

Obtenção e caracterização de esferas de quitosana/hidroxiapatita gerada *in situ*

M. J. L. Dantas*, T. B. Fidèles, R. G. Carrodegas, M. V. L. Fook

Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande
Aprígio Veloso 882, Bodocongó, Campina Grande, PB – CEP 58429 – 900

(Recebido em 06/01/2016; revisado em 23/02/2016; aceito em 25/02/2016)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

O objetivo do trabalho foi produzir esferas de quitosana-hidroxiapatita *in situ* (CS-HA) com diferentes conteúdos de HA e avaliar suas propriedades e comportamento *in vitro*. Foram obtidas esferas de CS contendo diferentes quantidades de HA de baixa cristalinidade (20, 50 e 70 % m/m). A HA foi gerada *in situ* no interior das esferas de CS. Para isso foi precipitado CaHPO₄ numa dissolução de CS e a suspensão resultante foi conformada na forma de esferas mediante gotejamento em dissolução de Na₅P₃O₁₀ (TPP) com pH 8-9. As esferas precipitadas foram mantidas sob agitação constante na solução de TPP e, posteriormente liofilizada. A caracterização foi realizada mediante microscopia ótica (MO), difração de raios X (DRX), análises termogravimétrica (TG), e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir dos resultados verificou-se que a metodologia foi aplicada foi eficaz na produção das esferas e se conseguiu gerar uma fase inorgânica precursora de HÁ.

Palavras-chave: Quitosana; hidroxiapatita; esferas de quitosana.

Abstract:

The objective was to produce spheres of chitosan-hydroxyapatite *in situ* (CS-HA) HA with different contents and evaluate their properties and behavior *in vitro*. CS levels were obtained containing different amounts of HA low crystallinity (20, 50 and 70% w / w). The HA was generated *in situ* within the CS spheres. To this precipitate was dissolved in CS CaHPO₄ and the resulting suspension was shaped in the form of spheres by dripping in dissolution Na₅P₃O₁₀ (TPP) at pH 8-9. The precipitated spheres were kept under constant stirring solution of the TPP and then lyophilized. The characterization was carried out by optical microscopy (OM), X-ray diffraction (XRD), thermal gravimetric analysis (TG) and scanning electron microscopy (SEM). From the results it was verified that the methodology was applied it was effective in producing the spheres and be able to generate a phase inorganic HA precursor.

Keywords: Chitosan; hydroxyapatite; chitosan spheres.

1. Introdução

Inserido na vasta área dos biopolímeros, a quitosana é um material, com características tecnológicas e econômicas relevantes, possuindo propriedades biológicas adequadas como: biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade, além de ser atóxico e produzido por fontes naturais e renováveis. A biodegradabilidade é devido à metabolização da quitosana por algumas enzimas humanas, como por exemplo, a lisozima. Essa propriedade condiz com um dos requisitos primários de um processo de biodegradação, que é ser susceptível a uma reação de hidrólise enzimática [1-4].

A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição [5]. Ela é um polissacarídeo formado por uma cadeia linear, composto por unidades repetitivas do tipo β (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxi-D-glucosamina e β (1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina, sendo encontrada na natureza em pequenas quantidades em muitos tipos de fungos, compõe-se de dois tipos de estruturas unidades distribuídas

aleatoriamente (distribuição Bernoulli) ao longo da cadeia: N-acetil-D-glucosamina (A) e D-glucosamina (D), ligadas entre si por ligações β do tipo glicosídicas (1 \rightarrow 4). Na sua forma semicristalina, CS é normalmente insolúvel em soluções aquosas neutras, mas solúvel em soluções ácidas diluídas (pH <6,0), onde os íons H⁺ livres no sistema se ligam ao grupo amino (-NH₂) deixando os protonados, diminuindo as ligações inter e intramoleculares. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos (-NH₂) é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações [5-7].

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas três décadas, e vão desde o simples uso como excipientes para a indústria farmacêutica até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas. Testes clínicos foram realizados a fim de verificar que biomateriais baseados em quitosana não demonstram qualquer inflamação ou reação alérgica seguida de implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano [7,8].

