

Artigo

Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo

Rolim, A. E. H.; Carvalho, F. A. A.; Costa, R. C. C.; Rosa F. P.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (2), 211-228. Data de publicação na Web: 17 de abril de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Chitosan Scaffolds - Physico-Chemical and Biological Properties for Bone Repair

Abstract: Chitosan is a versatile polymer, whose applicability in bone repair has been widely investigated. The main biological properties of this polymer are related to its biocompatibility, slow degradation, and controlled bioreabsorption. It also presents bioactivity in the induction or stimulation of osteoblasts, and antimicrobial, antifungal, hemostatic and angiogenic properties. Due to its characteristics, chitosan may integrate the structure of anionic polyelectrolytes, such as proteins and polymers which makes possible the obtainment of different biomaterials with properties, applications and distinct forms of presentation possible. Chitosan, when used in a three-dimensional (3D) matrix form, acts as a physical scaffold for tissue regeneration, through migration, adhesion and proliferation of bone cells. Its polymeric structure and its physical and chemical attributes allow the improvement of its bioactive properties through the addition of composites, cells, or growth factors. Thus, to the extent that there is improvement in the microstructure molecular of the chitosan, there are modifications in its properties as a reference biomaterial in bone tissue bioengineering. Among the modifiable characteristics of these biomaterials in the base of the chitosan, the mechanical strength, surface topography, hydrophilicity, elasticity, porosity, interconnectivity, biodegradation, molar mass, and its pH are to be noted. This paper, therefore, aims to address the main aspects (micro and macro-structural) related to the structure of chitosan in bone tissue repair, as well as its impact on the biological behavior of 3D arrays when it's used alone or in combination with other biomaterials in regenerative medicine.

Keywords: Chitosan; biomaterial; three-dimensional matrix; bone repair.

Resumo

A quitosana é um polímero versátil, cuja aplicabilidade no reparo ósseo tem sido amplamente investigada. As principais propriedades biológicas desse polímero estão relacionadas à sua biocompatibilidade, à degradação lenta e à biorreabsorção controlada. Apresenta também bioatividade na indução ou estimulação de osteoblastos, ação antimicrobiana, antifúngica, hemostática e angiogênica. Em razão de suas características, podem integrar a sua estrutura os polieletrólitos aniônicos, os polímeros e proteínas, o que possibilita a obtenção de diferentes biomateriais com propriedades, aplicações e formas de apresentação distintas. Quando utilizada sob a forma de matriz tridimensional (3D), atua como arcabouço físico para a regeneração tecidual, pela migração, adesão e proliferação das células ósseas. Sua estrutura polimérica e seus atributos físico-químicos permitem o aprimoramento de suas propriedades bioativas por meio da adição de compósitos, células ou fatores de crescimento. E assim, na medida em que há aprimoramento na microestrutura molecular da quitosana, há modificações nas suas propriedades como biomaterial de referência na bioengenharia tecidual óssea. Dentre as características modificáveis desses biomateriais à base de quitosana, destacam-se a resistência mecânica, topografia superficial, hidrofília, elasticidade, porosidade, interconnectividade, biodegradação, massa molar e seu pH. Este trabalho, portanto, tem como objetivo abordar os principais aspectos, micro e macroestruturais, relativos à estrutura da quitosana no reparo tecidual ósseo, assim como seu impacto sobre o comportamento biológico de matrizes tridimensionais, quando utilizadas de forma isolada ou associadas a outros biomateriais na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Quitosana; biomaterial; matriz tridimensional; reparo ósseo.

* Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde – ICS/UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/Nº, Vale do Canela, CEP 40110-100, Salvador-BA, Brasil.

✉ fabianapaim@hotmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20180018](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180018)

Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo

Ana Emília H. Rolim,^a Flávio Augusto A. Carvalho,^b Rhyna Carla C. Costa,^a
Fabiana Paim Rosa^{a,*}

^a Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde – ICS/UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/Nº, Vale do Canela, CEP 40110-100, Salvador-BA, Brasil.

^b Centro Universitário Cesmac, R. Cônego Machado, 918, Farol, CEP 57051-160, Maceió-AL, Brasil.

* fabianapaim@hotmail.com

Recebido em 17 de março de 2017. Aceito para publicação em 16 de abril de 2018

1. Introdução
2. Obtenção da quitosana
3. Grau de desacetilação - propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana
 - 3.1. Massa molar
 - 3.2. Cristalinidade e taxa de degradação
 - 3.3. Absorção de água
 - 3.4. Resistência mecânica
 - 3.5. Propriedades biológicas
 - 3.6. A viscosidade da quitosana e as propriedades biológicas
4. A quitosana para o reparo ósseo
 - 4.1. Vantagens e desvantagens da quitosana como biomaterial
 - 4.2. Matrizes de quitosana para o reparo ósseo
 - 4.3. Associação da quitosana a outro biomaterial ou fator de crescimento
5. Considerações finais

1. Introdução

A quitosana é um aminopolissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Sua

presença ocorre também em nematoides, na parede celular de fungos e em leveduras.¹

Um considerável número de estudos sobre quitina e quitosana – desenvolvidos principalmente na Ásia, predominantemente no Japão, na década de 1960 – começou a ser realizado com o objetivo de categorizar suas propriedades físico-químicas, os métodos de extração e produção, sua purificação e a

manipulação dos parâmetros microestruturais desse polímero.² A aplicabilidade da quitosana na área biomédica é reconhecida, embora, como biomaterial para a bioengenharia tecidual óssea, ainda sejam necessárias mais pesquisas para aprimoramento de suas propriedades biológicas.

Ademais, sua similitude com a estrutura das glicosaminoglicanas, um dos principais constituintes da matriz extracelular, e seu decorrente potencial osteocondutor fazem-na despontar como um biomaterial de aplicabilidade clínica, especialmente à medida que as investigações avançam e suas características físico-químicas são delineadas.² A quitosana é um polímero promissor para a bioengenharia tecidual devido a suas propriedades favoráveis, tais como: não alergênico, não tóxico, mucoadesivo, antimicrobiano, biocompatível e biodegradável; e também por sua propriedade de acelerar a proliferação celular. Além disso, é um bom carreador de genes devido à sua carga positiva; faz complexos com a carga negativa do DNA e protege os genes da degradação pelas nucleases.³

A quitosana é degradada, *in vivo* por via enzimática, hidrolisada pela lisozima, que é normalmente produzida pelos macrófagos. Após a dissolução do polímero em meio ácido, há a formação de um polímero catiônico, com adição de prótons do grupo amino (NH_3^+).⁴

Devido à natureza catiônica da quitosana, esse biomaterial interage com glicosaminoglicanos aniônicos, proteoglicanos e outras moléculas carregadas negativamente, como, por exemplo, alguns lipídeos. Uma vez que um grande número de citocinas e fatores de crescimento estão ligados a glicosaminoglicanos, espera-se que um arcabouço que contenha o complexo quitosana-glicosaminoglicanos possa transportar fatores de crescimento de forma mais eficiente.³

