

Rui Pedro de Paiva Pinho

Aplicações do quitosano como biomaterial

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Aplicações do quitosano como biomaterial

Rui Pedro de Paiva Pinho

Aplicações do quitosano como biomaterial

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Rui Pedro de Paiva Pinho

Aplicações do quitosano como biomaterial

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

(Assinatura do aluno)

Orientadora:
Professora Doutora Maria Pia Ferraz

Sumário

Os biomateriais podem ser utilizados para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos quando estes são impossibilitados de cumprir as suas funções naturais.

Atualmente existe uma panóplia de biomateriais que podem ser divididos, de acordo com a sua origem, em materiais naturais e sintéticos. O quitosano consiste num biomaterial natural, hidrófilo, atóxico, biodegradável e biocompatível, produzido por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas desde há vários anos.

O quitosano é um dos biomateriais com maior potencial de utilização na medicina regenerativa. Desde fios de suturas, a biomateriais de aplicação na pele, osso e cartilagens, o quitosano possui uma panóplia de possibilidades de utilização neste campo.

O objetivo deste trabalho de revisão bibliográfica é evidenciar os avanços do quitosano e sua vasta aplicabilidade como biomaterial. A composição do tecido ósseo, tecido cartilaginoso, e a pele, bem como o conceito de biomaterial e quitina serão abordados nas diferentes secções. Por fim, é efetuada uma referência relativa às técnicas de engenharia de tecidos com recurso ao quitosano como, bem como uma avaliação crítica do seu potencial de sucesso, através de exemplos práticos relativos aos seus avanços recentes.

Palavras-chave: Quitosano; Quitina; Biomaterial; Propriedades do quitosano; Engenharia de tecidos.

Abstract

Biomaterials can be used to replace, in whole or in part, biological systems when they are unable to comply with its natural functions.

Currently there is a range of biomaterials that can be divided, according to its origin, in natural and synthetic materials. Chitosan is a natural biomaterial, hydrophilic, non-toxic, biodegradable and biocompatible, produced from renewable natural sources, whose properties have been explored in industrial and technological applications for several years.

Chitosan is one of the biomaterials with potential for use in regenerative medicine. Since sutures, up to application of biomaterials in the skin, bone and cartilage, the chitosan has a range of potential uses in this field.

The objective of this literature review is to highlight the progress of chitosan and his extensive applicability as a biomaterial. The composition of bone, cartilage, and skin, as well as the concept of biomaterial and chitin are discussed in different sections.

Finally, a reference on of tissue engineering techniques using chitosan, as well as a critical evaluation of their potential for success through practical examples relating to its recent advances.

Keywords: Chitosan; chitin; Biomaterial; Chitosan properties; Tissue Engineering.

Agradecimentos

Com o culminar de mais uma etapa importante da minha vida, a realização desta dissertação, para poder concluir o meu mestrado em Ciências Farmacêuticas, queria aqui deixar um grande agradecimento a todos aqueles que me acompanharam ao longo da minha e que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Maria Pia Ferraz por toda a disponibilidade, e supervisão prestadas na realização deste trabalho de conclusão de ciclo.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que contribuíram para o meu conhecimento pessoal.

Um agradecimento profundo aos meus pais e irmãs por todo o apoio, motivação, carinho, dedicação, amizade e coragem que sempre me transmitiram.

Aos meus amigos pelo companheirismo, paciência e encorajamento.

Em suma, a todos os que de certa forma contribuíram na minha vida e que me ajudaram a ser quem sou.

A todos, muito obrigado!

Índice

I. Introdução	10
II. Biomaterial	12
2.1 Conceito	12
2.2 Tipos de biomateriais	12
2.3 Aplicação dos biomateriais	14
2.4. Requisitos dos biomateriais	14
III. Quitina	17
3.1. Conceito	17
IV. Quitosano	19
4.1 Conceito	19
4.2. Processo de obtenção do quitosano	21
4.3. Grau de desacetilação	22
V. Aplicações do quitosano	24
5.1 Medicina Regenerativa	24
5.1.1 Regeneração do osso	25
5.1.2. Regeneração de pele	32
5.1.3. Regeneração de tecido cartilaginoso	36
5.2 Atividade antimicrobiana	40
5.3 Coagulação do sangue	41
5.4. Outras aplicações	41
5.4.1. Excipiente em formulações de medicamentos	42
5.4.2. Fertilizantes naturais na área da agricultura	42
5.4.3. Agente quelante de metais no tratamento de águas	43
5.4.4 Bloqueador da absorção de gorduras	43
VI. Conclusão	44
VII. Referências bibliográficas	45

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química da quitina	20
Figura 2. Estrutura química do quitosano.....	21
Figura 3. Processo de desmineralização e desacetilação da quitina.....	23
Figura 4. Osso esponjoso à esquerda, e osso compacto à direita	26
Figura 5. Técnica usada na regeneração de tecidos a partir de células autógenas	29
Figura 6. Microscopia eletrónica de varrimento de um Scaffold de quitosano e células mesenquimais	31
Figura 7. Pele e hipoderme	34
Figura 8. Fotografia de microscopia ótica de cartilagem hialina	38

I. Introdução

Os avanços ao nível da tecnologia e da medicina aliados a melhores condições de trabalho e de higiene foram fatores predisponentes na melhoria da qualidade de vida da população, com um conseqüente aumento da esperança média de vida.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a esperança média de vida à nascença tem vindo a aumentar nos últimos anos em todo mundo, sendo que para Portugal, em 1990 o valor da esperança média de vida foi estimado em 74 anos, e no ano de 2013 foi estimado em 81 anos o que corresponde a um aumento da esperança média de vida de 7 anos (World Health Organization, 2015).

Perante a presente caminhada evolutiva e com o aumento da esperança média de vida da população, verificou-se um aumento dos riscos de saúde, potenciando desta forma, a probabilidade de ocorrência de danos e lesões graves e conseqüentemente um aumento da frequência de intervenções cirúrgicas.

Neste contexto, e no sentido de desenvolver técnicas que permitam restituir as funções totais ou parciais de órgãos ou tecidos, tem surgido uma necessidade de progresso na área da saúde e da engenharia. Desta forma, os biomateriais têm vindo a ganhar grande importância e a sua utilização no tratamento de lesões ou doenças revelou-se uma das soluções mais promissoras na prática clínica.

Os biomateriais podem ser utilizados para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos quando estes são impossibilitados de cumprir as suas funções naturais. Assim sendo, é obrigatório que os biomateriais possuam requisitos mínimos gerais com o objetivo de minimizar ou eliminar o possível impacto de rejeição que pode acontecer no corpo humano durante o período em que estejam implantados (Ratner et al., 2004).

Quando em contato com os tecidos humanos, o desgaste dos biomateriais não é completamente evitado, podendo causar reações alérgicas e inflamatórias que levariam à rejeição do implante e conseqüentemente à substituição do mesmo. A substituição dos implantes implica um grande acréscimo de custos, tornando-se contraproducente para os

serviços de saúde. Posto isto, é de extrema importância uma constante atualização da investigação no desenvolvimento dos biomateriais (Park e Lakes, 2007).

O presente trabalho é realizado no âmbito da obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Tem como principal objetivo apresentar uma revisão bibliográfica das potencialidades do quitosano como biomaterial e apresentar o seu vasto leque de possibilidades de utilização recorrendo para isso a uma análise de artigos científicos.

Inicialmente serão definidos conceitos como biomaterial e quitina. Posteriormente será abordado o conceito do quitosano, o processo de obtenção do mesmo e as propriedades deste polissacarídeo que lhe permitem ser usado como biomaterial. Por fim, serão realizadas conclusões gerais de todo o trabalho desenvolvido.

II. Biomaterial

2.1 Conceito

O termo biomaterial é empregue para indicar qualquer substância ou mistura de substâncias, usadas para produzir dispositivos farmacologicamente inertes, com o objetivo de serem utilizados na área da saúde, de forma a substituir alguma matéria viva que tenha perdido as suas funções, restaurando desta forma o funcionamento natural do tecido ou órgão (Park e Lakes, 2007).

Inicialmente, o biomaterial era considerado como um *“material não vivo, usado como dispositivo médico, projetado para interatuar com sistemas biológicos”*, no entanto, tal definição foi criando algum tumulto e discussão junto dos investigadores uma vez que se referia exclusivamente a matérias não vivas (Williams, 1988).

Mais tarde, no ano de 1991 durante a segunda Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais realizada em Chester, foi reformulada a sua definição sendo considerado *“um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”* (Williams et al., 1992).

2.2 Tipos de biomateriais

Trata-se então de um material sintético ou natural que poderá ser posteriormente adaptado de forma a minimizar qualquer anomalia quando em contacto com os sistemas biológicos, tendo necessariamente de ser biocompatível e biofuncional, cumprindo, assim, a sua aplicação específica sem causar inconvenientes (Park e Lakes, 2007; Ratner et al., 2004).

No que se refere à sua origem, os biomateriais podem ser classificados em naturais e sintéticos. Os biomateriais de origem natural são obtidos a partir de diversos organismos, desde bactérias a mamíferos, e os biomateriais de origem sintética têm a sua origem em misturas de vários compostos químicos (Chen et al., 2013).

Os biomateriais de origem natural podem ser classificados em autógenos, alógenos e exógenos, conforme o organismo de onde são extraídos. Neste sentido, os biomateriais autógenos são provenientes do mesmo indivíduo onde são retirados e implantados, possuindo menor probabilidade de rejeição e maior eficácia. Relativamente aos biomateriais alógenos, estes são provenientes de um doador da mesma espécie possuindo algum risco de rejeição. Por fim, os biomateriais exógenos são provenientes de um organismo de espécie diferente, estando associados a um elevado índice de rejeição (Park e Lakes, 2007; Ratner et al., 2004).

Quanto à sua composição química, os biomateriais podem ainda ser classificados em metais, cerâmicos, compósitos e polímeros.

Os biomateriais metálicos são caracterizados pela presença de ligações metálicas. Os mais utilizados são o aço inoxidável, cobalto, cromo e molibdênio e as ligas de titânio. Embora estejam entre os biomateriais mais usados, estes apresentam maior probabilidade de corrosão e toxicidade (Barrere et al., 2008; Eisenbarth, 2007).

Os biomateriais cerâmicos usados são compostos inorgânicos cristalinos, constituídos por elementos metálicos e não metálicos que se ligam a partir de ligações iônicas e covalentes que lhes confere uma enorme estabilidade, grande dureza e resistência às alterações químicas. Os mais compostos inorgânicos mais utilizados na constituição destes biomateriais são a hidroxiapatita, safira, alumina, zircônica, vidro cerâmico e carbonato de cálcio (Callister, 2000).

