



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0905514-2 B1

(22) Data do Depósito: 22/12/2009

(45) Data de Concessão: 14/08/2018



(54) Título: BIOMATERIAL DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA (CNHAP) PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DO MESMO

(51) Int.Cl.: A61L 27/12; A61L 27/20; A61L 27/52

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): GEOVANNA PIRES; WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI; CELSO APARECIDO BERTRAN; CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA; INEZ VALÉRIA PAGOTTO YOSHIDA

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/12/2009

Tecido

“BIOMATERIAL DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA (CNHAP) PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DO MESMO”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um biomaterial constituído de quitosana e hidroxiapatita (CNHAP) com aplicação em reconstrução tecidual óssea. Destaca-se neste biomaterial a ausência da possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas e de reações imunogênicas; além de reações imunogênicas, infecções, inflamações devido à composição de componentes bioativos, biodegradáveis e estéreis, além da capacidade de se
10 absorver substâncias como fármacos ou substâncias endógenas, por exemplo, células tronco.

Neste material a ausência da possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas e de reações imunogênicas são importantes de serem destacadas; não proporciona infecções nem inflamações, porque
15 CNHAP é a união de dois componentes bioativos e biodegradáveis; estéril; permite fácil aplicação e manuseio, bastando manter devidamente acondicionado à fratura. Este material é totalmente identificável radiologicamente.

Atualmente, o processo de preenchimento ósseo é realizado com
20 a utilização de cimentos ósseos, misturas simples, composição na forma de pó e pasta, que apresentam limitações, como a impossibilidade de mineralização *in situ*, além do alto custo. A presente invenção permite contornar tais limitações e possibilitam agregar valor ao produto.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

25 As doenças degenerativas e inflamatórias de ossos e articulações afetam milhões de pessoas no mundo inteiro, representando cerca metade de todas as doenças crônicas em pessoas com mais de 50 anos de idade nos países desenvolvidos. A previsão é que a percentagem de pessoas com mais de 50 anos de idade afetadas por doenças ósseas irá dobrar até o ano de

2020. Essas doenças freqüentemente exigem procedimentos cirúrgicos, incluindo substituição total ou parcial do tecido danificado nos casos de doenças degenerativas ou fraturas por acidentes.

Os biomateriais destinam-se à implantação no corpo humano como constituintes de dispositivos que são designados a realizar certas funções biológicas através da substituição ou guiando o reparo ósseo quando necessário.

Os biomateriais são descritos como materiais (implantes) especificamente desenvolvidos para obter compatibilidade com o sistema biológico. Além disso, um biomaterial pode ser entendido como um material de natureza sintética ou natural com finalidade de melhorar, aumentar ou substituir tecidos ou órgãos. O critério para a escolha de um biomaterial é feito de acordo com a similaridade química e física deste, em relação ao tecido ou órgão a ser substituído.

Existem requisitos necessários para que um biomaterial seja adequado, como: não causar danos locais ou sistêmicos (tóxicos, carcinogênicos ou radioativos) e ser biocompatível. A biocompatibilidade é um fator de suma importância para o sucesso dos biomateriais e pode ser definida como um material que provoca reações desejadas ao organismo. Além disso, características como composição e morfologia similar ao tecido a ser reconstituído, vem sendo um aspecto diferencial e inovador no desenvolvimento dos biomateriais. Até os dias de hoje não há um substituto ideal desenvolvido para substituição de tecidos ósseos.

Os biomateriais existentes no mercado variam muito de preço, sendo assim a melhor escolha seria o mais econômico a longo prazo. Com isso, os biomateriais que são substituídos pelo tecido ósseo novo reconstruído no local possuem custo mais elevado, entretanto o uso de biomateriais que não são substituídos resulta em uma nova intervenção cirúrgica para a troca por um novo dispositivo com o passar do tempo, resultando num custo final do tratamento mais elevado.

O biomaterial *scaffold* hidrogel compósito constituído de quitosana/hidroxiapatita, CNHAP, possui aplicação na área de preenchimento

ósseo devido à união das características peculiares dos componentes envolvidos, quitosana e hidroxiapatita. Entende-se por *scaffold* uma estrutura de suporte, no caso da presente invenção uma matriz porosa que compreende biomaterias com finalidade de preenchimento ósseo.

5 A quitosana, um polissacarídeo, é obtida por desacetilação alcalina de ligações N-acetil presentes na quitina, as quais são rompidas formando a D-glicosamina, que contém um grupo amino livre, como ilustrada na Figura 2. A diferença entre a quitina e a quitosana está na quantidade de grupos acetil. Quando o número de grupos acetil é maior que 50% (70-90%) o
10 bipolímero é determinado por quitina. Na terminologia da quitina, o número de grupos acetoamido é determinado pelo grau de acetilação (DA). Por outro lado, quando o grau de desacetilação (DD) ou o grupo amino é predominante, o biopolímero é determinado como quitosana. Logo, a quitosana é constituída por um conjunto de cadeias poliméricas parcialmente desacetiladas. As aplicações
15 e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho das cadeias poliméricas. É um polímero parcialmente cristalino, e o grau de cristalinidade depende do grau de desacetilação.

 Estudos comprovaram que a quitosana é segura para o consumo
20 humano e tem sido utilizada em numerosas aplicações industriais, na área de saúde e em produtos alimentícios. É descrito que a toxicidade da quitosana é menor que a glicose (açúcar comum) ou sacarose.

 A quitosana além de biocompatível, bioativa e biodegradável apresenta interessante propriedades biológicas, tais como atividades
25 bactericida, osteogênica, fungicida, hemostática, osteocondutiva, antitumor, imuno-adjuvante e ainda promove a osteointegração de um biomaterial ao tecido ósseo.

 Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização como bioadesivo, agente cicatrizante, agente antimicrobiano, material de bandagem,
30 suporte para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo material para lentes de contato, nas formas de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções. Além disso, a quitosana apresenta ação

bacteriostática, provavelmente pela ação dos grupos amino catiônicos da quitosana sobre os grupos aniônicos da parede celular de microorganismos. Biomateriais de quitosana também têm sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular

5 através do aumento de produção de fatores de crescimento. Também acelerariam a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização. Alguns autores citam que a quitosana fomenta o crescimento celular, porque as

10 células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente. Este comportamento tem sido aproveitado para os estudos em engenharia de tecidos, sendo a quitosana utilizada em trabalhos de regeneração da pele, do tecido ósseo e cartilaginoso e na preparação de pele artificial. Atua também como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído

15 por osso natural. Biomateriais à base de quitosana não reportaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão pelo corpo humano. Nesse âmbito, uma das possibilidades mais promissoras dos biomateriais obtidos da quitosana é sua capacidade em formar estruturas porosas, contendo fatores de crescimento, como proteínas

20 morfogenéticas ósseas ou fatores de crescimento vascular em sua composição, e que podem ser utilizados como suportes para crescimento celular. Recentemente, hidrogéis de quitosana foram utilizados como carreadores para proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-2) e implantados em defeitos ósseos críticos criados na calvária de ratos, proporcionando

25 regeneração tecidual otimizada, quando comparada ao uso dessas proteínas isoladamente.

O componente inorgânico que mais se assemelha à composição do osso é o fosfato de cálcio, dentre os quais a mais difundida é a hidroxiapatita (HA), cuja estrutura química é representada pela fórmula

30 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética (HA) são bem documentadas na literatura. Ela é utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies animais, com resultados satisfatórios.

vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável. A hidroxiapatita permite a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em aposição direta ao biomaterial.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio porosas com estruturas tridimensionais utilizadas para preenchimento ósseo são bioativas e permite o crescimento de tecido ósseo e revascularização da área do implante pela ligação química estabelecida entre a fase mineral dos ossos e o biomaterial. A dificuldade em relação ao uso de biocerâmicas está na má adaptação direta à falha do tecido ósseo a ser reparado, pois são peças rígidas com tamanhos definidos devendo ser adaptados com um segundo material geralmente na forma de pasta ou pó particulado para o completo preenchimento do local, ou a migração de fragmentos ocasionando na não regeneração óssea.

É importante salientar que o conceito de material poroso, sob a óptica da biocompatibilidade, está fundamentado em dimensões de poros completamente diferentes do que é usual para a Química. Segundo IUPAC, materiais macroporos apresentam poros com dimensões maiores que 50 nm. Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 nm).

Como já foram discutidas anteriormente, as biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam características físico-químicas e arquitetônicas importantes que possibilitam respostas biológicas como osteocondutividade e osteoindutividade intrínseca. Por outro lado, os polímeros biodegradáveis têm sido utilizados como suportes na engenharia de tecidos, principalmente pela cinética previsível de biodegradação e plasticidade. No entanto, a formação de compósitos parece aperfeiçoar a resposta biológica reparadora. Todavia, a quitosana apresenta propriedades biológicas bastante favoráveis para a reconstrução óssea.

Desse modo, apesar de existirem muitos biomateriais na forma de *scaffolds* para a engenharia de tecidos, uma matriz para o crescimento ósseo

deveria ser arquitetada para degradar (1) passivamente por dissolução no meio biológico e (2) ativamente por reabsorção dos osteoclastos durante o remodelamento normal do tecido ósseo.

Entre os principais requisitos para o desenvolvimento de um biomaterial *scaffold* para engenharia de tecidos óssea poderíamos citar: (1) fácil disponibilidade para o cirurgião; (2) promoção do crescimento ósseo; (3) não indução de crescimento de tecido mole na interface osso/implante; (4) diâmetro médio dos poros entre 200 e 400 μ m; (5) absorção de uma maneira previsível de acordo com o crescimento ósseo e (6) propriedades mecânicas e físicas apropriadas para aplicação.

Adicionalmente, o projeto de cada biomaterial *scaffold* deve permitir: (1) fácil manipulação na preparação e implementação do material implantado; (2) alta porosidade para permitir um rápido acesso e manutenção da vasculatura, assim como apresentar espaço para deposição de matrizes e componentes estruturais; (3) capacidade de ser aparado ou esculpido para encaixar-se perfeitamente ao sítio cirúrgico e (4) um rápido e reproduzível processo de dissolução em cada sítio implantado.

Neste contexto, quitosana tem sido utilizada em combinação com diferentes componentes inorgânicos bioativos, especificamente a hidroxiapatita (HA) para regeneração de tecidos devido à osteocondutividade. A incorporação de HA com quitosana pode promover a bioatividade e a osteointegração do biomaterial e o osso. Os pesquisadores têm dado muita atenção aos compósitos de quitosana e hidroxiapatita em diferentes proporções, na forma de pó, pasta e ainda na forma de *scaffold* para regeneração óssea.

Os métodos convencionais para a preparação de compósitos de quitosana e hidroxiapatita são realizados pela mistura mecânica da HAP em quitosana dissolvida em soluções de ácido acético, e então a mistura é seca em temperatura ambiente ou liofilizada. O material final é heterogêneo e opaco com estrutura compacta ou porosa. Entretanto, o método de liofilização para a obtenção de material poroso, não mantém a integridade da estrutura do material, fazendo com que o material se rompa pela velocidade de evaporação do solvente.

Um compósito de quitosana e hidroxiapatita pode ser preparado pelo método de precipitação simultânea na forma de bastão (Hu e colaboradores [18]). Sendo assim, é preparado um gel de quitosana dissolvida em solução de ácido acético e posteriormente adicionado uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 em ácido acético, misturados e o gel foi despejado em um cilindro preparado por uma membrana de quitosana enrolada. Após o gel estar dentro do cilindro de quitosana foi imerso em solução de hidróxido para a precipitação simultânea de CN e HA e em seguida retirada a membrana e o hidrogel liofilizado. O material apresentou-se na forma transparente com baixa quantidade de HA e opaco com alta quantidade de HA e com ausência de poros. Entretanto, a ausência de poros na material afeta no desempenho da regeneração óssea, uma vez que a morfologia e porosidade similar ao tecido ósseo são de extrema importância na osteocondução. A ausência de poros no material pode levar a agir como barreira para a condução do fluido corpóreo podendo desencadear inflamação generalizada no local.