Reforça-se, assim, o conceito atual que respalda e incrementa as técnicas inerentes à

medicina regenerativa e, mais especificamente, à bioengenharia tecidual óssea, na medida em que se estabelece a necessidade de desenvolvimento de materiais de preenchimento não apenas biocompatíveis, mas também bioabsorvíveis e que, estruturalmente, mimetizem a matriz óssea extracelular, sendo capazes de interagir com células osteoprogenitoras e moléculas de sinalização. Dentre outros atributos, tais biomateriais, considerados verdadeiros arcabouços de inserção celular, não unicamente devem contribuir para a adesão, proliferação e diferenciação das células que em sua direção migrem, mas também devem ser capazes de permitir a invasão e o crescimento vascular no sítio de sua implantação,⁵ como um dos fundamentos básicos e essenciais para o estabelecimento do processo de regeneração óssea tecidual.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo apresentar, as principais características da quitosana como biomaterial, bem como evidenciar a utilização da quitosana na bioengenharia tecidual óssea. Foi realizada, para tanto, uma pesquisa bibliográfica na base de dados eletrônica *PubMed*, *Science Direct* e *Scielo.br*, com as seguintes palavras-chave: chitosan, biomaterial, Tissue Bioengineering, bone repair, three-dimensional matrix, scaffold e, as respectivas palavras-chave em português. Foi estabelecido o período entre os anos de 2000 a 2016 como limite temporal.

2. Obtenção da quitosana

A quitina é um polissacarídeo linear, abundante na natureza, embora a quitosana seja obtida a partir da desacetilação da quitina em soluções alcalinas. A quitina é um polímero estrutural do exoesqueleto de animais marinhos (anelídeos, moluscos, celenterados, lagosta, camarão, caranguejo e krill), artrópodes (aranha, escorpião, formigas e besouros) e microrganismos (algas verdes, e marrons, leveduras, parede celular de fungos e esporos).⁶

Uma solução alcalina (por exemplo, solução de NaOH) remove, simultaneamente, as proteínas e desacetila a quitina. Dependendo da concentração dessa solução alcalina, alguns glicanos solúveis são removidos. O processamento de cascas de crustáceos envolve, principalmente, a remoção de proteínas e a dissolução do

carbonato de cálcio, que, em conchas de caranguejo, está presente em concentrações elevadas. A quitina resultante pode ser desacetilada, por exemplo, em hidróxido de sódio a 40% e a 120°C durante um período de 1 a 3 horas. Esse tratamento produz uma quitosana conforme observado na Figura 1.⁷

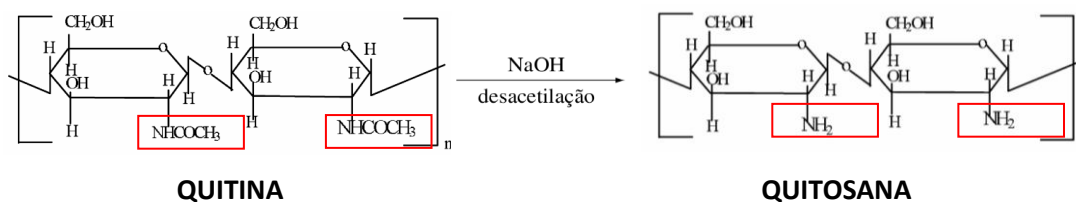


Figura 1. Reação de desacetilação da quitina, que origina a quitosana⁷

Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamida (-NHCOCH₃) da quitina são substituídos, em graus variados, por resíduos amino (-NH₂), dando origem à quitosana. A quitosana é uma base fraca, insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas diluídas abaixo do seu pKa (6,3), em que as unidades de glucosamina (-NH₂) podem ser convertidas na sua forma protonada e solúvel (NH₃⁺).⁶ A quitosana difere da quitina, dessa forma, pela desacetilação na posição do carbono-2 de cada unidade glicosídica. A quitina é composta por resíduos de N-acetil-D-glicosamina (β (1-4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glucose; já a quitosana é constituída por resíduos de D-glicosamina (β (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose e N-acetil-D-glicosamina (β (1-4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glucose, cujo número de resíduos de N-acetil-D-glicosamina (β (1-4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glucose reflete seu grau de acetilação, que é uma propriedade de fundamental interesse.⁶

3. Grau de desacetilação - propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana influenciará nas propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana e conseqüentemente no reparo ósseo com o uso desse biomaterial (conforme observado na figura 2). Dentre as propriedades que dependem do grau de desacetilação da quitosana destacamos: a variação da massa molar, da cristalinidade, na absorção de água, taxa de degradação, solubilidade, propriedades mecânicas dos arcabouços, resposta biológica do biomaterial, na ação antimicrobiana, na porosidade das matrizes tridimensionais para o reparo ósseo.

O correto grau de desacetilação que diferencie a quitina da quitosana não está totalmente definido na literatura. Por definição, quando o número de N-acetil unidades de glucosamina é superior a 50%, o polímero é considerado quitina. Por outro lado, quando o número de D-glicosamina unidades na molécula é superior, será denominado de quitosana.⁸ No entanto, segundo Kumar (2000)⁷, os materiais obtidos a partir da quitina, com grau de acetilação superior a 75% e solúveis em ácidos, como o acético e o fórmico, já são considerados como quitosana.



Figura 2. Relação entre o grau de desacetilação da quitosana e sua influência em outras propriedades físico-química e biológicas

3.1. Massa molar

A massa molar da quitosana pode variar de 300 a mais de 1000 kDa, a depender de sua origem e do método de preparação. Essa massa molar da quitosana influencia na resposta local após a implantação do biomaterial, ou seja: no edema e na biodegradação, bem como na proliferação celular. Uma menor massa molar resulta em melhor absorção de água, melhor dissolução e maior solubilidade.^{8,9}

Além disso, a massa molar da quitosana também influencia na atividade antibacteriana dos derivados. O poder bactericida aumenta com o aumento da sua massa molar.⁹ No entanto, os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das Gram-positivas, a hipótese é a de que a quitosana de alta massa molar forme películas ao redor da célula, que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente

em bactérias Gram-negativas, o que causa distúrbios no metabolismo desses microrganismos. Esses aspectos são relevantes, especialmente no reparo de feridas infectadas.¹⁰

3.2. cristalinidade e taxa de degradação

O grau de acetilação e o processo pelo qual a quitosana foi obtido influenciam em sua cristalinidade. Entretanto, sua estrutura espacial está relacionada à forma em que ela se encontra no estado sólido, ou seja, depende de a quitosana estar na forma hidratada, anidra, como complexos ou sais.⁸