Os biomateriais compósitos são misturas de outros biomateriais e têm como objetivo a criação de um biomaterial com propriedades melhoradas de forma a colmatar as restrições dos seus componentes isolados. São exemplos destes biomateriais os vidros sólidos amorfos (Eisenbarth, 2007; Karageorgiou e Kaplan, 2005).

Os polímeros são biomateriais compostos por moléculas de cadeia longa com unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes carbono-carbono (Baldwin e Kiick, 2010).

2.3 Aplicação dos biomateriais

Ao longo da história foi possível encontrar referências que nos remetem para a utilização de biomateriais. Entre elas, a utilização do ouro e do marfim para reparação ortodôntica pelos chineses, astecas e romanos. Por sua vez, em 1775, o ferro foi utilizado para solucionar situações de fraturas ósseas, enquanto que o primeiro olho de vidro terá sido produzido pelo vidreiro Ludwig Mulles-Urie, na Alemanha (Park e Lakes, 2007).

A importância dos biomateriais é cada vez mais significativa contribuindo para os avanços da medicina moderna. Atualmente, estes podem ser aplicados em várias áreas da saúde como a ortodontia onde são utilizados na correção da posição dos dentes e dos ossos maxilares posicionados de forma inadequada; na ortopedia onde são utilizados no fabrico de implantes e próteses; na cirurgia cardiovascular onde são utilizados no fabrico de pacemakers, válvulas e vasos artificiais; na oftalmologia no fabrico de lentes de contacto; na cirurgia plástica como implantes e substituição de tecidos, entre outros (Park e Lakes, 2007; Ratner et al., 2004).

2.4. Requisitos dos biomateriais

A falha dos primeiros biomateriais utilizados em implantes ocorreu por não ter sido atribuída a devida importância à adequabilidade biológica dos mesmos. Na abordagem contemporânea, a interface entre o biomaterial e o ambiente no qual o dispositivo deve funcionar é tido como prioritária na importância dos requisitos dos biomateriais. Desta forma, é imperativo a presença da biocompatibilidade como competência primordial do biomaterial para atuar numa aplicação específica (Park e Lakes, 2007; Ratner et al., 2004).

Relativamente á biocompatibilidade, o sistema imunitário tem a capacidade de determinar se o objeto é material do próprio organismo ou não. Posto isto, qualquer substância estranha ao organismo tem o potencial de gerar uma resposta do sistema imunológico, podendo causar reações inflamatórias caso seja reconhecida como estranha. Existem vários níveis de biocompatibilidade sendo alguns materiais mais

biocompatíveis do que outros, e por isso, mais rapidamente integrados no organismo sem provocar reações inflamatórias, sendo o fator determinante, a natureza química da superfície do objeto (Ratner et al., 2004).

Quanto às exigências físicas, os biomateriais devem satisfazer um conjunto de requisitos obrigatórios. Um exemplo concreto são os biomateriais utilizados em Cardiologia, nomeadamente os tubos usados para substituir uma artéria com déficit de função; estes devem ser flexíveis e não devem sofrer desgaste, nem alterações quando submetidos a pressão. Outro exemplo são as válvulas cardíacas artificiais, que devem abrir e fechar 70/80 vezes por minuto, a cada dia, por vários anos, sendo que qualquer erro existente nestes materiais coloca em risco a vida das pessoas que os recebam. (Ratner et al., 2004).

No que concerne às exigências químicas, os biomateriais devem ser aprovados para serem usados em qualquer aplicação por intervenção médica. Perante esta aplicabilidade todas as substâncias presentes no biomaterial devem permanecer em situação inócua durante toda a vida, ou seja, devem ser inofensivos uma vez que possivelmente poderão ficar em contacto com o organismo por um longo período de tempo (Brown, 2004).

No caso de um biomaterial colocado num organismo vivo, forma-se uma interface entre o biomaterial e os tecidos orgânicos. Essa interação que ocorre do contacto dos biomateriais com o sistema de fluidos orgânicos desse corpo e a resposta do hospedeiro aos iões desse mesmo material podem ser determinantes na existência de biocompatibilidade do material (Williams, 1989).

Em congruência com o supramencionado, segundo o Consensus Conference of the European Society for Biomateriais a biocompatibilidade dos materiais é definida como a capacidade de um material estranho ao organismo não desencadear rejeição no individuo, implicando a este apenas uma resposta adequada e eficaz (Sefton, 1986; Williams, 2008).

Posto isto, os requisitos gerais dos biomateriais para aplicação médica são a biocompatibilidade, de forma a não reagir com os tecidos e não sofrer desgaste ou corrosão que podem desencadear reações alérgicas inflamatórias; deve ser inócuo, ou seja, não deve ser carcinogénico nem tóxico; deve existir em abundância, ser de fácil obtenção; deve ser resistente aos métodos habituais de esterilização tais como o calor húmido, calor seco e radiações esterilizantes uma vez que este precisa de ser estéril para ser implantado; deve ser moldável; deve ainda possuir características físicas adequadas como resistência à aplicação de forças, elasticidade e durabilidade e por fim, deve possuir densidade próxima da dos meios biológicos onde será implantado (Chen et al., 2013).

A biocompatibilidade é o requisito mais importante de um biomaterial sendo que a escolha de um biomaterial adequado é essencial para o sucesso do tratamento.

Os polímeros naturais como colagénio, fibrinogénio, quitosano e derivados da quitina, ácido hialorónico e poli-hidroxibutirato, são uma classe de biomateriais que para além das suas características de biocompatível e biofuncional, possuem ainda a vantagem de serem biodegradáveis, ou seja, possuem a capacidade de desaparecer após a sua introdução no organismo evitando problemas de biocompatibilidade (Chen e Wang, 2002; Hojo et al., 2003; Ignatius et al., 2005; Liu et al., 1999; Zhao et al., 2002).

As vantagens de aplicabilidade destes materiais são diversas, dadas as suas características imunológicas, bioativas, a sua interação positiva com o corpo humano e o facto de serem encontrados em abundância e extraídos de fontes renováveis (Schmidt e Leach, 2003).

Não obstante, existe ainda outra variante de polímeros, os polímeros biodegradáveis sintéticos, destacando-se como os mais usados pela Engenharia Biomédica os poli (-hidroxiácidos), a poli (ϵ -caprolactona), os poli (carbonatos) e os poli (anidridos) (Ishaugh-Riley et al., 1997; Mooney et al., 1996; Urich et al., 1998; Washburn et al., 2002).

Os polissacarídeos como a quitina e o quitosano são polímeros naturais e constituem uma classe de biomateriais que foram inicialmente pouco utilizados neste campo. No entanto, o reconhecimento do seu potencial bem como a sua utilização está em crescimento significativo (Suh e Matthew, 2000).

III. Quitina

3.1. Conceito

Quitina é um termo derivado da palavra grega “khitón” que significa proteção através de um revestimento. A sua associação à quitina existe por esta ser uma substância estrutural da parede celular de fungos, da carapaça dos crustáceos e do exosqueleto dos artrópodes possibilitando proteção e revestimento a esses organismos (Santos, 2004).

Foi pelas mãos do professor francês Henri Braconnot, membro da Academia da Ciência de Nancy em França, que, em 1811, a quitina foi descoberta quando este desenvolvia uma investigação com fungos, ficando inicialmente conhecida como fungina (Bhatnagar e Sillanpaa, 2009; Santos, 2004).

No entanto, a sua aceitação foi discutida ao longo de vários anos uma vez que se levantaram vozes opositoras afirmando que esse material proveniente dos fungos, possuía semelhanças estruturais com a celulose. Assim, mais tarde, em 1823, o investigador Odier atribuiu o nome de quitina ao material tendo isolado este polímero de insetos. Odier desenvolveu ainda mais a sua investigação tendo constatado a presença de quitina na carapaça de caranguejos concluindo assim que este seria o material básico na formação do exosqueleto de insetos e crustáceos (Krajewska, 2004).

Ainda no ano de 1823, investigadores como Odier e mesmo Children indicaram que conseguiram isolar a quitina através de múltiplas aplicações com soluções de hidróxido de potássio concentrado. Porém, tudo indica que terão isolado quitosano em vez da quitina, uma vez que, a quitina em meio alcalino concentrado pode sofrer desacetilação e originar quitosano (Krajewska, 2004).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, após a celulose. Como já referido anteriormente, a quitina é um polímero sintetizado por um enorme número de organismos vivos sendo uma substância estrutural do exosqueleto de crustáceos tais como camarões, caranguejos e lagostas, e da parede celular de fungos e leveduras. Também é produzido por outros organismos vivos sendo degradada pela enzima quitinase (Rinaudo, 2006).

É possível aferir que as lulas, os caranguejos, camarões, lagostas e ostras possuem na sua constituição 10% a 15 % de peso seco em quitina. Por sua vez, os fungos da ordem mucorales possuem para além da quitina, o derivado desacetilado deste biopolímero denominado quitosano (22 a 44 %) (Andrade et al., 2003).

Como polissacarídeo natural que é, possui uma fase cristalina organizada, possível de analisar através de raios-X. Dependendo da fonte de obtenção, a estrutura cristalina da quitina figura na natureza sob três formas polimórficas indicadas como α , β e γ . A forma α é a mais abundante e apresenta elevada cristalinidade e simultaneamente elevada pureza apresentando uma maior dureza e maior estabilidade a reações químicas devido a fortes ligações de hidrogénio intermoleculares. Já nas formas β e γ ressalva-se a flexibilidade. Não obstante estas podem sofrer alterações após tratamentos e converterem-se na forma α (Antonino, 2007).

A quitina α é um polissacarídeo com uma coloração branca, insolúvel em água, com baixa reatividade química, rígido e inflexível, a partir do qual se obtém o quitosano (Dutta et al., 2004; Laranjeira e Fávere, 2009).

A quitina, assim como o seu derivado quitosano, em oposição a outros biomateriais, são polissacarídeos de baixo custo, renováveis e biodegradáveis (capaz de se desintegrar e ser absorvido pelo organismo após a sua implantação). A adoção destes polímeros orgânicos, dadas as suas características, contribuem para a diminuição dos impactos ambientais comparativamente ao de polímeros sintéticos e constituem um recurso economicista de baixo custo. Para além da aplicação na saúde, a quitina pode ser aplicada em outros setores como na construção civil, por se distinguir pela sua elevada resistência (Pillai et al., 2009).

As difíceis modificações químicas e a baixa solubilidade da quitina são os maiores fatores limitantes para a sua utilização como biomaterial. Desta forma, tem-se verificado um crescente interesse no estudo do quitosano devido á sua alta solubilidade em soluções aquosas ácidas e à facilidade de alterações químicas (Aoi et al., 2000).

IV. Quitosano

4.1 Conceito

Atualmente existe uma panóplia de biomateriais que podem ser divididos, de acordo com a sua origem, em materiais naturais e sintéticos. Uma vez que a maioria dos polímeros hoje em dia são materiais sintéticos, a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade é bastante limitada em comparação com os polímeros naturais. Neste âmbito, os biomateriais poliméricos de origem natural mais utilizados são o alginato, o colagénio, o ácido hialurónico e o quitosano (Bose et al., 2012).