Entre os muitos materiais utilizados como cimento ósseo, polimetilmetacrilato (PMMA) ou seus derivados têm sido bastante utilizados em cirurgias ortopédicas. Entretanto, o uso é limitado devido às diversas complicações, como exemplo, o PMMA não proporciona a osseointegração entre o material e o osso, não tem bioatividade, possui baixa propriedade mecânica, provoca aumento da temperatura no local devido à reação exotérmica de polimerização, e apresenta toxicidade do monômero. Além disso, mesmo a grande utilização de cimentos a base de PMMA nos últimos anos, falhas ocorreram na maioria das vezes devido à necrose do tecido. Contudo, diversas pesquisas têm sido realizadas em adicionar componentes bioativos com PMMA. Kim e colaboradores modificaram PMMA pela adição de quitosana e hidroxiapatita por serem bioativos e biocompatíveis. Investigaram o potencial de aplicação clínica através de testes *in vitro* e animais. Foi observado que os compósitos demonstraram osteocondução e biocompatibilidade. Entretanto, concluíram que mais estudos com animais precisam ser realizados para uma avaliação mais completa para a substituição do cimento já utilizado de PMMA pelos compósitos de

PMMA/quitosana/hidroxiapatita. Dois anos após a publicação desse artigo houve o depósito de uma patente internacional por Neoh e colaboradores em 2007 relatando o invento de um cimento ósseo composto de PMMA com quitosana ou derivado de quitosana.

5 Ito e colaborador desenvolveram e testaram um material na forma de pasta para um possível substituto ósseo para tratamento odontológico. O material foi preparado pela mistura mecânica dos compostos hidroxiapatita (HAP) na forma de pó, ZnO e CaO, e misturados a um gel de quitosana para formar uma pasta de endurecimento rápido. O composto apresentou pH neutro,
10 ajuste em tempo curto, e resistência à compressão relativamente alta. O uso do material para tratamento de defeitos periodontais se mostrou bastante eficaz na união entre o implante e o osso e tem grande potencial para aliviar os problemas associados com a implantação de partículas HAP, pois ocorre a migração antecipada dessas partículas sem que haja a união entre o implante
15 e o osso. Porém a forma de pasta limita o processo de regeneração do osso, podendo dificultar o manuseio ou ainda desencadear uma reação inflamatória generalizada, algo que não ocorre com o presente invento proposto.

Diante do estado da técnica é possível observar diversos documentos que mencionam produtos e processos que contemplam o uso de
20 quitosana e hidroxiapatita como componentes, porém baseiam-se somente em uma mistura mecânica entre os componentes, algo que difere da presente invenção. Ito e colaboradores descrevem um método de obtenção de uma substância osseoindutiva e a preparação de um material contendo essa substância osseoindutiva para preenchimento ósseo. O material foi preparado
25 pela mistura de substância osseoindutiva (substância derivada do colágeno) com gel de quitosana e hidroxiapatita em pó. Para a formação do gel de quitosana utilizou o ácido málico. Foram preparadas diferentes proporções dos componentes e obtidos materiais com diferentes propriedades mecânicas. O material utilizado na preparação do biomaterial é relativamente longo e requer
30 outras etapas de preparação podendo carregar resíduos de príon devido ao material ser de origem animal, podendo acarretar também em inflamação ao tecido vizinho.

No pedido de patente US2008181926-A1 há descrição do método biomimético de obtenção de compósitos de quitosana/ácido galacturônico/hidroxiapatita pela mineralização *in situ* de hidroxiapatita. Foram utilizadas misturas de diferentes soluções preparadas a partir dos componentes quitosana, ácido galacturônico e Na_2HPO_4 e CaCl_2 , e obtiveram compósitos nas formas de grânulos através de centrifugação e posterior secagem e filmes *scaffolds* através de liofilização. Os resultados dos materiais demonstraram uma boa interação entre a matriz quitosana e as partículas de HA, mudanças nos parâmetros e cristalinidade da HA devido à presença da quitosana quando comparado a HA pura e uma alta biocompatibilidade. O processo de obtenção do material citado no trabalho requer de longo processo de preparação resultando num maior custo final e ainda o processo de liofilização (secagem do material por sublimação) não mantém a integridade da estrutura dos poros do material. Além de ser uma técnica muito cara e não aceitar qualquer solvente, principalmente se for ácido.

Tendo em vista as limitações das tecnologias atuais, a presente invenção traz um biomaterial na forma final de hidrogel, que possui características de extrema importância na aplicação em tecidos ósseos, como a morfologia similar ao osso, *scaffold* com poros interconectados que promovem uma melhor regeneração do tecido ósseo pela osseocondução. Devido a sua forma de hidrogel, há uma facilidade de adaptação ao local de fratura óssea, aliado à facilidade de troca da água preenchida nos poros por soluções contendo substâncias bioativas ou ainda células tronco para indução da formação óssea mais rápida e eficaz.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata-se de um *scaffold* biomaterial hidrogel compósito CNHAP com características mecânicas que permitem um manuseio no momento de sua utilização, fracionamento no tamanho da fratura óssea e moldagem à sua forma no instante da intervenção cirúrgica. Além disso, o biomaterial apresenta características similares ao tecido ósseo como a composição, topografia, poros intercomunicantes, propriedades

intercomunicantes e propriedades biológicas adequadas à regeneração óssea, sem deixar resíduo tóxico ou carcinogênico além de ser antibactericida.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra um esquema de preparação do CNHAP.

5 A Figura 2 ilustra um esquema da obtenção da quitosana através da quitina.

A Figura 3 ilustra um esquema de preparação do *scaffold* hidrogel compósito CNHAP através da reação dos precursores envolvidos na reação da hidroxiapatita e o gel de quitosana.

10 A Figura 4 apresenta um espectro IV do compósito de CNHAP.

A Figura 5 ilustra um espectro RMN ^{31}P do compósito CNHAP. O referido espectro ilustra um único pico indicando um tipo de fosfato de cálcio, HA.