O grau de cristalinidade, controlado principalmente pelo grau de desacetilação, desse polímero é inversamente relacionada a taxa de degradação. O seu maior grau de desacetilação resulta em menor taxa de degradação.³ Portanto, a forma altamente desacetilada mantém-se *in vivo* por meses, e, a depender da taxa de degradação, tanto as

propriedades mecânicas quanto a solubilidade são afetadas.¹¹

Em um estudo *in vitro* com quitosana com grau de desacetilação 92,3%, não foi observada qualquer degradação mensurável durante duas semanas.¹¹ Em estudo em modelo *in vivo* de defeito em calvária de rato, uma degradação mínima foi observada após 12 semanas.¹¹

3.3. Absorção de água

As biomatrizes de quitosanas com altos graus de desacetilação são mais hidrofílicas, em consequência da alta afinidade por ácidos orgânicos que o biomaterial apresenta, resultante da característica de protonação atribuída aos grupos aminos resultantes de tal processo.⁸

A quitosana, quando tratada por soluções ácidas, tem natureza hidrofílica.¹² Em meio alcalino ou neutro, os grupos amino livres da quitosana não são protonados e, portanto, esse biomaterial é insolúvel em água.¹² As características catiônicas da quitosana, insolúvel em pH elevado, podem ser completamente revertidas por um processo de sulfatação, o que torna a molécula aniônica e solúvel em água e, também, introduz propriedades anticoagulantes. Em pH neutro, as moléculas de quitosana perdem cargas e se precipitam na solução. A modificação química reativa de vários grupos presentes na molécula (amino, hidroxila) promove novas propriedades biológicas e mecânicas.¹³

3.4. Resistência mecânica

Quanto maior o grau de desacetilação, maior será a resistência mecânica da quitosana de cadeia longa. Foi demonstrado que a quitosana 95% desacetilada apresenta melhor propriedade mecânica quando comparada com a 88% desacetilada com peso molecular similar. Porém diferentes

quitosanas desacetiladas apresentaram citocompatibilidade e morfologia semelhantes.³

3.5. Propriedades biológicas

A natureza catiônica da quitosana permite interações eletrostáticas com glicosaminoglicanas aniônicas (GAGs) e proteoglicanas. Estes polímeros naturais são conhecidos por influenciar na modulação e diferenciação da morfologia das células. Essa propriedade é de crucial importância no campo da engenharia tecidual, porque as moléculas GAG modulam a ação de diversas citocinas e fatores de crescimento.¹⁴

O grau de acetilação tem relação com algumas propriedades biológicas da quitosana por influenciar na adesão e no crescimento celular. Foi comprovado que quanto maior o grau de acetilação, menor é a adesão celular no sítio de implantação de estruturas bidimensionais de quitosana.¹⁵

As variações de acetilação da quitosana são de importância fundamental para o seu desempenho como biomaterial, por influenciar diretamente na resposta tecidual frente à sua implantação.¹⁶ Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado esse potencial, e matrizes tridimensionais de quitosana têm sido utilizadas como estratégia para o suporte e a organização tecidual na regeneração tecidual óssea. Quando analisado o efeito da acetilação da quitosana sobre adesão, expansão, proliferação e diferenciação osteogênica de células de uma linhagem óssea extraída da medula de rato, em membranas de quitosana com 4%, 13%, 22%, 30%, 49% de acetilação, as propriedades de superfície da matriz afetaram a expressão e conformação tridimensional das proteínas constituintes e, conseqüentemente, a adesão, a expansão e a expressão do fenótipo celular.¹⁷

Em análise semelhante, Amaral, Sampaio e Barbosa¹⁸ avaliaram a interferência de diferentes graus de acetilação (4 a 49%) de

filmes de quitosana frente à adesão e proliferação de osteoblastos humanos (linhagem MG-63). A adesão celular foi avaliada após 3 e 24 horas de cultura celular. Depois do segundo período, ou seja, das 24 horas de incubação, foi notado um efeito evidente do grau de acetilação. Menores graus de acetilação promoveram uma maior intensidade de adesão celular. Estudos *in vitro* demonstraram, por sua vez, a influência da composição e do grau de desacetilação de matrizes tridimensionais de quitosana sobre a adesão e a proliferação de células fibroblásticas. As biomatrizes com alto grau de desacetilação mostraram-se mais favoráveis à adesão e à proliferação celular quando comparadas com as biomatrizes de baixo grau.¹⁹

O comportamento histomorfológico de matrizes tridimensionais de quitosana demonstrou que biomatrizes com 4 e 15% de graus de acetilação são biocompatíveis, embora sem neoformação óssea associada à sua implantação em defeitos críticos em calvária de rato. Houve menor degradação das biomatrizes, com um grau de acetilação menor (4%), quando comparado com a biomatriz com grau de acetilação de 15%. Tal resultado pode ser explicado pela forma como a quitosana interage com proteínas e estruturas celulares, o que torna imprescindível a modulação do comportamento desse biomaterial quando inserido em modelo de análise *in vivo*.²⁰ Importante ressaltar que, quando há o contato da superfície da biomatriz com os fluídos biológicos, a adsorção proteica ocorre instantaneamente, e é esse evento que controla os mecanismos subsequentes de interação entre o biomaterial e as células presentes no local de implantação.²¹

3.6. A viscosidade da quitosana e as propriedades biológicas

A quitosana é um material pseudoplástico com excelente viscosidade em meios ácidos. A viscosidade da solução de quitosana aumenta proporcionalmente ao aumento da

concentração, e essa viscosidade diminui com o aumento da temperatura. A viscosidade da quitosana também influencia as propriedades biológicas, tais como a cicatrização de feridas, bem como a biodegradação pela lisozima. Essa enzima produzida por linfócitos e também secretada por monócitos, macrófagos e granulócitos quebra a cadeia polimérica da quitosana, diminuindo a massa molar até que ela se torne curta o suficiente para ser processada pelas células, sendo os produtos finais da degradação incorporados em glicoproteínas ou excretados na forma de dióxido de carbono.¹³

A quitosana tem a capacidade para formar géis em pH ácido. Esse tipo de gel pode ser usado como um sistema de liberação lenta e controlada de fármacos em feridas ósseas infectadas.¹² O biopolímero quitosana, um biomaterial seletivamente permeável, permite a liberação controlada de antibióticos, que podem ser utilizados na regeneração óssea em bolsas periodontais.²²

Na área odontológica, a quitosana em forma de gel, obtido a partir de diferentes granulações e concentrações do pó dessa substância, possibilitou sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica, com ação antimicrobiana. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infraósseos, o gel pode ser levado com uma seringa (matriz injetável) sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada uma solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e, portanto, não deve haver um alto grau de escoamento.⁴