A descoberta do quitosano ocorreu em 1859 por Rouget, após este ter tratado a quitina com uma solução concentrada de hidróxido de potássio (Amaral, 2005).

Segundo a literatura, o quitosano é um polímero biodegradável e biocompatível, que não induz resposta biológica do sistema imunológico quando implantado. Estas características fazem deste polímero uma excelente opção para ser utilizado como biomaterial (Polo-Corrales et al., 2014). Contudo, é escassa a possibilidade de se encontrar a estrutura do quitosano na natureza. Para colmatar esta problemática, a síntese deste polímero é conseguida industrialmente, recorrendo a processos químicos ou enzimáticos (Kumar, 2000).

O quitosano consiste, portanto, num polímero hidrófilo, atóxico, biodegradável, biocompatível, produzido por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas desde há vários anos (Kumar, 2000).

A quitina e o quitosano são polímeros constituídos por monómeros de 2-aminodesoxiglucose ou glucosamina (unidade não acetilada) e N-acetil-2-aminodesoxiglucose ou N-acetilglucosamina (unidade acetilada) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. No entanto, os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à sua solubilidade. Na estrutura da quitina predominam unidades de N-acetil-2-aminodesoxiglucose, em contrapartida, na estrutura do quitosano predominam unidades de 2-aminodesoxiglucose. Esta relação representa um fator marcante na solubilidade de ambos os polímeros uma vez que a quitina é insolúvel na maioria dos solventes e o quitosano é solúvel em soluções aquosas ácidas (Berger, 2004; Rinaudo, 2006).

Ambos os monómeros possuem estruturas moleculares similares, distinguindo-se apenas no grupo substituinte do carbono 2 do anel da glucopirranose, sendo que o monómero 2-aminodesoxiglucose apresenta um grupo amina e o monómero N-acetil-2-aminodesoxiglucose apresenta um grupo acetamida (Berger, 2004).

A figura 1 ilustra uma possível configuração química da quitina e a figura 2 ilustra uma possível configuração química do quitosano.

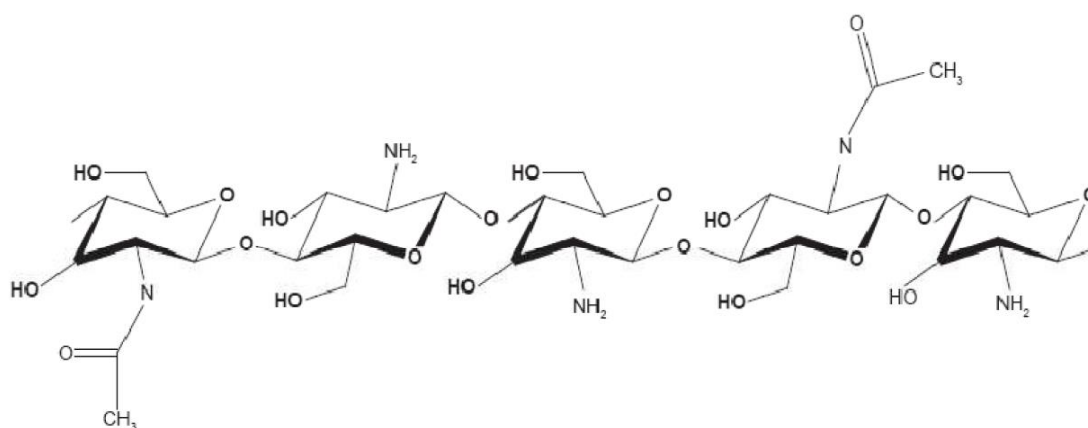


Figura 1. Estrutura química da quitina (Borgognoni et al., 2006)

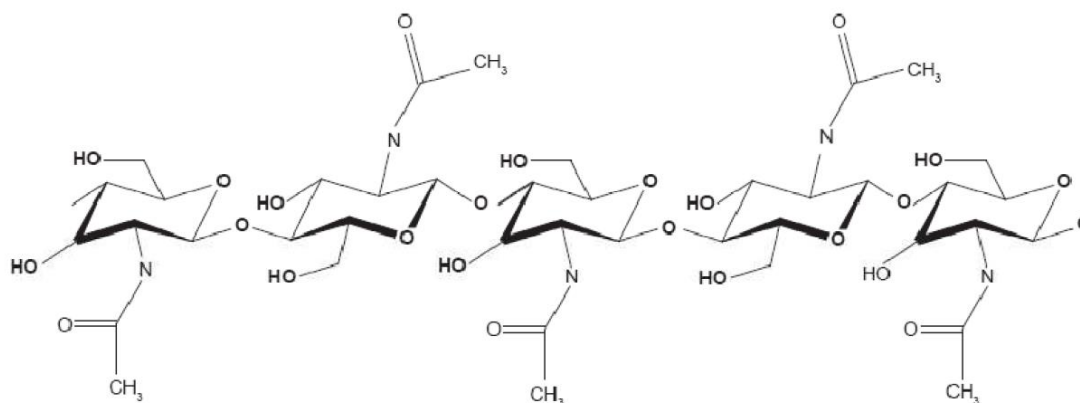


Figura 2. Estrutura química do quitosano (Borgognoni et al., 2006)

4.2. Processo de obtenção do quitosano

Tal como mencionado anteriormente, a quitina caracteriza-se como substância precursora do quitosano pois, embora o quitosano ocorra naturalmente na natureza em alguns fungos, este é geralmente obtido através do processo de desacetilação alcalina da quitina. A reação de desacetilação caracteriza-se pela remoção do grupo acetil ($-COCH_3$) de um composto orgânico. Contudo, a quitina tem de ser previamente tratada para poder ser usada na obtenção do quitosano (Kumar, 2000).

A utilização do exosqueleto dos crustáceos para a obtenção de quitina, envolve por isso, a dissolução prévia do carbonato de cálcio que se encontra presente em concentrações elevadas no seu exosqueleto. Partindo-se da matéria-prima bruta, inicia-se a lavagem abundante com água, seguida de uma lavagem com ácidos (geralmente ácido clorídrico) que retiram todo o conteúdo mineral do exosqueleto dos crustáceos (Kumar, 2000).

O exosqueleto dos crustáceos contem, ainda, pigmentos que não se encontram complexados com o carbonato de cálcio, desta forma, os pigmentos permanecem associados à quitina, não sendo eliminados pelo tratamento supramencionado. Estes pigmentos podem posteriormente ser eliminados por extração com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização (Rinaudo, 2006).

Após estes tratamentos, a quitina pode então ser submetida à desacetilação para obtenção do quitosano. A desacetilação da quitina pode ser realizada através de processos enzimáticos ou através de processos químicos com recurso a um meio de desacetilação ácido ou alcalino (Peniche et al., 2003).

A prática industrial mais comum no processo de desacetilação da quitina, também utilizada em laboratórios de pesquisa, é aquela na qual a desacetilação é realizada através de um tratamento alcalino, geralmente em solução aquosa de hidróxido de sódio. A desacetilação em meio ácido não é aplicado devido à suscetibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida (Peniche et al., 2003; Prashanth et al., 2002).

4.3. Grau de desacetilação

A desacetilação alcalina, embora a mais utilizada e mais estável, não obtém quitosano totalmente desacetilada (Campana e Signini, 2001; Prashanth et al., 2002).

Diferentes graus de desacetilação do quitosano podem então ser obtidos em consequência de variações no tratamento utilizado. Essas variações incluem sobretudo o tempo de reação, a temperatura a que decorre a reação e a concentração de hidróxido de sódio utilizada. Contudo, fatores como a adição de diluentes, a razão quitina-solução alcalina, o tamanho das partículas de quitina utilizadas, a atmosfera da reação, e a presença de agentes que evitem a despolimerização, podem também provocar alterações no grau de desacetilação obtido (Campana e Signini, 2001; Prashanth et al., 2002).

Para além do grau de desacetilação, o quitosano pode ainda apresentar variações a nível de comprimento das suas cadeias poliméricas e consequentemente do peso molecular, bem como a nível da solubilidade e distribuição dos grupos acetamida (Rinaudo, 2006; Okuyama et al., 2000). Estas variações também se devem às diferenças no tratamento utilizado uma vez que tempos de reação prolongados e temperaturas elevadas são os fatores responsáveis pela degradação das cadeias e obtenção de quitosano com reduzida massa molecular (Campana e Signini, 2001; Prashanth et al., 2002).

Um dos métodos descritos nas publicações científicas é a prévia desmineralização da quitina a 1.25M de ácido clorídrico e a desacetilação em solução de hidróxido de sódio a 1 ou 2M, a uma temperatura de 70°C (Amaral, 2005).

A maioria das publicações científicas usam o termo quitosano quando o grau de desacetilação é superior a 70%. No entanto, o grau de desacetilação que diferencia a quitina do quitosano não está ainda totalmente definido (Di Martino et al., 2005).

Na figura 3 é possível observar um exemplo do processo de desmineralização e desacetilação alcalina da quitina

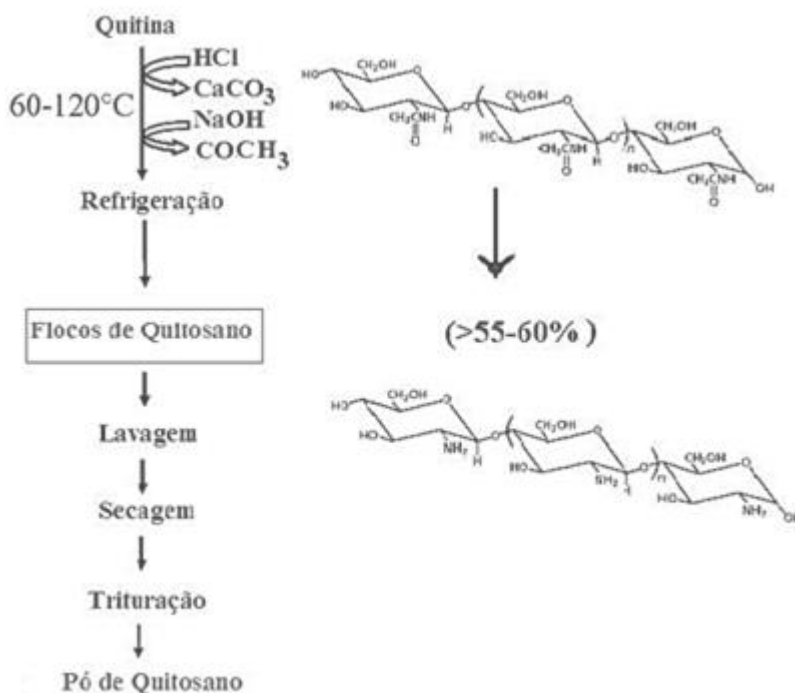


Figura 3. Processo de desmineralização e desacetilação da quitina (Adaptado de: Kristbergsson, 2007)

A importância atribuída ao quitosano tem sido nas últimas décadas acrescida por diversos fatores, onde se destaca a sua quantidade e facilidade de obtenção, aliadas ao facto de este polímero ser relativamente barato, e a sua facilidade de tratamento em comparação com a de outros biomateriais, uma vez que, o processo de desacetilação a partir da quitina, não é algo complexo (No et al., 2007).

