

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

VITOR HIROYUKI NOMURA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS HAP/QUI COM MATRIZ
POLIMÉRICA EXTRAÍDA DE BESOUROS (*STRATEGUS ALOEUS*)**

PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2018

VITOR HIROYUKI NOMURA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS HAP/QUI COM MATRIZ
POLIMÉRICA EXTRAÍDA DE BESOUROS (*STRATEGUS ALOEUS*)**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Liliam Cristina Angelo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana de Souza Sikora

PATO BRANCO

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS HAP/QUI COM MATRIZ POLIMÉRICA EXTRAÍDA DE BESOUROS (STRATEGUS ALOEUS)** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 17.2.2018 de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Liliam Cristina Angelo
Orientador

Rodrigo Brackmann
Membro da Banca

Vidiany Aparecida Queiroz Santos
Membro da Banca

RESUMO

NOMURA, Vitor Hiroyuki. Síntese e caracterização de compósitos HAP/QUI com matriz polimérica extraída de besouros (*strategus aloeus*). 2018. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

Nesse estudo foi sintetizado e analisado características físicas e químicas do compósito Hidroxiapatita/Quitosana (HAP/QUI). A quitosana utilizada foi obtida por meio da desacetilação da quitina extraída de besouros Broca-de-Raíz (*Strategus aloeus*). O compósito foi analisado por técnicas de DRX e IVTF. Além da caracterização foi feita uma teste de capacidade hemolítica do material. Por meio dessas análises foi possível comprovar a formação do compósito HAP/QUI. A HAP/QUI utilizando besouros (HAP/QUI-b) apresentou grande similaridade com um compósito referência (HAP/QUI-a), na qual foi utilizada quitosana comercial na síntese. Quanto a observação da capacidade hemolítica do material, a HAP/QUI-b apresentou um valor igual a $1,61 \pm 0,04\%$; valor baixo quando comparado com a literatura. Assim, a HAP/QUI-b demonstrou ser uma possível candidata para atuar como biomaterial.

Palavras-chave: Besouro, Hidroxiapatita, Quitosana.

ABSTRACT

NOMURA, Vitor Hiroyuki. Synthesis and characterization of HAP/CHI composites with polymer matrix extracted from beetles (*Strategus aloeus*). 2018. 46 f. Course Completion Work - Bachelor in Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

In this study, the physical and chemical characteristics of the Hydroxyapatite/Chitosan (HAP/CHI) composite were synthesized and analyzed. The chitosan used was obtained by deacetylation of the chitin extracted from ox beetles (*Strategus aloeus*). The composite was analyzed by XRD and IVTF techniques. In addition to the characterization, a hemolytic assay of the material was tested. Through these analyzes it was possible to prove the formation of the HAP/CHI composite. The HAP/CHI using beetles (HAP/CHI-b) showed great similarity with a reference composite (HAP/CHI-a), in which commercial chitosan was used in the synthesis. Regarding the observation of the hemolytic assay of the material, HAP/CHI-b presented a value equal to $1.61 \pm 0.04\%$; low value when compared with the literature. Thus, HAP/CHI-b has proved to be a possible candidate for biomaterial.

