ou naturais. Eles vêm sendo explorados como uma alternativa pelas últimas três décadas, como materiais substitutos de algum tecido ou órgão danificado. Polissacarídeos e proteínas são comumente unidos, com o objetivo combinar características consideradas positivas para a regeneração tecidual [39]. Compósitos com base em polímeros também têm sido aplicados para liberação de fármacos, curativos, cirurgias, imagens para detecção de câncer e resina dentária [37].

2.4. Biomateriais aplicados na engenharia tecidual óssea

Biomateriais têm sido comumente estudados e empregados pela engenharia tecidual como um tratamento alternativo para afecções no esqueleto. A ciência dos materiais envolve uma variedade de disciplinas para esta área de pesquisa, com engenharia e ciências aplicadas para as ciências da saúde [41]. Por ser um campo interdisciplinar, é requerido conhecimento das propriedades estruturais de materiais sintéticos e biológicos; assim como em biologia, fisiologia, anatomia, biologia celular e molecular. Além disso, a depender da aplicação do produto, é preciso ter conhecimento em ciências clínicas como odontologia, oftalmologia, ortopedia, cirurgia reconstrutiva, cirurgia cardiovascular, neurocirurgia, histopatologia, cirurgia experimental, e medicina veterinária [6].

A utilização de biomateriais como substitutos ósseos variam em relação a sua composição química (metais, polímeros ou cerâmicas), assim como o tipo de produto (blocos, hidrogéis, arcabouços porosos, grânulos, dentre outros). O titânio e suas ligas são amplamente utilizados para

implantes odontológicos e ortopédicos. Dentre as cerâmicas mais utilizadas nesta área, estão a HA e o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), biovidros e a alumina. Em relação ao uso dos polímeros, são exemplos a CHI, ácido hialurônico, a policaprolactona e o ácido polilático [6], [40], [42].

Dentre os biomateriais utilizados na engenharia tecidual, destacam-se os advindos de fontes renováveis, como o biopolímero CHI, que simula os GAGs das células e o PDA, que melhora a adesão e mineralização em diferentes superfícies [14], [24]. A HA, por sua vez, é uma cerâmica que apresenta bioatividade e é o principal componente mineral ósseo, tornando-se um candidato com potencial aplicabilidade para regeneração deste tecido. Estes três materiais combinados podem ser empregados em forma de arcabouços porosos tridimensionais, que servirão como ambiente de suporte temporário para a regeneração celular e tecidual [40], [43].

2.5. Quitosana

A quitosana (CHI) é um polissacarídeo linear derivado da desacetilação alcalina da quitina, que possui grande abundância na natureza. Sua extração pode ser feita do exoesqueleto de crustáceos e insetos, além da parede celular de fungos e bactérias. A CHI possui estrutura composta por unidades de copolímero de N-glucosamina e glucosamina distribuídas aleatoriamente, cuja estrutura pode ser observada na Figura 01 [13], [44].

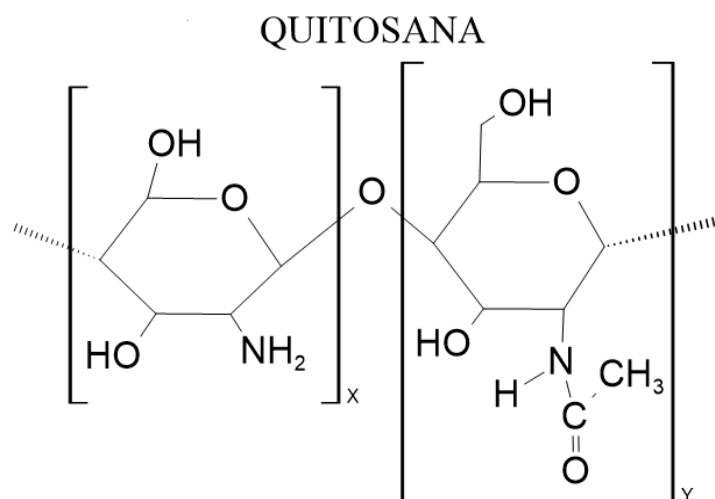


Figura 01: Representação da estrutura química da CHI. Fonte: Autoria própria.

Este polímero tem sido amplamente aplicado por ser biocompatível, biodegradável, por seu efeito cicatricial, hemostático, atividade antimicrobiana e bactericida [13], [27]. Ele é estudado quanto a seu papel na engenharia tecidual óssea por estimular a angiogênese, osteogênese e osteocondução [45]. A degradação da CHI é enzimática, dando origem a produtos não tóxicos. Além disso, sua estrutura química é similar à dos GAGs, um dos principais componentes da matriz extracelular da cartilagem e do osso [14].

Uma propriedade primordial para a regeneração óssea e de fraturas na TE é a adequada resistência mecânica. Assim, é necessário que se considere a rigidez, elasticidade e resistência à compressão mecânica dos materiais escolhidos. Há relação entre a rigidez do arcabouço e o comportamento celular da área aplicada, influenciando na diferenciação de MSCs, estimulando a regeneração do tecido novo e aumentando a eficácia de estímulos bioquímicos [17].

Como forma de melhorar as propriedades mecânicas e a degradabilidade acelerada dos arcabouços de CHI, estes têm sido combinados com diferentes tipos de materiais, como polímeros e cerâmicas. Sabe-se que a união entre a CHI, de carga positiva, com materiais de carga oposta pode resultar na formação de complexos de alta estabilidade. Tal complexo polieletrólito pode ser formado com a PDA, que possui caráter negativo em meio básico, dando origem a um material com maior força de interação molecular [46], [47].

2.6. Polidopamina

Na ciência dos materiais, a utilização de recobrimentos de superfícies permite o controle de propriedades e confere novas funcionalidades ao produto de interesse. Observando-se a capacidade de adesão dos mexilhões em superfícies sólidas, concluiu-se que tal propriedade era consequência da presença das proteínas 3,4 hidroxifenilalanina (DOPA) e lisina. A partir desta descoberta aumentou-se o interesse no estudo da PDA (Figura 02), por sua estrutura molecular similar à DOPA, que também apresenta como propriedade primária a capacidade de se aderir firmemente a superfícies. Tal adesão pode ser observada em substratos orgânicos ou inorgânicos, e até mesmo em superfícies de grande hidrofobicidade [24], [48], [49]. É possível ainda ter o controle da espessura dos filmes de PDA, com estabilidade química e térmica [48], [50].

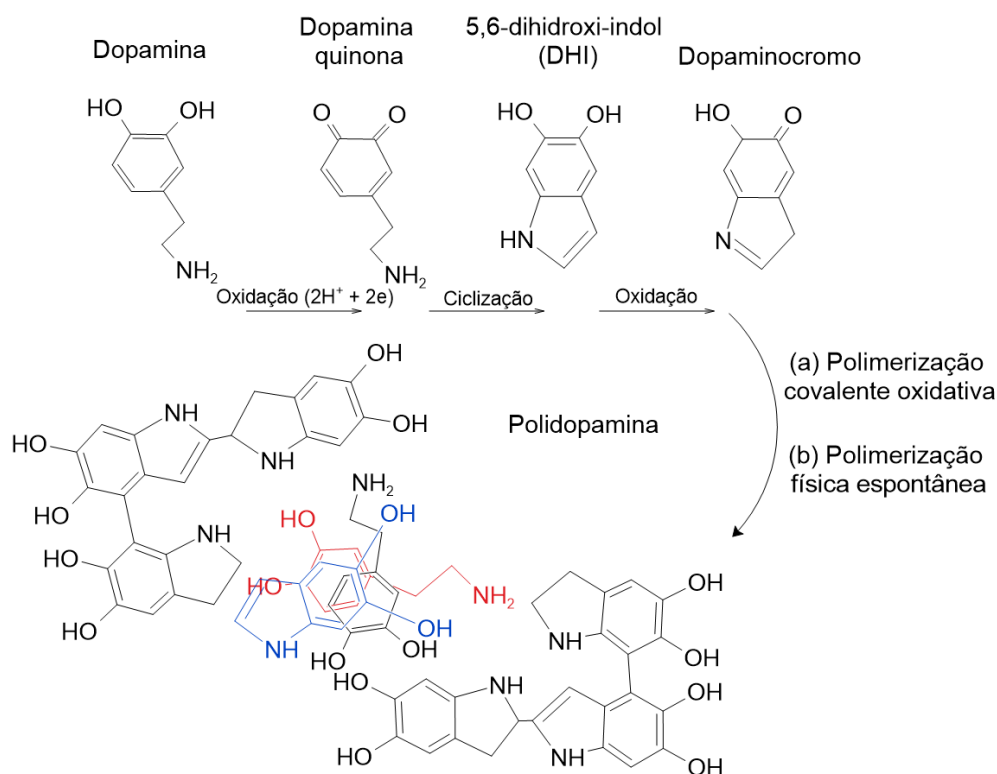


Figura 02: Representação esquemática das possíveis rotas de polimerização do PDA. Fonte: Autoria própria, baseada em [48], [51], [52].

O PDA apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade, propriedades necessárias à aplicação de arcabouços. No entanto, sua degradação é relativamente lenta, podendo ser combinado a outros componentes com degradação mais acelerada (a exemplo da CHI) [17], [22]. Sua síntese apresenta metodologia simples, por ser obtida espontaneamente a partir do seu monômero em condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$), com o oxigênio como oxidante, otimizando sua reprodutibilidade [49]. Além disso, materiais recobertos com PDA apresentam interesse na engenharia tecidual óssea por sua bioatividade. O anel do catecol apresenta adesão a uma ampla variedade de substâncias, assim como afinidade a íons cálcio. Por este motivo, foi criada uma rota de biomineralização para arcabouços, com a formação de HA assistida pela PDA [48].

Os grupos funcionais de sua estrutura tornam a PDA um zwitterion, com ponto isoelétrico em torno de 4. Com o pH abaixo de 4, os grupos amino na estrutura da PDA ficam protonados, tornando sua superfície carregada positivamente. Em valores de pH acima do ponto isoelétrico, a PDA será carregada negativamente por causa da desprotonação dos grupos fenólicos [46]. Nesta última condição, a adição de PDA ao arcabouço formado pela matriz policatiônica de CHI resulta num estável complexo de polieletrólitos, favorecendo sua utilização na regeneração óssea [47].

3.4. Hidroxiapatita

A HA (Figura 03) representa o principal componente inorgânico do tecido ósseo, tornando sua utilização na engenharia tecidual óssea atrativa. Dentre suas propriedades principais, estão a osteocondução e bioatividade [53], [54]. Como a HA não é consideravelmente biodegradável, costuma-se combiná-la a polímeros, para haver o equilíbrio na degradação dos materiais produzidos. De uma forma geral, as biocerâmicas como a HA são caracterizadas como não-tóxicas, estáveis quimicamente quando em meio biológico e biocompatíveis, com variáveis aplicações na TE, como restauradores dentários, recobrimento de materiais e preenchimentos para defeitos ósseos, que podem ser feitos em forma de pó, cerâmica densa e arcabouços porosos [27], [55].

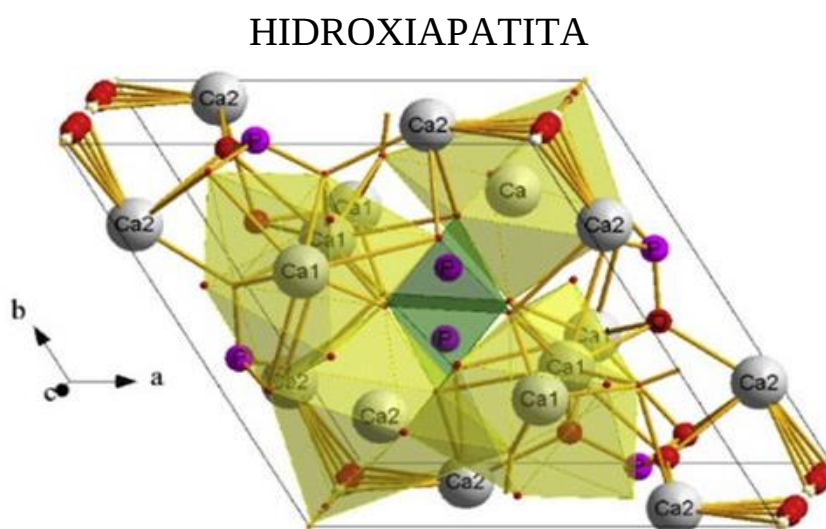


Figura 03: Representações da hidroxiapatita, com a célula unitária da cerâmica.

Fonte: Adaptado de Cipreste e colaboradores [56].

O uso de estruturas porosas tem como diferencial a melhora da fixação e crescimento celular no interior da estrutura, além da formação de novos vasos sanguíneos através dos poros que criarão a comunicação entre o arcabouço e o tecido nativo [57]. A estrutura óssea possui uma matriz inorgânica (com cristais de HA), cuja característica é ser rígida, porém quebradiça; e uma matriz orgânica (composta principalmente por fibras de colágeno), que é flexível e tem resistência relativamente baixa. Estas duas matrizes fazem do osso um tecido com grande capacidade mecânica, por unir os componentes de resistência à compressão e flexibilidade [58].

De forma geral, busca-se simular as propriedades do tecido ósseo nativo. Por esta razão, o uso isolado da HA não é ideal, por que desta forma estaria sendo excluído o componente ósseo orgânico e suas contribuições para a resistência mecânica tecidual [58]. O uso do colágeno nestes

arcabouços também tem alguns pontos negativos, como alta reabsorção, baixas propriedades adesivas, mecânicas e alto custo [59]. Os arcabouços porosos de HA também possuem limitações em relação ao longo período necessário para haver o reparo ósseo, por conta de sua fraca adesão celular [22].

Como forma de solucionar tais problemas, pode-se substituir o colágeno por outros polímeros biocompatíveis, como a CHI [15]. A combinação da CHI com HA em arcabouços tem sido explorada com e sem a adição de outros materiais, assim como a produção de arcabouços de PDA e HA. Não há, no entanto, trabalhos que explorem as propriedades em conjunto da CHI e HA juntamente com a PDA, ainda que estes três biomateriais possuam propriedades complementares para a um ambiente propício à regeneração tecidual óssea, bem como estudos que explorem o papel do revestimento de PDA em arcabouços de CHI/HA [22], [60], [61].

2.5. Modificação de superfícies com PDA na Engenharia Tecidual

A modificação de substratos tem sido estudada na Engenharia Tecidual, com o objetivo de torná-los mais atrativos para determinadas funções, como degradabilidade controlada, bioatividade e propriedades adesivas. Assim, a seleção de materiais aptos para o recobrimento de biomateriais (como implantes, arcabouços ou outros dispositivos médicos) exige que este fique fixo e estável na superfície aplicada. O revestimento de PDA pela deposição de DA a partir de sua oxidação espontânea ocorre de forma simples, potencializando o interesse em sua aplicação. No entanto, o mecanismo molecular da formação das cadeias de PDA ainda é debatido na literatura [48], [52]

A imprecisão deste processo se dá pela complexidade da reação redox e pelo número de estruturas intermediárias, desde a oxidação da DA até a formação final de PDA. As teorias para esta formação polimérica partem de diferentes pressupostos, como ligações covalentes entre os anéis aromáticos, agregação ou competição de monômeros dopaminérgicos, que levam a diferentes modelos de estruturação química. Estes podem ser por interações eletrostáticas ou covalentes, interação de cátion- π , e agregados supramoleculares [52]. Há, todavia, um consenso de que a polimerização se inicia com a oxidação espontânea de DA, que origina a dopamina quinona, seguida da ciclização levando a formação de 5,6-dihidroxi-indol. Então, com outra oxidação, é formado o dopaminocromo, que pode sofrer polimerização covalente oxidativa ou polimerização física espontânea, originando o PDA. Estas etapas e possível estruturação do PDA foram sugeridas na Figura 02, a partir dos trabalhos de Liu, Ai e Lu [48] D'Ischia e colaboradores [51] e Gao e colaboradores [52].

Alguns fatores podem alterar aspectos dos materiais recobertos com PDA, podendo ser modificados de acordo com o objetivo de suas aplicações. O pH, por exemplo, afeta significativamente a velocidade e espessura do filme polimerizado. De forma geral, um baixo pH reduz a oxidação e, por consequência, a taxa de polimerização. Por outro lado, valores acima de 10 resultam na desprotonação dos grupos de amina, que desmontam as cadeias de PDA. Por este motivo, é comum se padronizar a utilização do tampão Tris com pH 8,5 nos protocolos experimentais [18], [28], [52].

Outro aspecto importante de ser observado é a concentração de DA selecionada. Concentrações mais baixas, como 1 mg/mL, normalmente apresentam distribuição mais homogênea em superfícies. Por outro lado, utilizar maiores concentrações facilita a formação de superfícies mais rugosas, que podem ser mais interessantes para aplicações que necessitem de adesão celular. Além disso, concentrações maiores de DA podem levar a taxas de nucleação mais rápidas. Maiores tempos de deposição também levam a obtenção de superfícies rugosas, pela formação de agregados superficiais [52].

Outra variável para a deposição de PDA é a temperatura. O uso de aquecimento entre 50 e 75°C é capaz de acelerar a sua polimerização, por acelerar a nucleação de partículas de PDA e promover a difusão de monômeros de DA. Essa variável, no entanto, dificulta o controle e reprodutibilidade do processo, por conta da evaporação e necessidade de manter soluções mais volumosas com uma distribuição homogênea de temperatura [52], [62].

A utilização deste polímero tem como vantagem o seu método simples de recobrimento, comparando-se a outros materiais usados na modificação de superfícies, que exigem processamentos sequenciais ou instalações especiais. Seus filmes têm sido explorados para o aumento da hidrofília de superfícies, que favorece a proliferação celular nos materiais, como também na imobilização de fatores de crescimento, aumentando sua estabilidade e controlando melhor sua liberação em testes *in vitro* [63].

Sua adsorção em superfícies ocorre com facilidade, por meio de ligações covalentes ou interações físicas, com praticamente todos os tipos de materiais inorgânicos e orgânicos [63]. A camada de PDA pode promover adesão do material recoberto ao tecido do hospedeiro, gerando estímulo à neoformação óssea e eliminar espécies reativas de oxigênio nocivas para proteínas e outras moléculas da região [18].

2.6. Interação entre PDA com CHI e HA

Estudos utilizando o revestimento de PDA mostraram sua capacidade de promover a formação de HA *in vitro* e *in vivo*, indicando um aumento da bioatividade dos materiais, bem como a adesão celular e osteoindutividade de MSCs [64], [65]. Além disso, pode promover a melhora das propriedades mecânicas dos compósitos, evidenciando potencial para aplicação na engenharia tecidual óssea [66].

No estudo de Li e colaboradores [67] foi possível imobilizar CHI na superfície de arcabouços porosos para acelerar a regeneração óssea. Essa imobilização foi feita com o revestimento de PDA como uma ponte de interação entre CHI e a superfície dos arcabouços formados por Poli(ϵ -caprolactona) poroso e vidro bioativo. Dimassi e colaboradores [68], por sua vez, testaram a bioatividade de nanofibras de CHI tratadas com PDA, com resultados promissores para o uso destes materiais combinados para estimular a biomineralização, além de serem biocompatíveis em ensaio *in vitro* feito com células pré-osteoblásticas MC3T3-E1.

Em outro estudo, Zhu e colaboradores [69] funcionalizaram arcabouços contendo CHI com quercetina bioativa utilizando PDA como camada para imobilização. Como resultado, encontraram um efeito sinérgico da rede de nanofibras de CHI com a camada de PDA, que permitiu a liberação controlada da quercetina, além de afinidade celular e atividade osteogênica. A versatilidade do polímero PDA demonstrada na literatura o torna um bom candidato para ser explorado como modificador de superfícies para aplicações na regeneração óssea.

Compósitos contendo HA também foram estudados em conjunto com PDA. Como no trabalho de Han e colaboradores [22] que funcionalizaram arcabouços de HA com PDA e poli(L-lisina) para liberação da proteína morfogênica óssea-2 (BMP2). Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, indicando que a modificação da superfície de HA melhorou as propriedades biológicas do arcabouço, com aumento da proliferação e diferenciação celular e mais formação óssea. A versatilidade do PDA permite sua combinação em diferentes substratos.

Hu e colaboradores [70] estudaram nanopartículas de HA revestidas com PDA, que posteriormente foram combinadas com poli(ácido láctico) por eletrofiação. Os autores obtiveram os resultados da análise termomecânica, que mostraram que as fortes interações intermoleculares entre as nanopartículas de HA e PDA com a matriz PLA foram formadas, resultando em um aumento na força de ligação interfacial dos componentes.

Embora, até o momento, os três materiais não tenham sido combinados na formação de arcabouços 3D, as interações CHI/PDA e HA/PDA evidenciam potencial para utilização dos três na regeneração óssea.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Produzir e caracterizar arcabouços tridimensionais baseados em quitosana, polidopamina e hidroxiapatita para aplicações na engenharia tecidual óssea.

3.2. Objetivos Específicos

- Produzir diferentes arcabouços 3D contendo quitosana, polidopamina e hidroxiapatita;
- Caracterizar os materiais físico-química e morfológicamente com o auxílio das seguintes técnicas: ensaio de compressão, DRX, FTIR, MEV/EDS, TG e DSC;
- Determinar a porosidade dos arcabouços;
- Mensurar a degradação dos materiais em função do tempo;
- Avaliar a viabilidade celular dos arcabouços 3D com o ensaio da citotoxicidade.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Neste estudo, foi utilizada CHI (desacetilação $\geq 75\%$) com massa molecular média e adquirida da Sigma Aldrich Company (EUA). O ácido acético (P.A.) foi obtido da Vetec (Brasil). Ácido fosfórico com $\geq 85\%$ em massa e hidróxido de cálcio (P.A.) foram obtidos das empresas Sigma Aldrich e Synth no Brasil, respectivamente. O hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido da Neon Commercial (Brasil), enquanto o álcool etílico com pureza de 99,8% em peso foi adquirido da ACS Científica (Brasil) e o tripolifosfato de sódio (P.A.) pela Synth (Brasil). Cloridrato de dopamina (pureza de 98%) e os tampões Trizma® base (99,9%) e Trizma® HCl (99%) foram adquiridas pela Sigma Aldrich (EUA).

4.2. Divisão e identificação dos grupos

4.2.1. Etapa I

Para facilitar a compreensão dos resultados, foram divididas em duas etapas o estudo: a primeira, focada na padronização do recobrimento dos arcabouços com PDA (a CHI serviu como matriz na conformação tridimensional do arcabouço). Foram testados os recobrimentos em diferentes períodos (0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h) e quatro concentrações de dopamina (1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL e 4mg/mL). Sendo assim, os grupos ficaram divididos da seguinte forma:

Tabela 01: Divisão dos grupos da Etapa I (padronização do PDA).

Grupos da Etapa I (concentração/tempo)	0,5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
PDA a 1 %	GI 0,5 h	GI 1h	GI 3h	GI 6h	GI 12h	GI 24h
PDA a 2 %	GII 0,5 h	GII 1h	GII 3h	GII 6h	GII 12h	GII 24h
PDA a 3 %	GIII 0,5 h	GIII 1h	GIII 3h	GIII 6h	GIII 12h	GIII 24h
PDA a 4 %	GIV 0,5 h	GIV 1h	GIV 3h	GIV 6h	GIV 12h	GIV 24h

Legenda: Os grupos GI, GII, GII e GIV são referentes às concentrações de dopamina: 1, 2, 3 e 4 mg/mL, respectivamente; seguidos dos tempos de imersão utilizados.

4.2.2. Etapa II

Com a padronização do recobrimento de PDA, foi então iniciada a Etapa II, com a produção dos demais arcabouços, contendo CHI e HA, com e sem o revestimento de PDA. Sendo assim, foram propostos os seguintes grupos na Tabela 02:

Tabela 02: Divisão dos grupos da Etapa II (contendo os três materiais).

Grupos	% CHI	% HA	Recobrimento PDA (4 mg/mL)
CHI (100)	100	-	NÃO
CHI/PDA (100)	100	-	SIM
CHI/HA (50/50)	50	50	NÃO
CHI/HA/PDA (50/50)	50	50	SIM
CHI/HA (75/25)	75	25	NÃO
CHI/HA/PDA (75/25)	75	25	SIM

4.3. Síntese da hidroxiapatita por via úmida

Para a produção dos arcabouços, a HA foi sintetizada utilizando-se o processo de via úmida, ou seja, pela precipitação a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ e uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4), ambas na concentração de 2,0 mol/L. A razão molar de Ca/P utilizada foi de 1,67 (HA estequiométrica). Para evitar contaminações, utilizou-se água ultrapura no preparo das soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 . A solução foi então misturada num balão volumétrico e aquecida a 60°C. O hidróxido de potássio (KOH) foi adicionado aos poucos, para a manutenção do pH do meio em torno de 10. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 24 h, sendo em seguida filtrada a vácuo, lavada com água ultrapura até neutralização do meio e colocada em estufa a 100°C para secagem. A HA obtida foi macerada e peneirada até a obtenção do pó com granulometria $\leq 120 \mu\text{m}$ [71].

4.4. Produção dos arcabouços tridimensionais

Os arcabouços foram produzidos à base de CHI e HA, sendo posteriormente revestidos com PDA. A CHI serviu como matriz na conformação tridimensional do arcabouço. Eles foram produzidos a partir da sua dissolução em ácido acético (1% v/v), com 3% (m/v) de CHI pura com baixa viscosidade adquirida pela Sigma-Aldrich. Para garantir boa homogeneização, a suspensão de CHI ficou sob agitação por 01 dia. Após esse período, a HA foi adicionada aos poucos, nos grupos CHI/HA (50/50), CHI/HA/PDA (50/50), CHI/HA (75/25) e CHI/HA/PDA (75/25), permanecendo em agitação por mais 24 h. A solução foi posteriormente colocada em banho ultrassom por cerca de 10 min. Em seguida, foi colocada em molde cilíndrico de poli(tetrafluoretileno) (PTFE) (altura, 5 mm e diâmetro 10 mm), congelada em ultrafreezer e liofilizada em seguida (Liotop L101, Liobras, Brasil). Após a remoção dos arcabouços dos moldes, as amostras foram neutralizadas em uma solução de 0,1% de NaOH aquoetanólica (8:2) durante 3 h, lavadas por 30 min com água ultrapura, reticuladas (utilizando trifosfato pentassódico, 2,5% (m/v)) por 3 h e lavadas por 30 min com água ultrapura. Por fim, os arcabouços foram novamente congelados e liofilizados por 24 h.