*Email: jucelia.lima@hotmail.com (M. J. L. Dantas)

A hidroxiapatita é uma biocerâmica, pertencente à classe dos fosfatos de cálcio e apresenta semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos [9]. Possui vantagens como a sua composição uniforme, biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável [10]. Atualmente as aplicações da HA focam-se principalmente em situações em que há a necessidade de um aumento ósseo (reconstruções maxilo-faciais ou aplicações dentárias). Nestas situações a HA atua como suporte, promovendo o rápido preenchimento das cavidades com um novo osso fazendo parte da estrutura óssea originada e reduzindo consideravelmente os tempos de recuperação quando comparados a situações nas quais não é usada como preenchimento ósseo. São utilizadas também no preenchimento de defeitos ósseos resultantes da remoção de vastas áreas de osso (remoção de câncros ósseos e defeitos decorrentes de traumas ou acidentes). No tratamento de tumores ósseos, a hidroxiapatita vem sendo utilizada como suporte de ação prolongada associada a fármacos anticancerígenos. Essa união permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual dos fármacos *in situ*. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente [11]

A incorporação de fosfato de cálcio numa matriz polimérica tem contribuído para a obtenção de compósitos que combinam a flexibilidade dos polímeros com a resistência, a dureza e a bioatividade da fase inorgânica. Tais características garantem uma maior estabilidade ao material quando em contato com o plasma humano, além de desenvolver uma maior interação com o tecido ósseo [12]. Polímeros biodegradáveis e cerâmicas bioativas são combinados numa grande variedade de materiais compósitos para serem usados na substituição e regeneração do tecido ósseo [13,14]

No caso do presente trabalho que têm como matéria principal a quitosana é necessário combina-la a outro material, tendo em vista que a quitosana é flexível, mas não possui característica mecânica capaz de suportar as cargas de forma semelhante ao osso natural, sendo assim, a adição de materiais cerâmicos melhora sua capacidade de contribuir no reparo de defeitos ósseos. Neste sentido, os materiais de fosfato de cálcio são osteocondutores, alguns osteoindutores, e mimetizam a porção inorgânica do osso natural, justificando a associação da quitosana e hidroxiapatita no sentido de proporcionar características estruturais e funcionais mais próximas do tecido ósseo. Diante disso, este trabalho tem como objetivo produzir esferas de quitosana combinadas com hidroxiapatita gerada *in situ*, em diferentes concentrações, por meio do método da geleificação ionotrópica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande –

UFPG. Foram utilizadas as seguintes matérias-primas: Quitosana em pó que possui grau de desacetilação entre 75-85 %, adquirida pela Sigma Aldrich®; Ácido acético glacial P.A. Vetec®; Hidróxido de Sódio P.A.; Tripolifosfato de Sódio – TPP; Tampão Fosfato Salino - PBS P.A.; Acetato de Cálcio; Fosfato de Sódio e Gelatina todos Sigma Aldrich®.

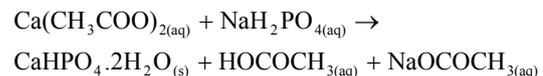
2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção das esferas de quitosana-hidroxiapatita (CS/HA).

A quitosana em pó foi dissolvida em uma solução de ácido acético (1% v/v), empregando uma relação entre a massa de quitosana e o volume de solução a ser utilizado (2% m/v).

Seguidamente foram precipitadas diferentes quantidades de hidrogênio fosfato de cálcio (CaHPO₄) na solução de quitosana, segundo a equação 1 [15].

Eq (1):



Para que ocorresse a transformação do CaHPO₄ em HA foi adicionado um volume de solução de acetato de cálcio (Ca(C₂H₃COO)₂) (25% m/v) em uma solução de 100 mL de quitosana (2% m/v) e em seguida foi adicionado, aos poucos, uma solução de dihidrogênio fosfato de sódio (NaH₂PO₄) (25% m/v). Estas soluções foram mantidas sob agitação mecânica constante por um período de 24 horas.