Devido à sua propriedade bioadesiva, esse polímero pode aderir aos tecidos moles e duros e tem sido utilizado em odontologia, ortopedia, oftalmologia, neurologia e em procedimentos cirúrgicos.^{7,23,24} A adesão do polímero aos tecidos epiteliais e mucosas – com ação fungistática ou bacteriostática, anticancerígena, anticolestérmica, anti-inflamatória e hemostática – tem sido

relatada em inúmeras pesquisas. Em testes clínicos com a quitosana não foi relatada reação inflamatória ou alérgica após a implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano.^{15,12}

Na odontologia, a quitosana é testada no tratamento de infecções bacterianas bucais, bem como na área médica, em que o crescimento de *Escherichia coli* foi inibido na presença de concentrações superiores a 0,025% de quitosana, que também inibiu o crescimento de *Fusarium*, *Alternaria* e *Helminthosporium*, provavelmente pela ação dos grupos amino catiônicos da quitosana sobre os grupos aniônicos da parede celular desses micro-organismos.⁴

Outros estudos verificaram a ação antimicrobiana em *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense*, *Erwinia sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* e *Candida*.¹⁹

Essa atividade antibacteriana intrínseca deve-se ao fato de a capacidade do grupo amino de caráter catiônico, presente na estrutura química da quitosana, poder associar-se com ânions presentes na parede celular, o que resulta na supressão da biossíntese e no transporte de metabólitos através da parede celular, com a consequente morte do micro-organismo bacteriano.²⁵

4. A quitosana para o reparo ósseo

No que diz respeito à regeneração tecidual óssea, embora o osso apresente potencial regenerativo, tal potencial não é

ilimitado. Diante de situações clínicas pouco favoráveis à reabilitação estrutural e funcional do tecido, o reparo da lesão originariamente presente no tecido ósseo pode resultar na formação de tecido conjuntivo fibroso ou cicatricial, na maior parte dos casos com comprometimento estrutural e (ou) funcional da região atingida.^{26,27} Tais situações compreendem a presença de áreas de extenso comprometimento vascular e (ou) perda ou ausência excessiva de substância óssea, ou seja, a presença de defeitos ósseos considerados críticos à regeneração tecidual, sejam eles resultantes de traumas, infecções, neoplasias ou anomalias de desenvolvimento.

Nesse contexto, buscam-se manobras curativas mais efetivas e com menor custo biológico implícito e reforça-se a aplicabilidade clínica dos biomateriais e das técnicas que fundamentam a bioengenharia tecidual. A bioengenharia tecidual tem sido primariamente definida como uma área que reúne os princípios científicos que visam a promover o desenho, a construção, a modificação e o crescimento de tecidos vivos pela utilização de biomateriais, implante de células e fatores celulares de forma conjunta ou isolada.⁵

As estratégias da engenharia de tecidos, da terapia gênica, ou mesmo das ações terapêuticas sistêmicas na reparação óssea, estão sob intensa investigação. Trata-se de um esforço para superar as limitações dos métodos atuais, tais como as técnicas de enxertia óssea com substitutos que apresentem propriedades biomecânicas similares às do osso normal, para acelerar o processo de regeneração, ou até mesmo para tratar condições sistêmicas, tais como distúrbios esqueléticos e a osteoporose.²³

Estudos mais recentes mostram uma preocupação em aprimorar as propriedades mecânicas e biológicas da quitosana.^{6,11,13,14,23,28-38} Sua associação com outros polímeros tem sido largamente estudada, e essa é a tendência de perspectivas futuras no que se refere à

pesquisa com quitosana. Essa complexa integração entre engenharia e biologia – áreas tão distintas, mas, ao mesmo tempo, tão intrinsecamente interligadas – proporciona uma verdadeira relação de interferências mútuas entre propriedades físicas, como resistência, rugosidade, elasticidade, porosidade, e químicas, como massa molar, pH, capacidade de hidratação, degradação. Associam-se a elas as propriedades biológicas, entre as quais biocompatibilidade, potencial antifúngico, antibacteriano, antitrombogênico, osteoindutor e bioadesivo.³⁹⁻⁴¹

Constatou-se também, durante a análise dos dados apresentados na literatura, que quanto menor o grau de acetilação, maior é a adesão, a proliferação e o crescimento de células de linhagem óssea, principalmente osteoblastos, na superfície da biomatriz.⁴²⁻⁴⁴ Essa adesividade explica-se também pela característica química que o biopolímero apresenta em relação a proteínas relacionadas com a adesão celular, como a fibronectina.^{17,45}

4.1. Vantagens e desvantagens da quitosana como biomaterial

A quitosana apresenta inúmeras vantagens, como facilidade de obtenção, possibilidade de manipulação em diferentes formas de apresentação (soluções, blends, esponjas, filmes, membranas, gel pasta, tabletes, microesferas, grânulos, fibras e outros), com propriedades físico-químicas que podem ser modificadas e propriedades biológicas promissoras para a bioengenharia tecidual (biocompatibilidade, atoxicidade, adesividade, ação bacteriostática e antimicrobiana, ação imunoadjuvante, aceleração da formação de osteoblastos e cicatrização de feridas).^{19,45} A quitosana é facilmente hidrolisada e metabolizada por várias enzimas lisossômicas, sendo considerada biodegradável.⁴⁶ Sua biodegradação é caracterizada pela liberação de aminoácidos, os quais podem ser incorporados às vias metabólicas das

glicosaminoglicanas e das glicoproteínas e depois excretados.^{15,16,46}

A quitosana é também considerada como um polímero bioativo e biocompatível,^{1,2,15,47,48} estimula o sistema imune a responder contra infecções provocadas por micro-organismos.⁸

Análises histológicas evidenciaram uma densidade elevada de neutrófilos no interior da área do implante de matrizes porosas de quitosana em modelo animal, que diminuem progressivamente em intensidade nos pontos biológicos mais distantes a partir da data do implante. Depósitos de fibras colágenas foram também observados, o que indicou a formação de uma matriz conjuntiva no sítio operado, além de atividade angiogênica. Embora tenha havido uma migração intensa de neutrófilos para a região do implante, houve apenas branda sinalização de reação inflamatória resultante da presença do material. Esse estudo preliminar reforça, portanto, a biocompatibilidade da quitosana quando implantada em modelo animal.⁸

A quitosana tem, ainda, capacidade de estimular células para que produzam e liberem citocinas, as quais favorecem a organização estrutural do tecido conjuntivo, o que facilita a osteogênese e a angiogênese.⁴⁹ Esse biomaterial também tem ação importante na captação da bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático, o que parece ser particularmente importante para a produção da dor liberada no sítio da inflamação.¹⁹

Em cultura de células, a quitosana acelera a infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando, consideravelmente, a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização. O grau de desacetilação modula a atividade das células imunológicas.⁵⁰