Keywords: Beetle, Chitosan, Hydroxyapatite.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de fosfato de cálcio e suas razões Ca/P.....	13
Tabela 2 - Áreas de emprego de quitina e quitosana.	16
Tabela 3 - Tamanho de cristalito médio (Dm) da amostra controle (HAP) e dos compósitos (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).	35
Tabela 4 - Absorbância das amostras à 541 nm.....	39
Tabela 5 - Capacidade hemolítica da amostra controle (HAP) e dos compósitos HAP/QUI-a e HAP/QUI-b.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de biocerâmicas comerciais a base de ortofosfato de cálcio....	12
Figura 2 – Osso cortical e tubecular.	15
Figura 3 – Representação da estrutura da quitosana.	16
Figura 4 – Representação da estrutura da quitina.	17
Figura 5 - Desmineralização da quitina.	20
Figura 6 - Desproteinação da quitina.	20
Figura 7 – Processo de despigmentação da quitina. Início do processo à esquerda, e, produto final à direita.	21
Figura 8 - Quitina extraída de <i>Strategus aloues</i>	21
Figura 9 - Quitosana sintetizada a partir de quitina extraída de <i>Strategus aloues</i>	22
Figura 10 - Esquema da síntese da hidroxiapatita.	23
Figura 11 - Quitosana 2%, diluída em meio ácido.	24
Figura 12 - Mistura contendo HAP e QUI.	25
Figura 13 - Compósito HAP/QUI, após secagem.	25
Figura 14 - Sangue humano após centrifugação.	26
Figura 15 - Processo de lavagem das hemácias. Primeira lavagem (à esquerda) e a última lavagem realizada (à direita).	27
Figura 16 - Solução de hemácias 10%.	28
Figura 17 - Soluções de hemácias contendo as amostras.	29
Figura 18 - Soluções de hemácias contendo as amostras após centrifugação.	29
Figura 19 - Difratoograma da quitosana comercial (QUI-a) e sintetizada (QUI-b).	31
Figura 20 - Difratoogramas da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).	32
Figura 21 - Difratoograma da amostra controle (HAP) ampliada com os principais picos indicados.	33
Figura 22 - Difratoogramas da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b) ampliada no pico de 25,9°.	34
Figura 23 – Espectros de IVTF da quitosana comercial (QUI-a) e sintetizada (QUI-b).	36
Figura 24 – Espectro de FTIR da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).	37
Figura 25 - Interação do Ca e HAP com o grupamento –NH ₂ da quitosana.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 GERAL	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 BIOCERÂMICAS	12
3.2 APATITA BIOLÓGICA	14
3.3 APATITA NA ÁREA MÉDICA	15
3.4 QUITOSANA	16
3.5 COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA/QUITOSANA (HAP/QUI)	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 SÍNTESE DE QUITOSANA À BASE DE QUITINA EXTRAÍDA DE BESOUROS (<i>STRATEGUS ALOEUS</i>)	19
4.1.1. Purificação Da Quitina	19
4.1.2. Desacetilação Da Quitina	21
4.3 PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA/QUITOSANA (HAP/QUI)	24
4.4 TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA	26
4.5 CARACTERIZAÇÃO	30
4.5.1 Difractometria de Raios X (DRX)	30
4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)	30
5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)	35
5.3 CAPACIDADE HEMOLÍTICA	39
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da medicina, a expectativa de vida aumentou drasticamente. Segundo o IBGE, de 1940 a 2015, a expectativa de vida no Brasil aumentou em 30 anos. Porém, com o aumento da longevidade, também houve uma maior suscetibilidade às doenças da idade, como catarata, artrite e osteoporose.

No processo de envelhecimento, os ossos podem sofrer bastante, principalmente devido a desgaste e deficiência de cálcio. Isso pode levar a fraturas ou mesmo à quebra dos ossos. Quando isso ocorre, podem ser necessárias intervenções cirúrgicas para reparar os danos, e é quando são necessários enxertos, implantes ou substituições dos ossos originais por próteses.

Esses processos são complicados e podem gerar rejeições. Geralmente, a rejeição está atrelada a presença de contaminações por microrganismos, sendo um deles o *Staphylococcus aureus*. Esses organismos podem gerar complicações; tais como a osteomielite, uma inflamação óssea, que causa sintomas como febre e dores na região afetada.

Por isso, é vital que sejam pesquisados materiais para serem usados nessas situações, e que possuam preferencialmente, alto índice de aceitação pelo corpo humano. Dentre esses materiais, as biocerâmicas são as que mais se destacam por possuírem, grande estabilidade química e dureza, tornando-as interessantes substâncias para substituir estruturas ósseas. Uma característica que vêm sendo buscada na biocerâmicas é sua reatividade benéfica com o corpo humano, interagindo de forma a estimular a região onde está presente. Uma dessas cerâmicas é hidroxiapatita, a mais utilizada em operações médicas.

A hidroxiapatita (HAP), é o material que compõe a maior parte do osso humano, cerca de 66% em massa. Sua síntese é relativamente simples e barata, tornando-a um objeto de estudo ainda mais interessante. Juntamente à HAP, podem ser incorporadas outras substâncias que darão flexibilidade e maleabilidade, formando um compósito mais eficiente que somente essa cerâmica.

Um material que vem sendo amplamente incorporado é a quitosana (QUI), que possui semelhança física ao colágeno, que é o segundo maior componente do osso. A utilização da quitosana vem se mostrando mais interessante que o próprio colágeno,

uma vez que melhora a capacidade de cicatrização do organismo e possui propriedades antimicrobianas, as quais o colágeno não apresenta.

O compósito formado por esses dois, hidroxiapatita e quitosana (HAP/QUI), possui uma mescla das características de ambos compostos, sendo de extremo interesse na substituição óssea. Logo, a HAP/QUI, como pode ser chamado o compósito, pode possuir características físicas e químicas semelhantes ao osso humano. Pois, devido à presença da HAP, possui dureza e resistência à compressão. Já a QUI, realiza a função do colágeno, dando maleabilidade à estrutura e as propriedades citadas no parágrafo anterior.