Os volumes empregados das soluções de acetato de cálcio e de dihidrogênio fosfato de sódio são mostrados na Tabela 1, e foram calculados segundo as Eqs. 1 e 2 para a obtenção de 3 diferentes compósitos de hidroxiapatita: 20, 50 e 70 % m/v, e os compósitos resultantes foram denominados CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70%, respectivamente.

Tabela 1. Volumes empregados das soluções de quitosana

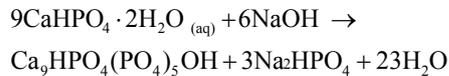
| Conteúdo de HA (% m/m) | Vol. CS (2% m/v) | Vol. Ca (C ₂ H ₃ COO) ₂ (25% m/v) | Vol. NaH ₂ PO ₄ (25% m/v) |
|------------------------|------------------|--|---|
| 20 | 100 ml | 3,0 ml | 2,3 ml |
| 50 | 100 ml | 12,0 ml | 9,0 ml |
| 70 | 100 ml | 28,0 ml | 21,3 ml |

Em seguida foram formadas as esferas de CS-HA segundo o seguinte procedimento:

- a solução de CS resultante contendo o precipitado de CaHPO₄ foi gotejada através de uma agulha hipodérmica (21-G) numa solução contendo 200 ml de tripolifosfato de sódio (Na₅P₃O₁₀), TPP, (5% m/v) com pH 8-9 (ajustado com solução de NaOH 5% m/v). O fluxo do gotejamento foi controlado para 1 mL/min com auxílio da bomba de infusão.
- as esferas formadas foram mantidas na solução de TPP (5% m/v) por mais 72 horas a temperatura ambiente sob

agitação constante, para completar a reticulação da quitosana e converter o CaHPO_4 em HA segundo a equação 2 [15].

Eq 2:



As esferas obtidas foram separadas por filtração e lavadas com uma solução de PBS (pH 7,4) para ser retirado o excesso de TPP e NaOH e seguidamente liofilizadas.

2.2.2 Caracterizações

Para a avaliação da morfologia das esferas foi realizado um ensaio de Microscopia Ótica (MO) em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 20x-100x, acoplado a um estação de Análise de Imagens. A identificação da fase e cristalinidade dos materiais obtidos em pó foi verificada por um DRX em difratômetro XRD-7000 Shimadzu (CERTBIO/UFMG), utilizando radiação $\text{K}\alpha$ do cobre (1,5418 Å), com varredura angular de $2^\circ < 2\theta < 60^\circ$, tensão 40 kV e corrente 30mA. As curvas TG foram obtidas por meio de uma termobalança Perkin Elmer®, modelo Pyris 1 TGA (CERTBIO/UFMG), em atmosfera de ar sintético, com fluxo de $20 \text{ mL}/\text{min}^{-1}$, com uma faixa de temperatura de 25 a 900°C sob a razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$. Foram utilizadas amostras com massa de $5,00 \pm 0,05 \text{ mg}$, acondicionadas em cadinho de alumina. A morfologia das esferas e a análise quantitativa da composição química da amostra foram analisadas a partir do equipamento MEV, PRO X Phenon, com aumento de até 40000 x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, e tensão de 15 kV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa). As imagens foram realizadas utilizando aumentos de 150x, 250x e 420x.

3. Resultados e Discussão

3.1 Microscopia Ótica

A morfologia das esferas CS-HA, apresentadas na Figura 1, 2 e 3 foi observada no microscópio ótico. Todas as esferas apresentam superfície rugosa, e esta rugosidade diminui conforme ocorre o aumento de percentual de HA, isto pode ser observado nas Figuras 1 (b), 2 (b) e 3 (b). As composições CS-HA20% e CS-HA50% apresentam partículas com forma esférica e superfície rugosa, com diâmetro médio de 1,9 mm e 2,2 mm, respectivamente. Já as partículas de CS-HA70% apresentaram formas mais irregulares e superfície mais lisa, com diâmetro médio de 2,3 mm, quando comparadas com as outras composições. Esse aumento médio de diâmetro se dá devido ao processo de liofilização, onde a água presente na quitosana é evaporada, logo, quanto menor o teor de quitosana na esfera, menos água será liberada, menos contração ocorrerá e maior será o tamanho da partícula.