Para além disso, as inúmeras modificações químicas possíveis, permitem a obtenção de uma grande variedade de derivados do quitosano e consequentemente diversas possibilidades de utilização deste biomaterial na área da saúde. Exemplo disso é a baixa solubilidade em água do quitosano (Borgognoni et al., 2006). No entanto, este ao ser alterado quimicamente através da introdução de cadeias de ácidos orgânicos ou ácidos inorgânicos diluídos, apresenta grande solubilidade em água podendo assim, ser modificado de forma a adquirir as características pretendidas (Okuyama et al., 2000).

Já a quitina, embora seja um recurso de elevada facilidade de obtenção a baixo custo, não possibilita modificações químicas uma vez que este polissacarídeo possui uma estrutura altamente cristalina, com fortes interações entre hidrogênios intramoleculares, e sendo insolúvel em água, apresenta consequentemente um número reduzido de possibilidades de utilização (Rinaudo, 2006).

O quitosano, para além da facilidade de obtenção, facilidade de tratamento e da possibilidade de alterações químicas apresenta propriedades fulcrais para a sua utilização como biomaterial das quais se destacam a bioadesão (devido à carga positiva que adquire a pH fisiológico), a possibilidade de formação de estruturas porosas, inócuo, biocompatível e biodegradável (Alexander et al., 1996; Amaral, 2005; Rabea et al., 2003).

V. Aplicações do quitosano

Nas últimas décadas, uma larga variedade de aplicações médicas do quitosano e seus derivados têm vindo a ser desenvolvidas.

5.1 Medicina Regenerativa

A pesquisa na área da Medicina Regenerativa tem demonstrado grandes progressos, sobretudo no que diz respeito aos biomateriais. Com efeito, a engenharia de tecidos tem como objetivo, criar e aperfeiçoar alternativas terapêuticas na regeneração e reparação de tecidos danificados (Chen et al., 2013).

O quitosano é um dos biomateriais com maior potencial de utilização na medicina regenerativa. Desde fios de suturas, a biomateriais de aplicação na pele, osso e cartilagens, existe uma panóplia de possibilidades de utilização deste polímero natural.

5.1.1 Regeneração do osso

Uma compreensão da estrutura e fisiologia do osso é essencial para o desenvolvimento de técnicas de reparação deste tecido. Neste sentido, o osso é formado por tecido rígido, metabolicamente ativo, muito vascularizado, inervado, que compõe o esqueleto dos vertebrados. Este tem como função, a proteção dos órgãos internos e serve de suporte para os tecidos moles, proporcionando assim uma manutenção da estabilidade estrutural. Para além disso, o osso tem a capacidade de armazenar minerais como o cálcio e o fosforo permitindo a libertação dos mesmos casos os seus níveis na corrente sanguínea diminuam. O osso está ainda diretamente relacionado com a produção de células sanguíneas e plaquetas uma vez que, muitos ossos contêm cavidades cujo interior está preenchido por medula óssea vermelha, responsável pela produção destas células (Amaral, 2005; Seeley et al., 2003).

Do ponto de vista macroscópico, o osso pode ser caracterizado em osso esponjoso e em osso compacto conforme a sua densidade. O osso esponjoso é constituído por trabéculas, onde entre elas existem espaços que são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos. O osso compacto é mais denso e possui menos espaços do que o osso esponjoso (Seeley et al., 2003).

Na figura 4 temos a representação do osso esponjoso á esquerda e do osso compacto á direita.

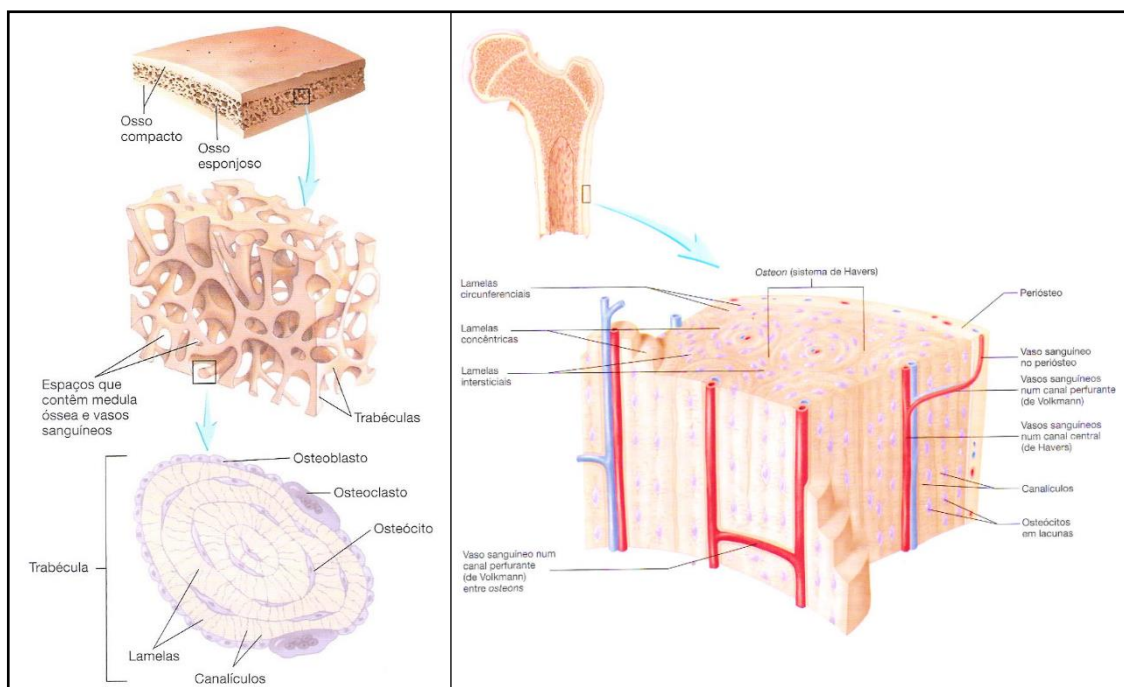


Figura 4. Osso esponjoso à esquerda, e osso compacto à direita (Seeley et al., 2003).

As células ósseas classificam-se em osteoblastos, osteócitos e osteoclastos que têm funções e origens diferentes (Seeley et al., 2003).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela osteogênese que corresponde ao processo de formação de tecido ósseo. A matriz óssea produzida pelos osteoblastos cobre a superfície óssea mais antiga e envolve os corpos celulares dos osteoblastos que se unem uns aos outros através de prolongamentos celulares, resultando numa nova camada de osso (Seeley et al., 2003).

Quando os osteoblastos ficam rodeados por matriz óssea, tornam-se relativamente inativos originando uma célula madura designada por osteócito. Estas células, embora possuam pouca atividade, são responsáveis pela síntese dos componentes necessários para manter a matriz óssea. Os osteoclastos são células grandes com vários núcleos, responsáveis pela destruição/reabsorção do osso (Amaral, 2005; Seeley et al., 2003).

Os osteoblastos derivam de células progenitoras osteocondrais que são células mesenquimais, enquanto os osteócitos derivam dos osteoblastos. Os osteoclastos não

derivam de células progenitoras osteocondrais mas sim de células estaminais da medula óssea vermelha (Seeley et al., 2003).

Em relação á matriz óssea, esta é constituída 35% de material orgânico como colagénio tipo I e proteoglicanos, e 65% de material inorgânico como a hidroxiapatite que consiste num cristal de fosfato de cálcio que confere dureza á matriz. Se o material orgânico for retirados do osso, este perde flexibilidade e torna-se frágil e quebradiço. Por sua vez, se o material inorgânico for retirado do osso, este perde dureza e torna-se muito flexível (Leite, 2014; Seeley et al., 2003).

A contínua reabsorção e formação óssea provocada pelos osteoclastos e osteoblastos, respetivamente, permite que o tecido ósseo esteja em contínua renovação. A osteoporose consiste na diminuição global do tecido ósseo que ocorre quando a velocidade de reabsorção supera a velocidade de formação óssea. A perda de massa óssea inicia-se por volta dos 35 anos e aumenta continuamente com o tempo sendo que com a idade essa perda pode ser tão significativa que os ossos fraturam espontaneamente (Leite, 2014).

Nas mulheres, o estrogénio que é segregado pelos ovários, é responsável pela inibição da atividade da PTH, sendo está hormona responsável pela estimulação da atividade osteoclástica. Desta forma o estrogénio contribui na manutenção da massa óssea. Nas mulheres pós-menopáusicas, a produção de estrogénio diminui resultando no aumento da incidência das fraturas ósseas. Nos homens, a redução dos níveis de testosterona pode também levar à perda deste tecido. Contudo, os níveis de testosterona não descem significativamente até aos 65 anos de idade (Leite, 2014; Seeley et al., 2003).

A diminuição da atividade física, consequência do avanço da tecnologia e industrialização dos dias modernos, também é um fator predisponente da diminuição do tecido ósseo. Para além disso, a absorção intestinal de cálcio, essencial para a manutenção óssea, diminui com a idade. Estes fatores aliados ao facto das pessoas viverem mais tempo, promoveu o aumento de lesões e fraturas ósseas (Leite, 2014; Seeley et al., 2003).

O osso é um tecido vivo que tem a capacidade de se autorregenerar após uma lesão, contudo, o processo de regeneração leva tempo, e quando a extensão da lesão é muito grande a regeneração do osso não é possível (Leite, 2014).

A reparação óssea é por isso um dos grandes problemas dos dias de hoje. Na tentativa de resolução dos problemas ósseos, alguns critérios importantes na cicatrização dos tecidos lesados devem ser tidos em conta como, a área do local lesionado, o aporte sanguíneo para uma correta nutrição celular e a presença de uma estrutura tridimensional que serve de suporte para o crescimento das células (Navarro et al., 2008).

A Medicina Regenerativa do tecido ósseo oferece abordagens interessantes para a regeneração e reparação deste tecido. Como solução a este problema tem sido utilizadas estruturas híbridas compostas por células e matrizes tridimensionais (*scaffolds*) na reparação e reconstrução das lesões. O uso de nutrientes e fatores de crescimento como açúcares (glucose), aminoácidos, (glutamina), sais minerais (sódio e potássio), vitaminas e hormonas, pode também estar envolvido de modo a promover a um crescimento celular mais acentuado (Pagni et al., 2012).