Na cicatrização de feridas no organismo, a quitosana tem propriedade imunomoduladora devido à sua capacidade de ativar macrófagos, e isso explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a

biodegradabilidade desse polímero no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, o que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana em monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. Em culturas de células tratadas com quitina e seus derivados, verificou-se um aumento da atividade da lisozima extracelular, o que estimula a formação de tecido conjuntivo. As feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa.¹⁹

A quitosana comportar-se como um agente hemostático que apresenta propriedades antitrombogênicas. A quitosana desempenha, ainda, importante papel na homeostase, por reduzir o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente e por agregar, também, os eritrócitos, devido à interação das cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas de receptores dos eritrócitos com resíduos de ácido neuramínico e murâmico. A ação da quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito importante na cicatrização, pois aumenta a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator de transformação do crescimento- β 1 (TGF- β 1).¹⁹

Destaca-se, como desvantagem, a utilização de quitosana na forma de pó ou de flocos para a adsorção de íons metálicos e corantes. A solubilidade da quitosana em meio ácido inviabiliza o processo de reciclagem, e a baixa área superficial limita o acesso aos sítios de adsorção (grupos amino) não expostos. Esses problemas são minimizados com modificações químicas na estrutura do biopolímero com o uso de

agentes reticulantes e quelantes.⁵¹

Os testes biológicos para a quitosana demonstraram segurança quanto à mutagenicidade, toxicidade cutânea e subcutânea, toxicidade crônica, pirogênese, hemólise e sensibilização.^{3,25} Entretanto, o potencial de genotoxicidade dos produtos derivados da quitosana, ou seja, os compósitos, materiais híbridos e os nanomateriais ainda devem ser investigados para uso biomédico.

A escolha do método de esterilização dos biomateriais de quitosana necessita de maiores investigações. O polímero de quitosana, quando exposto a temperaturas maiores que 120 °C, sofre alterações em sua estrutura física e no grau de solubilidade, e, quando exposto à radiação gama, sofre fissuras e um decréscimo de viscosidade que é dose-dependente. Portanto, o método de esterilização provavelmente irá alterar suas propriedades biológicas.⁴

4.2. Matrizes de quitosana para o reparo ósseo

Um aspecto bastante avaliado em bioengenharia tecidual óssea é o desenho estrutural dos arcabouços com a utilização do modelo 3D de biomatriz.^{15,52} Nesse formato, o processo de crescimento tecidual é facilitado pelo crescimento tecidual no interior da estrutura, o que proporciona também a formação de vasos e o consequente suprimento de oxigênio para a área enxertada.^{16,24,53-55} A utilização de modelos tridimensionais associados à cultura de células também tem mostrado ser um modelo atrativo para o crescimento celular e a interação entre o tecido em formação e a matriz implantada.⁵⁶

Em bioengenharia tecidual óssea, na maioria das vezes, a biomatriz de quitosana é projetada para atuar como uma matriz extracelular temporária. Deve apresentar características estruturais que facilitem sua substituição pelo trabeculado tecidual.⁵⁷

Além de possuir excelente biocompatibilidade e uma biodegradação controlável, deve apresentar adequada microestrutura e propriedades mecânicas favoráveis.⁵⁸

Para atingir as propriedades mecânicas desejadas, o arcabouço de quitosana pode ter, em sua composição, biocerâmicas como a hidroxiapatita, ou o fosfato de cálcio e outros materiais inorgânicos, tais como a wollastonita; ou ainda biomateriais orgânicos poliméricos como a gelatina, o colágeno e o alginato. Ao lado de diferentes formas de preparo e de composição desse arcabouço, o tamanho das partículas adicionadas a essa matriz tridimensional de quitosana também pode modificar suas propriedades biológicas.³

O arcabouço para a reconstrução óssea é, geralmente, uma microestrutura altamente porosa, com poros interconectados e grande área de superfície capaz de conduzir o crescimento de tecido ósseo dentro dessa estrutura. A alta porosidade e o tamanho dos poros, muitas vezes, resultam em baixa propriedade mecânica, e essa fragilidade pode ser um fator limitante na regeneração óssea. Dessa forma, um reforço com fibras orgânicas de quitosana ou cristais inorgânicos tem sido usado em quantidade adequada, com o objetivo de aprimorar as propriedades mecânicas desses arcabouços tridimensionais.⁵⁹ Os polímeros de quitosana são estabilizados por pontes de hidrogênio que lhes conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes, especialmente nos estágios iniciais de formação óssea.⁴⁵ Quando são analisadas as possíveis configurações que um biomaterial pode apresentar, as matrizes de sustentação celular poliméricas, como a quitosana, têm apresentado um perfil biofuncional mais apropriado no que diz respeito ao trânsito de moléculas e células no sítio a ser reparado.⁵⁷

A matriz biodegradável empregada na bioengenharia óssea tecidual funciona como um esqueleto temporário que acomoda e estimula o crescimento do novo tecido. A

escolha da quitosana encontra justificativa em vários fatores aqui relacionados. Além desses aspectos favoráveis citados anteriormente, soma-se também a capacidade de degradação da biomatriz de quitosana, pois é necessário que, à proporção que o crescimento celular aconteça, a matriz sofra degradação, para que o tecido ósseo neoformado ocupe o espaço delimitado por essa matriz.¹⁶ O comportamento de degradação é um fator crucial para o desempenho, em longo prazo, de biomatrizes de quitosana. A degradação pode afetar muitos processos celulares, inclusive crescimento celular, regeneração tecidual e resposta imunológica do hospedeiro.⁶⁰

Portanto, para que o processo de reorganização estrutural do tecido ósseo ocorra naturalmente, faz-se necessário que essa biomatriz apresente os pré-requisitos mencionados, como resistência mecânica favorável, condições de superfície que facilitem a adesão e a proliferação celular, hidrofília, elasticidade suficiente para suportar o crescimento celular sem deformar-se, porosidade, interconectividade e diâmetro dos poros favoráveis para permitir o crescimento celular e a formação de vasos no seu interior, biodegradação, massa molar e pH adequados.^{16,24,52,54}

O equilíbrio entre porosidade e propriedades mecânicas é também outra preocupação presente em relatos na literatura. Embora a porosidade e a interconectividade dos poros, no interior da biomatriz, sejam propriedades adequadas em virtude do favorecimento à proliferação e ao crescimento celular, bem como a angiogênese no interior do arcabouço matricial, quando em excesso, essas condições comprometem o desempenho mecânico da biomatriz no sítio do enxerto, degradando-se com muita facilidade.²⁵