(a)



(b)

Figura 1. MO das esferas CS-HA 20%



(a)



(b)

Figura 2. MO das esferas de CS-HA 50%

3.2 Difração de Raio X

Nos difratogramas de raios X das esferas de CS-HA com CS-HA20% e CS-HA50% só foi possível identificar picos de difração característicos da quitosana, já na composição CS-HA70% foram observados picos correspondentes a outras fases cristalinas além daqueles da CS. Na Figura 4 são mostrados os difratogramas correspondentes as esferas de CS-HA20% e CS-HA70%. O parâmetro principal que determina as propriedades da quitosana, além da massa molecular e grau de desacetilação é a cristalinidade do polímero [16]. De acordo com [17] a quitosana pode apresentar três morfismos diferentes: não-cristalina, cristalina hidratada e cristalina anidra, que podem ser identificados por difração de raios X. A forma hidratada de quitosana revela um pico agudo no ângulo $2\theta = 10,4^\circ$ e um pico fraco em $2\theta = 20-22^\circ$. A forma anidra, é caracterizada por um pico principal agudo em $2\theta = 15^\circ$ e um adicional no ângulo $2\theta = 20^\circ$, a forma amorfa possui apenas um pico agudo em $2\theta = 20^\circ$. [17]



(a)



(b)

Figura 3: das esferas de CS-HA 70%

No difratograma para a composição CS-HA20%, pode-se observar uma banda larga e assimétrica, com picos sobrepostos em $2\theta = 20.321^\circ, 21.307^\circ$ e 23.920° que corresponde aos principais picos de difração da CS como relatado na JCPDS arquivo N°. 039-1894. A sobreposição dos picos característicos que se fundem em uma banda larga é característica da baixa cristalinidade da CS.

Para a composição CS-HA70%, observaram-se picos característicos da monetita (DCP) CaHPO_4 em $2\theta = 26.426, 26.586$ e 30.188 (JCPDS 09-0080) entre outros, e do fosfato octacálcico (OCP) $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, conforme JCPDS 026-

1056, $2\theta = 26.002, 31.554, 31.703$, entre outros. A ausência dos picos de difração da HA evidenciou que a hidrólise do $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ segundo a Eq. 2 não ocorreu, ao menos em grau apreciável. Por outro lado, a presença da fase de OCP indica que a transformação que aconteceu foi a indicada pela Eq. 3.

Eq.3:

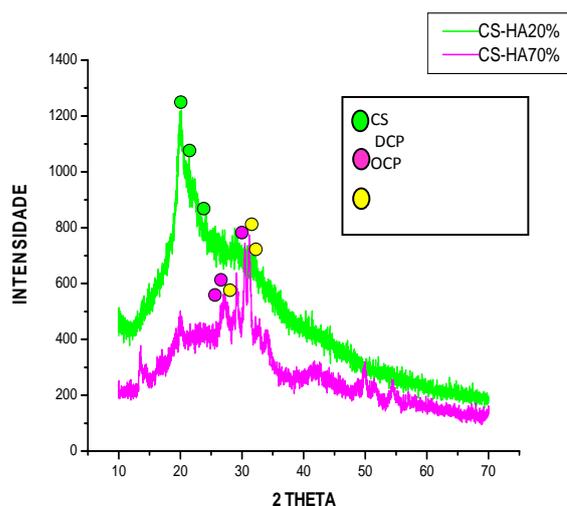
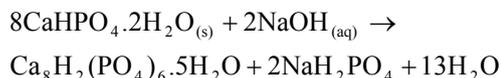


Figura 4. Difratograma de Raio X das Esferas de Quitosana/Hidroxiapatita, CS-HA (20,70%)

Resultados semelhantes já foram descritos para a hidrólise de monólitos de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [18], quando o pH do meio de hidrólise foi baixo demais para conseguir a transformação em HA segundo a Eq. 2. Além disso, a transformação do DCPD segundo a Eq. 3 não foi total. Parte dele foi desidratado originando CaHPO_4 .