15 A Figura 6 apresenta difratogramas da quitosana pura (A) e do compósito CNHAP (B). Observa-se através da análise de raios X dos materiais, picos de difração típicos de HA e o decréscimo do halo da quitosana.

A Figura 7 apresenta curvas termogravimétricas (a) e da derivada da curva termogravimétrica (b) para quitosana pura (A) e para o *scaffold* compósito CNHAP (B). A referida figura ilustra as curvas termogravimétricas da
20 quitosana e do *scaffold* seco. Observam-se comportamentos similares entre a degradação da quitosana pura e do *scaffold* seco, restando um resíduo bastante significativo de aproximadamente 49% referente a HA mineralizada *in situ*.

A Figura 8 ilustra uma fotografia do *scaffold* hidrogel compósito
25 CNHAP. Superfície da face superior (esquerda) e superfície da face inferior (direita). Tal fotografia ilustra a diferença entre as superfícies em relação à topografia, as quais diferem numa maior área superficial, disponibilizando uma maior área para a adesão de células, como pode ser observado nos resultados biológicos, que o CNHAP-rugoso (Figura 8 lado esquerdo) apresenta melhores
30 resultados em relação a superfície lisa (Figura 8 lado direito).

A Figura 9 apresenta uma fotografia do corte do *scaffold* hidrogel compósito CNHAP.

A Figura 10 apresenta micrografias do *scaffold* hidrogel compósito CNHAP. (A) x1000 e (B) x6000. Pode ser observada a porosidade intercomunicante do *scaffold*, conforme a seta, e a morfologia globular da HA dispersa pela matriz de quitosana.

A Figura 11 apresenta uma análise da viabilidade celular de pre-osteoblastos crescidos sobre diferentes materiais. Células crescidas sobre o poliestireno foi considerado como 100% (controle positivo, PS); (*) $p < 0.05$.

PS=Poliestireno.

A Figura 12 ilustra a expressão de proteínas relacionadas com a sobrevivência e viabilidade celular: **A)** Akt e **B)** Erk. Poliestireno (PS) foi considerado como grupo controle. Os gráficos representam a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*.

A Figura 13 apresenta níveis de adesão e proliferação celular. O gráfico representa qualitativamente a quantidade de células aderidas pela incorporação do cristal violeta. Tempos de análise: 15 min, 6 h e 48 h de cultivo celular; (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$. Poliestireno (PS) foi considerado como grupo controle.

A Figura 14. (A) ilustra uma expressão de proteínas relacionadas com a adesão celular. Poliestireno (PS) foi considerado como grupo controle. Já a Figura 14 (B) ilustra um gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*.

A Figura 15. (A) ilustra uma expressão de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular. Poliestireno (PS) foi considerado como grupo controle. Já a Figura 15 (B) ilustra um gráfico representando a análise densitométrica das bandas obtidas por *immunoblotting*.

A Figura 16 apresenta uma análise da atividade de fosfatase alcalina de pre-osteoblastos cultivadas sobre os diferentes materiais. Poliestireno (PS) foi considerado como grupo controle. (ns) sem diferença estatística; (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O objeto do presente invento trata-se de um processo para obtenção de um biomaterial hidrogel *scaffold* compósito através da mineralização *in situ* e produto obtido compreendendo elementos bioativos, biodegradáveis e estéreis para aplicação em reconstrução tecidual óssea.

Para efeito desta invenção, a expressão biomaterial hidrogel *scaffold* compósito diz respeito ao material obtido com as características de interesse para aplicação em reconstrução tecidual óssea.

Para a execução do invento foram utilizados materiais de partida compreendendo a quitosana de alta massa molar, viscosidade entre 800-2000 cP e grau de desacetilação ~83%, na forma de pó, de procedência Aldrich (St. Louis, MO, USA). A hidroxiapatita comercial (do tipo P.A. $\geq 90\%$) de procedência Fluka, foi utilizada como referência. O $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi de procedência Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha). O H_3PO_4 (do tipo P.A.) e o NH_4OH (teor (NH_3) 28,0-30,0%) foram de procedência Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Todos os componentes foram utilizados sem tratamento prévio. Placas de poços de poliestireno, PS, de procedência TPP (St. Louis, MO, USA), foram utilizadas como controle para o cultivo de células. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram obtidos da Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). $p\text{NPP}$ (fosfato p-nitrofenil dissódico hexahidratado) usado para medida da atividade de fosfatase alcalina e MTT (brometo de dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Para o processo de obtenção do biomaterial hidrogel *scaffold* compósito foi realizado uma mineralização *in situ* do gel de quitosana por hidroxiapatita. em meio ácido, seguido de adição de solução de Ca^{+2} e posterior neutralização, visando manter uma razão Ca/P de 1,67, razão de Ca e P observada nos ossos, onde quitosana (pó), 3g, foram adicionados a 80 mL de uma solução de ácido fosfórico (1,85 mL de H_3PO_4 /80 mL de H_2O), seguida da adição de 20 mL de uma solução de Ca^{+2} ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 10,68g/20mL H_2O),

obedecendo a uma razão Ca/P de 1,67, o qual representa a formação de hidroxiapatita, formando um gel ácido (pH~ 2,3). A proporção em massa de CN:HA estimada nos compósitos foi de 60:40, próximo das proporções de componentes orgânico: inorgânico encontradas nos ossos. Aliquotas de 4 a 6 mL, preferencialmente 5 mL deste hidrogel foram transferidas para moldes de Teflon® (3cm² de diâmetro x 2cm de profundidade) e neutralizadas pela adição de 20mL da solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) diretamente sobre o gel até o total preenchimento do volume do molde. Após esta etapa, os moldes permaneceram em recipiente fechado entre 40 e 60 h, preferencialmente por 48h à temperatura entre 10 e 30°C, preferencialmente 25°C para o processo de mineralização de hidroxiapatita *in situ*. O *scaffold* compósito foi retirado, lavado com água deionizada até a remoção completa do subproduto salino (nitrato de amônio) e mantidos em água deionizada sob 15 e -2°C, preferencialmente 10°C refrigeração, até sua utilização.

Os exemplos aqui descritos tem o intuito somente de exemplificar algumas das inúmeras formas de realização da invenção, e portanto devem ser encarados de forma ilustrativa, e não restritiva.