A biomatriz de quitosana, como arcabouço tridimensional, organiza a deposição de matriz óssea extracelular, a neovascularização e a deposição de minerais do tecido ósseo. Os métodos de preparação desses arcabouços são, em geral: a liofilização, a biomineralização, a agregação

de partículas, e a gelificação.³ Durante o processamento da quitosana a partir da matéria-prima, diferentes condições – como tipo e concentração dos reagentes, tempo e temperatura empregadas – podem afetar as características físicas do produto. A massa molar da quitosana também influenciará na viscosidade, solubilidade, elasticidade, e força do biomaterial. A solubilidade da quitosana pode ser reduzida por meio de ligações cruzadas covalentes com o glutaraldeído.¹²

As aplicações das matrizes de quitosana, na área de engenharia tecidual, permitem que elas sejam permeadas por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas, em terapias genéticas, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da adsorção de partículas de quitosana que carregam fragmentos de genes através da parede intestinal, inativando alérgenos de origem alimentar.⁴ Além disso, esse biopolímero é um agente cicatrizador e reparador, capaz de aumentar as funções de células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas.⁴

Arcabouços tridimensionais de quitosana com melhores propriedades biológicas e físico-químicas, biodegradáveis e bioativos porosos estão sendo investigados, bem como novas abordagens que utilizam a nanotecnologia, como arcabouços magnéticos bio-híbridos, que agem por meio de ligações cruzadas ou reticuladas com o colágeno na regeneração óssea guiada por um campo magnético externo, ou ainda implantados por meio de sistemas injetáveis na forma de cimentos, géis ou microesferas, em associação ou não com células-tronco mesenquimais e fatores de crescimento, como, por exemplo, as proteínas ósseas morfogenéticas ou recombinantes (BMPs), o fator derivado de plaquetas (PDGF) e o fator derivado de fibroblastos (TGF- β).²³

O modelo da biomatriz com desenho estrutural tridimensional, com alto grau de

porosidade, com seus poros interconectados, facilita a sua integração no organismo vivo⁵². Também, mantém correlação direta com o perfil bioquímico da quitosana. Foi comprovado, dessa forma, que o tamanho dos poros e a porosidade reduzem-se com a elevação da acetilação da quitosana.¹

O tamanho dos poros e sua orientação influenciam diretamente as propriedades mecânicas da biomatriz. Testes de tensão em amostras hidratadas mostraram que biomatrizes porosas de quitosana tinham uma grande redução no módulo de elasticidade (0,1-0,5MPa), quando comparadas com biomatrizes não porosas (5-7Mpa). A elasticidade de uma matriz varia de valores entre 30% aproximadamente para as matrizes não porosas e valores de 100% para as matrizes porosas.²⁵

Com o objetivo de construir uma matriz 3D de quitosana viável a cultura de células Hsieh, Chang e Lin (2007) observaram que a concentração ideal para se obter uma boa maleabilidade do arcabouço se situava na faixa entre 1-3% de quitosana. Nesse sentido, verificaram que o tamanho de poro e a porosidade reduziram-se à proporção que houve aumento na concentração da quitosana e na velocidade de agitação do homogeneizador. Quanto maior a concentração da quitosana, menor era a absorção de água pelo arcabouço de quitosana e maior a sua resistência à compressão. Os testes de degradação enzimática, para a quitosana com 80% de grau de desacetilação, revelaram que o arcabouço alcança o equilíbrio quando se verifica 20% de taxa de degradação da biomatriz.¹

4.3. Associação da quitosana a outro biomaterial ou fator de crescimento

O uso de nanohidroxiapatita, bem como de outros biomateriais inorgânicos em conjunto com a quitosana, contribui para o avanço e a exploração de diversos tipos

compósitos para o reparo ósseo.⁶¹ Assim, uma peculiaridade adicional da quitosana, emergente de estudos mais recentes, é a capacidade de influenciar tanto a mineralização como a atividade das células, com base em novas estratégias úteis para estimular células-tronco a se tornarem osteoblastos, e fazer co-culturas de osteoblastos e osteoclastos.^{22,31}

A interação das nanopartículas com a membrana celular pode influenciar a taxa de sua absorção pelas células. Ambos, PLGA e membranas celulares, são carregadas negativamente. Assim, adicionar polímeros carregados positivamente, como trimetil quitosana (TMC), que adere às partículas de PLGA, melhora a propriedade de adesão celular.⁶²

Observou-se o impacto do potencial osteogênico *in vitro* e *in vivo* em arcabouços de hidrogéis de quitosana dopadas com zinco e contendo nanohidroxiapatita e beta-glicerofosfato. A quitosana apresenta baixa imunogenicidade, capacidade de absorção de proteínas e capacidade de quelação com íons metálicos como o zinco. Esse íon tem papel importante na sinalização celular durante o reparo ósseo. A adsorção de proteínas é um pré-requisito para a interação célula-biomaterial e esta interação foi favorecida pela presença da quitosana.³¹

A associação de quitosana com a HA quelada com íons cálcio e fosfato, formando um gel, favorece a osteogênese ao promover a mineralização óssea.²⁸ As matrizes de quitosana apresentam vantagens adicionais quanto à possibilidade de processamento de suas características microestruturais, sobretudo, quando comparadas com as matrizes confeccionadas à base de materiais cerâmicos.⁵⁷

Ao adicionar um polímero obtido de algas marrons (fucoïdan) em arcabouços de quitosana e alginato observou-se melhor absorção de proteínas e mineralização duas vezes maior quando comparado ao arcabouço sem esse polissacarídeo. O fucoïdan promove interações eletrostáticas entre a quitosana e o alginato, com adição de

carga negativa e sulfatada que aprimora a bioatividade e as propriedades biológicas da matriz tridimensional de quitosana.⁶³

Segundo MA *et al.* 2011, a esponja de biocompósito nanoHA/quitosana oferece um potencial como arcabouço para a regeneração óssea, apresentando como vantagens fácil fabricação, excelente arquitetura tridimensional, biodegradação autocontrolada, recrutamento de fatores crescimento e adesão de células do estroma, boa capacidade osteogênica, assim como boa biocompatibilidade.⁴⁸

Uma esponja porosa, composta de quitosana-gelatina e fosfato octacálcico, já foi patenteada por pesquisadores russos por mostrar-se adequada para o preenchimento de defeitos ósseos.²⁸

Nos arcabouços de quitosana-colágeno combinado com o fator transformador de crescimento – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) –, observou-se um excelente potencial como um bom substrato para ser utilizado nas cirurgias regenerativas dos tecidos periodontais. No ambiente bucal, as propriedades antimicrobianas²⁵ e hemostáticas da quitosana são também relevantes para a reparação óssea.²⁵ A quitosana, formando um complexo polieletrólítico com a BMP-7, mostrou resultados promissores em cõndilos femorais de ratas osteoporóticas.²⁸

Em outro estudo, o efeito gel da quitosana, combinado com matriz óssea desmineralizada ou membrana de colágeno, na regeneração periodontal, foi investigado em vinte pacientes com periodontite crônica. A reparação óssea foi significativamente maior comparada com os valores basais, indicando que o gel de quitosana sozinho, ou sua combinação com matriz óssea desmineralizada/membrana de colágeno, é promissor para a regeneração periodontal.³