4.5. Recobrimento com Polidopamina

A solução de dopamina foi preparada em tampão Tris (tris(hidroximetil)aminometano), com pH de 8,5 para posterior imersão dos arcabouços. As amostras ficaram na suspensão em reação para que houvesse a oxidação e polimerização da dopamina, revestindo o arcabouço com PDA recém-formado. Os arcabouços foram então lavados repetidas vezes com água ultrapura, removendo o excesso da solução em que foram imersos e, com isso, eliminado monômeros de DA que não reagiram.

A presença de DA no sobrenadante foi monitorada por UV-Vis, a partir da água de lavagem dos arcabouços, focando na sua banda em 280 nm. Para garantir a completa remoção do monômero, foi estabelecida a necessidade de 8 ciclos de lavagem em água ultrapura para que não se detectasse mais a sua absorção, indicando que o arcabouço apresentava apenas PDA.

Foram avaliadas três formas de secagem destes arcabouços, os dois primeiros métodos testados foram com a secagem em estufa a 37°C durante 48 h ou em estufa a vácuo com mesma temperatura e tempo. Percebeu-se que nestes métodos, os arcabouços perdiam sua conformação estrutural, o que possivelmente alterava sua estrutura porosa e função como matriz para regeneração. O terceiro método, que foi escolhido como padrão, continha um novo ciclo de liofilização, para manter sua estrutura tridimensional. A comparação dos três métodos pode ser vista na Figura 04:

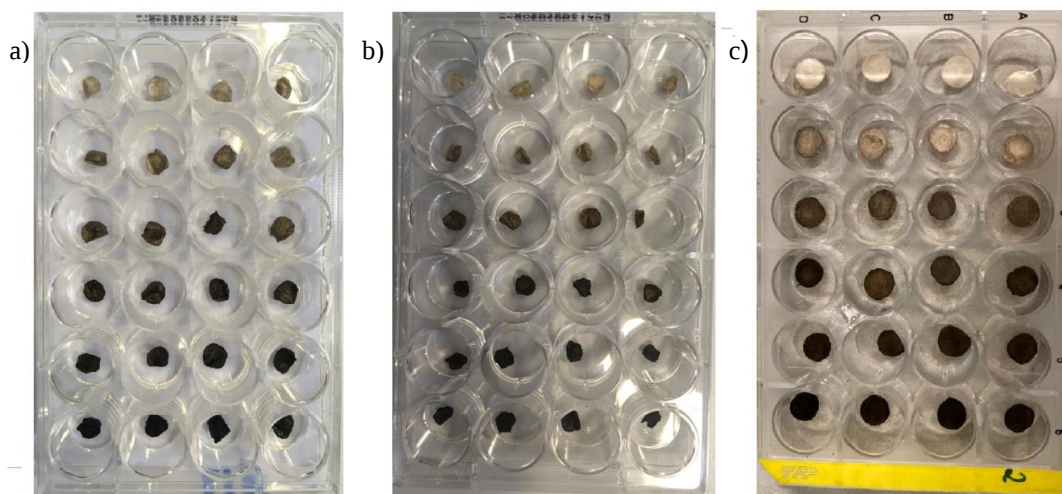


Figura 04: a) Amostras com secagem em estufa; b) Amostras com secagem em estufa a vácuo; c) Amostras com secagem por liofilização.

Assim, o esquema completo da metodologia de produção dos arcabouços pode ser observado na Figura 05:

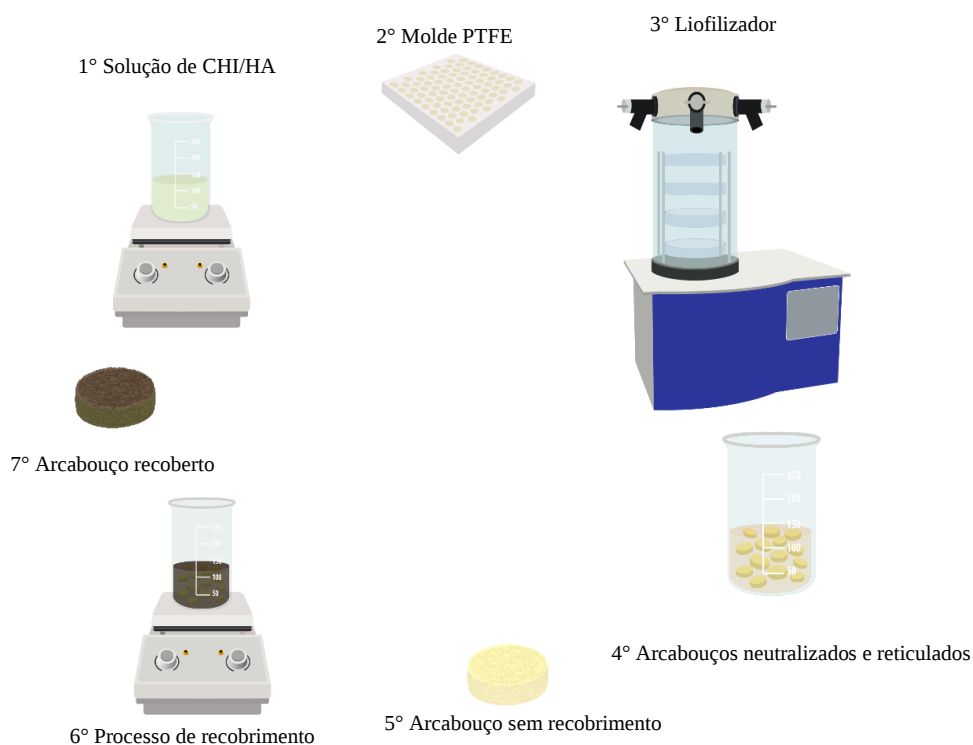


Figura 05: Etapas de produção dos arcabouços de CHI/HA, com o posterior recobrimento de PDA.

4.6. Caracterização físico-química e mecânica

4.6.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química dos biomateriais puros e dos arcabouços foi realizada com o infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com o espectrômetro modelo IRPrestige-21 (Shimadzu, Japão), no Núcleo de Energias Renováveis e Eficiência Energética de Sergipe (NERES), localizado no SergipeTec. Assim, identificou-se cada banda característica dos materiais, obtidas em um intervalo de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} . O método utilizado foi o das pastilhas de brometo de potássio (KBr).

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

A microestrutura das amostras foi examinada no Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (P²CEM – UFS). Após o revestimento com camada de ouro ou prata, a microscopia eletrônica de varredura foi realizada, selecionando-se as imagens com 50, 100 e 200x de cada amostra para comparação de suas superfícies. Foi utilizado o equipamento JSM6460LV (Jeol, Japão), operando sob vácuo com aceleração de feixe de elétrons de 5 kV e 10 kV. A composição química dos compósitos foi observada através da espectroscopia de energia dispersiva (Noran System Six, EUA), no Centro Multiusuário de Nanotecnologia (CMNano-UFS).

4.6.3. Porosidade

A quantificação de área e diâmetro de poros dos arcabouços foi medida a partir de micrografias obtidas por MEV, JSM-5700 (Jeol, Japão) do P²CEM - UFS. As imagens foram obtidas com 100x de aumento e aceleração de feixe de elétrons de 10 kV em diferentes regiões dos arcabouços, nas superfícies: superior, inferior e fratura. A análise foi realizada por meio do software ImageJ, sendo realizada com três imagens dos arcabouços da superior, três da inferior, e seis imagens da superfície de fratura. A fratura foi realizada com uma espátula, após os arcabouços serem congelados por imersão em nitrogênio líquido. Os dados obtidos foram tabulados e diferenças estatísticas foram calculadas o software comercial Origin© 8.5 SRO OriginLab Corporation (www.originlab.com).

4.6.4. Ensaio de compressão

Por se tratar de uma estrutura porosa, foi escolhido o ensaio mecânico de compressão, com o intuito de determinar a resistência à compressão dos arcabouços estudados. Para isso os arcabouços foram medidos com um paquímetro e foi analisada a resistência à compressão (MPa) diante da deformação (mm/mm) de cada amostra. Utilizou-se a máquina universal de ensaios mecânicos (Instron, modelo 3367), usando uma célula de carga de 100 N do P²CEM - UFS.

4.6.5. Difratometria de raios X (DRX)

A difratometria de raios X foi utilizada para avaliar a estrutura e cristalinidade dos materiais. Utilizou-se o difratômetro modelo Shimadzu LabX XRD-6000, no P²CEM – UFS, operando em modo de varredura, com radiação CuK α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e tubo operacional com voltagem e corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente. Os padrões de difração foram obtidos variando 2θ de 5 a 60° e com uma velocidade de varredura de 2°/min. Com esta técnica, foram identificados os padrões difratométricos característicos da HA e sua interação com os polímeros CHI e PDA.

4.6.6. Análise termogravimétrica (TGA)

A técnica de TGA avaliou a resistência térmica dos arcabouços produzidos. As medidas foram realizadas utilizando-se um analisador termogravimétrico da marca Netzsch, modelo STA 449 F3 Jupiter®, com taxa de aquecimento de 20°C/min, iniciando em temperatura ambiente até 1000°C, sob fluxo constante de nitrogênio. Com isso, se determinou a temperatura de degradação dos arcabouços e as etapas de perda de massa.

4.6.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os processos físicos e químicos envolvendo variação de energia foram estudados verificando as transições térmicas dos polímeros, através da calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para isso, foi utilizado o analisador de marca Netzsch, modelo 200 F3Maia, do P²CEM - UFS, na faixa de temperatura de 15-400 °C e taxa de aquecimento de 10°C/min, sob fluxo constante de nitrogênio.

4.7. Processo de esterilização

Para a realização dos testes biológicos, os arcabouços foram enviados para o Centro de Tecnologia das Radiações – CETER IPEN/ CNEN – SP, e esterilizados por método de irradiação gama (fonte cobalto 60) de acordo com ISO 11137-2:2006.

4.8. Avaliação *in vitro*

4.8.1. Ensaio de degradação *in vitro*

A degradação dos arcabouços foi avaliada no Laboratório de Biomateriais - UFS, medindo-se a porcentagem de perda de massa. O ensaio foi feito em meio de PBS (tampão fosfato-salino) com as amostras incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (LS Logen). Cada amostra foi pesada antes da imersão e então ficaram na solução durante intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada período, os arcabouços foram removidos da solução, lavados com água destilada repetidamente, congelados e liofilizados. As amostras secas foram pesadas novamente e os valores de massa antes e após imersão foram tabulados. Dessa forma, a taxa de degradação foi calculada com a fórmula abaixo:

$$\text{Degradação(\%)} = \frac{(W_0 - W_t)}{(W_0)} * 100$$

Sendo: W₀ - Massa inicial dos arcabouços.

W_t - Massa final dos arcabouços.

4.8.2. Avaliação de citotoxicidade

Após a esterilização, os arcabouços foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade, no Laboratório de Biologia e Imunologia de Câncer e Leishmania (LaBICeL) – UFS, utilizando-se o padrão ISO 10993-5:2009 para avaliação biológica de dispositivos médicos. Os resultados quantificaram a viabilidade celular do material, sendo utilizadas células fibroblásticas de rato (L929), cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium). Este foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 1% de L-

glutamina, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina, mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Para o controle negativo, as células foram cultivadas diretamente na placa de cultivo, na ausência das amostras, enquanto como controle positivo foi utilizado o poço sem amostras, contendo apenas o meio de cultura (branco), com 10% de DMEM.

O método escolhido para realizar as análises toxicológicas foi o colorimétrico, utilizando 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina – MTT. A absorbância foi lida em 570 nm pelo leitor de placa Elisa (Synergy H1) de marca BioTek, (EUA). Os resultados obtidos foram apresentados por porcentagem de viabilidade das células na presença dos arcabouços, em comparação aos controles negativo e positivo, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Amostra} - \text{Controle positivo})}{(\text{Controle negativo} - \text{Controle positivo})} * 100$$

4.9. Análise estatística

Os resultados dos ensaios de compressão, porosidade, degradação *in vitro* e citotoxicidade foram coletados a partir de testes em triplicata ou sextuplicata e expressos como média ± desvio padrão. A normalidade da distribuição das amostras foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (ou seja, quando existia menos de 5% de chance de os valores serem iguais). Os cálculos realizados por meio do software comercial Origin© 8.5 SRO OriginLab Corporation (www.originlab.com).

CAPÍTULO V

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Etapa I

Nesta primeira etapa, buscou-se avaliar o efeito da concentração e tempo de imersão de PDA poderia afetar nas interações química, mecânica e de microestrutura dos arcabouços. Portanto, foram produzidos arcabouços de CHI com PDA (1 a 4mg/mL), dentro dos períodos de 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, que foram comparados ao arcabouço sem recobrimento. Desta forma, com as análises de FTIR, MEV e teste de compressão, foi feita a seleção de uma das concentrações e tempo de recobrimento dentre as condições analisadas.

5.1.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectros de FTIR foram registrados, primeiramente, para os materiais puros (Figura 06). Na análise de CHI, foi identificada uma faixa larga entre 3750 e 3035 cm^{-1} , correspondente às vibrações de alongamento de O-H e NH_2 . A absorção do grupo amida I, característica da CHI, foi observada em 1640 cm^{-1} , com o alongamento de C=O [65], [72]. As regiões de 1343 e 890 cm^{-1} correspondem à flexão de C-H, enquanto 1375 cm^{-1} indica a deformação simétrica C-H do grupo acetamida. Na região centrada em 1322 cm^{-1} , foi evidenciada a banda característica do estiramento de C-N, conhecida como amida III [65], [68]. Em 1022 e 1065 cm^{-1} , foram identificadas as bandas correspondentes ao estiramento de C-O [68].

Assim como na CHI, o espectro de PDA apresentou suas bandas características na região entre 3500 e 2990 cm^{-1} , devido ao estiramento de O-H e NH_2 [73], [74]. Em 1612 cm^{-1} foi encontrado o grupamento correspondente à flexão dos grupos aromáticos da dopamina (N-H). Na região de 1499 cm^{-1} , por sua vez, estão os grupos aromáticos da dopamina com a flexão de C-H. Por fim, foi identificada a banda em 1280 cm^{-1} , atribuída às vibrações de ressonância de C=C de ciclos aromáticos [68], [74].

Nas Figuras 07, 08, 09 e 10, estão dispostos os espectros obtidos por FTIR dos grupos I, II, III e IV, respectivamente. Estes grupos correspondem aos arcabouços com matriz de CHI e diferentes recobrimentos de PDA. São sinalizadas as bandas de absorção da Amida I, proveniente da CHI e ligações N-H típicas do PDA, em seus respectivos períodos de recobrimento. Foram evidenciados os principais deslocamentos das bandas atribuídas a estes polímeros, indicando suas interações. Na Tabela 03 estão dispostos os deltas (Δ) do deslocamento que houve em relação aos materiais puros e as bandas de interesse nos arcabouços. Estes Δ s indicam que a interação entre PDA e CHI se dá entre a banda de amida I da CHI com o N-H do PDA. Este resultado está em conformidade com o encontrado na literatura, onde hidrogéis produzidos destes materiais apresentaram a banda correspondente ao alongamento de C=O da amida I com deslocamento de 1640 para 1660 cm^{-1} , indicando a formação do complexo CHI-PDA [75]. Os espectros com maior destaque para esta região estão no anexo suplementar (Figura S1).

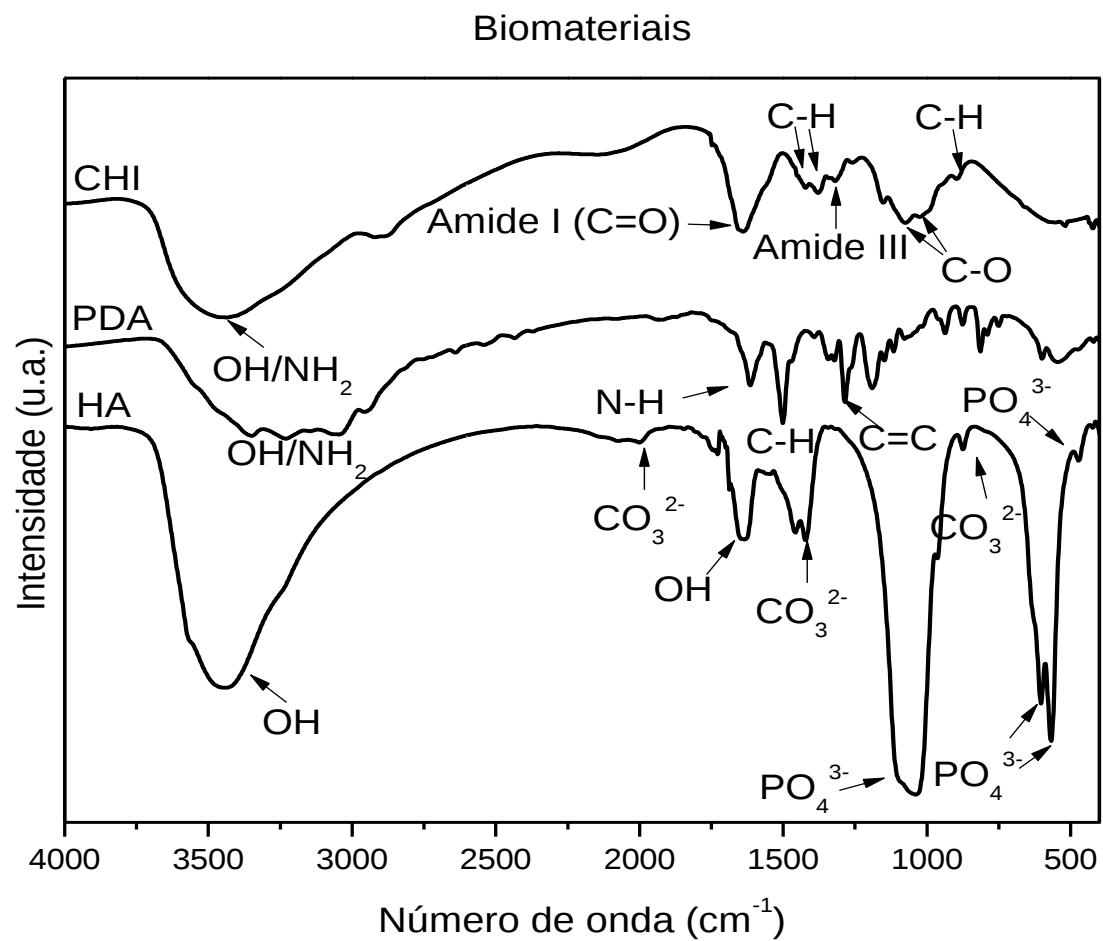


Figura 06: Espectros obtidos no FTIR dos pós da CHI, PDA e HA.

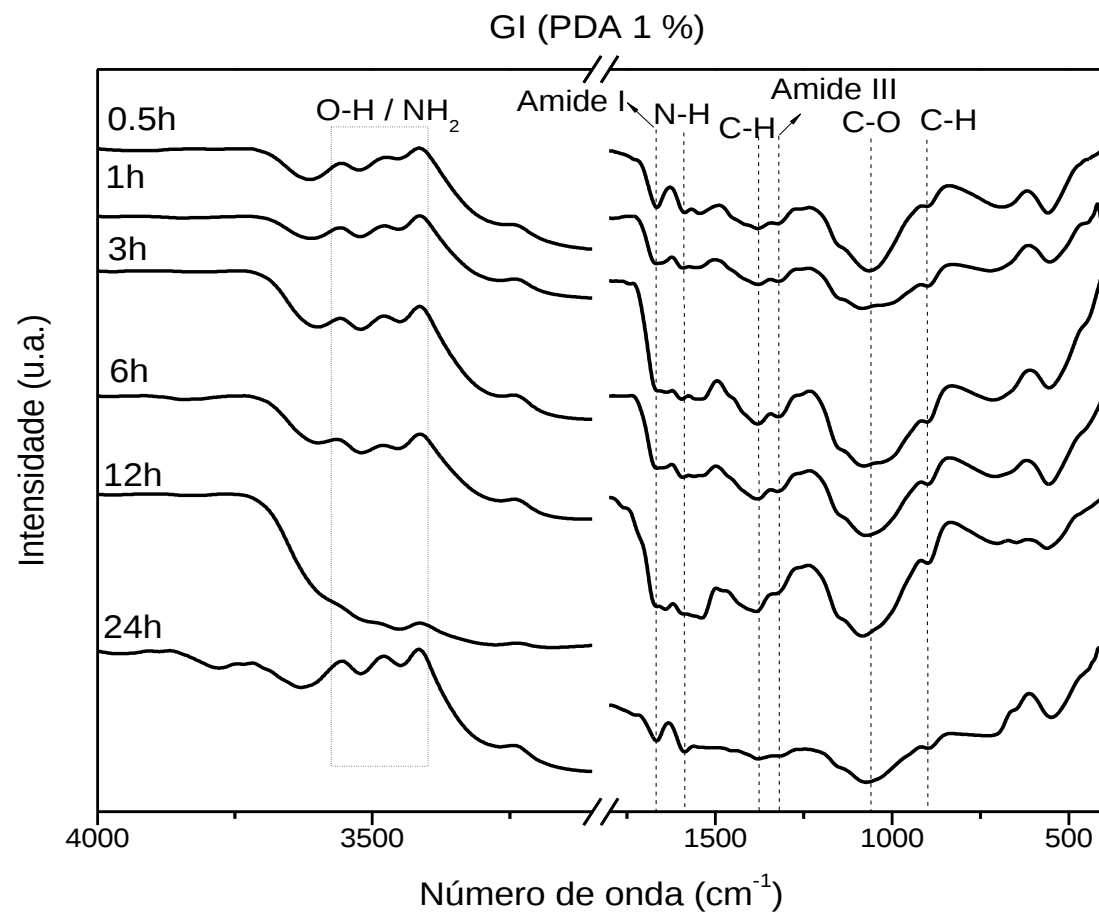


Figura 07: Espectros obtidos no FTIR do grupo I. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.

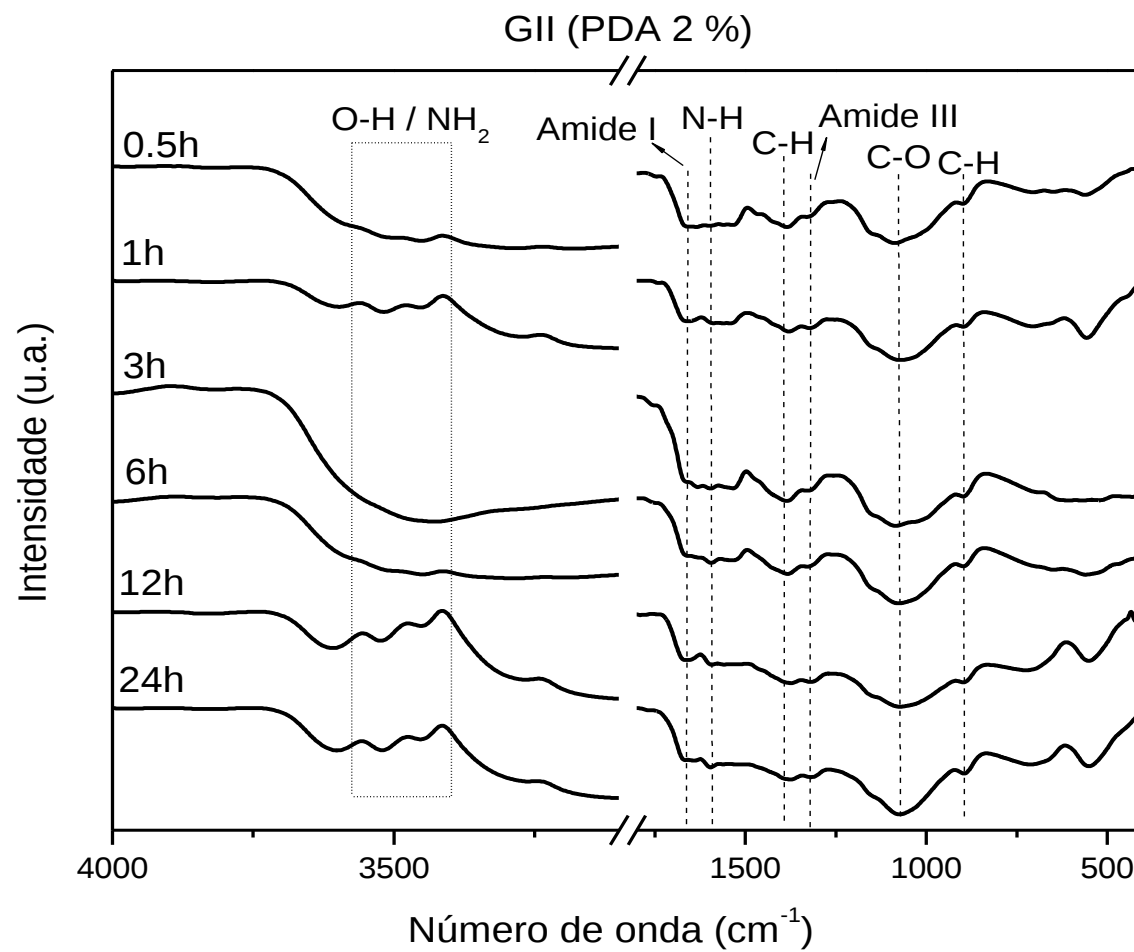


Figura 08: Espectros obtidos no FTIR do grupo II. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.