REIVINDICAÇÕES

1 – Processo para a produção de um biomaterial de quitosana e hidroxiapatita (CNHAP), **caracterizado** por ser pela mineralização in situ do gel de quitosana por hidroxiapatita em meio ácido, compreendendo as etapas de:

- 5 a) adição de quitosana (pó) em uma solução ácida, sendo que a razão da quitosana/solução ácida está compreendida na faixa de 1:20 a 1:30;
- b) adição de uma solução de Ca^{+2} na solução resultante da etapa a) sob agitação constante e obedecendo a razão Ca/P de 1,67;
- c) obtenção de hidroxiapatita na forma de um hidrogel ácido;
- 10 d) separação de alíquotas do hidrogel obtido na etapa c) em moldes;
- e) neutralização das alíquotas do hidrogel obtidas na etapa c) e separadas na etapa d) pela adição de uma base;
- f) armazenamento do produto obtido em e) durante um período de
- 15 tempo compreendido entre 40 e 60 horas a uma temperatura compreendida entre 10 e 30° C;
- g) lavagem do compósito resultante com água deionizada; e
- h) armazenamento do produto obtido em f) a uma temperatura entre -2 a 15 ° C até a sua utilização.
- 20 2- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela razão da quitosana/solução ácida na etapa a) ser 1:26,6.
- 3- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela solução de Ca^{+2} da etapa b) ser $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.
- 4- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**
- 25 pelo pH do hidrogel obtido na etapa c) ser 2,3.

5- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela base utilizada na etapa e) ser uma solução de hidróxido de amônio (NH_4OH).

5 6- Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o referido NH_4OH apresenta um teor de NH_3 de 28 a 30%.

7- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo armazenamento da etapa f) ser em um recipiente fechado, à 25°C por 48 horas.

10 8- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela referida quitosana compreender uma quitosana em pó, de alta massa molecular, com viscosidade compreendida entre 800 e 2000 cP e grau de acetilação de 83%.

9- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a referida hidroxiapatita é do tipo P.A. $\geq 90\%$.

15 10- Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a solução ácida da etapa a) compreende uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) em que o dito ácido é do tipo P.A.

11 – Biomaterial de quitosana e hidroxiapatita (CNHAP), **caracterizado** pelo fato de ser um compósito *scaffold* na forma hidrogel.

20 12 – Biomaterial de quitosana e hidroxiapatita (CNHAP), **caracterizado** pelo fato de que o referido biomaterial compreende proporção de CN:HA de 60:40.