Na aplicação de membranas de quitosana na regeneração óssea guiada (ROG) e na regeneração tecidual guiada (RTG) observou-se que a quitosana pode ser um bom substrato para a reparação tecidual periodontal.⁶⁴

Um estudo com compósitos de quitosana com nanohidroxiapatita/colágeno e microesferas de poli (L- ácido láctico) - PLLA também trouxe resultados surpreendentes no reparo ósseo com aumento da expressão e da proliferação celular e do tecido vascular.⁶¹

O reparo ósseo com a utilização de uma biomatriz híbrida de quitosana-alginato, trouxe resultados significativamente superiores, mecânica e biologicamente, quando comparado com a biomatriz pura de quitosana.⁵⁴

Entretanto, em outro estudo, que analisou o comportamento de biomatrizes de quitosana associadas à gelatina, comparadas com biomatrizes de quitosana pura *in vivo*, demonstrou-se que o comportamento celular foi igual para ambos os espécimes; as biomatrizes de quitosana associadas à gelatina apresentaram degradação mais rápida e perda significativa de material, embora não tenha ficado claro, para os autores, se as propriedades mecânicas também foram afetadas.⁶⁵

Os efeitos da concentração de quitosana sobre morfologia, propriedades mecânicas, estruturas de poros e comportamento celular com três variáveis – biomatrizes biógenas tridimensionais de quitosana, um polímero sintético à base de ácido láctico e ácido glicólico e biomatrizes de microesferas de quitosana – mostraram que a presença da quitosana contribuiu para o aumento, a diferenciação e a maturação de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1. A quitosana, na superfície das microesferas, aumentou a fosfatase alcalina e também regulou a expressão gênica da sialoproteína e da osteopontina.⁵⁷

5. Considerações finais

A quitosana apresenta-se como um biomaterial promissor, de ampla aplicabilidade em bioengenharia tecidual óssea. É um produto natural, de baixo custo,

renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Esse biomaterial tem sido extensivamente estudado em pesquisas, como arcabouço tridimensional na regeneração óssea. Entretanto, na prática, ela ainda é mais utilizada como um curativo e agente hemostático em medicina. Apesar de apresentar excelentes propriedades biológicas, suas propriedades mecânicas ainda precisam ser aperfeiçoadas. Suas características microestruturais físicas e químicas devem ser delineadas e especialmente aprimoradas previamente ao seu emprego, sendo possível, inclusive, o uso dos recursos da nanotecnologia dos materiais.

Vários estudos relatam uma resposta biológica mais favorável quando a quitosana é associada a outros biomateriais. Dessa forma, é importante prosseguir as investigações científicas com o uso desse biopolímero natural, para melhor se entender sua função sobre o comportamento celular, bem como para aperfeiçoar as metodologias de fabricação que poderiam ampliar o uso clínico na regeneração óssea.

Com as investigações científicas em curso em todos os campos relevantes do conhecimento e em biomateriais, espera-se que muitas doenças ósseas, processos de trauma secundário, ressecção óssea devido a cirurgia ablativa, envelhecimento e alterações esqueléticas, metabólicas ou genéticas sejam tratados com sucesso em novos protocolos de regeneração óssea.

Agradecimentos

UFBA, CAPES, CNPQ

Referências Bibliográficas

- ¹ Hsieh, W. C.; Chang, C. P.; Lin, S. M. Morphology and characterization of 3D

- micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2007**, *57*, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Khor, E.; Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Arca, H. Ç.; Şenel, S. Chitosan Based Systems for Tissue Engineering Part 1 : Hard Tissues. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *33*, 35. [[Link](#)]
- ⁴ Spin-Neto, R.; Pavone, C.; Freitas, R. M. de; Marcantônio, R. A. C.; Mascantonio-Júnior, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica : revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP* **2008**, *37*, 155. [[Link](#)]
- ⁵ Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science* **2011**, *2011*,1 [[CrossRef](#)]
- ⁶ Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Ravi Kumar, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* **2000**, *46*, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Vandevord, P. J.; Matthew, H. W. T.; Desilva, S. P.; Mayton, L.; Wu, B.; Wooley, P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *59*, 585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Jia, Z.; Shen, D.; Xu, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research* **2001**, *333*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Zheng, L. Y.; Zhu, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *54*, 527. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Reves, B. T.; Jennings, J. A.; Bumgardner, J. D.; Haggard, W. O. Osteoinductivity assessment of BMP-2 loaded composite chitosan-nano-hydroxyapatite scaffolds in a rat muscle pouch. *Materials (Basel)* **2011**, *4*, 1360. [[CrossRef](#)]
- ¹² Bansal, V.; Sharma, P. K.; Sharma, N.; Pal, O. P.; Malviya, R. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Biological Research* **2011**, *5*, 28. [[Link](#)]
- ¹³ Martins, A. M.; Alves, C. M.; Kurtis Kasper, F.; Mikos, A. G.; Reis, R. L. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 1638. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Costa-Pinto, A. R.; Reis, R. L.; Neves, N. M. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2011**, *17*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, a Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **2001**, *22*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Seda Tiğli, R.; Karakeçili, A.; Gumusderelioglu, M. *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *18*, 1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Amaral, I. F.; Lamghari, M.; Sousa, S. R.; Sampaio, P.; Barbosa, M. A. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2005**, *75*, 387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Amaral, I. F.; Sampaio, P.; Barbosa, M. A. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: The effect of the degree of acetylation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2006**, *76*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Costa Silva, H. S. R.; Dos Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova* **2006**, *29*, 776. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Carvalho, F. A. A; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Bahia, 2008. [[Link](#)]
- ²¹ Coutinho, D. F.; Pashkuleva, I. H.; Alves, C. M.; Marques, A. P.; Neves, N. M.; Reis, R. L. The effect of chitosan on the *in vitro* biological performance of chitosan-poly(butylene succinate) blends. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1139. [[CrossRef](#)]

[PubMed]