3.3 Análise Termogravimétrica

A Figura 5 (a) ilustra os resultados TG para a quitosana pura CS- pura e as esferas de CS-HA de composições: CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70%. Para melhor visualização dos eventos térmicos, foi analisada também a curva derivada termogravimétrica DTG (b).

A partir da análise dos termogramas, observa-se que a primeira etapa de perda de massa que ocorreu entre 70° e 90°C nas amostras é característica à perda de água e também de matéria volátil, pois a quitosana apresenta ao longo de sua cadeia grupos amino ($-\text{NH}_2$) na posição C-2, grupos hidroxila primários ($-\text{OH}$) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico [19]. Subsequente, o segundo intervalo de perda que ocorre entre

260° e 320°C é caracterizado por um processo complexo em que ocorre a desidratação dos anéis sacarídeos, decomposição e despolimerização das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana. Já a terceira perda está relacionada decomposição térmica da quitosana. [20,21].

As decomposições térmicas dos compósitos das esferas estão evidenciadas na Tabela 2

A partir dos termogramas obtidos, Figura 5, foi observado que através da variação da composição das amostras, as curvas térmicas diferenciais termogravimétricas, foram deslocadas a diferentes temperaturas, de modo que tanto as curvas de decomposição máxima de temperatura como a DTG mostraram temperaturas diferentes para cada perda (Tabela 2) o que é indicativo da existência de integração entre a quitosana e a fase inorgânica presente do compósito, gerando assim uma ordenação na cadeia polimérica e

estabilização do composto. Estes fatores podem explicar por que, na Tabela 2, pode-se observar que à medida que o conteúdo de quitosana aumentou os compósitos tornaram-se mais estável termicamente e a decomposição de quitosana foi deslocada para temperaturas mais elevadas. Observa-se também que, não houve perda de massa após 620°C, indicando, assim, que todas as macromoléculas orgânicas foram decompostas abaixo desta temperatura [22].

Subseqüentemente observa-se que não houve proporcionalidade dos resíduos (componente inorgânicos do composto) dos compostos CS-HA50% e CS-HA70%, com o aumento do conteúdo de HA (Tabela 2), esperava-se que estes resíduos fossem de 50 e 70% respectivamente. Para o compósito CS-HA20% o resíduo obtido condiz com a porcentagem de HA incorporada.

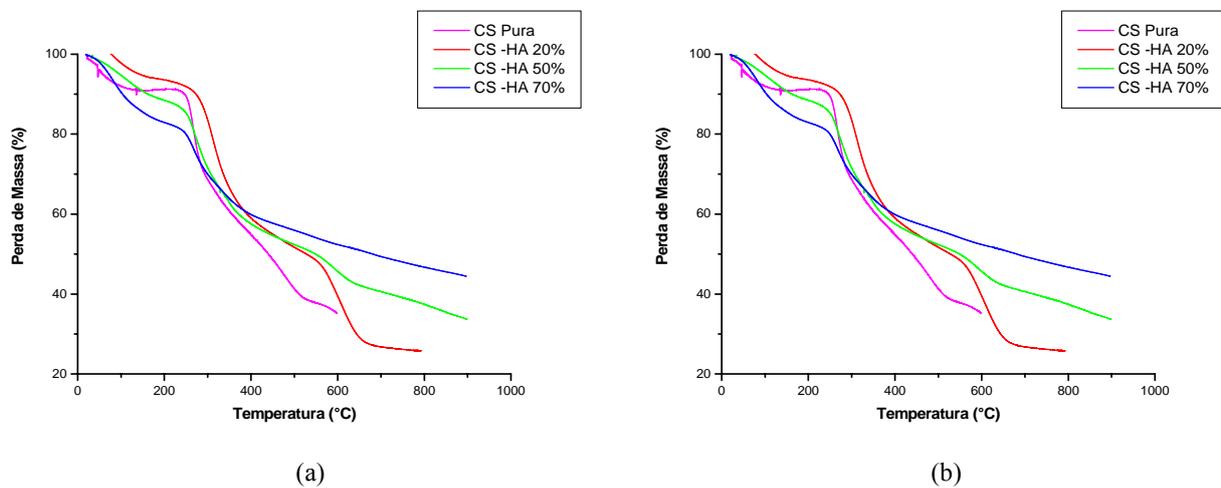


Figura 5. Curvas TG (a) para CS Pura, CS-HA 20%, CS-HA 50%, CS-HA 70%, (b) DTG

Tabela 2. Eventos térmicos para as esferas de quitosana pura e quitosana/hidroxiapatita (CS-HA20%, CS-HA50%, CS-HA70%)