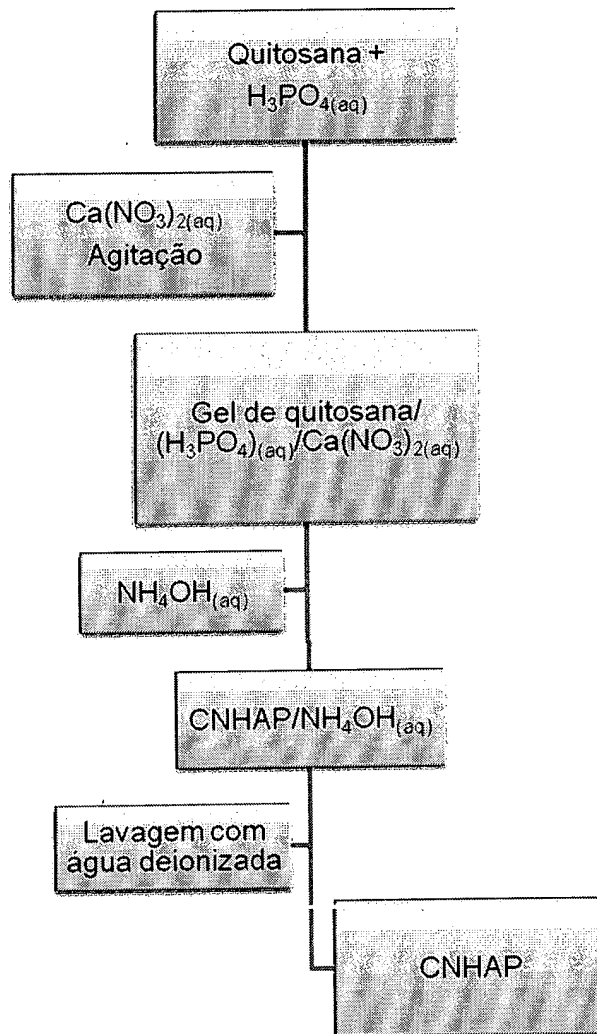


FIGURA 1

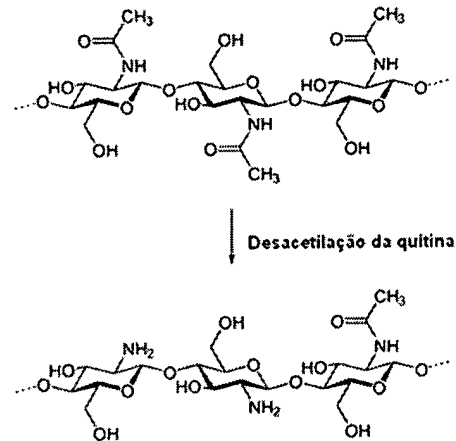


FIGURA 2

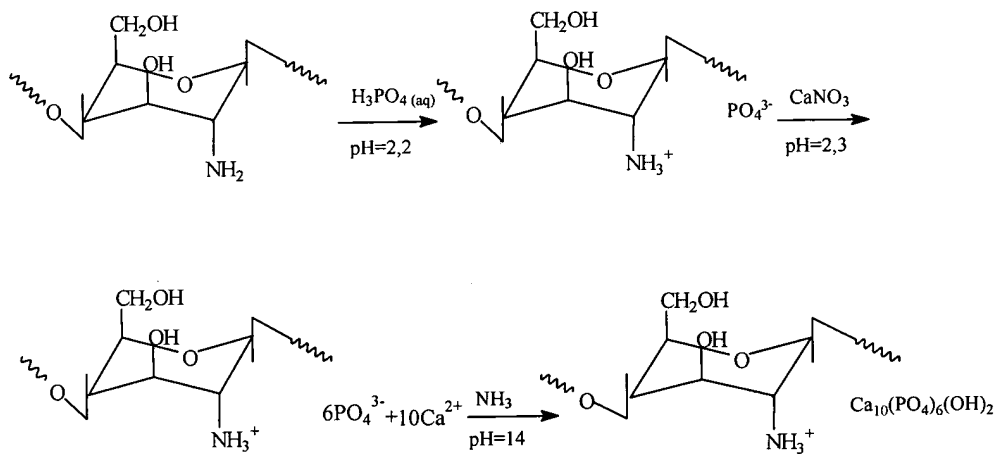
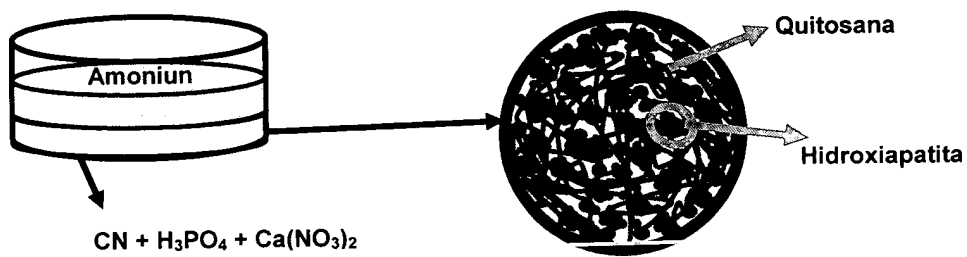
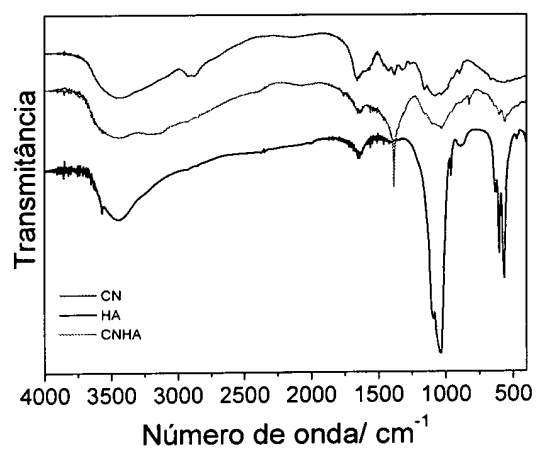
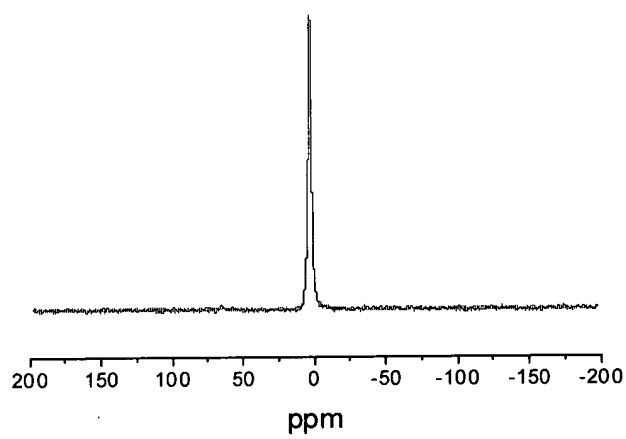


FIGURA 3

**FIGURA 4****FIGURA 5**

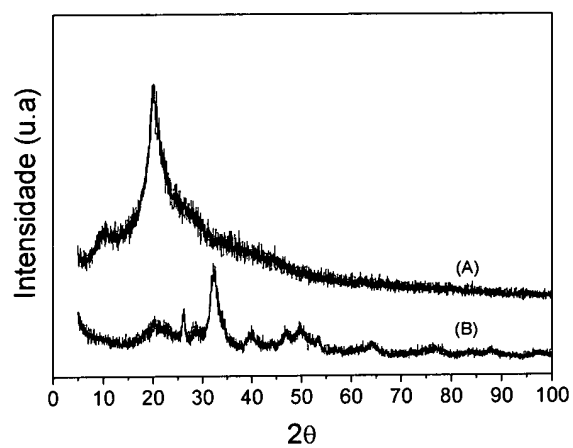


FIGURA 6

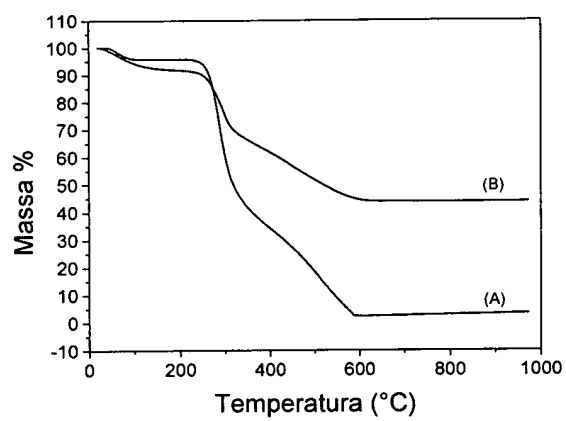


FIGURA 7 (A)