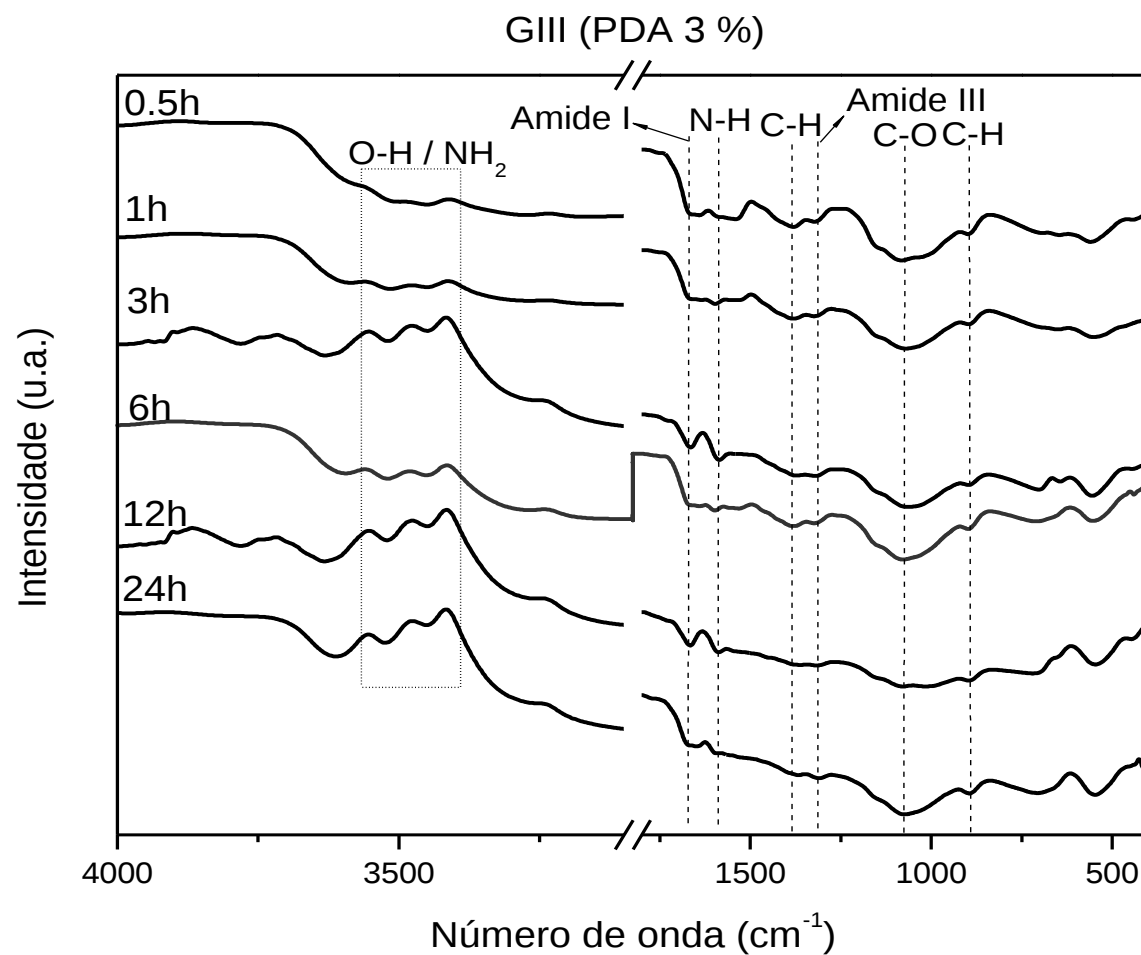


Figura 09: Espectros obtidos no FTIR do grupo III. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.

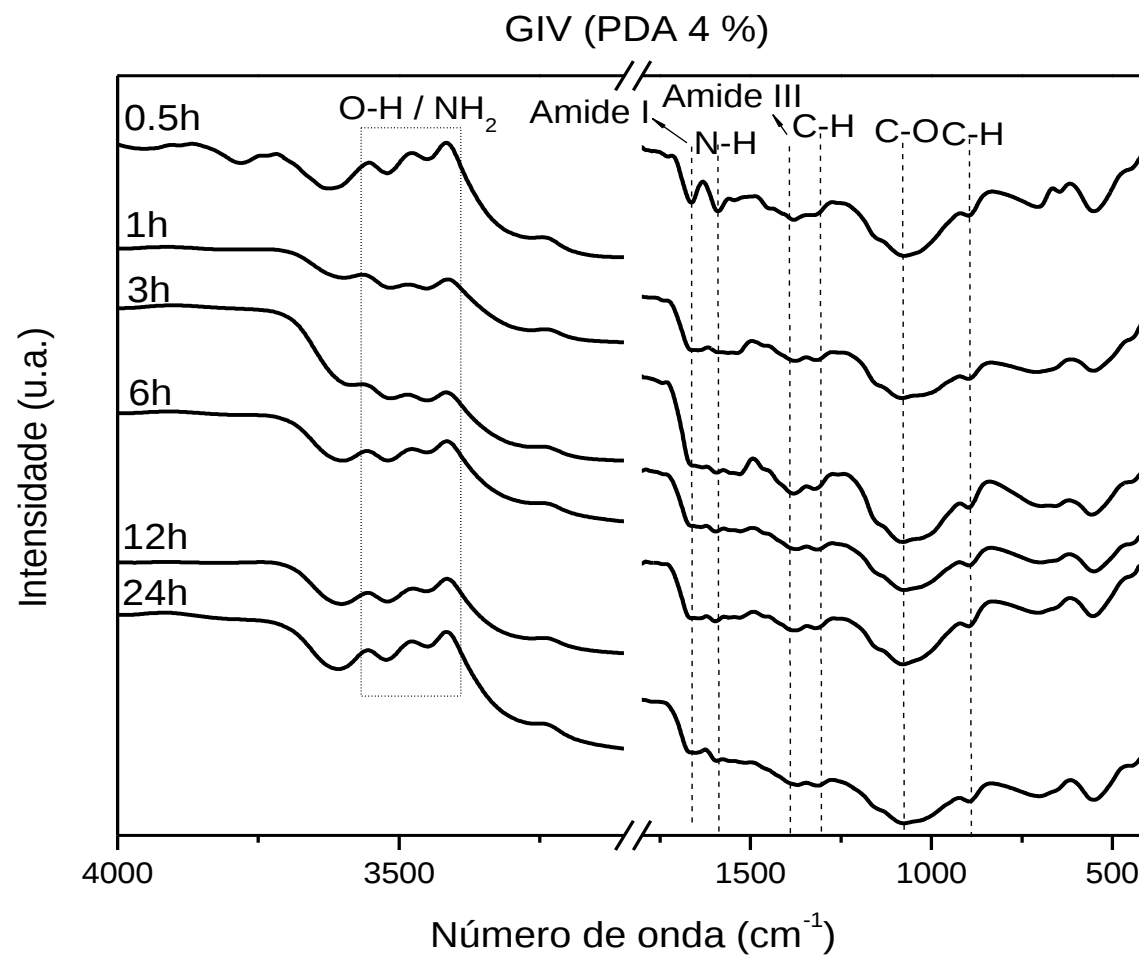


Figura 10: Espectros obtidos no FTIR do grupo IV. Os espectros são correspondentes aos períodos de recobrimento em polidopamina: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.

A faixa vibracional entre 3750 e 3035 cm^{-1} (relacionada ao estiramento O-H e NH_2 na CHI pura) e entre 3500 e 2990 cm^{-1} (atribuída ao PDA), teve um deslocamento para a faixa entre 3600 e 3350 cm^{-1} , no espectro dos grupos contendo os dois materiais. A formação desta banda mais ampla indica a possível interação dos polímeros em sobreposição, com a formação de mais grupos amina, grupos hidroxila e interações de ligações de hidrogênio [65], [72], [74][72]. Em 1590 cm^{-1} , por sua vez, pode-se identificar ombros correspondentes à flexão de N-H, advindos da adição do PDA à amostra [68].

Mantiveram suas regiões originais nos espectros dos grupos, as bandas da CHI correspondentes a deformação C-H (1380 cm^{-1}) e a amida III, com o estiramento de C-N (1320 cm^{-1}) [65]. Esta última banda está localizada em região de absorção próxima à atribuída às vibrações de C=C, em 1280 cm^{-1} , o que poderia indicar uma sobreposição de bandas nos materiais combinados. Houve o deslocamento de C-O, que originalmente se encontravam em 1022 e 1065 cm^{-1} , para 1060 cm^{-1} . Além disso, foi encontrada a banda de flexão de C-H em 890 cm^{-1} , finalizando-se os achados relacionados à CHI [65], [68]. De forma geral os demais grupos estudados apresentaram as mesmas bandas vibracionais correspondentes a CHI e PDA, demonstrando pouca variação nas regiões absorvidas e indicando a presença dos polímeros estudados.

Tabela 03: Deslocamento (Δ) das bandas de interesse de cada grupo de recobrimento.

Amostras da etapa I	Amida I (Δ)	N-H (Δ)
PDA (1 %)	23	-22
PDA (2 %)	18	-18
PDA (3 %)	21	-22
PDA (4 %)	21	-20

Legenda: Média do deslocamento (Δ) das bandas de interesse em cm^{-1} do espectro infravermelho dos materiais puros pelos grupos de arcabouços.

5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura da superfície superior das amostras foi evidenciada, mostrando a distribuição de poros interconectados na superfície de todos os arcabouços de CHI, com e sem recobrimento de PDA. De uma forma geral, percebe-se que a superfície do material se tornou mais rugosa com o aumento da concentração/tempo de recobrimento do PDA, o que pode influenciar na deposição e fixação celular no arcabouço em estudos futuros. Como a etapa inicial da regeneração tecidual ocorre com a adsorção de proteínas na interface do biomaterial, esta deve ser atrativa para estimular a fixação, proliferação e diferenciação das células ósseas no material [23], [67].

De acordo com Li e colaboradores [67] a modificação de uma superfície lisa para uma mais rugosa é positiva do ponto de vista celular, indicando que a adsorção de PDA ao arcabouço de CHI pode melhorar sua atividade regenerativa. À exceção do GI (PDA 1%) na Figura 12, em que os arcabouços apresentaram estrutura de poros mais heterogênea e em ‘forma de fenda’ com depressões, as amostras aparentaram superfície promissora para a deposição de células [4]. Dessa forma, pode-se considerar que, ao menos com base nestas análises, o GIV (PDA 4 %) (Figura 15) se mostrou mais promissor como grupo de recobrimento. Com a adição da HA, na etapa II, outras comparações foram aplicadas, já que a interação entre CHI e PDA com essa cerâmica influencia no material, tanto em relação a rugosidade da superfície, como na sua porosidade [63].

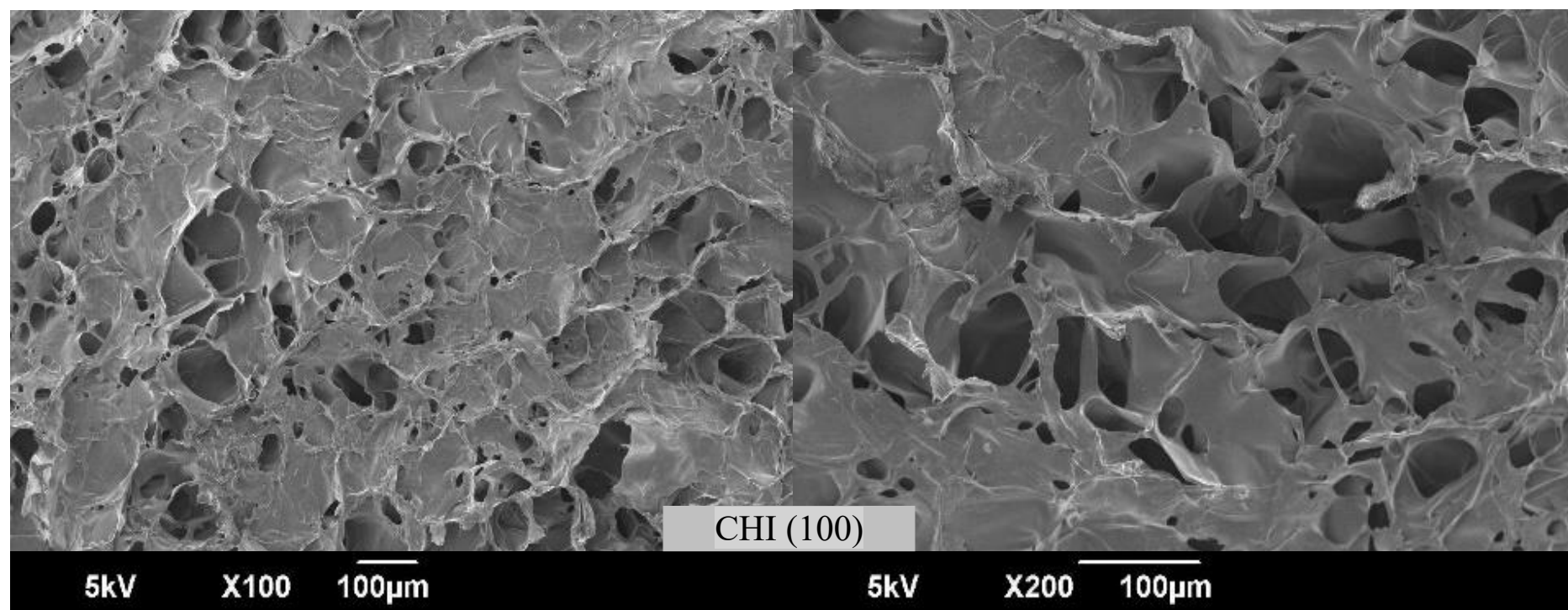


Figura 11: Imagens obtidas pelo MEV (100x e 200x) do arcabouço de quitosana sem recobrimento (a).

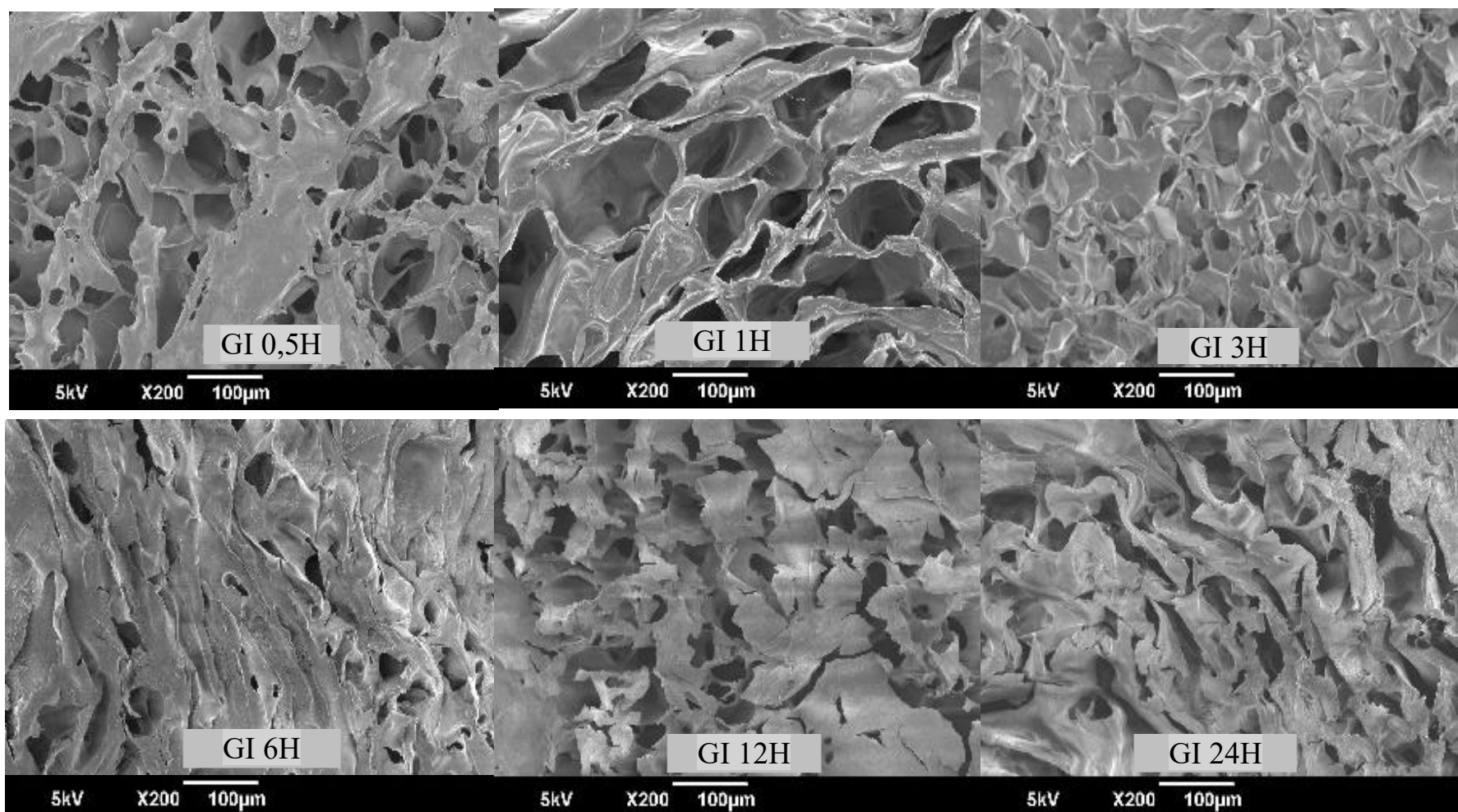


Figura 12: Imagens obtidas pelo MEV do GI (200x), dos arcaçouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

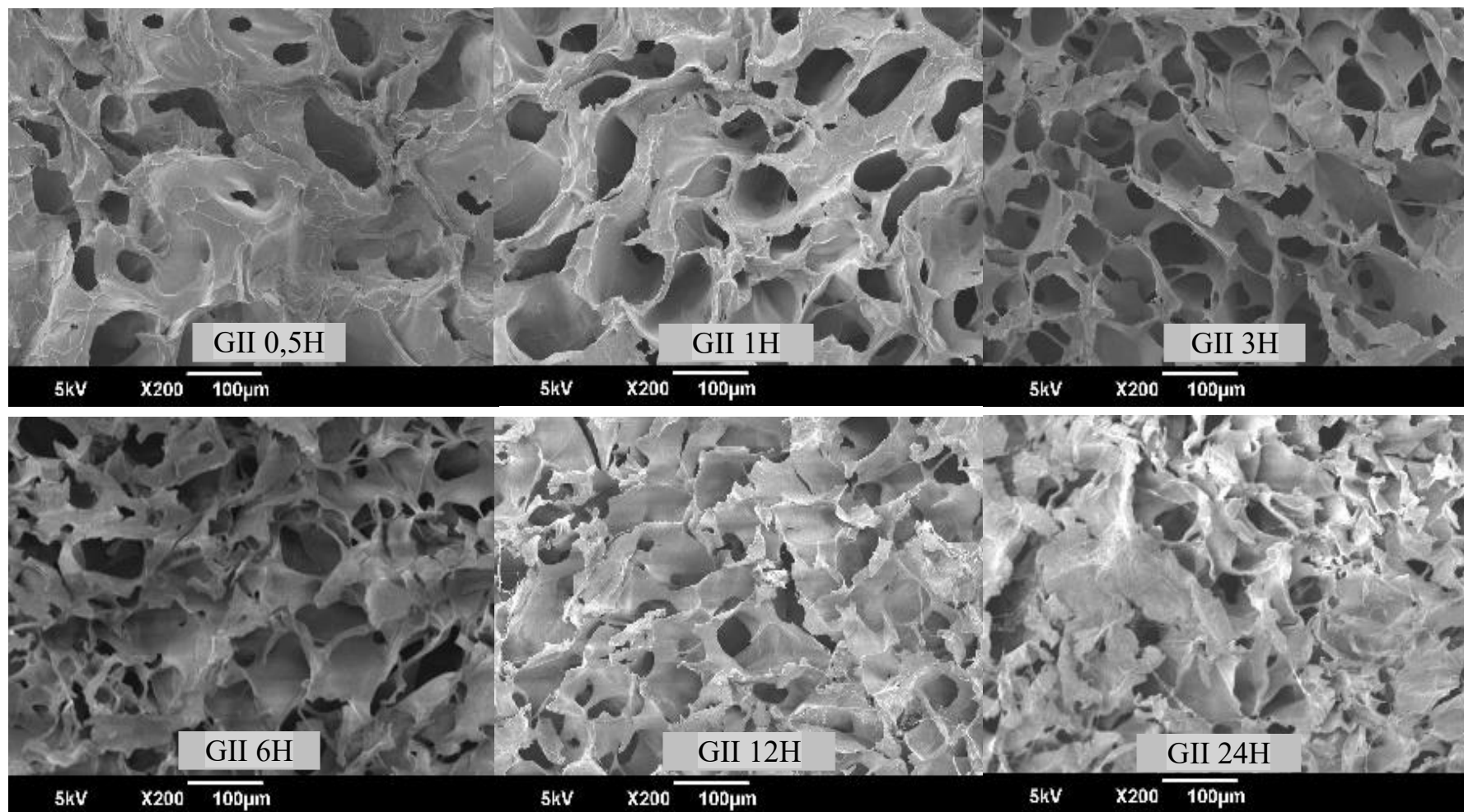


Figura 13: Imagens obtidas pelo MEV do GII (200x), dos arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

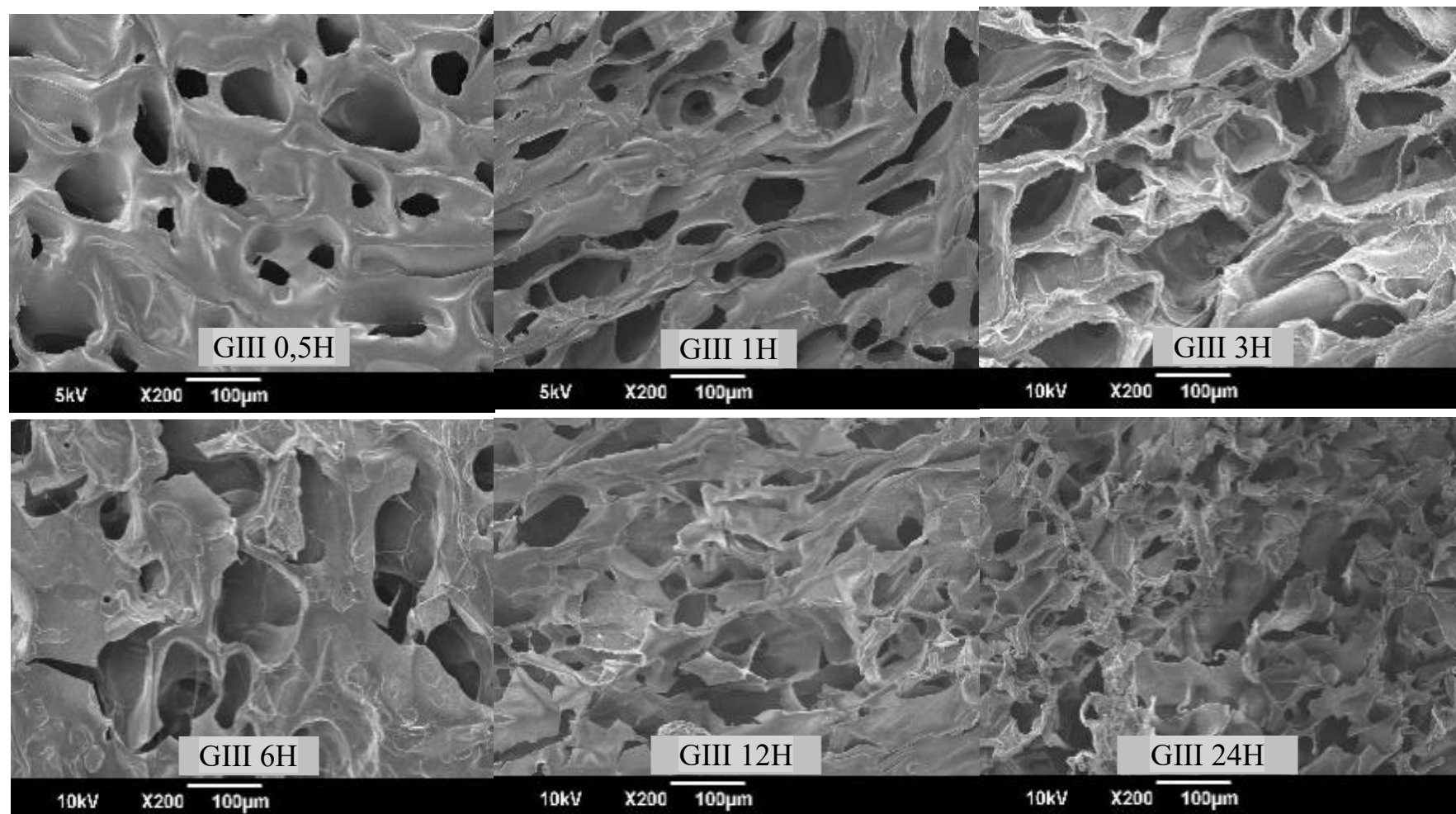


Figura 14: Imagens obtidas pelo MEV do GIII (200x), arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

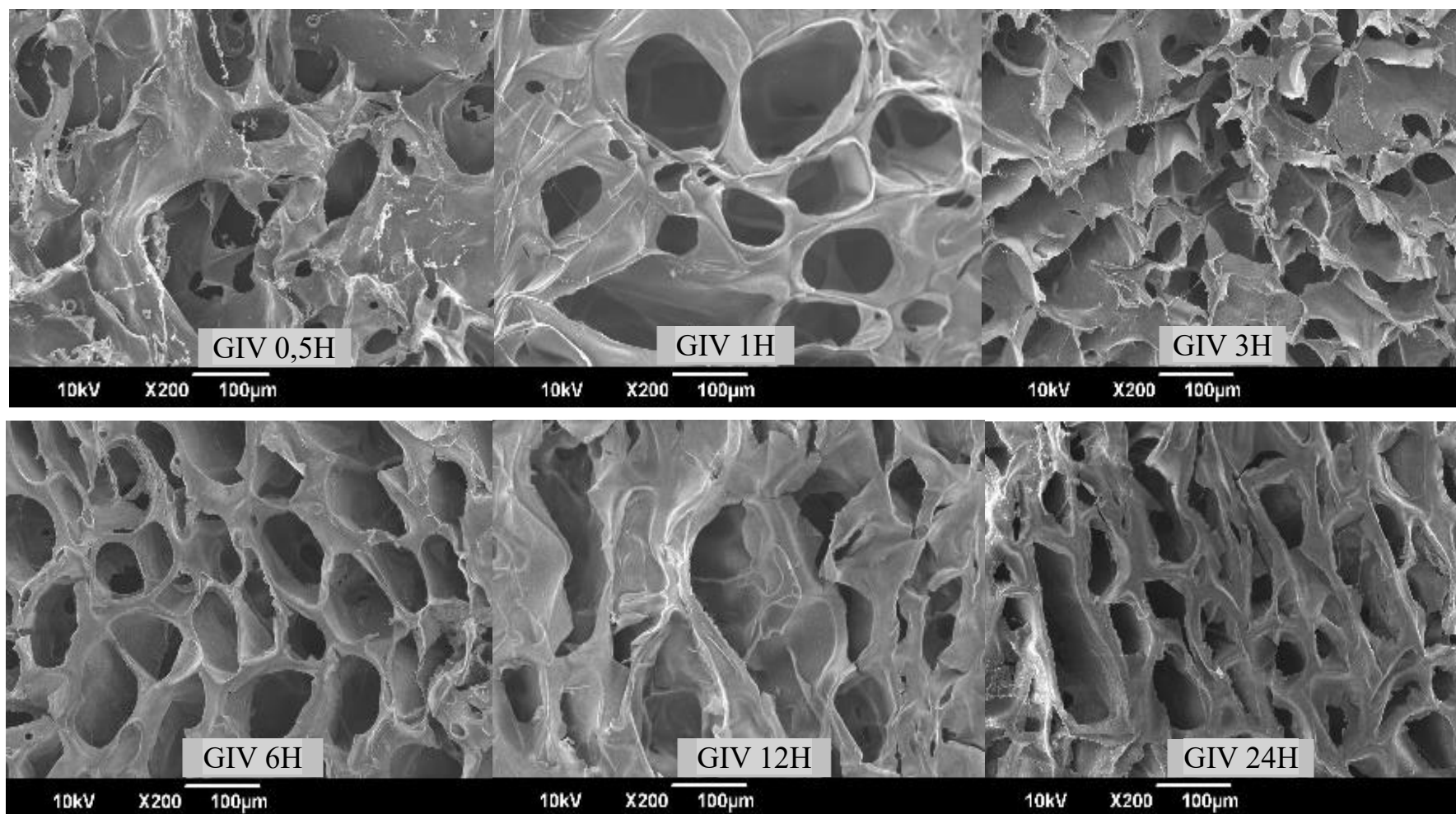


Figura 15: Imagens obtidas pelo MEV do GIV (200x), arcabouços com recobrimento de polidopamina em 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

5.1.3. Ensaio de compressão

Os arcabouços desempenham papel semelhante à matriz extracelular de tecidos naturais, dando suporte à fixação, proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, sua estrutura tridimensional e porosa, imitando a matriz extracelular, permite que as células se acumulem e cresçam no seu interior, originando um tecido funcional 3D. Para que isso seja possível, o material precisa ser capaz de manter sua estrutura e dar suporte às células neoformadas, evitando seu colapso. Dessa forma, arcabouços ósseos devem suportar 3 kN. A ciência tem, portanto, encontrado a necessidade de modificar as superfícies dos materiais, para que haja o aumento da estabilidade e resistência mecânica dos arcabouços [23], [76]. Assim, foi realizado o ensaio de compressão dos materiais desenvolvidos nesse trabalho, em triplicata, comparando-se a resistência à carga compressiva dos arcabouços em relação a sua deformação (mm/mm). Buscou-se avaliar se há diferença na resistência mecânica dos materiais com a adição do PDA nos arcabouços de CHI.