| Amostras | Etapas de Decomposição | | | | | | |
|----------|------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| | 1ª Etapa | | 2ª Etapa | | 3ª Etapa | 3ª Etapa | Resíduos |
| | Perda (%) | T(°C) | Perda (%) | Perda (%) | Perda (%) | Perda (%) | |
| CS | 7,0 | 75 | 31,2 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| CS-HA20% | 11,0 | 74 | 40,0 | 28,0 | 28,0 | 605 | 28,0 |
| CS-HA50% | 12,0 | 90 | 33,2 | 21,0 | 21,0 | 590 | 21,0 |
| CS-HA70% | 17,5 | 85 | 15,0 | 23,0 | 23,0 | 345 | 23,0 |

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS)

As micrografias MEV da área central das esferas CS-HA com aumento de 250X e 420X estão apresentadas nas Figuras 4 (a) e (b), Figuras 5 (a) e (b), Figuras 6(a) e (b) para as respectivas concentrações: CS-HA20%, CS-HA50% e CS-HA70%.

As micrografias revelam uma arquitetura rugosa à medida que se tem o aumento da concentração de hidroxiapatita no compósito de 20% para 50%, Figuras 4 e 5 (b), já para as

esferas de composição CS-HA70%, Figura 6 (b), observa-se um comportamento denso com superfície irregular. Este comportamento é típico de compostos cerâmicos e é consequência da etapa de congelamento, onde os cristais de gelo crescem e solidificam na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro [23].

A morfologia da região central e análise química foram analisadas das esferas foram analisadas por MEV acoplado com EDS e estão apresentadas na Figura 7 (a) para CS-HA20%, (b) para CS-HA50% e (c) para CS-HA70%.