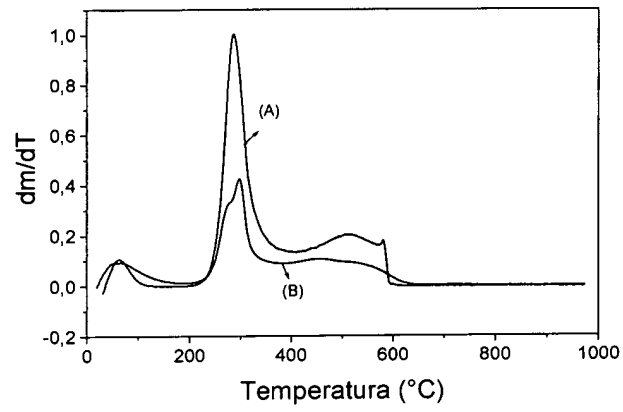
**FIGURA 7 (B)****FIGURA 8**



FIGURA 9

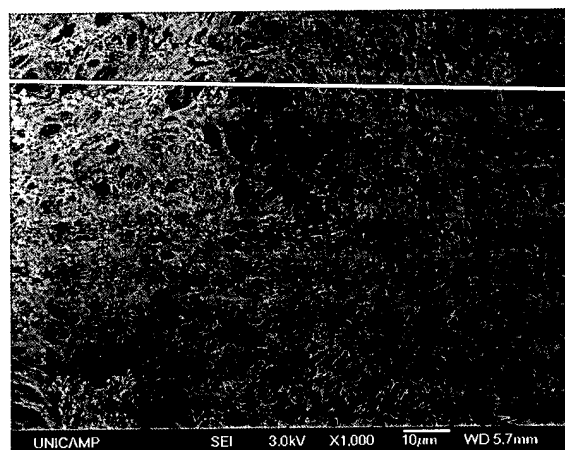


FIGURA 10 (A)

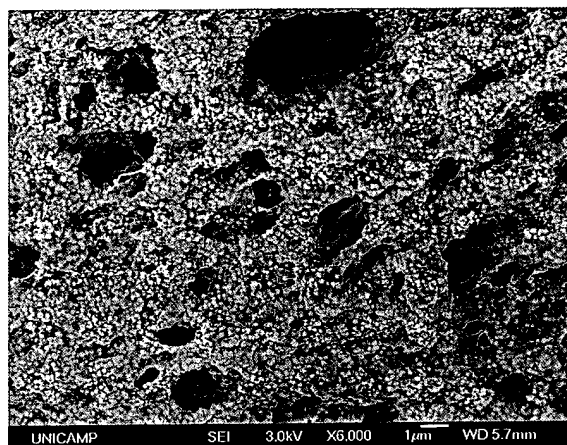


FIGURA 10 (B)