A significância estatística dos dados foi avaliada, indicando a média de resistência à compressão da quitosana pura como $0,59 \pm 0,01$ (MPa). Essas amostras possuíram maior deformação compressiva a uma menor carga (em comparação aos outros arcabouços), levando à proximidade das placas do equipamento e a necessidade da finalização do ensaio em 50% de compressão. Acredita-se que o material tenha apresentado menor capacidade de absorver energia em relação à carga compressiva. Embora isso indique um comportamento mecânico indesejável, esta média está em conformidade com o encontrado na literatura; no estudo de Xu e colaboradores [77], eles avaliaram a compressão de arcabouços porosos de quitosana e encontraram o valor de 520 kPa, equivalente a 0,52 MPa.

A partir da análise de variância dos dados, percebeu-se que apenas as amostras do grupo IV, com 12h e 24h de recobrimento, tiveram uma diferença estatística em relação ao grupo CHI. O GIV 12h teve o valor de $p = 0,02353$ e o GIV 24h, $p = 0,01467$. Os demais grupos de recobrimento apresentaram $p > 0,05$, indicando que não houve diferença no desempenho mecânico entre eles e o grupo CHI. Possivelmente, a formação de uma camada mais uniforme de PDA aumentou o potencial do material a resistir à compressão, já que estes são os dois grupos de maior concentração de recobrimento. Já considerado anteriormente como um polímero com potencial na formação de revestimentos mecanicamente robustos, o PDA tem sido aplicado em conjunto a biocerâmicas, agregando esta e outras características consideradas positivas para a Engenharia Tecidual Óssea [66].

Na Figura 16 são apresentadas as médias das triplicatas; enquanto na Figura 17, estão as curvas do ensaio das amostras de CHI em comparação aos grupos de recobrimento com PDA que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

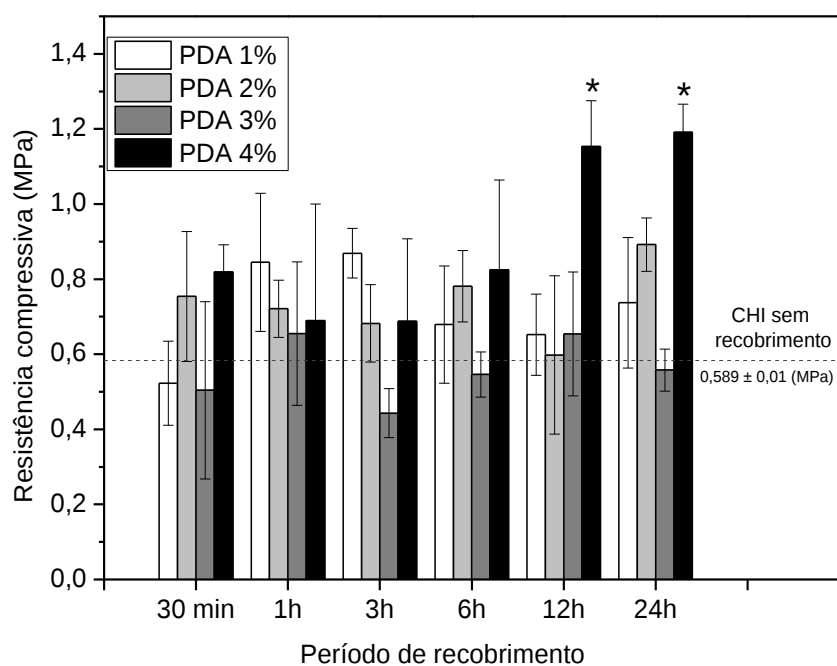


Figura 16: Ensaio de compressão das amostras de CHI pura e com recobrimentos de PDA. (*) ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey evidenciou diferença estatística entre a amostra de CHI e com o recobrimento do GIV 12h e GIV 24h ($p \leq 0,05$). Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).

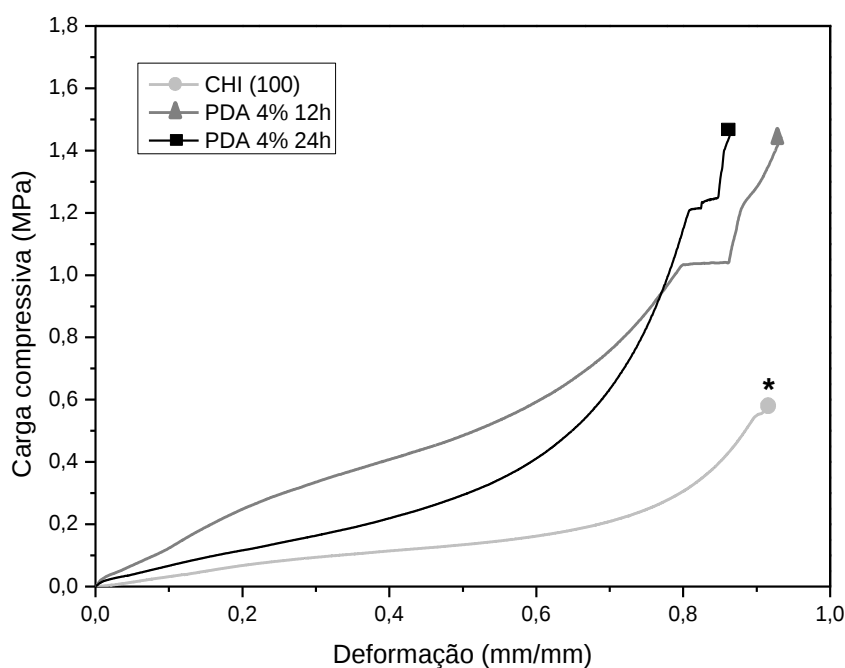


Figura 17: Curva da relação entre compressão (MPa) e deformação (mm/mm) dos arcabouços de CHI sem recobrimento, GIV 12h e GIV 24h. * Ensaio finalizado em 50% de compressão para CHI, e em 80% para as demais curvas.

Os resultados da média da compressão dos grupos IV (12 e 24h) foram de $1,2 \pm 0,1$ (MPa). Estes resultados indicam que os arcabouços não possuem resistência adequadas para aplicações que precisem do suporte de cargas, como em articulações. No entanto, caso possuam resposta celular positiva, eles podem ser utilizados como preenchedores de defeitos ósseos, em aplicações que a resistência mecânica não seja tão exigida. Isto foi previsto por Seidenstuecker e colaboradores [9], em estudo que visou produzir arcabouços impressos 3D, a partir do pó à base de biovidro e fosfato tricálcico. Eles apresentaram uma variação de 0,17 a 0,64 MPa como resultado do ensaio de resistência à compressão, valores menores aos encontrados nos arcabouços recobertos do presente estudo, mas similares ao grupo contendo apenas CHI ($0,589 \pm 0,007$ (MPa)).

Sabe-se que os valores de resistência compressiva encontrados nos ossos trabeculares (conhecidos por sua maior porosidade) são de 0,1 a 16 MPa e dos ossos corticais (mais densos) são de 100 a 200 MPa [78]. Sendo assim, o presente estudo apresenta amostras que podem mimetizar o osso trabecular em determinadas regiões que não exijam alto estresse de carga (como a maxila, calvária, dentre outras), por estarem dentro da sua faixa de resistência compressiva. Outros fatores, como de porosidade, foram avaliados após a adição de HA nos arcabouços, assim como uma reavaliação da sua resistência a compressão, já que esta cerâmica ajudaria a simular a parte inorgânica do tecido ósseo, responsável pela rigidez e força dos ossos [58].

5.1.4. Considerações sobre a padronização do recobrimento com PDA

Através da metodologia estudada, foi possível produzir arcabouços 3D de quitosana com diferentes concentrações e tempos de recobrimento utilizando polidopamina. Por meio das análises de caracterização dos materiais, foi evidenciada a interação dos polímeros, assim como a observação de uma camada mais uniforme para os grupos de recobrimento com maior relação de concentração/tempo. Estes também demonstraram maior potencial de resistência às cargas compressivas, ficando definida a padronização do recobrimento para os arcabouços utilizando-se 4mg/mL de dopamina e 24 h em contato com a solução durante sua polimerização. Estas informações são favoráveis para utilização dos materiais, nestas condições, para a engenharia tecidual óssea.

5.2. Etapa II

5.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Em complemento ao estudo do FTIR na etapa I, foram obtidos os espectros dos materiais puros de CHI e PDA, juntamente com o da HA, disposto anteriormente na Figura 06. A partir da análise da HA, foram identificadas as bandas vibracionais que comprovam sua síntese. De forma similar à análise de CHI e PDA, foi observado no espectro de HA a banda larga centrada em 3445 cm^{-1} , indicando a presença de água retida no material e o alongamento da vibração do grupo da hidroxila da HA. Uma segunda banda do grupo hidroxila se apresentou em 1640 cm^{-1} que está associada à adsorção de moléculas de água da HA [79], [80], [81].

Ainda em relação ao espectro de HA, as bandas nas regiões de 1993 cm^{-1} (ν_3) e 876 cm^{-1} (ν_2), pertencentes ao grupo dos carbonatos (CO_3^{2-}), são atribuídas à posição dos fosfatos substituídas por CO_3^{2-} na rede de HA [79], [82]. O trecho entre 1550 e 1450 cm^{-1} apresenta banda também relacionada ao grupamento CO_3^{2-} [80]. Já a banda centrada em torno de 1073 cm^{-1} , corresponde ao modo vibracional ν_3 do grupo PO_4^{3-} [82]. As bandas duplicadas de 602 e 568 cm^{-1} refletem os modos vibracionais degenerados do estiramento assimétrico ν_4 de PO_4^{3-} . Em 466 cm^{-1} , por sua vez, está a banda vibracional atribuída ao modo ν_2 duplamente degenerado da PO_4^{3-} [83].

Em 1597 cm^{-1} é encontrada a região correspondente à amida II da CHI [84]. Apenas no grupo CHI/HA/PDA (75/25), que contém CHI, HA e o recobrimento de PDA, é possível observar a banda em 1505 cm^{-1} , que segundo Wu e colaboradores [85], pode estar relacionado à ligação C-C hibridizada sp^2 no anel aromático de PDA. Já na região de 1426 cm^{-1} está a banda vibracional que corresponde ao grupo carbonatos (CO_3^{2-}), característico da HA [80]. Em 1380 cm^{-1} está a banda da deformação de C-H e em 1320 cm^{-1} a amida III, com o estiramento de C-N, presente comumente na CHI [65], [84]. Em 1260 cm^{-1} está a banda deslocada do PDA, originalmente em 1280 cm^{-1} , atribuída às vibrações de ressonância de C=C de ciclos aromáticos do polímero [68], [74].

Assim como na etapa I, o deslocamento para 1060 cm^{-1} do estiramento de C-O, e a flexão de C-H em 890 cm^{-1} estão presentes na maioria dos espectros, achados atribuídos à CHI [65], [68]. Nos espectros dos arcabouços com HA, foram encontradas as bandas duplicadas em 600 e 566 cm^{-1} referentes ao estiramento assimétrico ν_4 de PO_4^{3-} . Além disso, repetiu-se o espectro do modo ν_2 duplamente degenerado de PO_4^{3-} em 466 cm^{-1} , atribuído à presença da HA na composição dos arcabouços [83]. Na Figura 18 estão dispostos os espectros obtidos pelo FTIR dos grupos contendo CHI, PDA e HA.

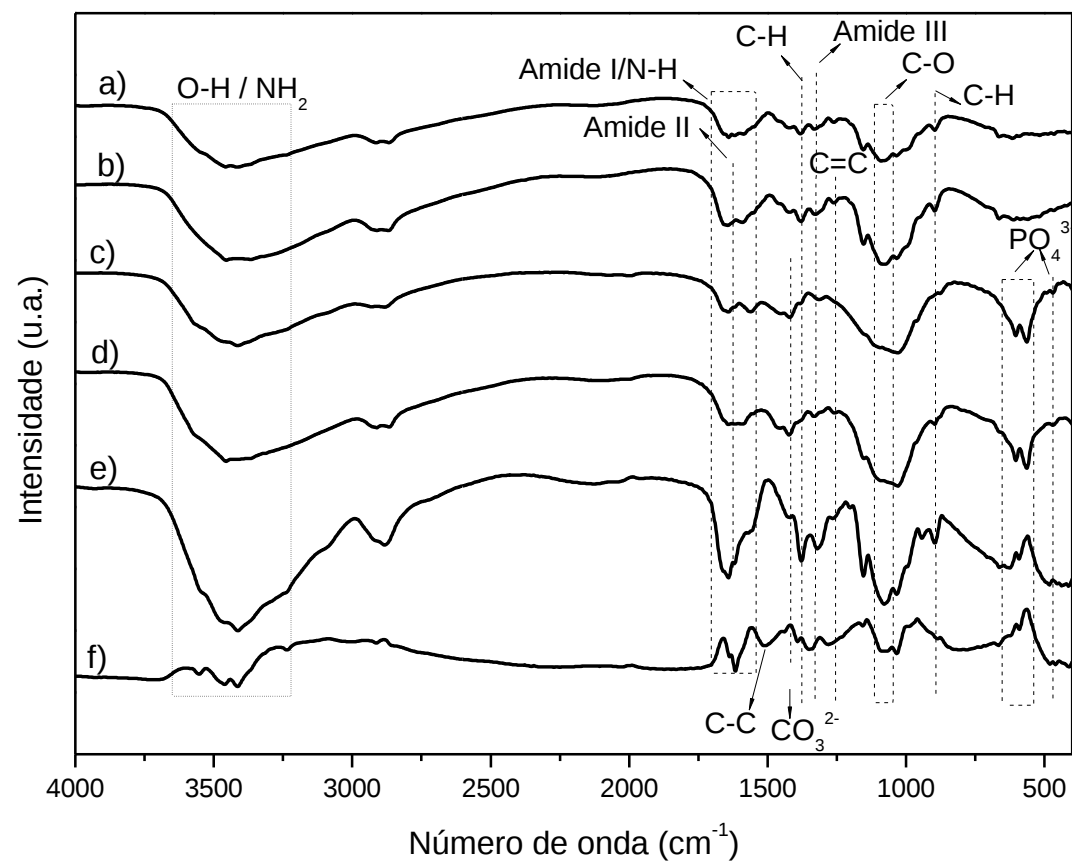


Figura 18: Espectro obtido pelo FTIR dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

Também foi possível evidenciar a interação dos materiais após a produção dos diferentes arcabouços pelo cálculo dos deltas (Δ) do deslocamento das principais faixas vibracionais encontradas. Foram analisadas as bandas da CHI (Amida I), PDA (ligação N-H) e HA, com a hidroxila (-OH). Estes dados estão contidos na Tabela 04 e informações completas das faixas vibracionais das bandas analisadas, bem como os deslocamentos (Δ) estão dispostos no anexo suplementar (Tabela S1). Além disso, os espectros com destaque para a região analisada dos Δ s está disponível no anexo suplementar (Figura S1).

Como observado previamente no FTIR dos materiais puros e nos espectros dos arcabouços contendo CHI e PDA, na etapa I, aqui estão algumas das principais bandas dos materiais estudados. Em torno de 1660 e 1640 cm^{-1} está a amida I, com deslocamentos da região de absorção que pode indicar a interação de CHI-PDA, como inferido previamente [75]. Além disso, é possível que tenha ocorrido a sobreposição da hidroxila da HA, que aparece nesta mesma região [81]. A análise dos Δ s corroboram estas informações, cujos deslocamentos variam de acordo com as formulações dos grupos. Desta forma, a ligação se deu pela -OH (da HA) e N-H (do PDA) à matriz de CHI pela amida I.

De uma forma geral, os espectros contendo os três materiais tiveram característica similar e mais bandas atribuídas à CHI, provavelmente por sua prevalência de grupamentos funcionais, já que este polímero serviu de matriz para a formação dos arcabouços. Tal característica foi também encontrada por Ge e colaboradores [84], que estudaram arcabouços contendo CHI, HA e celulose. Porém, com a identificação dos Δ s das bandas vibracionais, foi possível evidenciar a interação dos três materiais estudados.

Tabela 04: Deslocamento (Δ) das bandas de interesse de cada arcabouço.

Etapa II (Δ)	Amida I	N-H	OH
CHI (100)	17	-	-
CHI/PDA (100)	23	-23	-
CHI/HA (50/50)	14	-	17
CHI/HA/PDA (50/50)	18	-23	21
CHI/HA (75/25)	21	-	24
CHI/HA/PDA (75/25)	17	-33	20

Legenda: Média do deslocamento (Δ) das bandas em cm^{-1} obtidas pelo FTIR dos materiais puros em relação aos arcabouços estudados.

5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva

A partir das micrografias obtidas (Figuras 19 e 20), observa-se que a matriz de CHI propiciou aos arcabouços uma estrutura porosa interconectada, que beneficia a penetração celular e permeação de nutrientes e oxigênio [7]. Assim como observado na etapa I, a modificação das superfícies dos arcabouços com PDA as tornou mais rugosas, padrão que não parece ter sido alterado com a adição de HA, com os grupos CHI/HA/PDA (50/50) e CHI/HA/PDA (75/25). Em sua pesquisa prévia, Brahimi e colaboradores [83] também observaram a mudança do aspecto liso dos arcabouços de CHI, para um mais rugoso quando incluíram HA, em concordância com os achados da Figura 19 (d, f). Acredita-se que esta modificação na interface dos arcabouços colabore para a sua adsorção proteica, evento primário que antecede a adesão, proliferação e diferenciação celular [67].

Os grupos contendo HA, em especial os que tiveram sua maior concentração, CHI/HA (50/50) e CHI/HA/PDA (50/50), aparentaram possuir paredes mais espessas do que os grupos com apenas 25% da cerâmica em sua conformação e do que os grupos contendo somente os polímeros CHI e CHI/PDA [83]. Os formatos dos poros também mostraram variações em suas superfícies, apresentando aspecto de fenda e distribuição mais uniforme nos grupos CHI/HA (75/25) e CHI/HA/PDA (75/25). Estes dados são importantes, porque o formato dos poros também afeta a regeneração óssea. Enquanto os poros interconectados esferoidais e em formato de canais longos (fendas) auxiliam na colonização tecidual e crescimento ósseo, os poros com baixa interconexão e curvos (com “depressões”) dificultam a penetração de células precursoras de osteoblastos e infiltração capilar, limitando a mineralização apenas à superfície do arcabouço [1], [4].

Provavelmente, devido ao método de fabricação dos arcabouços ter sido a liofilização, que envolve o fenômeno de separação de fases de seus componentes durante o congelamento e sublimação, parece terem sido formados materiais anisotrópicos com faixas de diferentes tamanhos de poros. Microestruturas anisotrópicas podem ser vantajosas para a organização e diferenciação de células variadas envolvidas no processo de regeneração tecidual. A anisotropia no material também pode fornecer a direção para o crescimento celular, simulando o alinhamento natural de tecidos como osso e músculo [1], [76], [86].

Tais características de tamanho e distribuição de poros serão discutidos com a porosimetria, suas possíveis correlações com a resistência mecânica e se há diferenças significativas entre um grupo e outro. Além disso, com os dados obtidos por EDS (Figura 21) foi possível observar a presença dos elementos característicos dos biomateriais selecionados, carbono, nitrogênio e oxigênio em todos os grupos, e cálcio e fósforo nos grupos contendo HA.