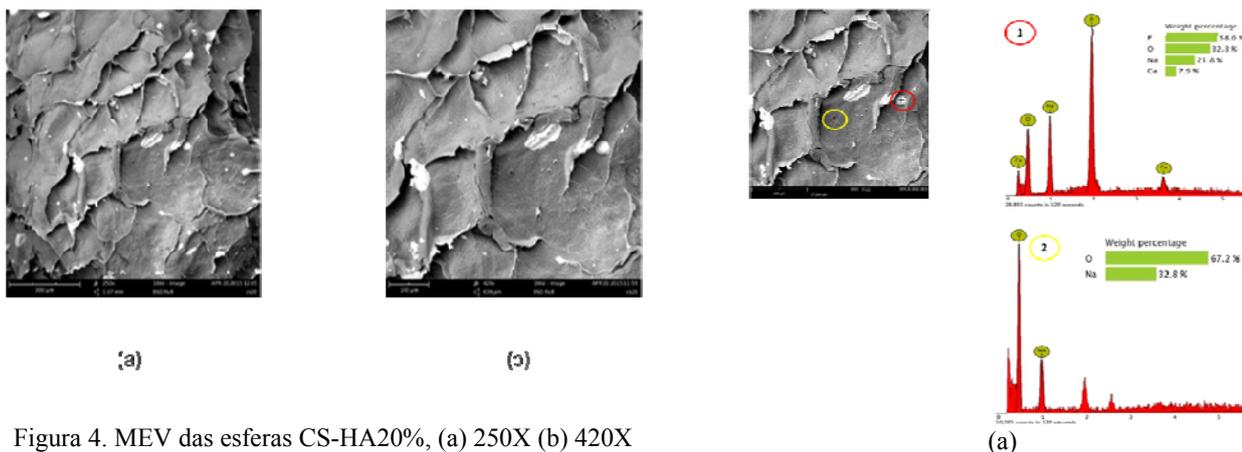


Figura 4. MEV das esferas CS-HA20%, (a) 250X (b) 420X

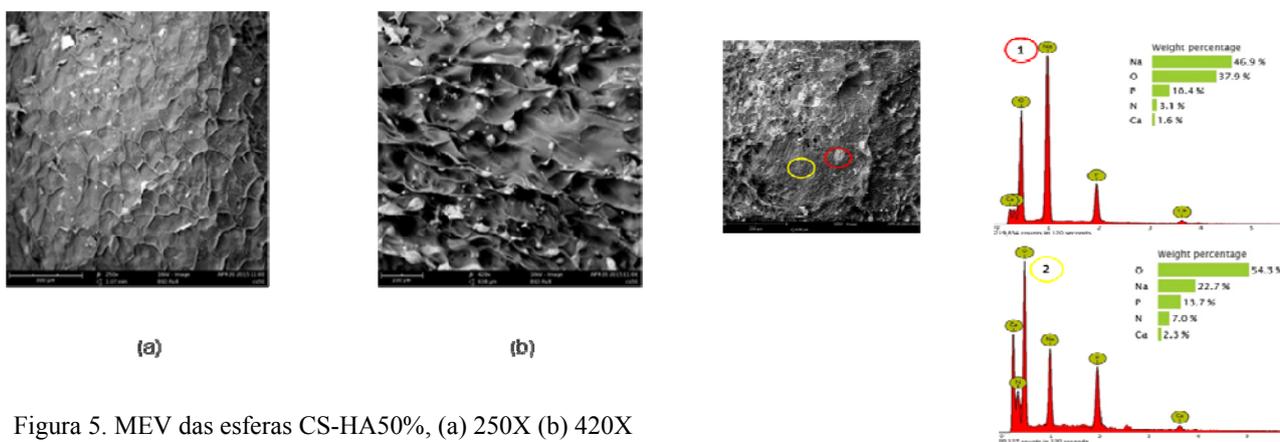


Figura 5. MEV das esferas CS-HA50%, (a) 250X (b) 420X

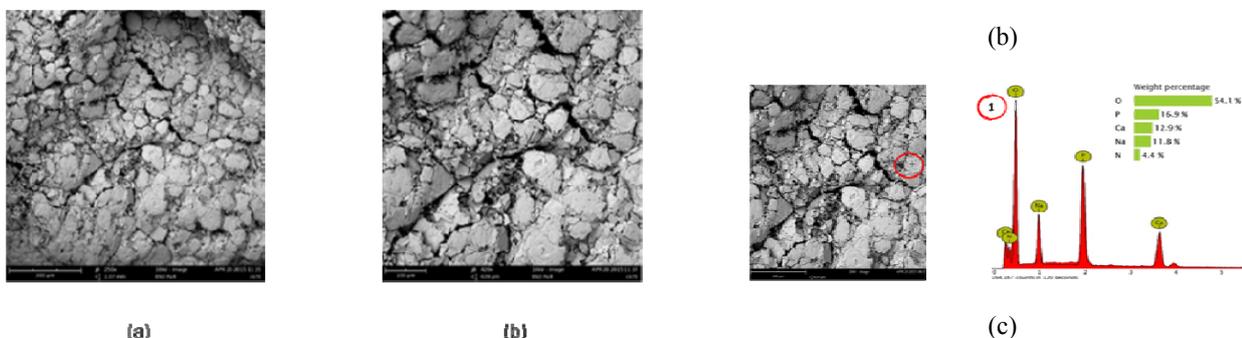


Figura 6. MEV das esferas CS-HA70%, (a) 250X (b) 420X

Figura 7: MEV- EDS (a) para CS-HA20%, (b) para CS-HA50% e (c) para CS-HA70%.