Os *scaffolds* caracterizam-se por matrizes tridimensionais porosas que permitem cultivar e servir de suporte à proliferação das células de forma semelhante à de tecidos *in vivo*. Devem por isso ser organizadas de forma a permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como o transporte de nutrientes e a remoção de metabolitos tendo como função criar um microambiente favorável para a deposição de matriz extracelular. Para além disto, os *scaffolds* devem ainda possuir uma biodegradabilidade adequada e não devem induzir reações imunológicas (Pagni et al., 2012).

Os *scaffolds* usados na regeneração do osso são por isso biomateriais que adquirem uma estrutura tridimensional, e têm a capacidade de conferir suporte físico para crescimento ósseo, permitindo o transporte de osteoblastos ou das suas células precursoras para o local lesionado, promovendo o crescimento celular local e permitindo a restituição das funções perdidas, quer por acidente, quer por doença. Após a implantação, os *scaffolds* devem de ter a capacidade imediata de remodelação e

bioadesão aos tecidos e a capacidade de mimetizar os meios físicos e químicos do tecido saudável, causando a migração, diferenciação e proliferação tecidual a partir de células aí implantadas, ou através de células de tecidos vizinhos (Karageorgiou e Kaplan, 2005).

Caraterísticas como a capacidade de bioadesão, capacidade de formação de estruturas porosas, capacidade de se moldar e adaptar aos contornos do defeito ósseo e o facto de se tratar de um biomaterial biodegradável, para além dos requisitos obrigatórios para ser usado como biomaterial, fazem do quitosano um polímero com um elevado potencial de utilização na estruturação de *scaffolds* (Bose et al., 2012).

A figura 5 representa a técnica de regeneração de tecidos com recurso a um *scaffold* e a partir de células autógenas.

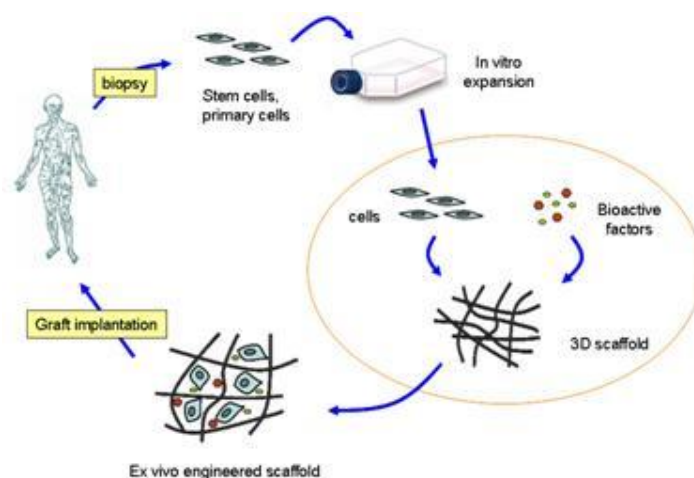


Figura 5. Técnica usada na regeneração de tecidos a partir de células autógenas (National University Health System, 2010).

O método utilizado em Medicina Regenerativa, na regeneração dos tecidos lesados através do quitosano consiste no seguinte: Com recurso a uma biopsia, são extraídas de um organismo uma pequena quantidade de células que são cultivadas *in vitro*. Estas

células podem ser classificadas em células autógenas, alógenas e exógenas conforme o organismo de origem das células sendo este um fator crítico na biocompatibilidade do implante final. As células mesenquimais são o tipo de células mais utilizadas na regeneração do osso. De seguida, as células são cultivadas *in vitro* em meios de cultura de forma a obter uma quantidade substancial de células. Depois, as células são retiradas do meio de cultura onde se encontravam a proliferar, e são adicionadas aos *scaffolds* de quitosano, construídos previamente. São também adicionados fatores de crescimento. Os *scaffolds* servem de suporte para o crescimento das células, permitindo que o tecido formado adquira uma estrutura tridimensional, semelhante à que existe nos tecidos do organismo. Os fatores de crescimento servem de substrato para o crescimento dessas células de forma a obter um desenvolvimento celular mais acentuado. No final, obtém-se uma cultura *in vitro* de uma estrutura híbrida constituída por um elemento vivo (células) e um elemento não vivo (*scaffolds* de quitosano), que são posteriormente implantadas *in vivo*, no local da lesão normalmente através de injeção. A implantação por injeção é uma mais valia uma vez que evita uma “cirurgia aberta” sendo esta menos traumática, realizada em menor tempo permitindo ainda uma melhor recuperação (Berthiaume et al., 2011, Shokeir et al., 2010).

Os *scaffolds* de quitosano são biomateriais que podem ser usados isoladamente (sem adição de células) na reparação de defeitos ósseos. Contudo, nos casos em que estão envolvidas áreas extensas lesadas e conseqüentemente a regeneração do osso não é possível, os *scaffold* por si só não é suficiente na reparação das lesões, sendo por isso importante a combinação com a terapia celular (Robey, 2011).

O quitosano como biomaterial bioabsorvível, quando em contacto com os fluidos corporais sofre degradação e serve de substrato para o crescimento celular, ou é fagocitados pelos macrófagos, sendo reabsorvido e eliminado pelo próprio organismo sem que surjam efeitos adversos. Como anteriormente referido, as atenções têm-se virado para estes biomateriais, uma vez que este não necessita de uma intervenção cirúrgica para a retirar o material implantado (Hench e Wilson, 1993; Koops, 2010).

Na figura 6 é possível ver um exemplo de um *scaffold* de quitosano e células mesenquimais em crescimento através de microscopia eletrônica de varrimento.

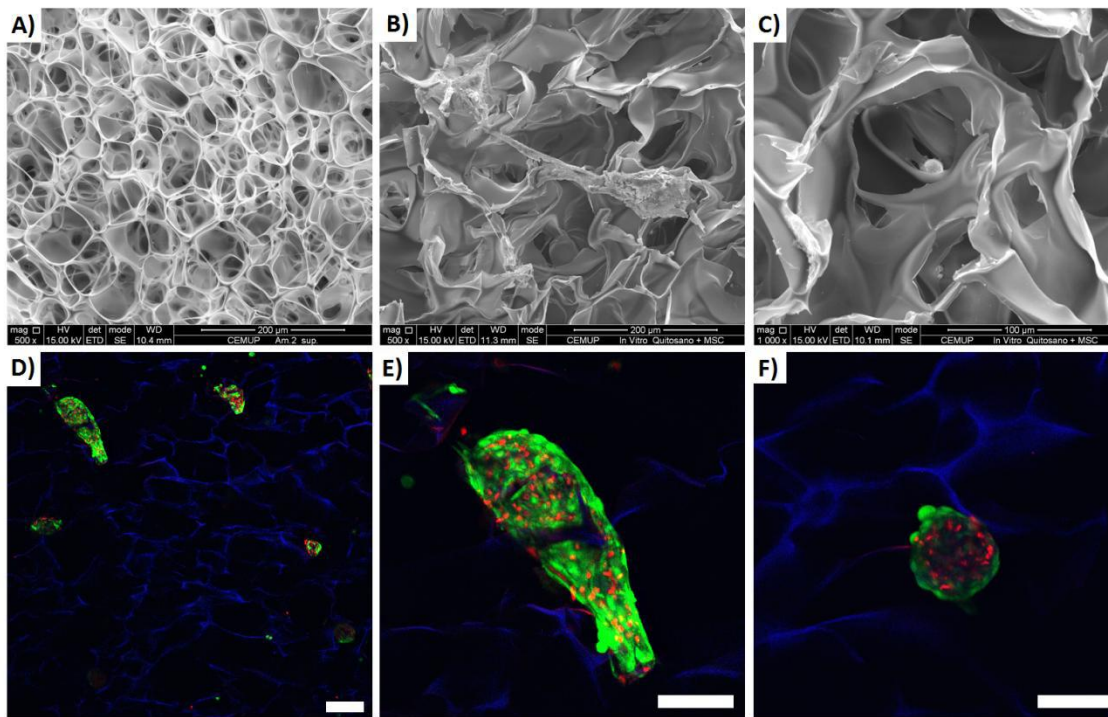


Figura 6. Microscopia eletrônica de varrimento de um Scaffold de quitosano e células mesenquimais (Barros, 2012).

Vários estudos demonstraram a viabilidade e o sucesso da utilização de *scaffolds* de quitosano na promoção da diferenciação dos osteoblastos e na regeneração do tecido ósseo. Nos próximos parágrafos são descritos exemplos dos resultados obtidos por alguns investigadores.

Segundo os estudos de Park et al. (2000), a aplicação de quitosano em defeitos ósseos em ratos promoveu a formação de novo osso, enquanto os defeitos ósseos que não tratados com quitosano, foram completamente preenchidos por tecido fibroso.

Muzzarelli et al. (1993) tratou defeitos ósseos na tíbia de coelhos com *scaffolds* de quitosano que mostraram mais tarde sinais de crescimento ósseo em comparação com o controle.

5.1.2. Regeneração de pele

A pele tem como principal função a proteção do organismo das ameaças externas físicas e imunitárias, protegendo também contra a desidratação ao reduzir a perda de água transepidérmica. Esta permite-nos ainda regular a temperatura corporal controlando o fluxo de sangue através da pele e através atividade das glândulas sudoríparas. Para além disso, a pele permite-nos interagir com o meio exterior uma vez que contém recetores sensoriais capazes de detetar diversos estímulos como a dor, a pressão, o calor e o frio (Seeley et al., 2003).

A pele é composta por duas camadas principais designadas de epiderme (menos espessa) e derme (mais espessa). A epiderme assenta na derme que por sua vez repousa sobre a hipoderme, tecido este com abundante depósito de gordura e que embora não faça parte da pele, permite estabelecer ligações entre a pele e as estruturas subjacentes a este tecido, como o músculo e o osso (Chu, 2008).

A epiderme é a camada mais superficial da pele e apresenta um epitélio pavimentoso estratificado constituído pelo estrato córneo, estrato lúcido ou translúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo ou basal, podendo o estrato lúcido estar ou não presente uma vez que este é característico apenas da pele mais espessa. A epiderme é avascularizada sendo nutrida por difusão a partir de capilares presentes na derme. As células são produzidas nas camadas mais profundas da epiderme por mitose e à medida que se vão multiplicando, empurram as células mais velhas para a superfície onde acabam por morrer e escamar (Chu, 2008).

A maior parte das células da epiderme são designadas por queratinócitos responsáveis pela produção de queratina que confere à epiderme a capacidade de resistir à abrasão e reduzir a perda de água. Outras células presentes na epiderme são os melanócitos, que contribuem para a cor da pele, as células de Langerhans que fazem parte do sistema imunitário, e as células de Merkel, que são células sensoriais associadas a terminações nervosas e responsáveis por detetar estímulos como o tato e a pressão superficial (Chu, 2008; .Seeley et al., 2003).