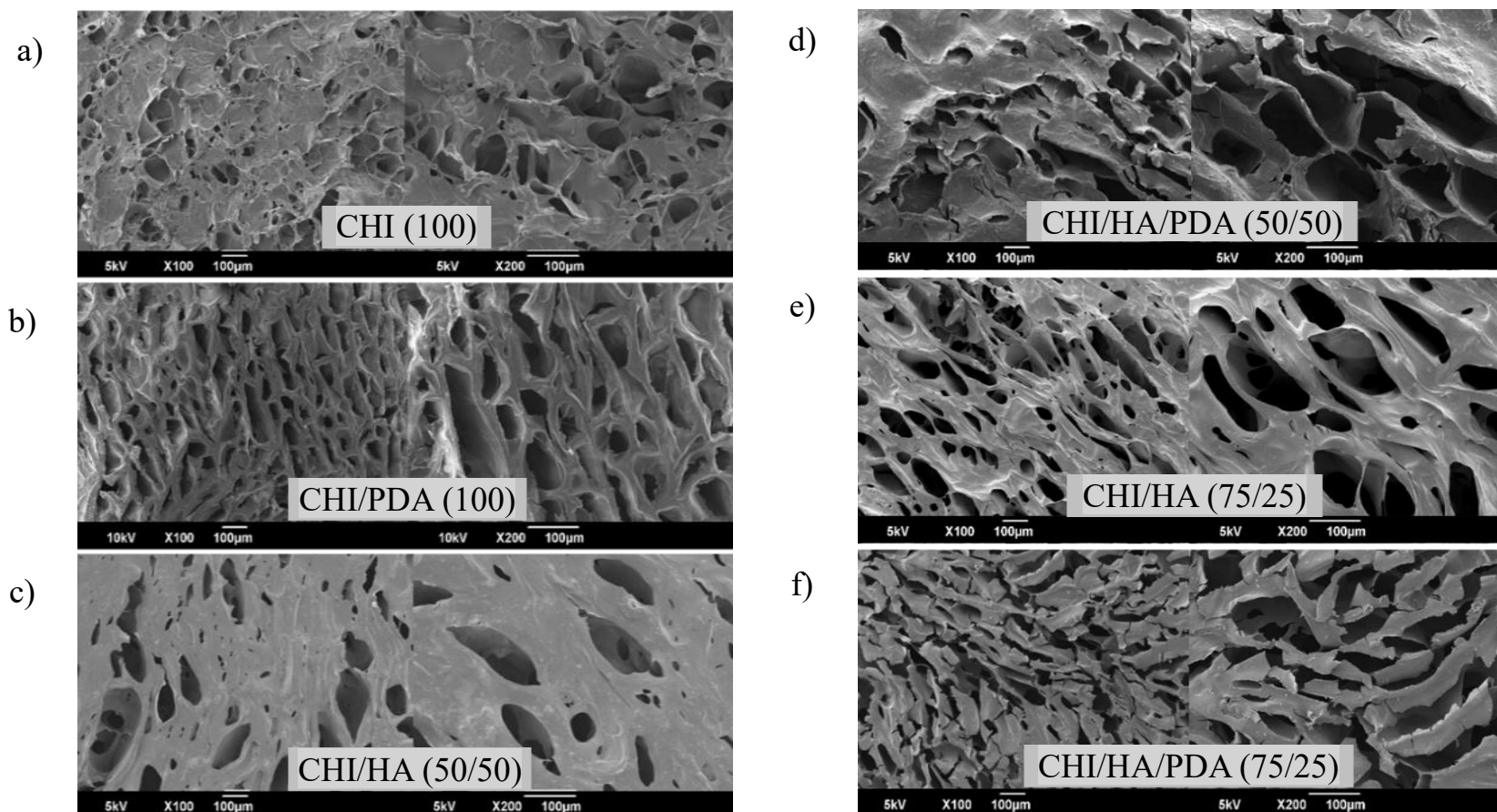


Figura 19: Imagens obtidas pelo MEV (100x e 200x) dos arcabouços a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

g)

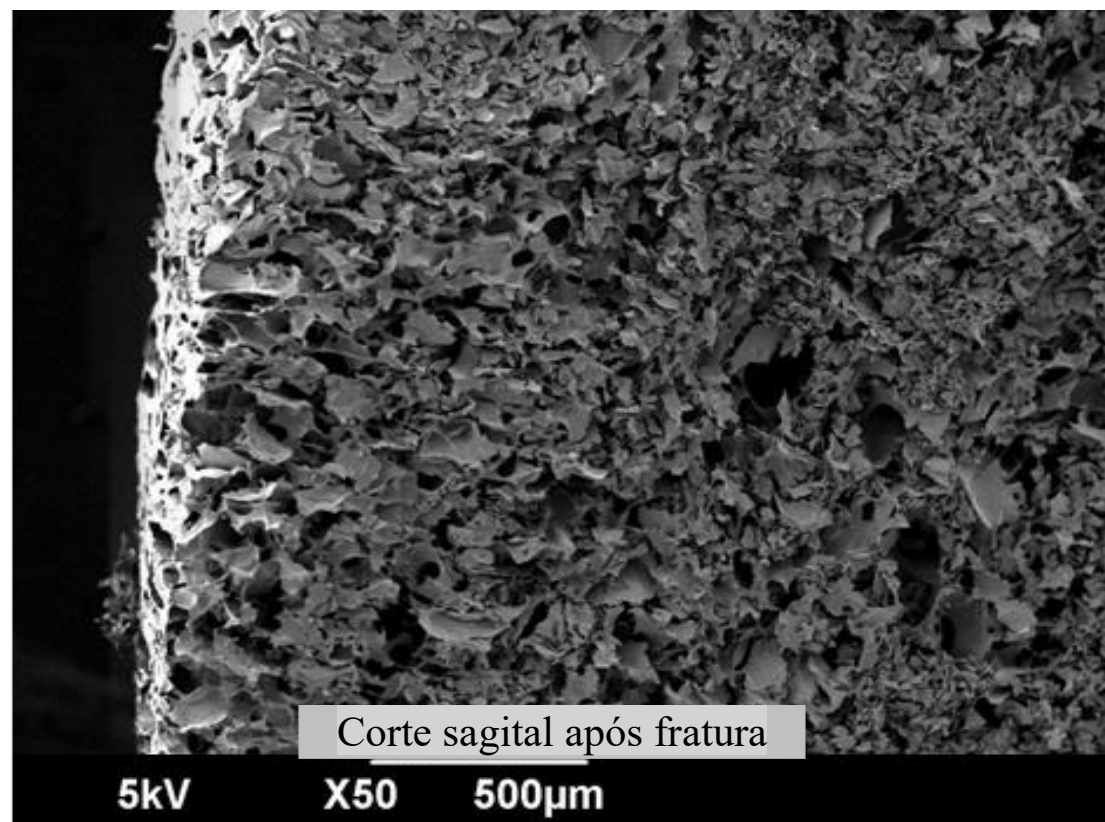


Figura 20: Imagem obtida pelo MEV em 50x, referente ao grupo CHI/HA/PDA (50/50) (g), num corte sagital do arcabouço pós fratura, para visualização da camada de PDA depositada na superfície do material (borda localizada à esquerda).

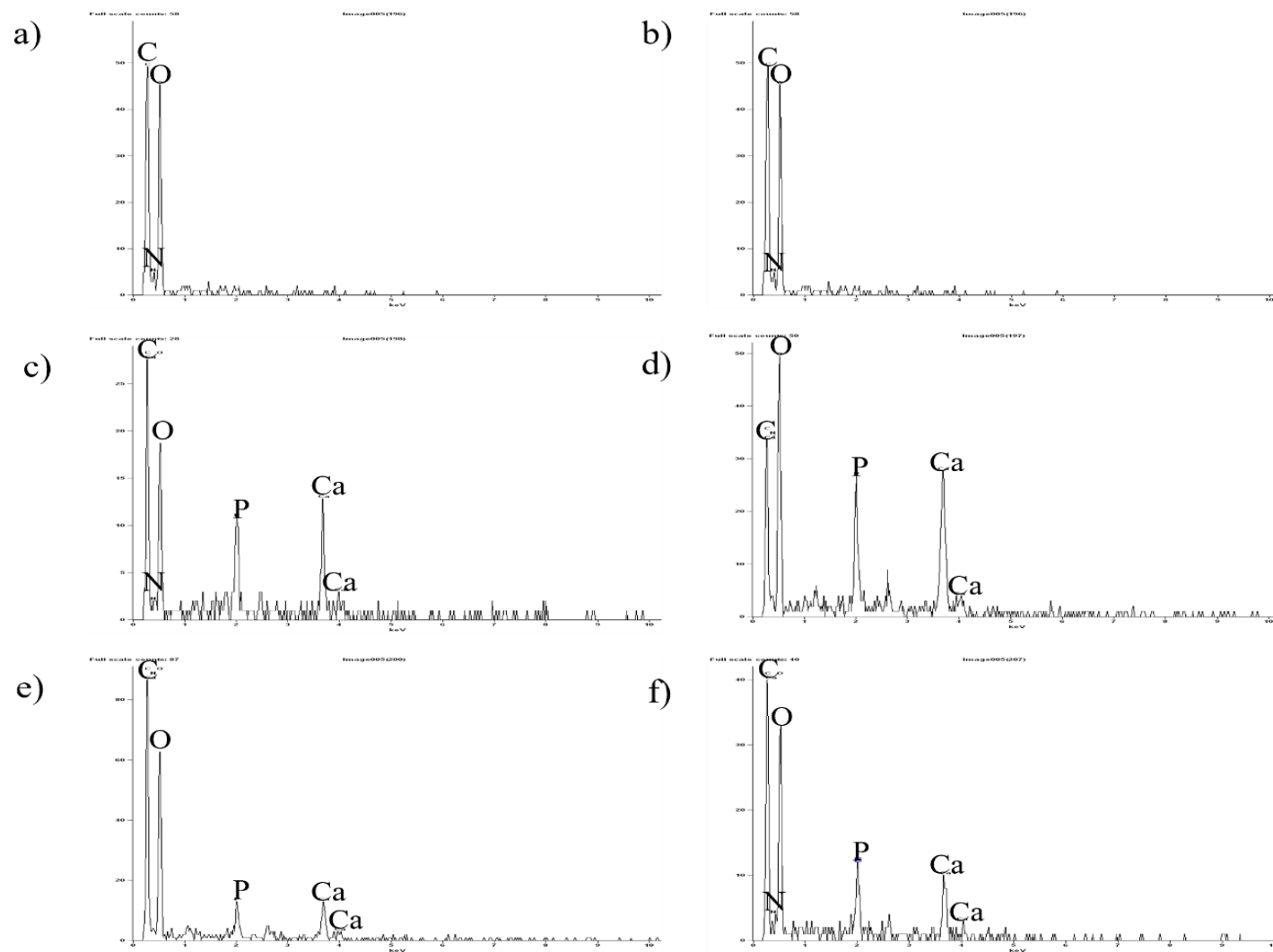


Figura 21: Dados obtidos por EDS dos grupos de arcabouços a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

5.2.3. Análise de porosidade

Dados relacionados à porosidade dos arcabouços foram obtidos por meio da análise das micrografias no software ImageJ (Tabela 05). Em relação à área total de poros, os grupos que apresentaram menor porosidade nas superfícies (superior e inferior) foram aqueles com maior concentração de HA. Sendo assim, houve diferença estatística do CHI/HA (50/50) e CHI/HA/PDA (50/50) em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), com média de 12 ± 5 e $14 \pm 4\%$ de porosidade, respectivamente. Já os grupos CHI (100), CHI/PDA (100), CHI/HA (75/25) e CHI/HA/PDA (75/25), que não apresentaram diferença estatística entre si, tiveram médias que variaram de 21% a 27%.

Na superfície de fratura, por sua vez, o grupo CHI/PDA (100) teve a maior média dos grupos (27 ± 6) com diferença estatística em relação aos grupos CHI/HA (50/50), CHI/HA/PDA (50/50), CHI/HA (75/25) e CHI/HA/PDA (75/25) ($p < 0,05$). O grupo CHI/HA (50/50), que teve a menor média (14 ± 4), apresentou diferença estatística com CHI (100), CHI/PDA (100). A presença da HA reduziu a porosidade das amostras, dados corroborados por Shemshad e colaboradores [87], que testaram arcabouços de CHI, HA e dióxido de silício. No seu estudo, tal diminuição se deu pela ligação intermolecular de hidrogênio entre os grupos NH_2 da CHI e o grupo OH da HA.

Tabela 05: Dados do estudo de porosidade dos arcabouços (média $\pm$ desvio padrão).

Grupos	Número de poros $\pm$ DP		Porosidade (%) $\pm$ DP		Tamanho de poros (μm) $\pm$ DP	
	Superfícies	Fratura	Superfícies	Fratura	Superfícies	Fratura
CHI (100)	145 ± 45	356 ± 54	21 ± 4	22 ± 3	66 ± 9	45 ± 3
CHI/PDA (100)	119 ± 20	289 ± 58	22 ± 12	27 ± 6	77 ± 7	52 ± 6
CHI/HA (50/50)	93 ± 11	271 ± 41	12 ± 5	14 ± 4	52 ± 9	38 ± 6
CHI/HA/PDA (50/50)	67 ± 15	316 ± 65	14 ± 4	19 ± 5	89 ± 11	40 ± 3
CHI/HA (75/25)	161 ± 29	367 ± 34	26 ± 2	17 ± 2	72 ± 13	41 ± 5
CHI/HA/PDA (75/25)	161 ± 22	286 ± 42	27 ± 5	19 ± 3	92 ± 14	46 ± 4

Com a análise dos diâmetros de poros (μm), obteve-se a média do grupo CHI/HA (100), a menor entre os grupos, com 52 ± 9 e diferença estatística em relação ao CHI/PDA (100),

CHI/HA/PDA (50/50) e CHI/HA/PDA (75/25) ($p < 0,05$). O grupo com maior média de diâmetro foi o CHI/HA/PDA (75/25), com 92 ± 14 , apresentando diferença estatística, como dito anteriormente, ao grupo CHI/HA (50/50), além do CHI (100) e CHI/HA (75/25). Estes dados foram extraídos do sumário obtido no ImageJ, onde foi calculada a média de diâmetro após a contagem de todos os poros de cada imagem tratada. O grupo CHI/HA/PDA (75/25), que apresentou o maior diâmetro médio, teve poros que variaram de 778 a 14,54 μm . A medida desses diâmetros na superfície de fratura, por sua vez, é limitada, já que o corte feito por congelamento com nitrogênio líquido fez com que os poros da superfície perdessem seu formato original, com estilhaços do material cortado os recobrindo. O aspecto do diâmetro da superfície de fratura pode ser observado na Figura 20, da análise de MEV.

A técnica de produção dos arcabouços a partir da liofilização não dispõe o perfeito controle do tamanho de poros, assim como sua geometria e distribuição, o que pode gerar materiais com baixa interconexão de poros [88]. Poros interconectados são necessários para permitir a permeação celular e distribuição de nutrientes no interior do material e matriz extracelular. Além disso, sabe-se que os osteoblastos possuem tamanho médio de 10-50 μm , sendo preferíveis substratos com poros na faixa de 100 a 200 μm , para facilitar a infiltração de macrófagos, migração celular e vascularização. Poros menores ($<100 \mu\text{m}$), por sua vez, dão suporte ao osteóide não mineralizado, precursor de tecidos fibrosos e osso maduro [1].

Ainda assim, estudos mostraram que o uso de arcabouços microporosos podem promover suporte para a formação óssea madura através de vascularização. Ao se comparar com superfícies macroporosas, os microporos oferecem área de superfície, significativa adesão proteica e celular, além da migração para o interior do arcabouço [89], [90].

Discussões sobre as melhores características de porosidade variam de acordo com o objetivo da aplicação do material. A variação da densidade óssea (cortical e trabecular) presente nos tecidos nativos e suas respectivas propriedades mecânicas influenciam na seleção de arcabouços com maior e menor diâmetro e porcentagem de poros. Arcabouços com padrões heterogêneos de porosidade (poros pequenos e grandes) podem simular a camada mais porosa do osso esponjoso leve, enquanto áreas mais compactas simulam o osso cortical rígido [90].

É essencial considerar que a alta porosidade e o grande tamanho dos poros resultam no maior crescimento ósseo, mas, por outro lado, o alto grau de volume vazio no arcabouço reduz as suas propriedades mecânicas (principalmente resistência e rigidez) o que pode prejudicar a integridade estrutural do biomaterial [4].

A seguir estão os gráficos referentes à contagem de poros, sua área e diâmetro de poros para melhor visualização dos resultados estatísticos (Figura 22):

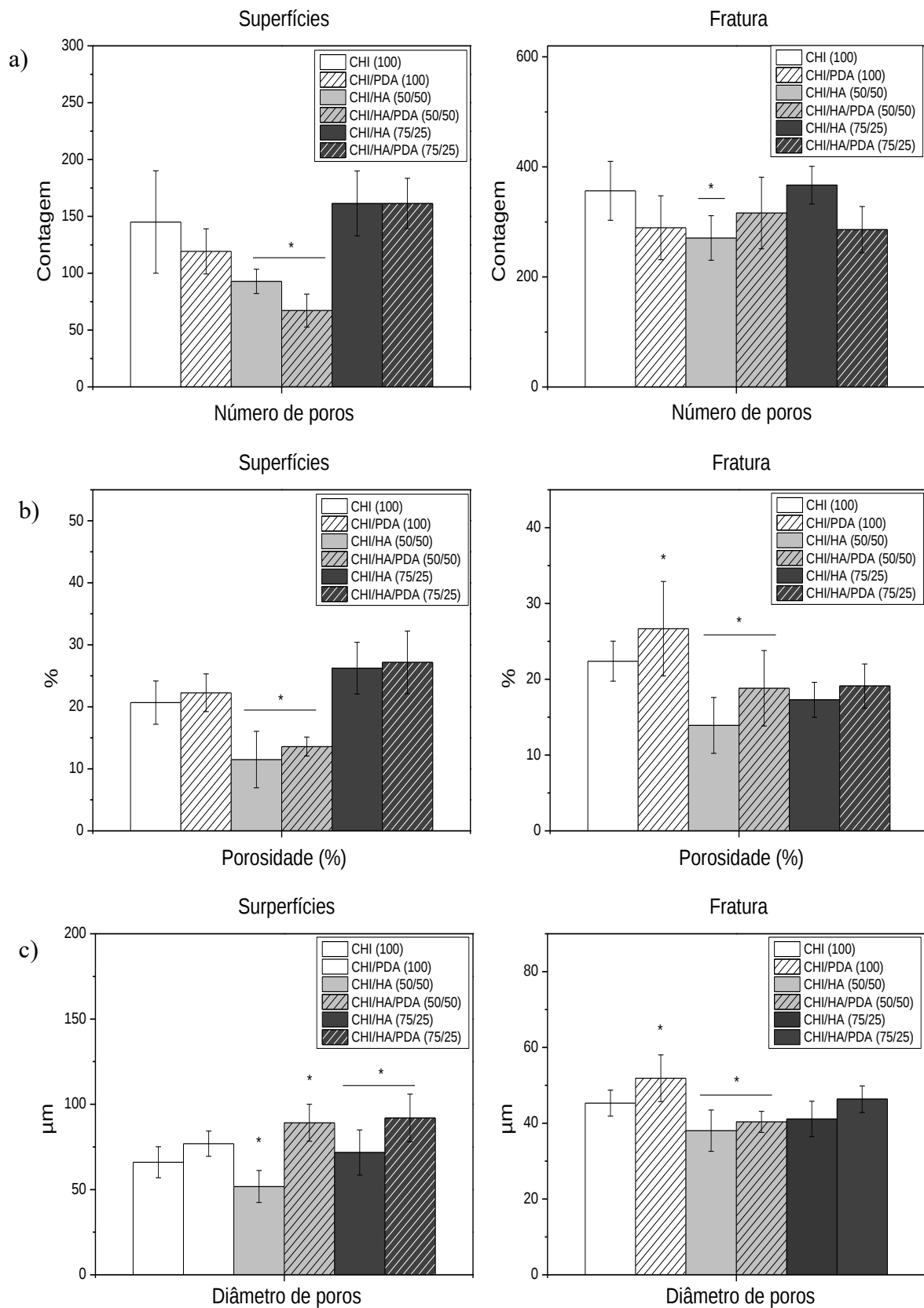


Figura 22: Análise da porosidade dos arcabouços em relação a contagem de poros (a); área total dos poros em % (b); diâmetro médio dos poros em μm (c).

5.2.4. Ensaio de compressão

Em conformidade aos resultados obtidos na Etapa I, a média de resistência à compressão dos arcabouços do grupo CHI (100) foi de $0,59 \pm 0,01$ (MPa). Nesse grupo, a proximidade das placas do equipamento levou à necessidade da finalização do ensaio em 50% de compressão. O recobrimento de PDA selecionado foi com concentração de 4% e 24h de contato dos arcabouços à solução de DA em meio alcalino, CHI/PDA (100), que propiciou aos arcabouços maior resistência compressiva, com média de $1,2 \pm 0,01$ (MPa).

Com a adição de HA aos materiais, houve diferença na resistência compressiva apenas para o grupo CHI/HA (50/50) em comparação ao grupo CHI/PDA (100) ($p < 0,05$). Sua média foi de $0,5 \pm 0,1$ (MPa), com o ensaio finalizado em 70% de compressão devido à proximidade das placas do equipamento. O recobrimento com PDA pode melhorar as propriedades mecânicas dos materiais, aumentando sua rigidez [66]. No presente estudo, no entanto, a adição de PDA aos arcabouços contendo HA não causou diferença relevante no ensaio compressivo. Embora as médias sejam maiores nos grupos contendo PDA, como observado na Tabela 06, do ponto de vista estatístico sua adição não melhorou a resposta à compressão ($p > 0,05$).

Tabela 06: Ensaio de compressão dos arcabouços em triplicata.

Amostras em triplicata	Média (MPa)	$\pm$ DP
CHI (100) (50%) ***	0,59	0,01
CHI/PDA (100) (80%) ***	1,2	0,01
CHI/HA (50/50) (70%) ***	0,5	0,1
CHI/HA/PDA (50/50) (80%)	0,9	0,2
CHI/HA (75/25) (70%)	0,9	0,3
CHI/HA/PDA (75/25) (70%)	1,0	0,3

Legenda: Valores obtidos expressos por média e DP ($\pm$). *** ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey evidenciou diferença estatística entre os grupos: CHI (100) e CHI/PDA (100) ($p = 0,03637$), CHI/PDA (100) e CHI/HA (50/50) ($p = 0,0221$). Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).

Observa-se, então, que os arcabouços contendo os três materiais, CHI/HA/PDA (50/50) e CHI/HA/PDA (72/25), apresentaram médias de resistência à compressão que poderiam mimetizar

ossos trabeculares em aplicações que não sejam exigidas sobrecargas e descarga de peso [78]. Neste aspecto, é importante que as capacidades mecânicas do biomaterial sejam similares às do local aplicado, para que não exista risco à integridade estrutural do arcabouço enquanto o novo tecido se forma [4], [8]. Além disso, é importante que se observe quais grupos provêm resultados positivos do ponto de vista celular, para que com base nisto seja identificado o material que ofereça melhores condições para a regeneração tecidual, balanceando aspectos mecânicos e biológicos. Abaixo está o gráfico com os resultados do ensaio compressivo dos grupos (Figura 23):

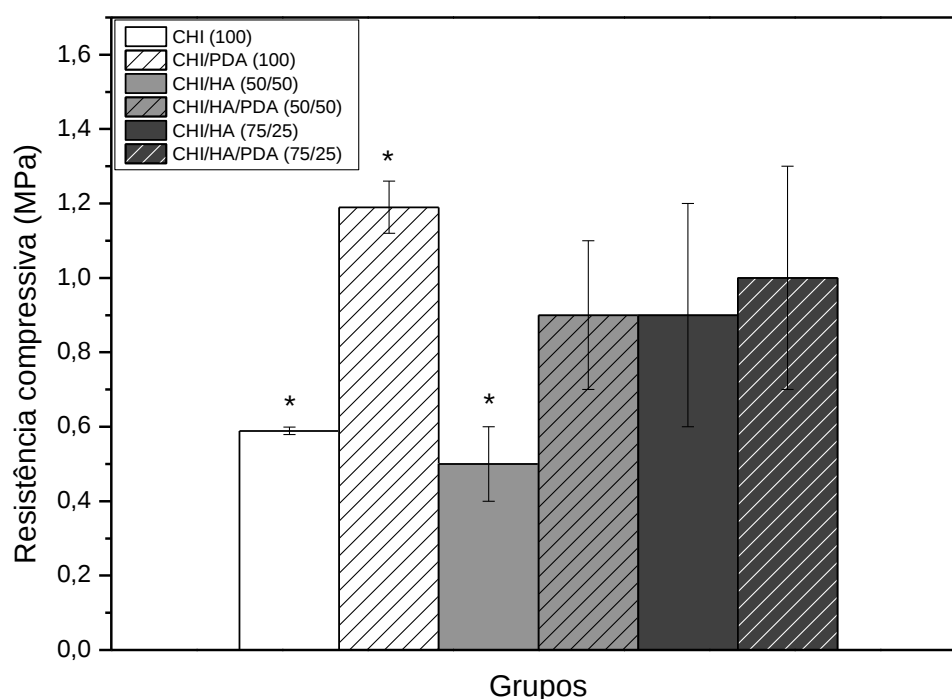


Figura 23: Ensaio de compressão dos grupos. (*) ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey evidenciou diferença estatística entre os grupos: CHI (100) e CHI/PDA (100) ($p = 0,03637$), CHI/PDA (100) e CHI/HA (50/50) ($p = 0,0221$). Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).

5.2.5. Difractometria de raios X (DRX)

A análise de difração exibe os padrões de difração dos materiais puros. Na CHI (Figura 24 a), que é um polímero semicristalino, pode-se observar a $2\theta = 10,87^\circ$ e $20,93^\circ$, picos correspondendo aos planos (020) e (110), respectivamente. Eles são característicos do halo amorfo hidratado da CHI e da estrutura β -quitina [85], [91]. O PDA (Figura 24 a) por sua vez, que é um polímero amorfo, apresentou um halo também em 20° [92].

Já com a análise do padrão de difração da HA (Figura 24 b), pode-se identificar os principais picos de seus planos cristalinos condizentes, como esperado, a este biomaterial cerâmico. Não se observou, através desta análise, a formação de outras fases de apatitas. Os picos observados em 2θ foram $10,7^\circ$, $16,8^\circ$, $18,7^\circ$, $21,7^\circ$, $22,8^\circ$, $25,8^\circ$, $28,1^\circ$, $28,9^\circ$, $31,9^\circ$, $32,9^\circ$, 34° , $35,5^\circ$, $39,8^\circ$, $46,7^\circ$ e $49,5^\circ$, com seus respectivos planos cristalinos da HA: (100), (101), (110), (200), (111), (002), (102), (210), (211), (300), (202), (301), (310), (222) e (213) [93], [94].