- ²² Kavitha, K.; Keerthi, T.S.; Tamizh Mani, T. Chitosan Polymer Used As Carrier In Various Pharmaceutical Formulations : Brief Review. *Internacional Journal of Applied biology and Pharmaceutical Technology* **2011**, 249. [Link]
- ²³ Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* **2011**, 9, 66. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Burg, K. J.; Porter, S.; Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, 21, 2347. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Di Martino, A.; Sittinger, M.; Risbud, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **2005**, 26, 5983. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Gonçalves, E. A. L.; Guimarães, S. A. C.; Garcia, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* **1998**, 12, 299. [CrossRef]
- ²⁷ Lim, S. C.; Lee, M. J.; Yeo, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathology International* **2000**, 50, 594. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Guerra, G. D.; Barbani, N.; Gagliardi, M.; Rosellini, E.; Cristallini, C. Chitosan-based Macromolecular Biomaterials for the Regeneration of Chondroskeletal and Nerve Tissue. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2011**, 2011, 1. [CrossRef]
- ²⁹ van de Graaf, G. M. M.; De Zoppa, A. L. do V.; Moreira, R. C.; Maestrelli, S. C.; Marques, R. F. C.; Campos, M. G. N. Morphological and mechanical characterization of chitosan-calcium phosphate composites for potential application as bone-graft substitutes. *Research on Biomedical Engineering* **2015**, 31, 334. [CrossRef]
- ³⁰ Kucharska, M.; Walenko, K.; Lewandowska-Szumie, M.; Brynk, T.; Jaroszewicz, J.; Ciach, T. Chitosan and composite microsphere-based scaffold for bone tissue engineering: evaluation of tricalcium phosphate content influence on physical and biological properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2015**, 26 [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Dhivya, S.; Saravanan, S.; Sastry, T. P.; Selvamurugan, N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nanobiotechnology* **2015**, 13, 40. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Caetano, G. F.; Frade, M. A. C.; Andrade, T. A. M.; Leite, M. N.; Bueno, C. Z.; Moraes, Â. M.; Ribeiro-Paes, J. T. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2015**, 103, 1013. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Macea, R. B.; De Hoyos, C. F.; Montes, Y. G.; Fuentes, E. M.; Ruiz, J. I. R. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros* **2015**, 25, 58. [CrossRef]
- ³⁴ Kim, H.-L.; Jung, G.-Y.; Yoon, J.-H.; Han, J.-S.; Park, Y.-J.; Kim, D.-G.; Zhang, M.; Kim, D.-J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, 54, 20. [CrossRef]
- ³⁵ Romero, R.; Chubb, L.; Travers, J. K.; Gonzales, T. R.; Ehrhart, N. P.; Kipper, M. J. Coating cortical bone allografts with periosteum-mimetic scaffolds made of chitosan, trimethyl chitosan, and heparin. *Carbohydrate Polymers* **2015**, 122, 144. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Heidari, F.; Bahrololoom, M. E.; Vashae, D.; Tayebi, L. In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application. *Ceramics International* **2015**, 41, 3094. [CrossRef]
- ³⁷ Teterina, A. Y.; Fedotov, A. Y.; Egorov, A. A.; Barinov, S. M.; Komlev, V. S. Microstructure formation in porous calcium phosphate-chitosan bone cements. *Inorganic Materials* **2015**, 51, 396. [CrossRef]
- ³⁸ Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-ruiz, B.; Ramos-zúñiga, R.; Saldaña-koppel, D. A.; Quiñones-olvera, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine.

- BioMed Research International* **2015**, 2015 [CrossRef]
- ³⁹ Lee, Y. M.; Park, Y. J.; Lee, S. J.; Ku, Y.; Han, S. B.; Choi, S. M.; Klokkevold, P. R.; Chung, C. P. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *Journal of Periodontology* **2000**, *71*, 410. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Lee, J. Y.; Nam, S. H.; Im, S. Y.; Park, Y. J.; Lee, Y. M.; Seol, Y. J.; Chung, C. P.; Lee, S. J. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release* **2002**, *78*, 187. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Ezoddini-Ardakani, F. Effects of chitosan on dental bone repair. *Health* **2011**, *03*, 200. [CrossRef]
- ⁴² Jiang, T.; Nukavarapu, S. P.; Deng, M.; Jabbarzadeh, E.; Kofron, M. D.; Doty, S. B.; Abdel-Fattah, W. I.; Laurencin, C. T. Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: *In vitro* degradation and *in vivo* bone regeneration studies. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 3457. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Kong, L.; Ao, Q.; Wang, A.; Gong, K.; Wang, X.; Lu, G.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications* **2007**, *22*, 223. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Tuzlakoglu, K.; Reis, R. L. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *18*, 1279. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁵ Muzzarelli, C.; Muzzarelli, R. A. A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *92*, 89. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁶ Jung, U.-W.; Song, K.-Y.; Kim, C.-S.; Lee, Y.-K.; Cho, K.-S.; Kim, C.-K.; Choi, S.-H. Effects of a chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in a rat calvarial defect. *Biomedical Materials* **2007**, *2*, S101. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁷ Shi, C.; Zhu, Y.; Ran, X.; Wang, M.; Su, Y.; Cheng, T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *The Journal of Surgical Research* **2006**, *133*, 185. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁸ Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4833. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁹ Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 780. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁰ Ueno, H.; Murakami, M.; Okumura, M.; Kadosawa, T.; Uede, T.; Fujinaga, T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1667. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵¹ Dias, F. S.; Queiroz, D. C.; Nascimento, R. F.; Lima, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. *Química Nova* **2008**, *31*, 160. [CrossRef]
- ⁵² Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2529. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ Hu, Q.; Li, B.; Wang, M.; Shen, J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* **2004**, *25*, 779. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁴ Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3919. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁵ Wang, Y.; Wan, C.; Gilbert, S. R.; Clemens, T. L. Oxygen sensing and osteogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2007**, *1117*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁶ Pound, J. C.; Green, D. W.; Roach, H. I.; Mann, S.; Oreffo, R. O. C. An ex vivo model for chondrogenesis and osteogenesis. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2839. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁷ Jiang, T.; Abdel-Fattah, W. I.; Laurencin, C. T. *In vitro* evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4894. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁸ Liu, H.; Fan, H.; Cui, Y.; Chen, Y.; Yao, K.;

- Goh, J. C. H. Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Huang, D.; Zuo, Y.; Zou, Q.; Wang, Y.; Gao, S.; Wang, X.; Liu, H.; Li, Y. Reinforced nanohydroxyapatite/polyamide66 scaffolds by chitosan coating for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2012**, *100 B*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Ren, D.; Yi, H.; Wang, W.; Ma, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 2403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Niu, X.; Fan, Y.; Liu, X.; Li, X.; Li, P.; Wang, J.; Sha, Z.; Feng, Q. Repair of bone defect in femoral condyle using microencapsulated chitosan, nanohydroxyapatite/collagen and poly(l-lactide)-based microsphere-scaffold delivery system. *Artificial Organs* **2011**, *35*, E119 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Novak, B.; Astete, C.; Sabliov, C.; Moldovan, D. Interaction of PLGA and trimethyl chitosan modified PLGA nanoparticles with mixed anionic/zwitterionic phospho- lipid bilayers studied using molecular dynamics simulations. *Bulletin of American Physical Society Interactions* **2012**, *57*, 1. [[Link](#)]
- ⁶³ Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S. K. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Marine Drugs* **2014**, *12*, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Xu, C.; Lei, C.; Meng, L.; Wang, C.; Song, Y. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2012**, *100 B*, 1435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]