A derme encontra-se dividida em duas camadas: camada papilar (mais superficial) e a camada reticular (mais profunda). A camada papilar é constituída por papilas que se são prolongamentos da derme em direção á epiderme. Esta camada é constituída por tecido conjuntivo laxo com fibras finas e numerosos vasos sanguíneos que permitem fornecer nutrientes à epiderme. A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso com fibras dispostas irregularmente sendo esta a principal camada da derme (Chu, 2008; .Seeley et al., 2003).

A derme é caracterizada por tecido conjuntivo constituído por fibroblastos e matriz extracelular. Por sua vez, a matriz extracelular é constituída por fibras de elastina e colagénio tipo I (derme reticular), II e III (derme papilar), água e ainda glucosaminoglicanos (GAG) como o ácido hialurónico e o sulfato de condroitina. O ácido hialurónico é um polímero constituído por monómeros de ácido glucurónico e N-acetilglucosamina (monómero comum com o quitosano). Na derme podemos ainda encontrar anexos cutâneos (folículos pilosos, musculo liso e glândulas), terminações nervosas, vasos sanguíneos e macrófagos (Chu, 2008; .Seeley et al., 2003).

Os fibroblastos constituem a maior parte das células da derme e são responsáveis pela produção das fibras de colagénio e elastina bem como os glucosaminoglicanos. As fibras de colagénio são as principais fibras encontradas na derme e conferem suporte da pele enquanto as fibras de elastina conferem elasticidade. Os glucosaminoglicanos são polímeros longos que possuem carga negativa e por isso têm a capacidade de atrair catiões como o sódio. Em consequência da migração de sódio para a pele, ocorre também a migração de moléculas de água que potenciam a hidratação da matriz extracelular. O ácido hialurónico é o principal glucosaminoglicano da pele (Chu, 2008; .Seeley et al., 2003).

Na figura 7 é possível observar a pele e hipoderme assim como anexos cutâneos e hipoderme.

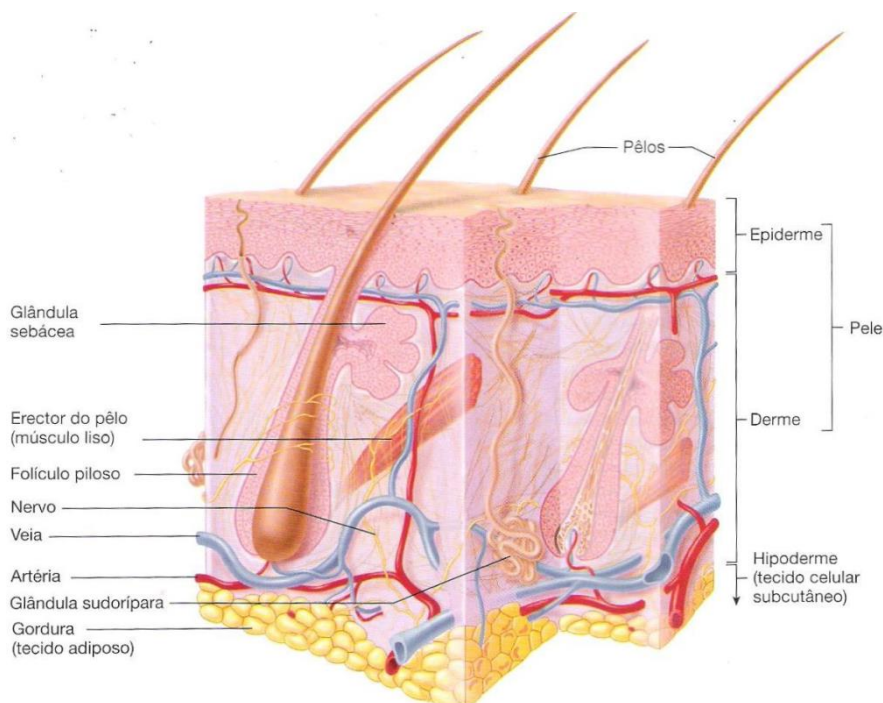


Figura 7. Pele e hipoderme (Seeley et al., 2003).

Uma queimadura é uma lesão na pele que pode ser provocada por diversos fatores como calor, atrito, radiação, entre outros. No caso de queimaduras superficiais, estas podem ser tratadas através do processo de cicatrização natural da pele desencadeado pelo organismo. Contudo, em queimaduras mais profundas, a cicatrização da pele encontra-se comprometida uma vez que a presença de tecido necrótico acompanhado por constante produção de exsudado torna difícil o processo de cicatrização natural. Indivíduos que sofreram perdas extensivas de pele, muito comum no caso de queimaduras provocadas por incêndios, produzem efeitos sistêmicos que podem ameaçar a sua vida tanto pela elevada probabilidade de contrair infecções como também pela elevada perda de fluidos corporais devido á ausência da pele. Para além disto, estes indivíduos sofrem problemas na sua reabilitação decorrentes das profundas e desfigurantes cicatrizes (Seeley et al., 2003).

Desta forma, a área da Medicina Regenerativa tem-se dedicado intensamente á regeneração da pele uma vez que as suas lesões são bastante recorrentes nos tempos modernos. Devido á sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formular estruturas porosas, facilidade de manuseamento e capacidade de adesão aos tecidos lesionados, o quitosano tornou-se numa das alternativas disponíveis pela Medicina Regenerativa na reparação deste tecido (Amaral, 2005; Muzzarelli, 2009).

A lisozima é uma enzima catalítica que promove a hidrólise das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Esta tem um elevado potencial no controlo de infeções bacterianas uma vez que induz a lise dos peptidoglicanos da parede das bactérias levando à morte celular. A lisozima pode ser encontrada no citoplasma de macrófagos, nos tecidos em caso de infeção, e em várias secreções corporais como a lagrima, saliva, leite humano e nos fluidos que rodeiam a cartilagem (Amaral, 2005; Lee t al., 1996; Olsen et al., 1989; Sandford e Steinners, 1991).

O quitosano, utilizado na regeneração da pele, após ser implantado no local de lesão, vai sofrer hidrólise por parte das lisozimas uma vez que este biomaterial é constituído por monómeros unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. O monómero N-acetilglucosamina proveniente da hidrólise do quitosano tem a capacidade de desencadear uma resposta imunitária por parte dos macrófagos, que libertam interleucina-1 e lisozimas. A libertação de lisozimas potencia a dissociação do quitosano nos seus monómeros permitindo alcançar concentrações elevadas de N-acetilglucosamina nos tecidos lesados (Amaral, 2005; Lee et al., 1996; Olsen et al., 1989; Sandford e Steinners, 1991).

A interleucina-1 estimula a proliferação de fibroblastos, que por sua vez vai promover a formação de fibras de colagénio e elastina bem como a formação de ácido hialurónico beneficiando das elevadas concentrações de N-acetilglucosamina. Desta forma, vão ser sintetizados componentes fundamentais da matriz extracelular da pele que funciona como substrato para o crescimento celular uma vez que permite a ancoragem das células e constitui o meio por onde chegam os nutrientes e são eliminados os resíduos celulares provenientes da sua metabolização (Amaral, 2005; Lee t al., 1996; Olsen et al., 1989; Sandford e Steinners, 1991).

O quitosano pode então ser usado na regeneração da pele uma vez que promove a aceleração da cicatrização das lesões (Amaral, 2005; Lee et al., 1996; Olsen et al., 1989; Sandford e Steinners, 1991).

Para além disso, *scaffolds* de quitosano complexados com células mesenquimais podem também ser usados na regeneração da pele, por processos idênticos à sua utilização na regeneração de tecido ósseo.

Vários estudos demonstraram a viabilidade e o sucesso da utilização do quitosano na regeneração da pele. Nos próximos parágrafos são descritos exemplos dos resultados obtidos por alguns investigadores.

Wittaya-arekul e Prahsarn (2006) testaram membranas de quitosano no tratamento de lesões na pele. Estes autores consideram que um biomaterial, para além de a proteger, tem a capacidade de promover a restituição do tecido, originando um microambiente de tratamento adequado e removendo o exsudado produzido pelas feridas. As membranas de quitosano mostraram boa proteção microbiana indicando bom potencial de tratamento (Cho et al., 1999).

Após a aplicação de fibras de algodão com quitosano em feridas abertas de cães, foi possível aferir que o quitosano é eficiente na regeneração da pele devido à indução de macrófagos bem como a migração fibroblástica para a zona da ferida (Ueno et al., 2007).

Para além disso, membranas de quitosano mostraram uma perda de água por evaporação controlada, boa oxigenação e uma melhoria na capacidade de drenagem de fluidos (Mi et al., 2002).

5.1.3. Regeneração de tecido cartilaginoso

O tecido cartilágneo ou cartilagem é um tecido avascularizado, constituído por células e matriz extracelular. As células presentes neste tecido são os condroblastos e os condrócitos. Os condroblastos são células responsáveis pela produção de uma pequena

quantidade de matriz de cartilagem que quando envolvidos pela matriz, passam a chamar-se condrócitos, células estas arredondadas que ocupam um espaço na matriz extracelular designada de lacuna. Os condrócitos possuem a capacidade de se dividir e são responsáveis pela produção de mais matriz extracelular no seio da matriz já existente. Por sua vez, a matriz extracelular é constituída por água, proteoglicanos e fibras de colagénio maioritariamente tipo II podendo também conter fibras de elastina (Gorsline et al., 2010; Iwasaki et al., 2011).

As fibras de colagénio são responsáveis por conferir resistência à cartilagem. Os proteoglicanos formam agregados com o ácido hialurónico que atuam como esponjas, capazes de absorver grandes quantidades de água, que vai permitir que a cartilagem recupere a forma após ser comprimida. A maior parte da superfície da cartilagem é rodeada por uma camada de tecido conjuntivo, chamada pericôndrio sendo as células da cartilagem originárias deste tecido (Ragetly, 2010).

Existem três tipos de cartilagem: cartilagem hialina, fibrocartilagem e cartilagem elástica. A cartilagem hialina contém fibras de colagénio pequenas dispersas uniformemente na matriz, e está presente nos ossos longos em crescimento, anéis cartilágeos do aparelho respiratório, cartilagem nasal e nas superfícies articulares dos ossos. A cartilagem fibrosa contém mais fibras de colagénio que qualquer outro tipo de cartilagem sendo que estas estão dispostas em feixes espessos e está presente nos discos intravertebrais. A cartilagem elástica contém fibras de colagénio e elastina de forma a conferir rigidez e maior flexibilidade, e está presente no ouvido externo, epiglote e trompas de Eustáquio (Seeley et al., 2003).

Na figura 8 segue um exemplo de cartilagem hialina.