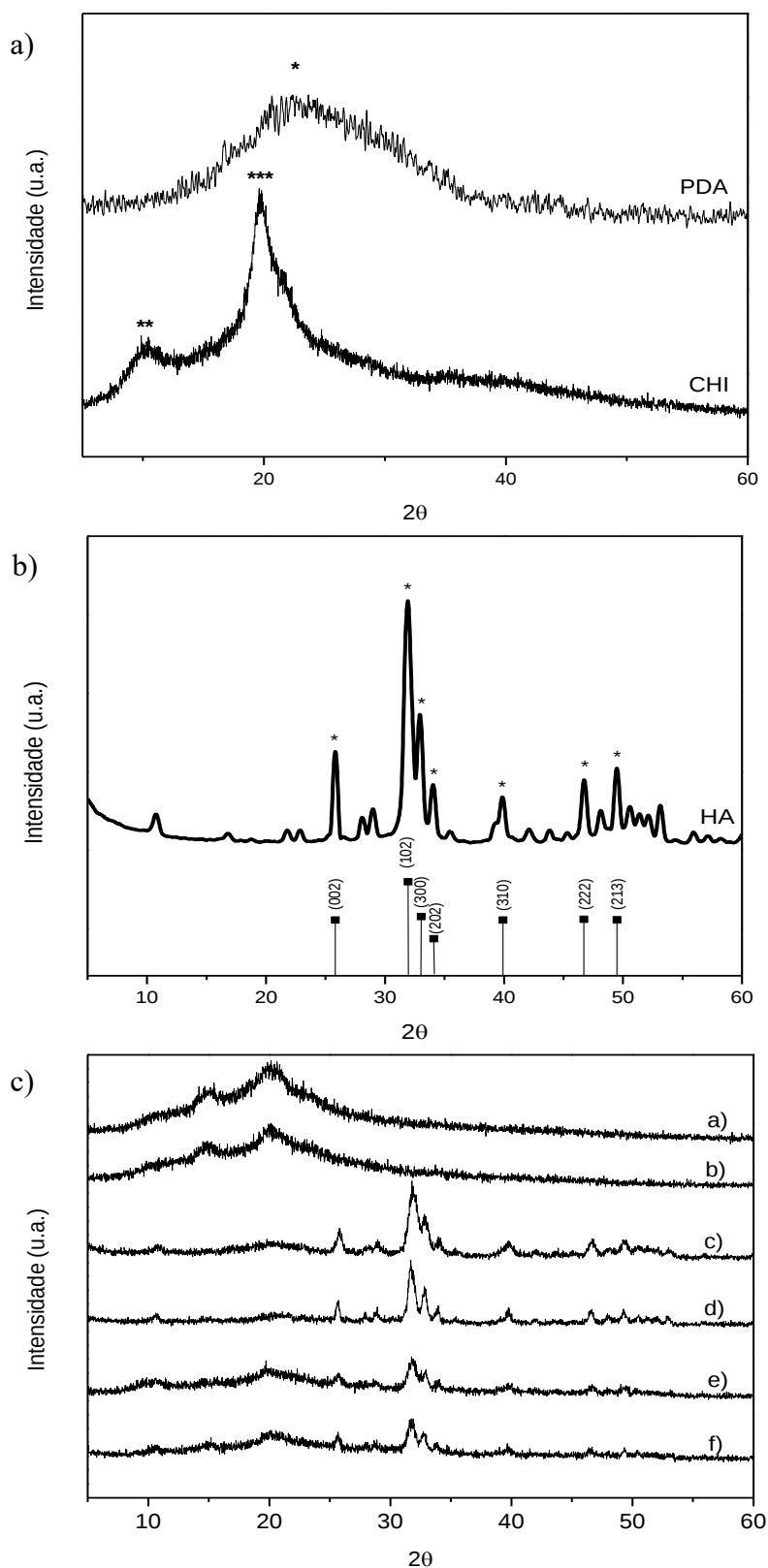


Figura 24: (a) Padrão de difração de DRX com identificação do halo amorfo contido na CHI (*) e PDA (**, ***). (b) Picos e planos cristalinos da HA (*). (c) Padrão de difração de DRX dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

Na Figura 24 (c) estão dispostos os padrões difratométricos dos arcabouços contendo os materiais. No grupo CHI (100), que contém apenas CHI e grupo CHI/PDA (100), com CHI e PDA, observa-se apenas o pico largo característico desses materiais, a 2θ : 20° [84], [92]. Nos demais grupos, que possuem HA em sua composição, é possível observar a aparição dos seus picos cristalinos correspondentes [94]. Além disso, observa-se que nos grupos CHI/HA (50/50) e CHI/HA/PDA (50/50), em que a relação de CHI para HA é de 50/50, os picos possuem maior intensidade e estreitamento que nos grupos CHI/HA (70/25) e CHI/HA/PDA (75/25), onde a relação de concentração é de 75 de CHI para 25 de HA.

Sendo assim, os resultados foram condizentes com a concentração utilizada dos biomateriais. A interação destes materiais resultou em um arcabouço de característica semicristalina, resultados corroborados por Brahimi e colaboradores [83]. Os padrões de difratometria encontrados inferem a presença dos polímeros e os componentes da biocerâmica, que tem sido relatado com ocorrência de ligações de hidrogênio e interação eletrostática [95].

5.2.6. Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA dos arcabouços foram realizadas com utilização de nitrogênio, com um primeiro evento térmico iniciando na faixa de ~ 40 - 150°C , atribuído à perda de água adsorvida ou fracamente ligada ao hidrogênio da CHI. A faixa de temperatura é correspondente à análise do polímero puro [96], [97]. O segundo evento iniciou com variações dentre os grupos (entre ~ 215 - 250°C), finalizando sem grandes variações em torno de 320°C . Essa perda corresponde à degradação térmica do anel piranose, com ruptura das ligações glicosídicas entre os anéis de glucosamina e N-acetilglucosamina que ocorre na CHI, além da liberação de produtos voláteis [98], [99], [100]. A Figura 25 mostra os resultados das análises de perda de massa dos biomateriais puros (a), dos arcabouços (b) e o DTG dos arcabouços (c).

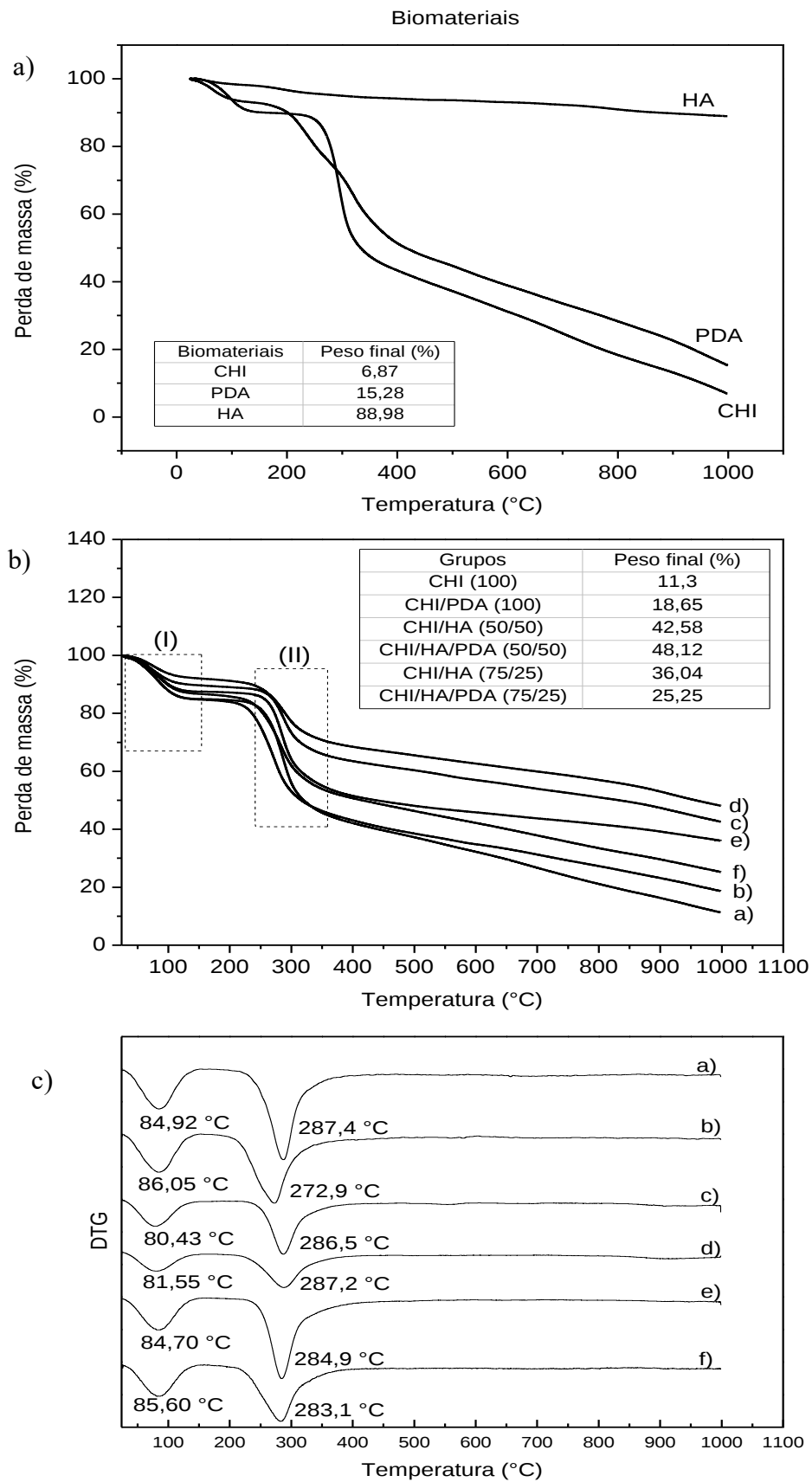


Figura 25: Análise termogravimétrica por TGA dos materiais puros de CHI, PDA e HA (a). Análise por TGA dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25) (b) e DTG (c).

As faixas destes eventos em cada grupo, bem como a sua perda de massa (%) estão detalhadas na tabela 07, separadas para os dois eventos.

Tabela 07: (a) Dados referentes ao primeiro evento térmico com suas respectivas perdas de massa (%). (b) Dados do segundo evento térmico com as variações de temperatura, bem como as perdas de massa (%).

1° evento térmico		
Grupos	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
CHI (100)	84,92	36,11
CHI/PDA (100)	86,05	36,18
CHI/HA (50/50)	79,30	21,2
CHI/HA/PDA (50/50)	81,55	19,16
CHI/HA (75/25)	84,70	26,8
CHI/HA/PDA (75/25)	85,60	31,21
2° evento térmico		
Grupos	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
CHI (100)	287,4	36,11
CHI/PDA (100)	272,9	36,18
CHI/HA (50/50)	286,5	21,2
CHI/HA/PDA (50/50)	287,2	19,16
CHI/HA (75/25)	284,9	26,8
CHI/HA/PDA (75/25)	283,1	31,21

Legenda: Valores obtidos pelos gráficos tratados das curvas DTG.

Os eventos térmicos obtidos pelo DTG dos grupos estão disponíveis no material suplementar (Figura S2). A partir da análise de dados do TGA, foi possível observar que a adição de HA tornou os arcabouços mais resistentes termicamente, como esperado de um material cerâmico [80]. De forma geral, a temperatura de perda de massa do 2° evento iniciou em temperaturas mais baixas nos arcabouços recobertos com PDA, podendo indicar a segunda etapa de desidratação dos materiais recobertos. O PDA possui natureza higroscópica, cuja água pode estar mais superficial ou mais firmemente ligada, levando também a uma maior degradação térmica na faixa de 280°C [101]. Com o uso da formulação de os três biomateriais, com o grupo CHI/HA/PDA (50/50), foi observada a menor perda de massa nas faixas tabuladas e no término da análise. Isto se deu pela maior quantidade de HA neste grupo e pode indicar maior estabilidade dos materiais nestas condições de concentração, tendência que também será observada no ensaio de degradação *in vitro*.

Ao final da medida, em 1000°C, as massas restantes para os materiais puros foi de: CHI = 6,87%; PDA: 15,28% e HA: 88,98%. Nos polímeros o resíduo final foi basicamente de cinzas, enquanto a HA apresentou somente 11,02% de perda de massa. Em comparação, as massas residuais dos arcabouços após a análise foi de: CHI (100) = 11,3%; CHI/PDA (100) = 18,65%; CHI/HA (50/50) = 42,58%; CHI/HA/PDA (50/50) = 48,12%; CHI/HA (75/25) = 36,04%; CHI/HA/PDA (75/25) = 25,25%. Estes resultados são compatíveis com os materiais utilizados e as formulações dos grupos.

5.2.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Com a análise térmica DSC, feita entre 15-400°C, pode-se observar as duas principais diferenças de fluxo de calor em razão do aumento de temperatura (Figura 26). O primeiro pico foi endotérmico, relativo à evaporação da água, e se deu na faixa de 40-100°C. Posteriormente, agora entre 250-325°C, apareceu um pico exotérmico relativo à degradação térmica, com a decomposição da cadeia polimérica, devido à despolimerização e decomposição das unidades de CHI desacetiladas e acetiladas e de seu anel de piranose [99], [100], [102]

A presença dos dois eventos, endotérmicos e exotérmicos, foram similares devido a composição da matriz ser de CHI. No entanto, nos grupos de recobrimento foi observado um alargamento dos picos exotérmicos na faixa de 300°C. Em seu estudo, Hu e colaboradores [70] perceberam o mesmo alargamento no DSC do seu compósito de nanofibras de ácido polilático com HA e PDA, podendo indicar a mudança dos materiais pela utilização de PDA.

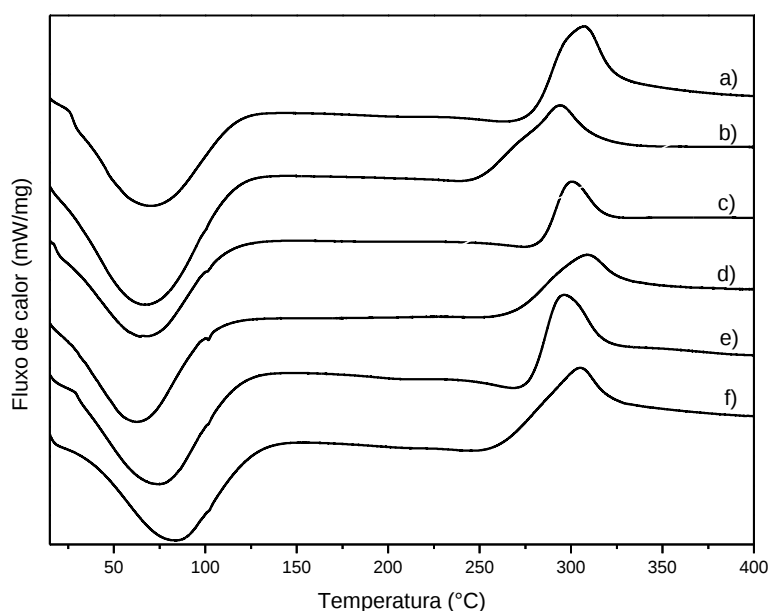


Figura 26: Termograma por DSC dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

5.2.8. Ensaio de degradação *in vitro*

A perda de massa dos arcabouços foi mensurada com o ensaio *in vitro* em meio a PBS, utilizando condições similares às do corpo humano. Foram feitas as medidas nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, a partir das quais foram obtidas as seguintes porcentagens:

Tabela 08: Ensaio de degradação *in vitro* dos arcabouços.

Degradação (%)	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
CHI (100)	8 ± 2 (a)(b)	4 ± 1 (a)	5 ± 1 (a)	14 ± 3 (a)(b)
CHI/PDA (100)	3 ± 2 (a)(b)	5 ± 1 (b)	7 ± 1 (a)(b)	8 ± 2 (a)
CHI/HA (50/50)	3 ± 1	1 ± 1 (b)	2 ± 1 (b)	2 ± 1 (b)
CHI/HA/PDA (50/50)	2 ± 1 (b)	$1,6 \pm 0,3$	4 ± 2	1 ± 1 (b)
CHI/HA (75/25)	4 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	6 ± 6 (b)
CHI/HA/PDA (75/25)	3 ± 1 (b)	3 ± 2	3 ± 1	3 ± 1 (b)

Legenda: Variação da perda de massa dos arcabouços (%) em função do tempo de imersão na solução de PBS. (a) $p < 0,05$ para a análise intragrupo: CHI (100), 28 dias $\neq$ dos demais períodos; CHI/PDA (100), 7 dias $\neq$ 21 e 28 dias. (b) Análise entre grupos para o grupo CHI (100) e CHI/PDA (100) em relação aos demais grupos. Valores obtidos em triplicata expressos por média e desvio padrão ($\pm$).

O gráfico contendo a variação da perda de massa pode ser observado na Figura 27. Com base nestes achados, percebe-se que a adição de HA levou à redução da perda de massa em relação ao tempo. Na análise intragrupos (a), que levou em consideração as diferenças estatísticas de cada grupo em relação ao período analisado, observou-se que os grupos I e II, sem a biocerâmica em sua formulação, apresentaram diferença significativa de perda de massa no período de 28 dias em relação aos demais períodos (7, 14, e 21 dias) ($p < 0,05$). Isso se deu, possivelmente, pela hidrólise dos grupamentos 1-4 N-acetil-glucosamina presentes na CHI quando em contato com o PBS. A degradação destes grupamentos leva à liberação de aminoácidos, que podem ser incorporados nas vias metabólicas de glicosaminoglicanos e glicoproteínas, ou excretados [103].

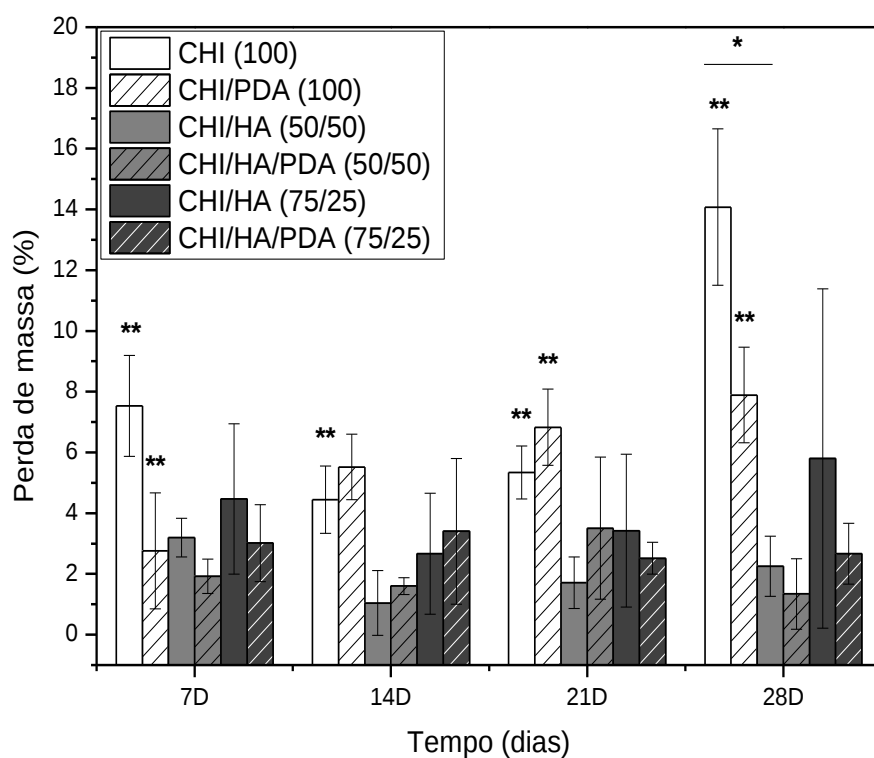


Figura 27: Variação da perda de massa dos arcabouços (%) em função do tempo de imersão na solução de PBS. (*) $p < 0,05$ para a análise intragrupo: CHI (100), 28 dias $\neq$ dos demais períodos; CHI/PDA (100), 7 dias $\neq$ 21 e 28 dias. (**) Análise entre grupos para CHI (100) e CHI/PDA (100) em relação aos demais grupos.

Em seu estudo, Khan e Sultana [104] obtiveram resultados contrários, com o aumento da taxa de degradação nos arcabouços contendo nanohidroxiapatita na matriz de CHI. Eles consideraram que isso se deu pela dissolução das partículas da cerâmica presentes na matriz polimérica. Foi observado, no entanto, que sua metodologia não incluiu a reticulação dos materiais, o que poderia implicar na menor estabilidade química entre eles. Diferentemente, no presente estudo, a adição de HA foi realizada com o processo de reticulação dos arcabouços, levando à formação de ligações covalentes entre suas cadeias, o que tornou o material mais resistente e menos suscetível à degradação em meio a PBS, resultados corroborados por Iqbal e colaboradores [103].

Percebe-se, agora na análise entre grupos (b), que a adição de PDA reduziu de forma significativa a perda de massa dos arcabouços ($p < 0,05$). No primeiro período avaliado, com 7 dias, CHI (100) apresentou maior degradação em relação aos grupos de recobrimento: CHI/PDA (100), CHI/HA/PDA (50/50) e CHI/HA/PDA (75/25). Aos 14 dias de ensaio, no entanto,

CHI/PDA (100) apresentou maior taxa de degradação em relação a CHI/HA (50/50). Isso ocorreu, possivelmente, pela perda de partículas de PDA que não se fixaram tão estavelmente à matriz de CHI. Sua adsorção nos grupos contendo HA, por sua vez, aparentam ter gerado maior estabilidade aos arcabouços, visto que a degradação destes grupos foi reduzida em relação ao grupo CHI (100), em especial com o decorrer dos 28 dias de ensaio. Estes resultados corroboram com a análise de TGA e com a literatura, já que tanto o polímero PDA como a biocerâmica HA possuem taxa de degradação *in vitro* lenta [22], [95].

A combinação dos três materiais, então, pode ser benéfica quando aplicada *in vivo*, já que a degradação rápida de CHI pode ser controlada com a adição de HA e recobrimento de PDA. Desta forma, promove-se a estabilidade estrutural do arcabouço, necessária para garantir a sua adesão e diferenciação celular durante sua aplicação [16], [17].

5.2.9. Avaliação de citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular é um importante indicador do potencial de aplicabilidade de biomateriais, sendo determinante para as demais avaliações que precedem a utilização em humanos (proliferação celular *in vitro*, avaliações *in vivo* com histologia, dentre outras). Assim, seguindo o padrão ISO 10993-5:2009, foi investigada a taxa de viabilidade de cada grupo em triplicata, com a porcentagem feita a partir das absorbâncias obtidas. As células utilizadas, L929, são comumente aplicadas na determinação da citotoxicidade de polímeros [105].

A análise de variância Anova de um fator não relacionado, seguida do teste de Tukey demonstrou que não houve diferença significativa nas viabilidades celulares dos arcabouços em relação ao controle negativo. Esse comportamento indica que a presença dos materiais não afetou significativamente as células presentes nas placas, já que este controle possuía apenas as células em meio de cultura e suas absorbâncias foram similares às com interação dos arcabouços ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos dos arcabouços, mas pelas porcentagens de viabilidade celular é possível observar a tendência de aumento da compatibilidade nos grupos contendo os três biomateriais, demonstrando potencial para futuros testes biológicos destes arcabouços.

Wang e colaboradores [106] também avaliaram o recobrimento de PDA, utilizando-o em arcabouços contendo alginato de sódio e fibroína da seda. O teste com MTT em células L929 demonstraram a resposta biocompatível do revestimento. Um estudo com hidrogéis contendo nanofibras de β -quitina modificadas com PDA e CHI demonstrou biocompatibilidade em células L929 [85]. Resultados similares foram encontrados por Sun, Khan e Sultana [104], que avaliaram a citotoxicidade de arcabouços contendo CHI e nanohidroxiapatita, obtendo uma média de 95% de viabilidade celular. Em seu estudo, Ryu e colaboradores [107] testaram a modificação da HA com PDA como um complexo de revestimento. Eles avaliaram a viabilidade destes materiais em meio a células pré-osteoblásticas, que tiveram caráter não citotóxico. Assim, diferentes fontes da literatura reforçam a característica biocompatível da combinação entre CHI, HA ou PDA. No presente trabalho, a interação dos três não interferiu em sua biocompatibilidade, indicando potencial para outras aplicações biológicas e sua utilização na engenharia tecidual óssea.

Abaixo, na Figura 28, estão detalhados os resultados de viabilidade celular (%) e o gráfico obtido pelo tratamento estatístico, seguido da Tabela 09, que contém as absorbâncias médias obtidas:

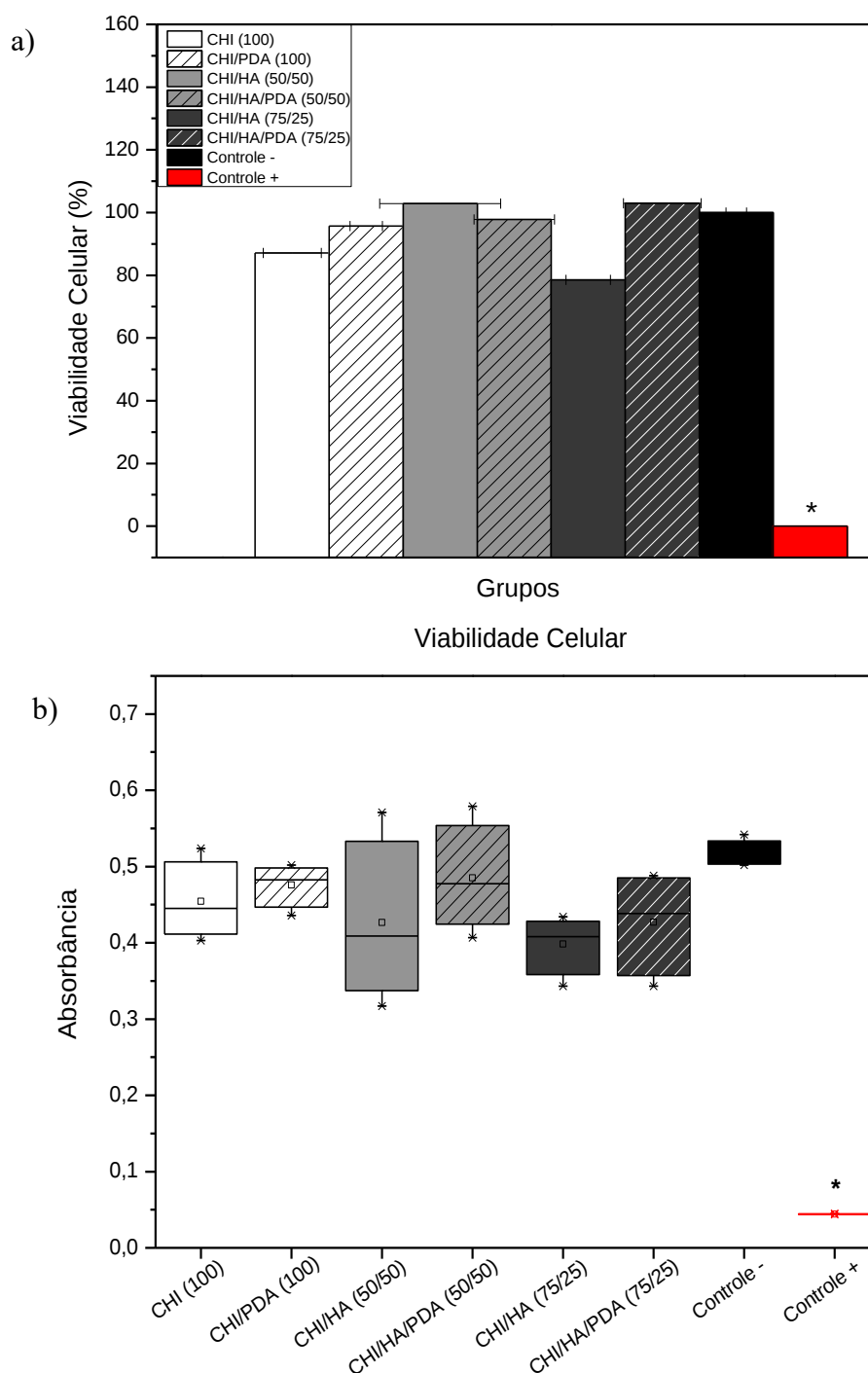


Figura 28: (a) Análise da viabilidade celular obtida em porcentagem, comparando-se os grupos aos controles. (b) Análise das absorbâncias ($\lambda = 570$ nm) dos grupos por Box Plot, evidenciando diferença significativa para o controle positivo em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Análise feita por ANOVA de um fator não relacionado seguida de teste de Tukey. Demais análises não demonstraram significância ($p > 0,05$).