A partir dos resultados da espectroscopia dispersiva de raios X apresentados na Figura 7 (a), (b) e (c) foi observada a presença dos elementos, Ca, P, N, próprios dos fosfatos de cálcio, além, do elemento Na que é característico da reticulação com TPP e ajuste de pH com o NaOH. Os pontos opacos evidenciam a formação de um fosfato nas esferas de quitosana, como pode se observar a partir da composição resalta na região 1 e, com boa dispersão entre a fase CS- HA, Figura 7 (b).

4. Conclusões

Considerando os objetivos estabelecidos deste trabalho: Obtenção de esferas de composto quitosana-hidroxiapatita por meio gelificação ionotrópica e geração in situ de hidroxiapatita e otimização da proporção de hidroxiapatita nas esferas. Pode-se concluir que:

- a metodologia aplicada foi eficaz na produção de esferas;
- conseguiu-se gerar uma fase inorgânica, precursora da HA;

• para completa transformação da fase inorgânica em HA, faz-se necessário, variar alguns parâmetros: aumento do tempo de reticulação, variação no pH e otimização do conteúdo de fosfato durante a hidrólise.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) e seus colaboradores, e a Universidade Federal de Campina Grande.

Referências

- [1] Campana, S. P., Signini, R. Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11 (4), 169-173, 2001.
- [2] Triplett, R. G., Schow, S. R., Fields, R. T. Bone augmentation with and without biodegradable and nonbiodegradable microporous membranes. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*, 13 (3), 411-22, 2001.
- [3] Senel, S., McClure, S. J. Potential application of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56,1467-1480, 2004.
- [4] Bettini, R., Romani, A. A., Morganti, M. M., Borghetti, A. F. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 74-81, 2008.
- [5] Dallan, P. R. M. In: Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele. (Tese Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.
- [6] Assis, A. S. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9 (5), 480-491, 2008.
- [7] Neto, R. S. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37, 155-161, 2008.
- [8] Khor, E., Lima, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339–2349, 2003.
- [9] Fook, A. C. B. M. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. *Revista Matéria*, 15 (3), 392–399, 2010.
- [10] Ono, I. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, 21, 143-151, 2000.
- [11] Andrade, F. A. C. Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, 2013.
- [12] Araújo Júnior, J. V. Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas. Dissertação (Dissertação) – Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro. Universidade de Aveiro, Portugal, 2005.
- [13] Zioupos, P., Barbenel, J., Fisher, J. Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium. *Medical e Biological Engineering e Computing*, 1, 76 - 82. 1992.
- [14] Rezwan, Z., Chen, Q., Blaker, J., Boccaccini, A. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 27, 3413-3431. 2006.
- [15] Moré, Y. S. Desarrollo De Composites Basados Em Quitosana/Apatita Y Quitosana/Apatita-Silicato Como Material Soporte Para Regeneración Ósea. (Tese Doutorado) Universidad de La Habana, Centro de Biomateriales Facultad de Química, La Habana, 2014.
- [16] Modrzejewska, Z. Maniukiewicz, W. Wojtasz-Pajak, A. Determination of hydrogel chitosan membrane structure. *Polish Chitin Society, Monografia XI*, 2006.
- [17] Luyen, D. V., Huong, D. M. Chitin and derivatives. In: J.C. Salamone (Ed.), *Polymeric Materials Encyclopedia*, 2, 1208–1217, 1996.
- [18] Carrodegua R. G. Hydrothermal method for preparing calcium phosphate monoliths. *Materials Research*, 6 (3), 395-401, 2003.
- [19] Santos, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. (Tese Doutorado)– Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- [20] Nascimento, I. V. S. R. Desenvolvimento de Sistemas Quitosana/Piperina para Liberação Controlada de Fármacos. (Dissertação) Universidade Federal de Campina Grande, 2014.
- [21] Fideles, T. B. Desenvolvimento de Scaffolds de Quitosana para Aplicação na Engenharia de Tecidos. (Tese Doutorado), Universidade Federal de Campina Grande, 2014.
- [22] Murugan R., Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*, 25, 3829-3835, 2004.
- [23] Zhang W, Walboomers X., Van Osch, G., Van Den Dolder, J., Jasen Ja. Hard tissue formation in a porous ha/tcp ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A.*, 14 (2), 285 -94, 2008.