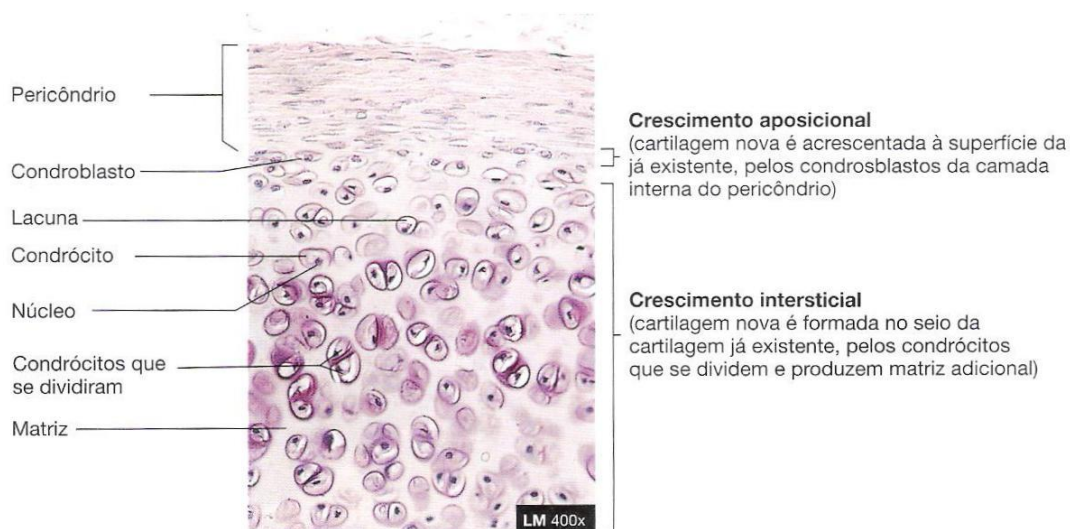


Figura 8. Fotografia de microscopia ótica de cartilagem hialina (Seeley et al., 2003).

A osteoartrite ou osteoartrose é uma doença crônica, caracterizada por degeneração da cartilagem articular sendo mais prevalente em obesos. Embora a cartilagem não apresente tanto risco de lesão comparativamente com a pele e o osso, esta não possui vascularização (à exceção do pericôndrio), sendo por isso a sua cicatrização muito lenta uma vez que os nutrientes necessários à sua reparação não conseguem chegar facilmente à área danificada (Ewing, 1990; Seeley et al., 2003).

O quitosano tem sido utilizado em experiências no tratamento da osteoartrite. *Scaffolds* de quitosano podem ser usados na regeneração da cartilagem, por processos idênticos à sua utilização na regeneração de osso. Neste método, células mesenquimais do estroma que posteriormente vão diferenciar-se em condrocitos são cultivadas *in vitro* de forma a obter uma quantidade substancial de células para depois serem adicionadas aos *scaffolds* de quitosano formando estruturas tridimensionais híbridas com consistência de gel. Estas estruturas são depois implantadas *in vivo* no local da lesão promovendo a proliferação celular e a regeneração do tecido (Barros, 2012; Muzzarelli, 2009; Ragetly, 2010).

A utilização individual de quitosano, sem adição de células estaminais permite também potenciar a regeneração da cartilagem. O quitosano, após ser implantado no local de lesão, vai induzir os macrófagos a produzir lisozimas e interleucina-1. As lisozimas vão provocar a hidrólise do quitosano permitindo alcançar concentrações

elevadas de N-acetilglucosamina nos tecidos lesados. Por sua vez, a interleucina-1 estimula a proliferação de condrócitos, que vai promover a formação de colagénio bem como a formação de ácido hialurónico beneficiando das elevadas concentrações de N-acetilglucosamina. Desta forma, vão ser sintetizados componentes fundamentais da matriz extracelular da cartilagem potenciando a regeneração da mesma. Este processo é semelhante ao processo de utilização do quitosano na regeneração da pele (Barros, 2012; Muzzarelli, 2009; Ragetly, 2010).

Vários estudos demonstraram a viabilidade e o sucesso da utilização do quitosano na regeneração da cartilagem. Nos próximos parágrafos são descritos exemplos dos resultados obtidos por alguns investigadores.

Montebault et al. (2006) usaram substratos de hidrogel de quitosano em culturas de condrócitos humanos e de coelhos. Estes foram capazes de sintetizar colagénio do tipo II, enquanto a cultura de condrócitos sem hidrogel de quitosano não se diferenciaram como indicado pela presença de colagénio tipo II não maduro e de colagénio tipo I.

O uso de membranas de quitosano em culturas de condrócitos de bovino, bem como sulfato de condroitina combinado com o quitosano, permitiram às células manter a sua morfologia redonda, produzir colagénio tipo II de cartilagem e proteoglicanos. (Li e Zhang, 2005; Sechriest et al., 2000).

Ragetly et al. (2010) estudaram a regeneração da cartilagem a partir de *scaffolds* de quitosano e células mesenquimais. Após 21 dias de cultura, as células do mesenquima obtiveram uma viabilidade acima de 90% em toda a matriz de quitosano e verificou-se um aumento de glucosaminoglicanos (ácido hialurónico) e colagénio tipo II.

5.2 Atividade antimicrobiana

Dentre as inúmeras características que distinguem o quitosano dos demais biomateriais, destaca-se a atividade antimicrobiana. Este polímero provoca a inibição do crescimento de diversos microrganismos, ao inibir a formação de biofilmes, tendo sido demonstrada eficácia contra diferentes bactérias em produtos alimentares (No et al., 2007).

Contudo, o mecanismo de inibição de crescimento dos microrganismos por parte do quitosano ainda não se encontra bem esclarecido.

Alguns pesquisadores explicam que o mecanismo da atividade antimicrobiana do quitosano deve-se a características químicas do quitosano, em que os seus grupos amina uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e ligam-se às cargas positivas da membrana das bactérias, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do seu crescimento (Shahidi et al., 1999).

Uma vez que é capaz de prevenir a formação de biofilmes, o quitosano tem sido também utilizado no revestimento de dispositivos médicos, como os implantes de titânio, com o objetivo de inibir a adesão e proliferação de bactérias (Carlson et al., 2008).

Para além disso, a atividade antimicrobiana do quitosano torna-se uma mais valia na regeneração da pele em caso de queimaduras uma vez que a estas lesões estão muitas associadas infeções bacterianas que dificultam ainda mais a regeneração da pele.

5.3 Coagulação do sangue

Uma outra capacidade que o quitosano apresenta é a indução da coagulação do sangue (Klokkevold et al., 1999).

Em testes realizados em coelhos, o quitosano apresentou capacidade de induzir a coagulação sanguínea mesmo na presença de agentes anticoagulantes (Klokkevold et al., 1999).

Ainda, hidrogéis de quitosano, quando aplicados em incisões feitas em pele de ratos, mostraram ser capazes de parar hemorragias e induzir contração dos tecidos para uma melhor regeneração (Meng et al., 2007).

Recentemente, alguns autores sugerem que a atividade anticoagulante do quitosano podia estar relacionada com a capacidade deste biomaterial se ligar a moléculas de fibrinogénio, glicoproteínas envolvidas nas etapas finais da cascata da coagulação (Benesch e Tengvall, 2002).

Contudo, o mecanismo que promove a coagulação do sangue por parte do quitosano, embora comprovado, ainda não está bem esclarecido.

Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, atividade de coagulação de sangue aliada a capacidade de cicatrização de feridas, fazem do quitosano um excelente biomaterial para ser incorporado em fios de sutura.

5.4. Outras aplicações

O quitosano, para além da sua aplicabilidade como biomaterial na área da medicina regenerativa, pode ainda ser aplicado noutras áreas da ciência com potencial já demonstrado.

5.4.1. Excipiente em formulações de medicamentos

Como foi já possível aferir, os polímeros são parte integrante do nosso dia-a-dia uma vez que se destacam como uma classe de biomaterial versátil, com uma vasta aplicabilidade nas mais variadas áreas, como é o caso da sua utilização na indústria farmacêutica na produção de medicamentos.

O quitosano é um polímero que pode ser usado como excipiente na encapsulação de substâncias ativas uma vez que constitui um sistema de reservatório farmacologicamente inativo e biodegradável, que permite efetuar uma libertação controlada das moléculas encapsuladas através da erosão/biodegradação da sua matriz (Bansal et al., 2011; Ray, 2011).

5.4.2. Fertilizantes naturais na área da agricultura

Em consequência do atual crescimento populacional, vem a necessidade de aumentar a produção de produtos agrícolas de forma a colmatar as exigências alimentares. Desta forma, tem vindo a ser realizado um elevado esforço no sentido de garantir melhorias tanto a nível da quantidade como a nível da qualidade dos produtos agrícolas, sem prejudicar o meio ambiente e de uma forma o mais ecológica possível.

Dadas as características do quitosano (inócuo, biocompatível; biodegradável; antimicrobiano), este tem demonstrado ser um material com potencial de aplicação na agricultura uma vez que possui capacidade de controlo no crescimento de alguns microrganismos fitopatogénicos, apresentando-se assim como um substituto dos pesticidas químicos (Shahidi et al., 1999).

Algumas investigações na área da agronomia consideram que o quitosano pode ser aplicado como película de proteção/biofilme no controlo do crescimento de microrganismos patogénicos, promovendo a preservação de frutas, legumes e sementes, salvaguardando a planta de possíveis infestações e potenciando o crescimento da produção vegetal (Boonlertnirun, 2008; Shahidi et al., 1999).

5.4.3. Agente quelante de metais no tratamento de águas

A contaminação dos cursos de água por metais de elevada toxicidade é maioritariamente resultado das atividades industriais. Entre os principais elementos tóxicos despejados estão o mercúrio, chumbo e cádmio. O contacto com estas substâncias, quer através da ingestão da água ou de peixe contaminado, pode provocar sérios problemas de saúde que devem ser evitados.

A descontaminação destas águas pode ser feita através da utilização do quitosano. Ao que parece, este polímero tem a capacidade de funcionar como agente quelante de metais facilitando a sua remoção da água e permitindo desta forma, a descontaminação dos cursos de água.

5.4.4 Bloqueador da absorção de gorduras

O quitosano tem propriedades que intensificam a perda de peso através da inibição da absorção de gorduras. A carga iónica do quitosano está na base da explicação deste processo uma vez que as cargas positivas do quitosano ligam-se às cargas negativas dos lípidos originando um complexo que o intestino humano não consegue absorver reduzindo assim a absorção intestinal de lípidos e promovendo a perda de peso (Koide, 1998).

Atualmente em Portugal, existem no mercado e à venda em farmácias diversos suplementos à base de quitosano para serem usados na inibição da absorção de gorduras e perda de peso.

VI. Conclusão

No decorrer e elaboração da presente revisão teve-se como objetivo primordial apresentar uma visão geral do estado da arte acerca das aplicações técnicas do quitosano como biomaterial.