Tabela 09: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos arcabouços.

Grupos	Viabilidade Celular (%)	Absorbância média	± DP
CHI (100)	87	0,45	0,04
CHI/PDA (100)	96	0,48	0,02
CHI/HA (50/50)	103	0,43	0,09
CHI/HA/PDA (50/50)	98	0,49	0,06
CHI/HA (75/25)	78	0,40	0,03
CHI/HA/PDA (75/25)	103	0,43	0,06
Controle -	100	0,52	0,02
Controle +	0	0,04	0

Legenda: Valores obtidos expressos por média e DP ($\pm$).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Através da metodologia utilizada, foi possível produzir arcabouços porosos 3D baseados em CHI e HA, modificados com revestimento de PDA. Após as análises de caracterização, evidenciou-se a interação dos polímeros com a HA. Eles exibiram potencial de resistência a cargas compressivas em áreas que não requerem alta descarga de peso. Os arcabouços apresentaram padrões heterogêneos de porosidade e sua superfície tornou-se mais rugosa com o aumento da concentração de PDA/tempo de recobrimento, o que pode influenciar na deposição e fixação das células do arcabouço em estudos futuros. Além disso, o grupo CHI/HA/PDA (75/25) apresentou poros esferoides interconectados com forma de canais longos (*gaps*). A combinação dos biomateriais controlou a taxa de degradação térmica e *in vitro* da CHI. Os arcabouços não demonstraram toxicidade significativa em células L929, apresentando comportamento similar ao controle negativo, que observa as células em meio de cultivo sem contato com amostras. Essas informações parecem ser favoráveis para a utilização deste material, nessas condições, para a engenharia tecidual óssea.

CAPÍTULO VII

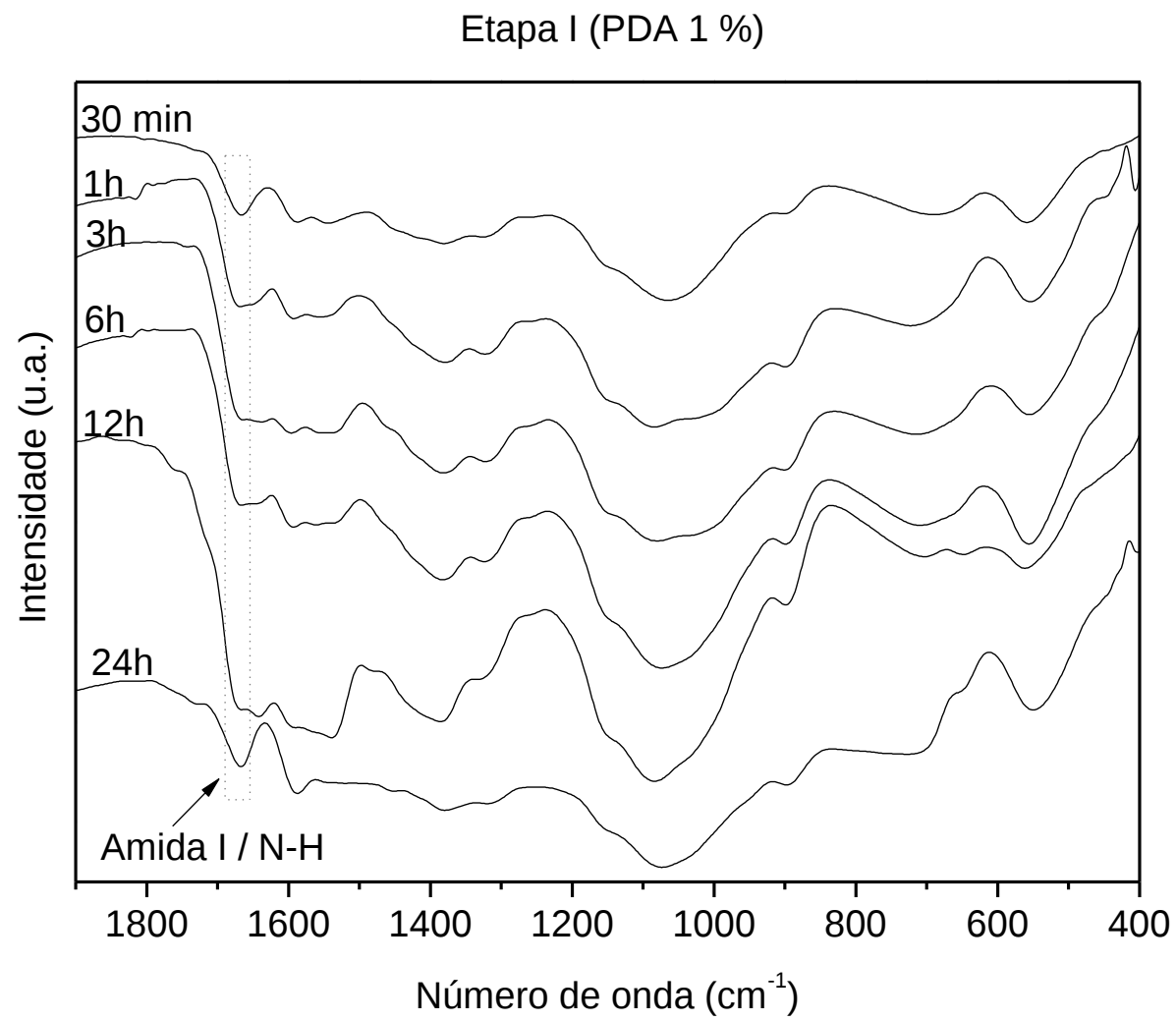
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

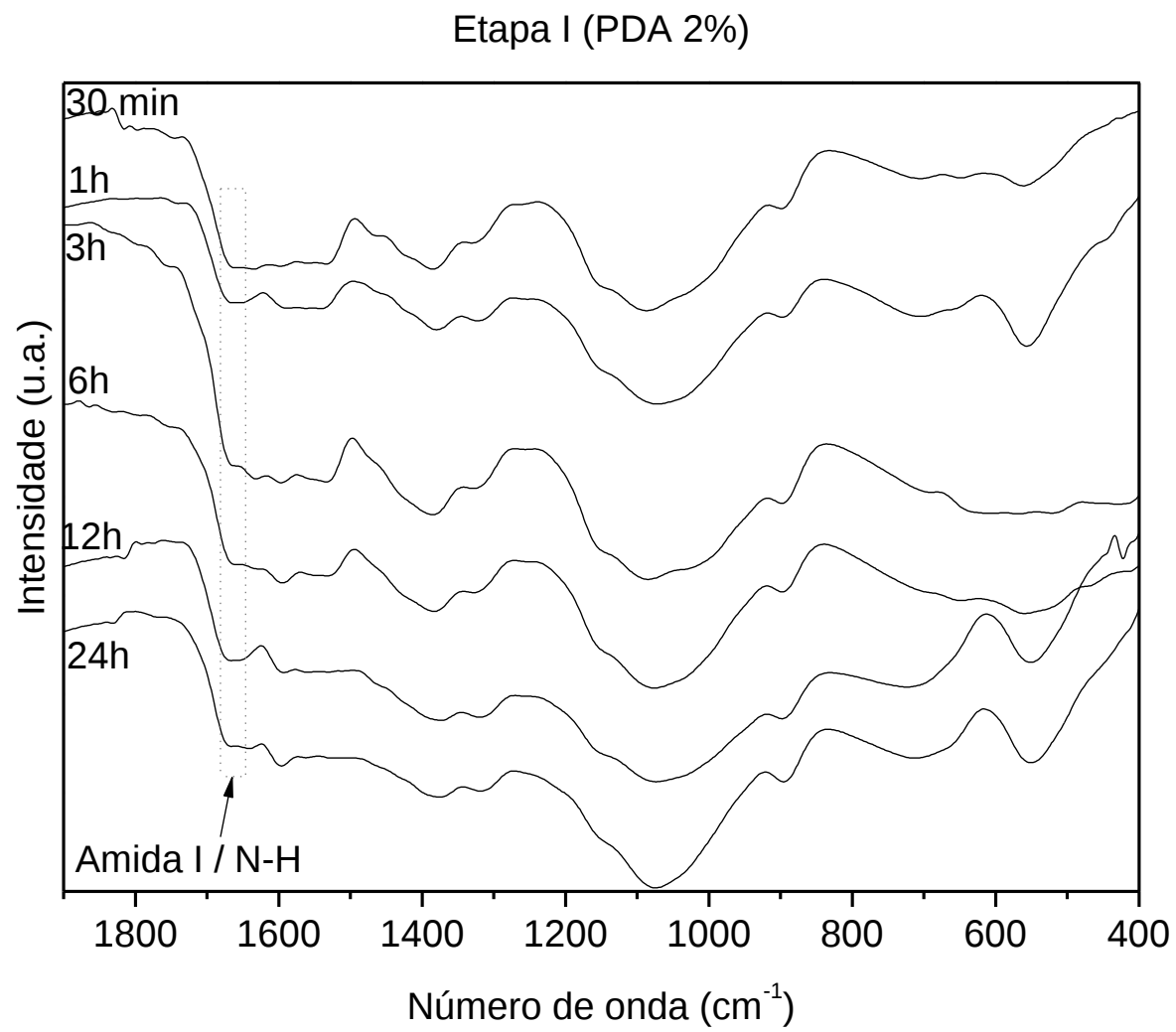
7. PERSPECTIVAS FUTURAS

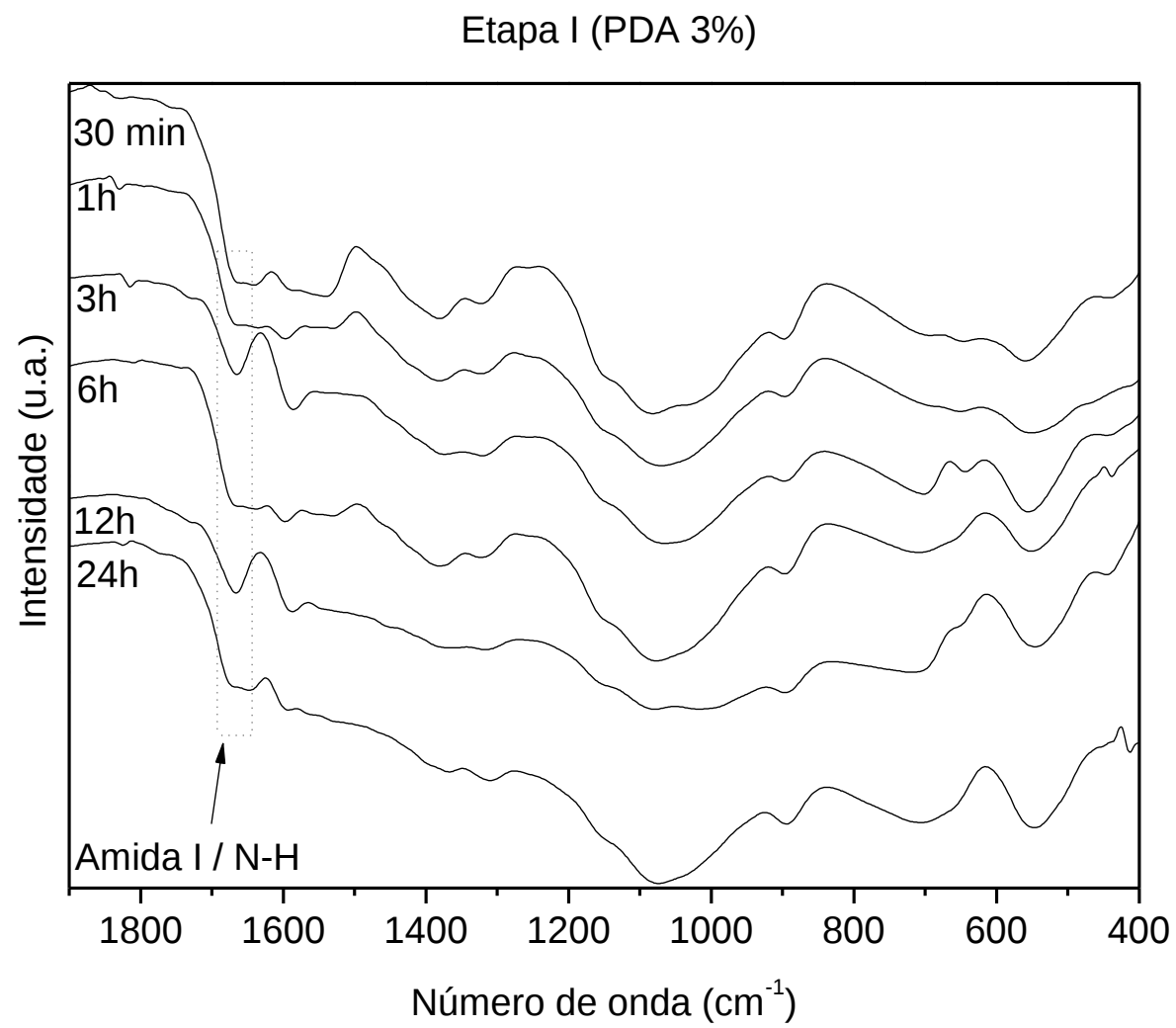
- Caracterizar por microtomografia computadorizada (μ CT) para comparação dos achados de porosidade;
- Investigar a biomineralização dos arcabouços 3D em meio simulado;
- Realizar testes biológicos *in vitro* de proliferação celular para os arcabouços produzidos;
- Avaliar com ensaios *in vivo* os arcabouços para análise histológica e comportamental.

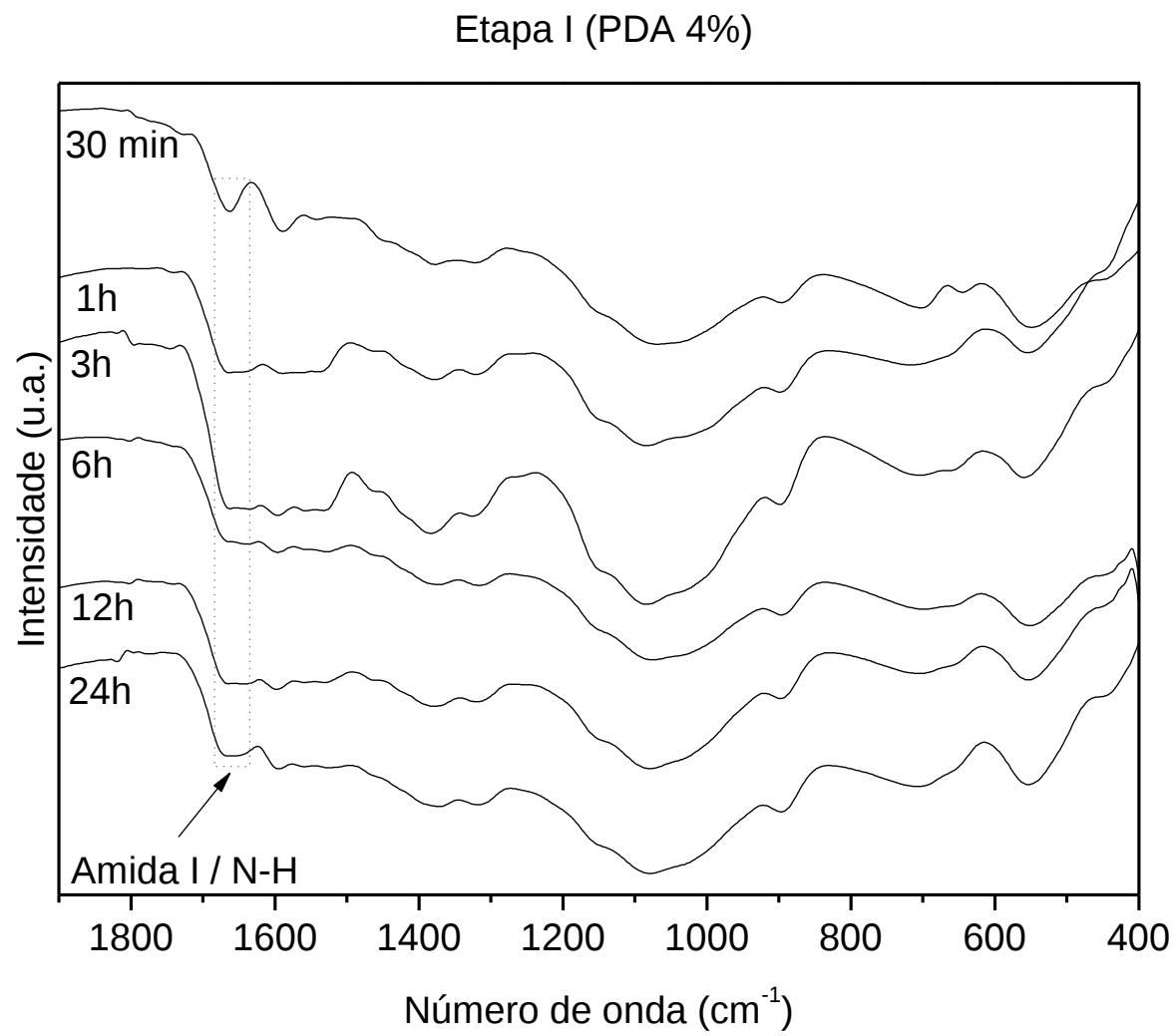
ANEXO SUPLEMENTAR

8. ANEXO SUPLEMENTAR









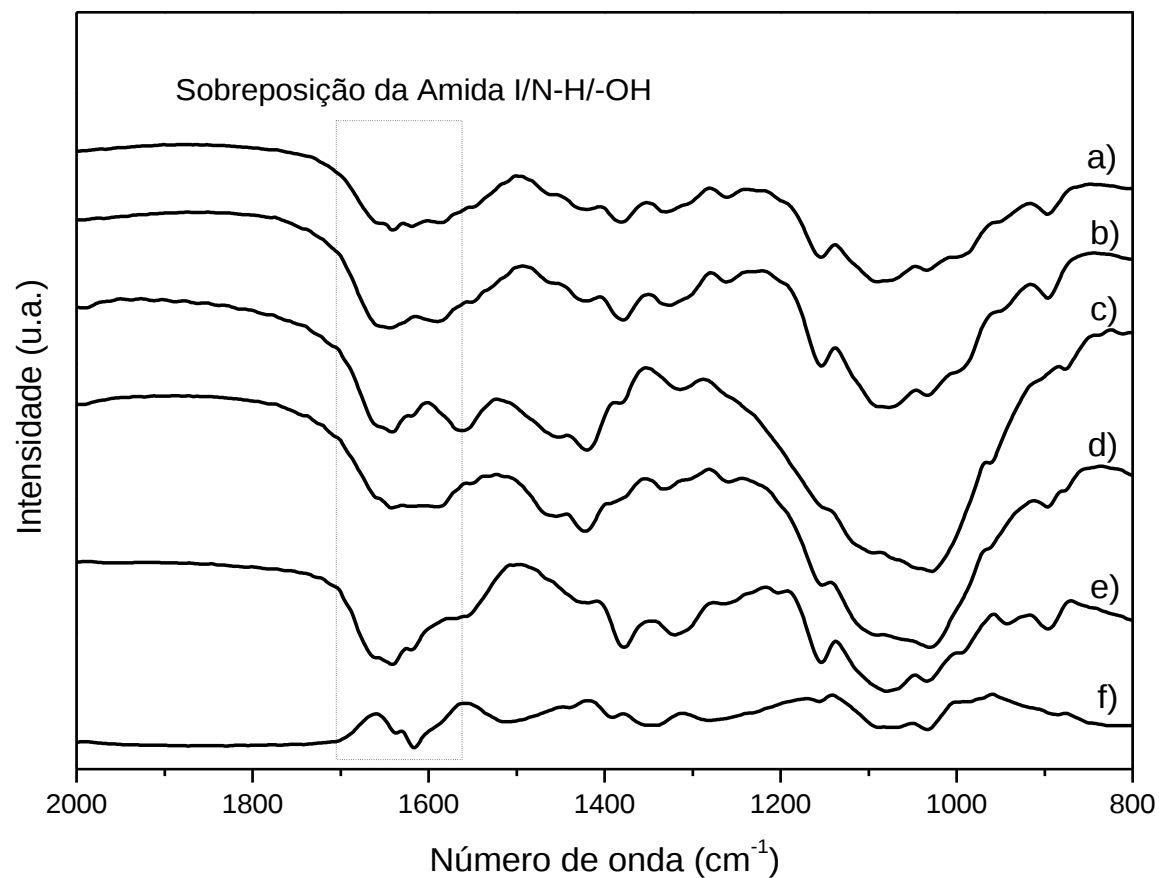


Figura S1: Espectros de FTIR com destaque às bandas de ligação dos materiais, da etapa I (1, 2, 3 e 4 % de PDA) e da etapa II, com os grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

Tabela S1: Regiões das bandas de absorção dos arcabouços (etapa II) e seus deslocamentos (Δ).

Etapa II	Amide I	N-H	OH	PO ₄ ³⁻	PO ₄ ³⁻
CHI (100)	1660	-	-	-	-
CHI/PDA (100)	1666	1590	-	-	-
CHI/HA (50/50)	1657	-	1657	605	565
CHI/HA/PDA (50/50)	1661	1590	1661	605	565
CHI/HA (75/25)	1664	-	1664	589	561
CHI/HA/PDA (75/25)	1660	1580	1660	589	565
Deslocamento (Δ)	Delta (Amide I)	Delta (N-H)	Delta (OH)	Delta (PO ₄ ³⁻)	Delta (PO ₄ ³⁻)
CHI (100) (Δ)	17	-26	-	-	-
CHI/PDA (100) (Δ)	23	-23	-	-	-
CHI/HA (50/50) (Δ)	14	-	17	3	-3
CHI/HA/PDA (50/50) (Δ)	18	-23	21	3	-3
CHI/HA (75/25) (Δ)	21	-	24	-13	-7
CHI/HA/PDA (75/25) (Δ)	17	-33	20	-13	-3

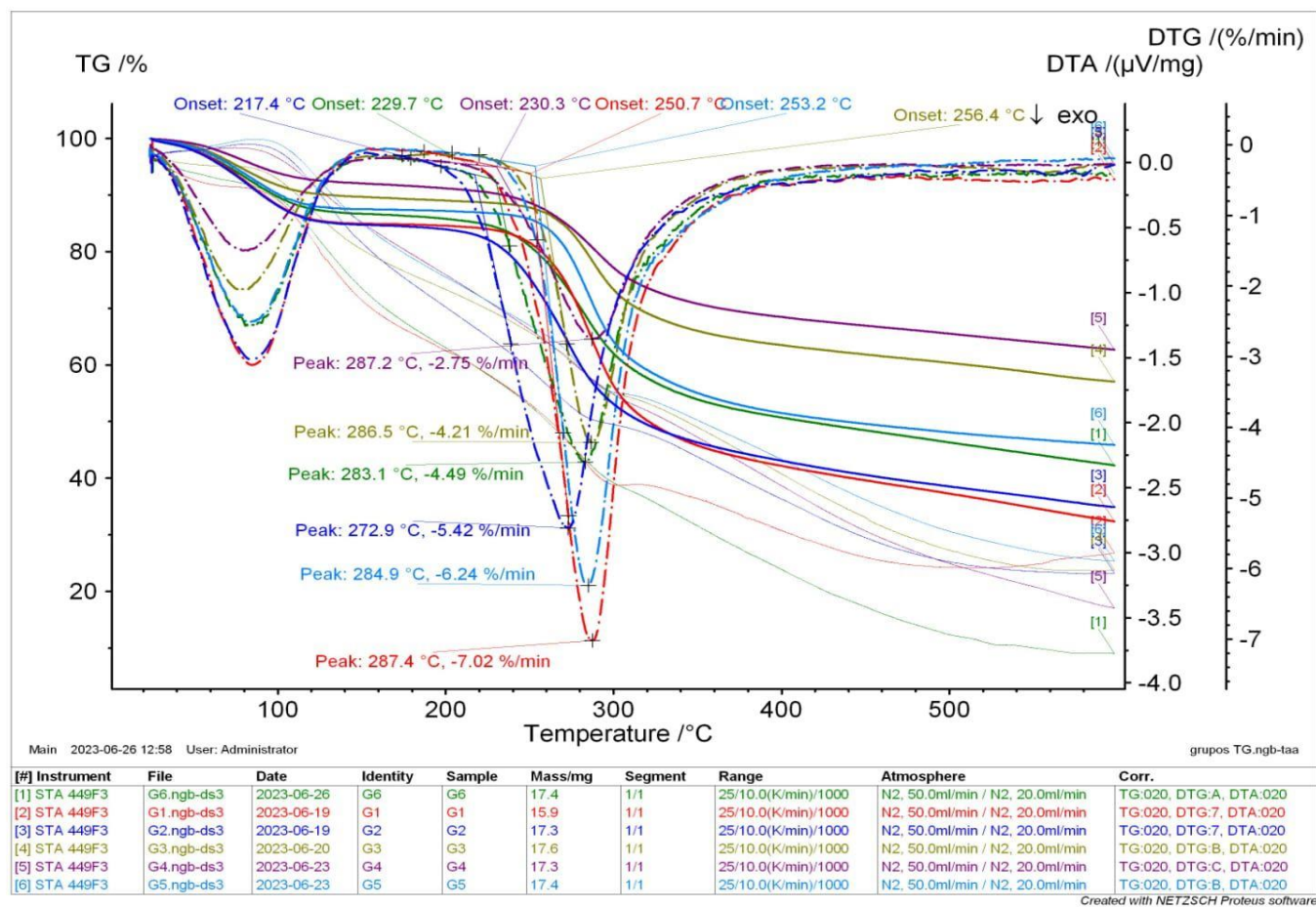


Figura S2: Análise termogravimétrica por TGA com picos do DTG dos grupos a) CHI (100), b) CHI/PDA (100), c) CHI/HA (50/50), d) CHI/HA/PDA (50/50), e) CHI/HA (75/25) e f) CHI/HA/PDA (75/25).