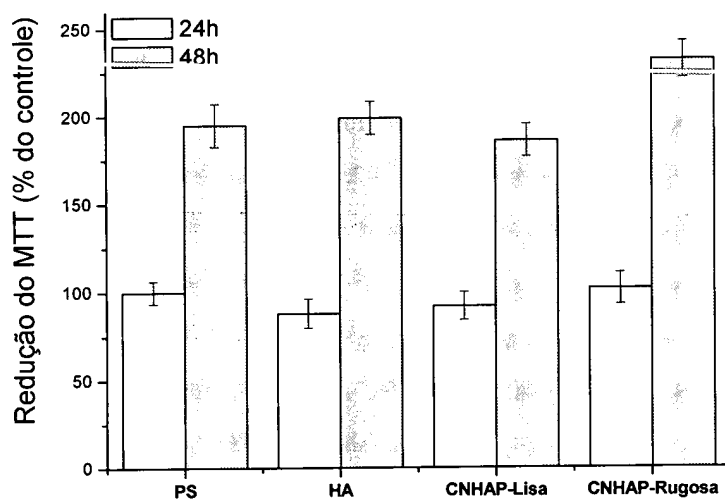


FIGURA 11

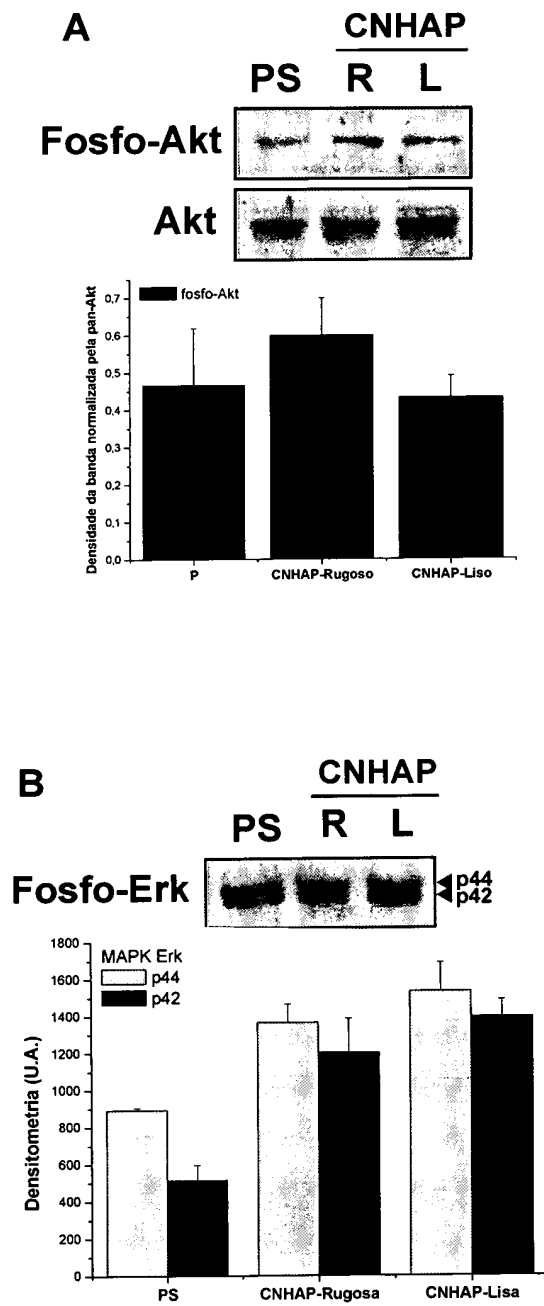


FIGURA 12

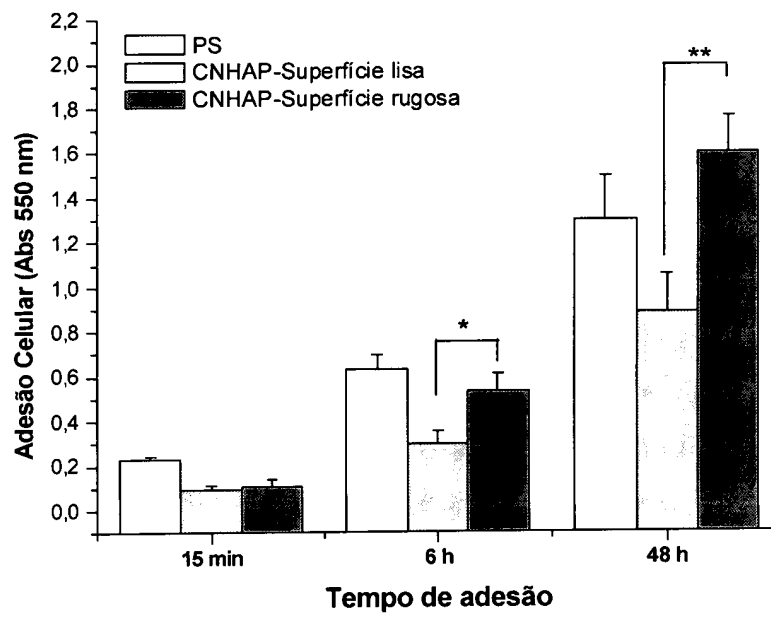


FIGURA 13

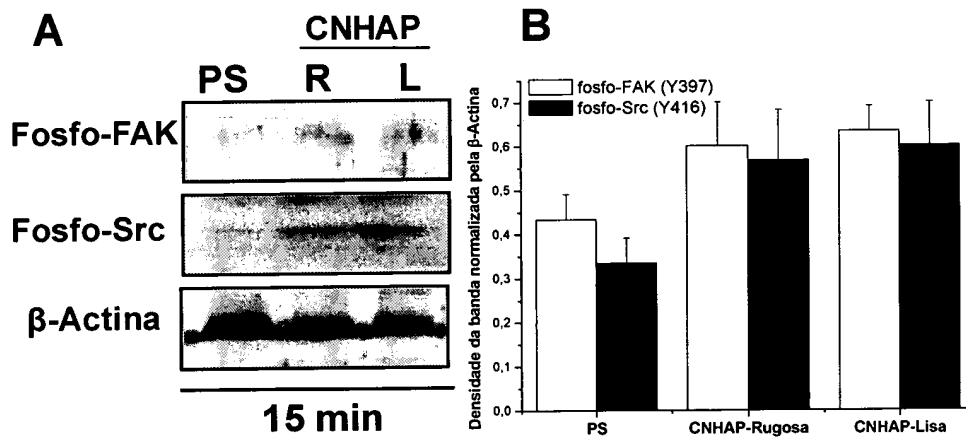


FIGURA 14

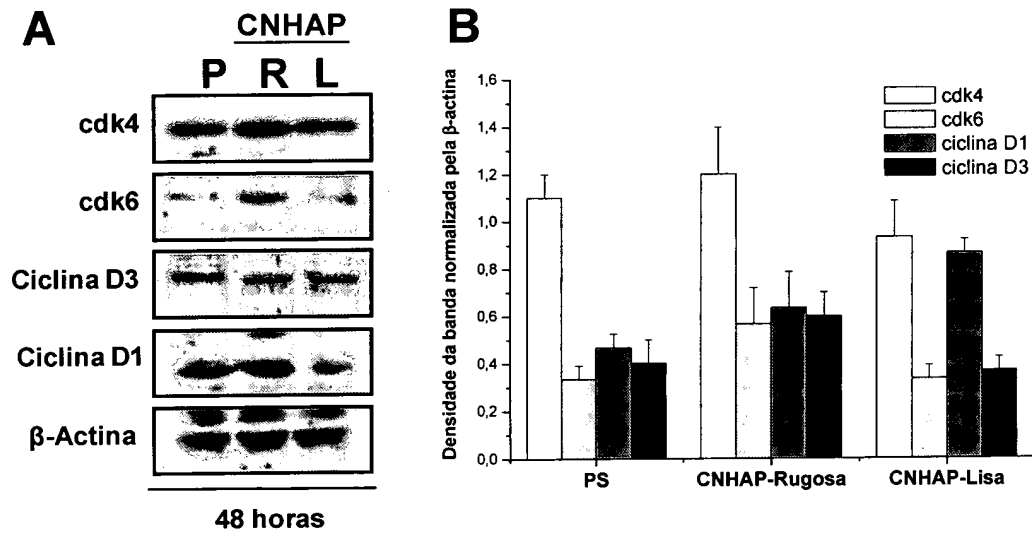


FIGURA 15

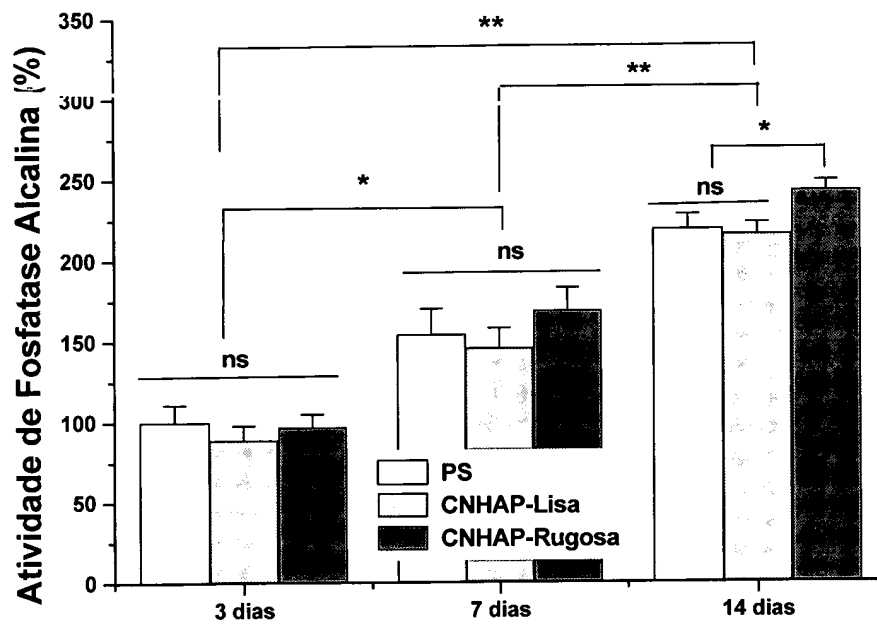


FIGURA 16