Com o desenvolvimento do estudo, foi possível aferir que a literatura acerca do tema é vasta no que diz respeito aos conceitos e suas aplicações. No entanto, foi necessário uma escolha cuidada dos trabalhos e artigos mais significativos de forma a reunir o que se revelou como mais importante.

Neste âmbito, foi possível aferir que o quitosano se apresenta como um biomaterial de grande utilidade na área da saúde ao qual varias técnicas recorrem, sendo utilizado principalmente na área da medicina regenerativa, na regeneração de diversos tecidos, tais como, o tecido ósseo, a cartilagem e a pele. Assim, considera-se que o quitosano e seus derivados possuem um vasto potencial de características ilimitadas e potenciadoras de distintas aplicações.

VII. Referências bibliográficas

- Alexander, H. et al. (1996). Classes of materials used in medicine. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, pp. 37-130.
- Amaral, I. M. S. R. F. (2005). *Chitosan matrices for cell-based bone regenerative therapies*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.
- Andrade, V. S. et al. (2003). Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570)- A factorial study. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 20(4), pp. 149-153.
- Antonino, N. A. (2007). *Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosano de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.
- Aoi, K. et al. (2000). Synthesis of a novel N-selective ester functionalized chitin derivative and water-soluble carboxyethylchitin. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201(14), pp. 1701-1708.
- Baldwin, A. D. e Kiick, K. L. (2010). Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Peptide Science*, 94(1), 128-140.
- Bansal, V. et al. (2011). Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research*, 5(1), pp. 28-37.
- Barrere, F. et al. (2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59(1), pp. 38- 71.
- Barros, R. S. D. C. (2012). *MSCs chondrogenesis in 3D scaffolds*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal.
- Benesch, J. e Tengvall, P. (2002). Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*, 23(12), pp. 2561-2568.

- Berger, J. et al. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), pp. 19-34.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J. e Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, pp. 403-430.
- Bhatnagar, A. e Sillanpaa, M. 2009. Applications of chitin and chitosan derivatives for the detoxification of water and wastewater – A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152, pp. 26-38.
- Boonlertnirun, S., Boonraung, C., e Suvanasara, R. (2008). Application of chitosan in rice production. *Journal of metals, materials and minerals*, 18(2), pp. 47-52.
- Borgognoni, C. F., Polakiewicz, B., e Pitombo, R. N. D. M. (2006). Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. *Ciênc Tecnol Aliment*, 26(3), pp. 502-508.
- Bose, S., Roy, M., e Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), pp. 546-554.
- Brown, T. L. et al. (2004). *Química: La ciência central*. México, Pearson Education.
- Callister, W. (2000). *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. Grupo Gen-Livros Técnicos e Científicos.
- Campana, S. P. e Signini, F. R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, pp. 169-173.
- Carlson, R. P. et al. (2008). Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 19(8), pp. 1035-1046.
- Chen, L. J. e Wang, M. (2002). Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer. *Biomaterials*, 23(13), pp. 2631-2639.

- Chen, Q., Liang, S. e Thouas, G. A. (2013). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38 (4), pp. 584-671.
- Cho, Y. W. et al. (1999). Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*, 20(22), pp. 2139-2145.
- Chu, D. H. (2008). Development and structure of skin. Fitzpatrick's dermatology. In: Wolff, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., e Leffell, D. J (Eds.). *General medicine*, USA, McGraw-Hill Companies, pp. 58-75.
- Di Martino, A., Sittinger, M. e Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26 (30), pp. 5983-90.
- Dutta, P. K., Dutta, J. e Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research*, 63(1), pp. 20-31.
- Eisenbarth, E. (2007). Biomaterials for tissue engineering. *Advanced Engineering Materials*, 9(12), pp. 1051-1060.
- Ewing, J. W. (1990). *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*. New York, Raven Press.
- Gamage, A., e Shahidi, F. (2007). Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chemistry*, 104(3), pp. 989-996.
- Gorsline, R. T. et al. (2010). Accelerated chondrogenesis in nanofiber polymeric scaffolds embedded with BMP-2 genetically engineered chondrocytes. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 3(9), pp. 908-916.
- Hench, L. L., e Wilson, J. (1993). *An introduction to bioceramics*. Singapore, World Scientific.
- Hojo, M. et al. (2003). Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plastic and reconstructive surgery*, 111(5), pp. 1638-1645.

Ignatius, A. et al. (2005). Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials*, 26(3), pp. 311–318.

Ishaug-Riley, S. L. et al. (1997). Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *Journal of biomedical materials research*, 36(1), pp. 1-8.

Iwasaki, N. et al. (2010). Chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers as a scaffold biomaterial for cartilage tissue engineering. *Polymers*, 3(1), pp. 100-113.

Karageorgiou, V. e Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), pp. 5474-5491.

Klokkevold, P. R. et al. (1999). The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 57(1), pp. 49-52.

Koide, S. S. (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18(6), 1091-1101.

Koops, F. A. (2010). *Síntese de hidroxapatita reforçada com alumina obtida através de aspersão de solução por chama*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (3), pp. 126-139.

Kristbergsson, K. et al. (2003). Recent developments in deacetylation of chitin, and possible applications in food formulations. *Trans Atlantic fisheries technology. Iceland: Reykjavik*.

Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polimers*, 46(1), pp. 1–27.

Laranjeira, M. C. M., e Fávere, V. D. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, 32, pp. 672-678.

Le, Y., Anand, S. C. e Horrocks, A. R. (1996). Development of anti-bacterial polysaccharide fibres and their performance. In *European Conference on Advances in Wound Management*, Amsterdam, Netherlands.

Leite, G. A. S. (2014). *Avaliação do risco de fratura por desmineralização óssea*. Dissertação de Doutoramento, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Li, Z. e Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *Journal of biomedical materials research*, 75(2), pp. 485-493.

Liu, L. S. et al. (1999). An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, 20(12), pp. 1097-1108.

Meng, S. et al. (2007). Phosphorylcholine modified chitosan: Appetent and safe material for cells. *Carbohydrate polymers*, 70(1), pp. 82-88.

Mi, F. L. et al. (2002). Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *Journal of biomedical materials research*, 59(3), pp. 438-449.

Montebault, A. et al. (2006). A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*, 88(5), pp. 551-564.

Mooney, D. J. et al. (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14), pp. 1417-1422.

Muzzarelli, R. A. A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76 (2), pp. 167-182.

Muzzarelli, R. A. A. et al. (1993). Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model. *Biomaterials*, 14(12), pp. 925-929.

National University Health System (2010). NUS Tissue Engineering Programme [Em linha]. Disponível em < <http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som->

registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>. [Consultado em 26/03/2016].

Navarro, M. et al. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(27), pp. 1137-1158.

No, H. K. et al. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of food science*, 72(5), pp. 87-100.

Okuyama, K. et al. (2000). Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), pp. 237-247.

Olsen, R. et al. (1989). In: Skjak-Brack, G., Anthonsen, T., Sandford, P. A. (Eds.), *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, Elsevier Applied Science, New York.

Pagni, G. et al. (2012). Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 64(12), pp. 1310-1319.

Park, J., Lakes, R. S. (2007). Introduction. In: Park, J., Lakes, R. S. (Eds.). *Biomaterials: An Introduction*. Third Edition. Spring Street, NY, Springer, pp. 1-16.

Park, Y. J. et al. (2000). Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21(2), pp. 153-159.

Park, Y. J. et al.. (2000). Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21(2), pp. 153-159.

Peniche, C. et al. (2003). Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), pp. 511-520.

Pillai, C. K. S., Paul, W. e Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34 (7), pp. 641-678.

Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., e Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), pp. 15-56.

Prashanth, K. H., Kittur, F. S., e Tharanathan, R. N. (2002). Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), pp. 27-33.

Rabea, E. I. et al. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), pp. 1457-1465.

Ragetly, G. R. (2010). *Chitosan fibrous scaffolds for cartilage tissue engineering*. Dissertação de Doutorado, Universidade Illinois em Urbana-Champaign, USA.

Ragetly, G. R. et al. (2010). Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, 6(4), pp. 1430-1436.

Ratner, B. D. et al. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Califórnia, USA, Academic press.

Ray, S. D. (2011). Potential aspects of chitosan as pharmaceutical excipient. *Acta Pol. Pharm*, 68(5), pp. 619-622.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7), pp. 603-632.

Robey, P. G. (2011). Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(6), pp. 423-430.

Sandford, P. A. E e Steinners, A. (1991). Biomedical applications of high-purity chitosan. In: Shalaby, S. W., McCormick, C. L., e Butles, G. B. (Eds.). *Water-soluble polymers*. Washington, ACS symposium series, p. 430.

Santos, J. E., 2004. *Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre*. Dissertação de doutorado, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

Schmidt, C. E. e Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual review of biomedical engineering*, 5(1), pp. 293-347.

Sechriest, V. F. et al. (2000). GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *Journal of biomedical materials research*, 49(4), pp. 534-541.

Seeley, R., Stephens, T., e Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia. 6ª Edição*. Portugal, Lusociência.

Sefton, M. V. (1986). Consensus Conference on Definitions Chester, UK March 3–5, 1986. *Biomaterials*, 7(4), pp. 308-309.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. e Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, 10(2), pp. 37-51.

Shokeir, A. A., Harraz, A. M. e El-Din, A. B. S. (2010). Tissue engineering and stem cells: basic principles and applications in urology. *International Journal of Urology*, 17, pp. 964-973.

Suh, J. K. F. e Matthew, H. W. T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), pp. 2589-2598.

Ueno, H. et al. (2007). Chitosan application to X-ray irradiated wound in dogs. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 60(3), pp. 304-310.

Uhrich, K. E. et al. (1998). Chemical changes during in vivo degradation of poly (anhydride-imide) matrices. *Biomaterials*, 19(22), pp. 2045-2050.

Washburn, N. R. et al. (2002). Co-extrusion of biocompatible polymers for scaffolds with co-continuous morphology. *Journal of biomedical materials research*, 60(1), 20-29.

Williams, D. F. (1988). Consensus and definitions in biomateriais. In: Putter, C., DeLange, G. L., Groot, K., et al. (Eds.). *Advances in Biomateriais - Implant Materials in Biofunction*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 11-16.

Williams, D. F. (1989). A model for biocompatibility and its evaluation. *Journal of biomedical engineering*, 11(3), pp. 185-191.

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), pp. 2941-2953.

Williams, D. F., Black, J. e Doherty, P. J., (1992). Second consensus conference on definitions in biomateriais. *In: Doherty, P. J., Williams, R. L., Williams, D. F., et al. (Eds.). Advances in Biomateriais: Biomaterial-Tissue Interfaces*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 525-53.

Wittaya-areekul, S. e Prahsarn, C. (2006). Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *International journal of pharmaceutics*, 313(1), pp. 123-128.

World Health Organization (2015). *Global Health Observatory data repository* [Em linha]. Disponível em <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.688?lang=en>>. [Consultado em 20/11/2015].

Zhao, F. et al. (2002). Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, 23(15), pp. 3227-3234.