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. P. Francis, A. R. Augustus, S. Chandramohan, S. A. Bhat, V. V. Priya, e R. Rajagopalan, “A review on biomaterials-based scaffold: An emerging tool for bone tissue engineering”, *Mater Today Commun*, vol. 34, mar. 2023, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.105124.
- [2] P. Yuan *et al.*, “Effects of polylactic acid coating on properties of porous Zn scaffolds as degradable materials”, *Mater Charact*, vol. 199, maio 2023, doi: 10.1016/j.matchar.2023.112852.
- [3] L. R. Yadav, S. V. Chandran, K. Lavanya, e N. Selvamurugan, “Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering”, 31 de julho de 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215.
- [4] G. Iviglia, S. Kargozar, e F. Baino, “Biomaterials, current strategies, and novel nano-technological approaches for periodontal regeneration”, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/jfb10010003.
- [5] N. Yamamoto, K. Hayashi, e H. Tsuchiya, “Progress in biological reconstruction and enhanced bone revitalization for bone defects”, *Journal of Orthopaedic Science*, vol. 24, nº 3, p. 387–392, maio 2019, doi: 10.1016/j.jos.2019.01.015.
- [6] C. A. C. Zavaglia e M. H. Prado da Silva, “Feature Article: Biomaterials”, em *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-12-803581-8.04109-6.
- [7] Z. Meng *et al.*, “Biomimetic Polydopamine-Modified Silk Fibroin/Curcumin Nanofibrous Scaffolds for Chemo-photothermal Therapy of Bone Tumor”, *ACS Omega*, vol. 6, nº 34, p. 22213–22223, ago. 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c02903.
- [8] A. Kumar, K. C. Nune, L. E. Murr, e R. D. K. Misra, “Biocompatibility and mechanical behaviour of three-dimensional scaffolds for biomedical devices: Process-structure-property paradigm”, 1º de fevereiro de 2016, *Maney Publishing*. doi: 10.1080/09506608.2015.1128310.
- [9] M. Seidenstuecker *et al.*, “3D powder printed bioglass and β -tricalcium phosphate bone scaffolds”, *Materials*, vol. 11, nº 1, dez. 2017, doi: 10.3390/ma11010013.
- [10] R. J. Miron e D. D. Bosshardt, “OsteoMacs: Key players around bone biomaterials”, 1º de março de 2016, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.017.
- [11] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, e S. G. Kumbar, “Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering”, 1º de dezembro de 2016, *KeAi Communications Co*. doi: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001.
- [12] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, e E. Chiellini, “Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications”, 2011, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.

- [13] P. Ramasamy *et al.*, “Characterization of bioactive chitosan and sulfated chitosan from *Doryteuthis singhalensis* (Ortmann, 1891)”, *Int J Biol Macromol*, vol. 99, p. 682–691, jun. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.041.
- [14] N. Bhardwaj e S. C. Kundu, “Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends”, *Biomaterials*, vol. 33, n° 10, p. 2848–2857, abr. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.028.
- [15] D. Komoto, T. Furuike, e H. Tamura, “Preparation of polyelectrolyte complex gel of sodium alginate with chitosan using basic solution of chitosan”, *Int J Biol Macromol*, vol. 126, p. 54–59, abr. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.195.
- [16] V. Vyas, T. Kaur, e A. Thirugnanam, “Chitosan composite three dimensional macrospheric scaffolds for bone tissue engineering”, *Int J Biol Macromol*, vol. 104, p. 1946–1954, nov. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.055.
- [17] K. Balagangadharan, S. Dhivya, e N. Selvamurugan, “Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering”, 1º de novembro de 2017, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046.
- [18] H. Li, D. Yin, W. Li, Q. Tang, L. Zou, e Q. Peng, “Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy”, 1º de março de 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111502.
- [19] N. Patil, P. Naranjo, e B. Zappone, “Propiedades Adhesivas Húmedas de la Proteína del Pie de Mejillones Verdes Asiático (*Perna viridis*) Pvpf-5: Una Base Adhesiva Subacuática”, *NOVASINERGIA REVISTA DIGITAL DE CIENCIA, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA*, vol. 1, n° 2, p. 91–100, dez. 2018, doi: 10.37135/unach.ns.001.02.10.
- [20] P. Palladino, A. Britto, E. Pascale, M. Minunni, e S. Scarano, “Colorimetric determination of total protein content in serum based on the polydopamine/protein adsorption competition on microplates”, *Talanta*, vol. 198, p. 15–22, jun. 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.095.
- [21] Y. Z. Zhou, Y. Cao, W. Liu, C. H. Chu, e Q. L. Li, “Polydopamine-induced tooth remineralization”, *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 4, n° 12, p. 6901–6910, dez. 2012, doi: 10.1021/am302041b.
- [22] L. Han *et al.*, “Mussel-inspired hybrid coating functionalized porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 179, p. 470–478, jul. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.024.
- [23] W. B. Tsai, W. T. Chen, H. W. Chien, W. H. Kuo, e M. J. Wang, “Poly(dopamine) coating of scaffolds for articular cartilage tissue engineering”, *Acta Biomater*, vol. 7, n° 12, p. 4187–4194, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.024.
- [24] L. Jia *et al.*, “Polydopamine-assisted surface modification for orthopaedic implants”, 1º de abril de 2019, *Elsevier (Singapore) Pte Ltd.* doi: 10.1016/j.jot.2019.04.001.
- [25] B. S. Gholizadeh, F. Buazar, S. M. Hosseini, e S. M. Mousavi, “Enhanced antibacterial activity, mechanical and physical properties of alginate/hydroxyapatite bionanocomposite film”, *Int J Biol Macromol*, vol. 116, p. 786–792, set. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.104.

- [26] M. F. Vassal, J. Nunes-Pereira, S. P. Miguel, I. J. Correia, e A. P. Silva, “Microstructural, mechanical and biological properties of hydroxyapatite - CaZrO₃ biocomposites”, *Ceram Int*, vol. 45, n° 7, p. 8195–8203, maio 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.01.122.
- [27] A. Gomez Sanchez *et al.*, “Chitosan-hydroxyapatite nanocomposites: Effect of interfacial layer on mechanical and dielectric properties”, *Mater Chem Phys*, vol. 217, p. 151–159, set. 2018, doi: 10.1016/j.matchemphys.2018.06.062.
- [28] Y. W. Chen *et al.*, “Osteogenic and angiogenic potentials of the cell-laden hydrogel/mussel-inspired calcium silicate complex hierarchical porous scaffold fabricated by 3D bioprinting”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 91, p. 679–687, out. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.06.005.
- [29] D. B. Burr e M. R. (Professor of anatomy and cell biology) Allen, *Basic and applied bone biology*, 2 ed., Elsevier. 2019.
- [30] Y. Esmaeili *et al.*, “Exploring the evolution of tissue engineering strategies over the past decade: From cell-based strategies to gene-activated matrix”, 15 de outubro de 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.aej.2023.08.080.
- [31] A. Oryan, S. Alidadi, A. Bigham-Sadegh, e A. Moshiri, “Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study”, *J Mater Sci Mater Med*, vol. 27, n° 10, out. 2016, doi: 10.1007/s10856-016-5766-6.
- [32] M. Fu, C. Yang, e G. Sun, “Recent advances in immunomodulatory hydrogels biomaterials for bone tissue regeneration”, 1º de novembro de 2023, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.molimm.2023.09.010.
- [33] C. K. Mayfield, M. Ayad, E. Lechtholz-Zey, Y. Chen, e J. R. Lieberman, “3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions”, 1º de novembro de 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/bioengineering9110680.
- [34] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, e M. J. Gardner, “Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives”, 1º de abril de 2018, *Springer-Verlag France*. doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.
- [35] R. Langer e J. P. Vacanti, “Tissue Engineering”, *Science (1979)*, vol. 260, p. 920–926, 1993, [Online]. Disponível em: www.sciencemag.org
- [36] N. Celikkin, C. Rinoldi, M. Costantini, M. Trombetta, A. Rainer, e W. Świążzkowski, “Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications”, 1º de setembro de 2017, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.msec.2017.04.016.
- [37] M. Chelu e A. M. Musuc, “Advanced Biomedical Applications of Multifunctional Natural and Synthetic Biomaterials”, 1º de setembro de 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/pr11092696.
- [38] J. Huang e Z. X. Guo, “Biomechanical and biochemical compatibility in innovative biomaterials”, em *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*, Elsevier, 2012, p. 37–61. doi: 10.1533/9780857096456.1.37.

- [39] F. Kuchakzadeh, J. Ai, e S. Ebrahimi-Barough, “Tissue engineering and stem cell-based therapeutic strategies for premature ovarian insufficiency”, 1º de março de 2024, *Japanese Society of Regenerative Medicine*. doi: 10.1016/j.reth.2023.11.007.
- [40] A. Arias-Betancur, N. Badilla-Wenzel, Á. Astete-Sanhueza, N. Farfán-Beltrán, e F. J. Dias, “Carrier systems for bone morphogenetic proteins: An overview of biomaterials used for dentoalveolar and maxillofacial bone regeneration”, 1º de novembro de 2022, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.10.001.
- [41] S. Bose, M. Roy, e A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds”, outubro de 2012. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
- [42] L. S. de A. F. Oliveira, C. S. Oliveira, A. P. L. Machado, e F. P. Rosa, “Biomaterials for bone regeneration-Methods of analyses and future perspectives”, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, vol. 9, nº 1, p. 37–44, 2010.
- [43] H. A. Kim e B. K. Kim, “Synthesis and properties of waterborne polyurethane/hydroxyapatite chemical hybrids”, *Prog Org Coat*, vol. 128, p. 69–74, mar. 2019, doi: 10.1016/j.porgcoat.2018.12.009.
- [44] P. Gupta, S. Sharma, S. Jabin, e S. Jadoun, “Chitosan nanocomposite for tissue engineering and regenerative medicine: A review”, 1º de janeiro de 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127660.
- [45] A. S. de Azevedo, M. J. C. de Sá, M. V. L. Fook, P. I. da N. Neto, O. B. de Sousa, e S. S. de Azevedo, “Hydroxyapatite and chitosan isolated and associated with bone marrow in repair of bone tissue in rabbits. Histological and morfometric study”, *Ciência Rural*, vol. 43, p. 1265–1270, 2013.
- [46] H. Liu, K. Nakagawa, D. Chaudhary, Y. Asakuma, e M. O. Tadé, “Freeze-dried macroporous foam prepared from chitosan/xanthan gum/montmorillonite nanocomposites”, *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 89, nº 11, p. 2356–2364, nov. 2011, doi: 10.1016/j.cherd.2011.02.023.
- [47] M. Z. Bellini, P. de Oliva-Neto, e Â. M. Moraes, “Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 58, nº 2, p. 289–299, 2015, doi: 10.1590/S1516-8913201500305.
- [48] Y. Liu, K. Ai, e L. Lu, “Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields”, 14 de maio de 2014, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/cr400407a.
- [49] Z. Yang *et al.*, “Biomimetic composite scaffolds based on surface modification of polydopamine on electrospun poly(lactic acid)/cellulose nanofibrils”, *Carbohydr Polym*, vol. 174, p. 750–759, out. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.010.
- [50] J. Dai *et al.*, “A rational design of separator with substantially enhanced thermal features for lithium-ion batteries by the polydopamine-ceramic composite modification of polyolefin membranes”, *Energy Environ Sci*, vol. 9, nº 10, p. 3252–3261, out. 2016, doi: 10.1039/c6ee01219a.
- [51] M. D’Ischia, A. Napolitano, V. Ball, C. T. Chen, e M. J. Buehler, “Polydopamine and eumelanin: From structure-property relationships to a unified tailoring

- strategy”, *Acc Chem Res*, vol. 47, nº 12, p. 3541–3550, dez. 2014, doi: 10.1021/ar500273y.
- [52] S. Gao *et al.*, “Advances and opportunities of polydopamine coating in biosensing: Preparation, functionality, and applications”, 15 de fevereiro de 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ccr.2023.215564.
- [53] V. Trakoolwannachai, P. Kheolamai, e S. Ummartyotin, “Characterization of hydroxyapatite from eggshell waste and polycaprolactone (PCL) composite for scaffold material”, *Compos B Eng*, vol. 173, set. 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2019.106974.
- [54] S. Chen, Y. Shi, Y. Luo, e J. Ma, “Layer-by-layer coated porous 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug delivery”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 179, p. 121–127, jul. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.063.
- [55] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeateau, e L. Berzina-Cimdina, “Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review”, *J Funct Biomater*, vol. 6, nº 4, p. 1099–1140, dez. 2015, doi: 10.3390/jfb6041099.
- [56] M. F. Cipreste *et al.*, “Synthesis and characterization of ^{159}Gd -doped hydroxyapatite nanorods for bioapplications as theranostic systems”, *Mater Chem Phys*, vol. 181, p. 301–311, set. 2016, doi: 10.1016/j.matchemphys.2016.06.063.
- [57] A. C. S. Dantas, D. H. Scalabrin, R. De Farias, A. A. Barbosa, A. V. Ferraz, e C. Wirth, “Design of Highly Porous Hydroxyapatite Scaffolds by Conversion of 3D Printed Gypsum Structures - A Comparison Study”, em *Procedia CIRP*, Elsevier B.V., 2016, p. 55–60. doi: 10.1016/j.procir.2015.07.030.
- [58] C. Sharma, A. K. Dinda, P. D. Potdar, C. F. Chou, e N. C. Mishra, “Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 64, p. 416–427, jul. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.03.060.
- [59] Y. Gwon, S. Park, W. Kim, T. Han, H. Kim, e J. Kim, “Radially patterned transplantable biodegradable scaffolds as topographically defined contact guidance platforms for accelerating bone regeneration”, *J Biol Eng*, vol. 15, nº 1, dez. 2021, doi: 10.1186/s13036-021-00263-8.
- [60] C. Y. Goh, S. S. Lim, K. Y. Tshai, A. W. Z. Z. El Azab, e H. S. Loh, “Fabrication and in vitro biocompatibility of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan–hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration”, *J Mater Sci*, vol. 54, nº 4, p. 3403–3420, fev. 2019, doi: 10.1007/s10853-018-3087-5.
- [61] S. Chen, Y. Shi, X. Zhang, e J. Ma, “3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties”, *Ceram Int*, vol. 45, nº 8, p. 10991–10996, jun. 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.02.182.
- [62] M. Wu, T. Wang, L. Müller, e F. A. Müller, “Adjustable synthesis of polydopamine nanospheres and their nucleation and growth”, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 603, out. 2020, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.125196.

- [63] X. Zhao *et al.*, “BMP-2 immobilized PLGA/hydroxyapatite fibrous scaffold via polydopamine stimulates osteoblast growth”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, p. 658–666, set. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.186.
- [64] C. J. Houk, F. O. Beltran, e M. A. Grunlan, “Suitability of EtO sterilization for polydopamine-coated, self-fitting bone scaffolds”, *Polym Degrad Stab*, vol. 194, dez. 2021, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2021.109763.
- [65] B. H. Huang *et al.*, “Electrophoretic fabrication of a robust chitosan/polyethylene glycol/polydopamine composite film for UV-shielding application”, *Carbohydr Polym*, vol. 273, dez. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118560.
- [66] J. H. Ryu, P. B. Messersmith, e H. Lee, “Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery”, 7 de março de 2018, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsami.7b19865.
- [67] X. Li *et al.*, “Polydopamine-Assisted Anchor of Chitosan onto Porous Composite Scaffolds for Accelerating Bone Regeneration”, *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00209.
- [68] S. Dimassi *et al.*, “Polydopamine treatment of chitosan nanofibers for the conception of osteoinductive scaffolds for bone reconstruction”, *Carbohydr Polym*, vol. 276, jan. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118774.
- [69] L. Zhu *et al.*, “3D poly (L-lactide)/chitosan micro/nano fibrous scaffolds functionalized with quercetin-polydopamine for enhanced osteogenic and anti-inflammatory activities”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 391, jul. 2020, doi: 10.1016/j.cej.2019.123524.
- [70] S. Hu, J. Wu, Z. Cui, J. Si, Q. Wang, e X. Peng, “Study on the mechanical and thermal properties of polylactic acid/hydroxyapatite@polydopamine composite nanofibers for tissue engineering”, *J Appl Polym Sci*, vol. 137, nº 36, set. 2020, doi: 10.1002/app.49077.
- [71] F. B. Simões, L. M. da Silva, T. O. Fonseca, L. E. Almeida, e E. A. dos Santos, “Isolated effects of microwave radiation on the solid-liquid interface reactions between hydroxyapatite nanocrystals and silver ions”, *Ceram Int*, vol. 44, nº 14, p. 16960–16971, out. 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2018.06.137.
- [72] G. B. Brito *et al.*, “Development of chitosan-based oleogels via crosslinking with vanillin using an emulsion templated approach: Structural characterization and their application as fat-replacer”, *Food Structure*, vol. 32, abr. 2022, doi: 10.1016/j.foostr.2022.100264.
- [73] H. J. Cox, J. Li, P. Saini, J. R. Paterson, G. J. Sharples, e J. P. S. Badyal, “Bioinspired and eco-friendly high efficacy cinnamaldehyde antibacterial surfaces”, *J Mater Chem B*, vol. 9, nº 12, p. 2918–2930, mar. 2021, doi: 10.1039/d0tb02379e.
- [74] T. Tarhan, Ö. Şen, M. E. Ciofani, D. Yılmaz, e M. Çulha, “Synthesis and characterization of silver nanoparticles decorated polydopamine coated hexagonal boron nitride and its effect on wound healing”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 67, set. 2021, doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126774.

- [75] N. Li, X. Ji, B. Wang, Y. Guo, C. Wang, e Y. Chen, “Functional composite hydrogels entrapping polydopamine hollow nanoparticles for highly efficient resistance of skin penetration and photoprotection”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 128, set. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112346.
- [76] M. Rahatuzzaman, M. Mahmud, S. Rahman, e M. E. Hoque, “Design, fabrication, and characterization of 3D-printed ABS and PLA scaffolds potentially for tissue engineering”, *Results in Engineering*, p. 101685, dez. 2023, doi: 10.1016/j.rineng.2023.101685.
- [77] Y. Xu, D. Xia, J. Han, S. Yuan, H. Lin, e C. Zhao, “Design and fabrication of porous chitosan scaffolds with tunable structures and mechanical properties”, *Carbohydr Polym*, vol. 177, p. 210–216, dez. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.069.
- [78] E. Ryan e S. Yin, “Compressive strength of β -TCP scaffolds fabricated via lithography-based manufacturing for bone tissue engineering”, *Ceram Int*, vol. 48, n° 11, p. 15516–15524, jun. 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2022.02.085.
- [79] G. Carvalho, Y. Almeida, K. Alves, J. Farias, V. Simões, e A. Braga, “View of Avaliação estrutural e morfológica da hidroxiapatita sintetizada por pechini Structural and morphological evaluation of hydroxyapatite synthesized by pechini”, *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, p. 71812–71821, 2020.
- [80] F. Aslan, D. Baybaş, e U. Ulusoy, “Lignin grafted hydroxyapatite entrapped in polyacrylamide: Characterization and adsorptive features for Th4+ and bovine serum albumin”, *Int J Biol Macromol*, vol. 204, p. 333–344, abr. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.200.
- [81] C. Y. Beh *et al.*, “Low frequency dielectric and optical behavior on physicochemical properties of hydroxyapatite/cornstarch composite”, *J Colloid Interface Sci*, vol. 600, p. 187–198, out. 2021, doi: 10.1016/j.jcis.2021.03.158.
- [82] O. keltoum Kribaa, S. Latif, F. Saifi, e N. Chahbaoui, “Elaboration and chemical characterization of a composite material based on hydroxyapatite/polyethylene”, em *Materials Today: Proceedings*, Elsevier Ltd, 2020, p. 1017–1022. doi: 10.1016/j.matpr.2021.08.120.
- [83] S. Brahimi *et al.*, “Preparation and characterization of biocomposites based on chitosan and biomimetic hydroxyapatite derived from natural phosphate rocks”, *Mater Chem Phys*, vol. 276, jan. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2021.125421.
- [84] Y. W. Ge *et al.*, “Nacre-inspired magnetically oriented micro-cellulose fibres/nano-hydroxyapatite/chitosan layered scaffold enhances pro-osteogenesis and angiogenesis”, *Mater Today Bio*, vol. 16, dez. 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100439.
- [85] M. Wu *et al.*, “Study of polydopamine-modified β -chitin nanofiber hydrogels for full-thickness wound healing”, *Eur Polym J*, vol. 183, jan. 2023, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111758.
- [86] K. F. Leong, C. M. Cheah, e C. K. Chua, “Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs”, *Biomaterials*, vol. 24, n° 13, p. 2363–2378, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00030-9.

- [87] S. Shemshad, S. Kamali, A. Khavandi, e S. Azari, “Synthesis, characterization and in-vitro behavior of natural chitosan-hydroxyapatite-diopside nanocomposite scaffold for bone tissue engineering”, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 68, nº 9, p. 516–526, jun. 2019, doi: 10.1080/00914037.2018.1466138.
- [88] F. A. M. M. Gonçalves, A. C. Fonseca, M. Domingos, A. Gloria, A. C. Serra, e J. F. J. Coelho, “The potential of unsaturated polyesters in biomedicine and tissue engineering: Synthesis, structure-properties relationships and additive manufacturing”, 1º de maio de 2017, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.progpolymsci.2016.12.008.
- [89] M. Q. Cheng *et al.*, “A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration”, *Sci Rep*, vol. 6, abr. 2016, doi: 10.1038/srep24134.
- [90] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, e N. T. Nguyen, “Porous scaffolds for bone regeneration”, 1º de março de 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
- [91] J. Becerra, M. Rodriguez, D. Leal, K. Noris-Suarez, e G. Gonzalez, “Chitosan-collagen-hydroxyapatite membranes for tissue engineering”, *J Mater Sci Mater Med*, vol. 33, nº 2, fev. 2022, doi: 10.1007/s10856-022-06643-w.
- [92] Y. W. Chen *et al.*, “Osteogenic and angiogenic potentials of the cell-laden hydrogel/mussel-inspired calcium silicate complex hierarchical porous scaffold fabricated by 3D bioprinting”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 91, p. 679–687, out. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.06.005.
- [93] M. Sadat-Shojai, M. Atai, A. Nodehi, e L. N. Khanlar, “Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application”, *Dental Materials*, vol. 26, nº 5, p. 471–482, maio 2010, doi: 10.1016/j.dental.2010.01.005.
- [94] L. Fan, H. Liu, C. Gao, e P. Zhu, “Facile synthesis and characterization of magnetic hydroxyapatite/Fe₃O₄ microspheres”, *Mater Lett*, vol. 313, abr. 2022, doi: 10.1016/j.matlet.2022.131648.
- [95] A. Sadeghianmaryan *et al.*, “Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration”, *Int J Biol Macromol*, vol. 204, p. 62–75, abr. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.201.
- [96] F. S. Pereira, S. Lanfredi, E. R. P. González, D. L. da Silva Agostini, H. M. Gomes, e R. dos Santos Medeiros, “Thermal and morphological study of chitosan metal complexes”, *J Therm Anal Calorim*, vol. 129, nº 1, p. 291–301, jul. 2017, doi: 10.1007/s10973-017-6146-2.
- [97] I. Dziedzic e A. Kertmen, “Methods of Chitosan Identification: History and Trends”, 30 de dezembro de 2023, *AMG Transcend Association*. doi: 10.33263/LIANBS124.094.
- [98] C. Mu, L. Zhang, X. Zhang, L. Zhong, e Y. Li, “Selective adsorption of Ag (I) from aqueous solutions using Chitosan/polydopamine@C@magnetic fly ash adsorbent beads”, *J Hazard Mater*, vol. 381, jan. 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.120943.

- [99] I. Dziedzic e A. Kertmen, “Methods of Chitosan Identification: History and Trends”, 30 de dezembro de 2023, *AMG Transcend Association*. doi: 10.33263/LIANBS124.094.
- [100] F. S. Pereira, S. Lanfredi, E. R. P. González, D. L. da Silva Agostini, H. M. Gomes, e R. dos Santos Medeiros, “Thermal and morphological study of chitosan metal complexes”, *J Therm Anal Calorim*, vol. 129, nº 1, p. 291–301, jul. 2017, doi: 10.1007/s10973-017-6146-2.
- [101] K. G. Malollari *et al.*, “Mechanical Enhancement of Bioinspired Polydopamine Nanocoatings”, *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 11, nº 46, p. 43599–43607, nov. 2019, doi: 10.1021/acsami.9b15740.
- [102] Y. Liu, Y. Cai, X. Jiang, J. Wu, e X. Le, “Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films”, *Food Hydrocoll*, vol. 52, p. 564–572, jan. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.08.005.
- [103] H. Iqbal *et al.*, “Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 160, p. 553–563, dez. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.059.
- [104] T. Sun, T. H. Khan, e N. Sultana, “Fabrication and in vitro evaluation of nanosized hydroxyapatite/chitosan- based tissue engineering scaffolds”, *J Nanomater*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/194680.
- [105] Y. A. De Almeida, D. F. Bispo, M. M. Montalvão, K. O. Mota, C. B. Corrêa, e I. F. Gimenez, “Effect of preparation additives on the antimicrobial activity and cytotoxicity of polypyrrole”, *J Braz Chem Soc*, vol. 32, nº 6, p. 1203–1212, 2021, doi: 10.21577/0103-5053.20210021.
- [106] Y. Wang *et al.*, “Fabrication, characterization and potential application of biodegradable polydopamine-modified scaffolds based on natural macromolecules”, *Int J Biol Macromol*, vol. 253, dez. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126596.
- [107] J. Ryu, S. H. Ku, H. Lee, e C. B. Park, “Mussel-inspired polydopamine coating as a universal route to hydroxyapatite crystallization”, *Adv Funct Mater*, vol. 20, nº 13, p. 2132–2139, jul. 2010, doi: 10.1002/adfm.200902347.