Dos meios de obtenção da QUI, a mais comum é pela desacetilação da quitina extraída de crustáceos. Porém, pode-se usar outras fontes alternativas provedoras de quitina, como os besouros Broca-de-Raiz (*Strategus aloeus*), inseto comum na região sul do continente americano. Esse besouro é considerado uma espécie invasora e uma praga agrícola no Brasil. Desta forma, há de se destacar a possibilidade do uso dessa fonte para a extração da quitina, uma vez que, contribui para o reaproveitamento desta biomassa, que ainda não possui destinação de descarte. Por conseguinte, o trabalho desenvolvido teve como propósito sintetizar e caracterizar compósitos de hidroxiapatita utilizando como base polimérica a quitina extraída de besouros *Strategus aloeus*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir compósitos de hidroxiapatita/quitosana (HAP/QUI) e verificar a influência da adição da matriz polimérica extraída de besouros (*Strategus aloeus*) nas características físicas, químicas e biológicas do material para possível aplicação como biomaterial.

2.2 ESPECÍFICOS

- a. Validar a síntese de compósitos HAP/QUI, utilizando a quitosana oriunda de *Strategus aloeus* como matriz polimérica;
- b. Certificar se houve formação de hidroxiapatita como fase majoritária por difratometria de raios X;
- c. Identificar os grupos funcionais característicos do compósito HAP/QUI por espectroscopia vibracional na região do infravermelho;
- d. Investigar a atividade hemolítica do compósito sintetizado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOCERÂMICAS

As cerâmicas são compostos micro particulados, constituídos por materiais que sofreram tratamento térmico de aproximadamente 550 °C e seus principais representantes são óxidos. As biocerâmicas são um subgrupo das cerâmicas, e a característica que as diferencia do restante é a capacidade de serem compatíveis com sistemas biológicos (HENCH, 1991; DOROZHKIN, 2010).

Segundo Kawachi et al. (2000), existem registros do uso de biocerâmicas desde 1894, quando teria sido proposto o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$) como substituto de ossos e dessa maneira, surgiu a oportunidade de se usar as cerâmicas para o uso de cerâmicas. Infelizmente, o gesso não tem resistência suficiente para funcionar como substituto ósseo, mas outras cerâmicas vêm sendo pesquisadas ao longo das décadas para tal fim.

Desde então, uma gama de materiais, que não incluíam apenas cerâmicas começaram a ser pesquisadas para uso médico, como polímeros, metais, ligas e vidros (KAWACHI et al., 2000). Mas mesmo com tantos materiais úteis, uma das classes merece destaque, as cerâmicas de fosfato de cálcio. Na Figura 1 são mostrados alguns exemplos de materiais comercialmente disponíveis, produzidos a base de cerâmicas de fosfato de cálcio.

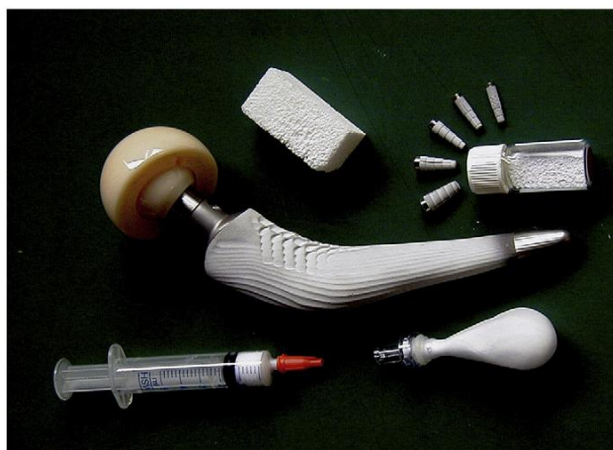


Figura 1 - Exemplos de biocerâmicas comerciais a base de ortofosfato de cálcio.
Fonte: Dorozhkin (2010).

Um dos principais motivos da aplicação comercial das cerâmicas de fosfato de cálcio é que essas apresentam, por diversas vezes, uma série de propriedades desejadas em processos de implantes e próteses, como atoxidade local ou sistêmica e biocompatibilidade, dentre outras (KAWACHI et al., 2000). Na Tabela 1, estão descritas algumas formas que esse grupo pode se apresentar.

Tabela 1 - Tipos de fosfato de cálcio e suas razões Ca/P.

Nome da biocerâmica	Fórmula química	Razão Ca/P
Fosfato monocálcico mono-hidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Monohidrogênio fosfato de cálcio	CaHPO_4	1,0
Fosfato tricálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita deficiente de cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5-1,55
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}\text{PO}_4\text{F}_2$	1,67
Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0

Fonte: Adaptada de Gonsalves (2016).

Dentre as formas que o fosfato de cálcio pode se apresentar, as apatitas têm sido mais visadas para aplicações médicas, principalmente por já serem encontradas de forma natural no corpo humano (DESAI et al., 2013).

3.2 APATITA BIOLÓGICA

A apatita é uma família de minerais constituída de fosfatos de cálcio, dividida em grupos, sendo suas principais representantes as clorapatitas, fluorapatitas e hidroxiapatitas. A última citada se destaca por realizar papel fundamental na biologia humana (RODRIGUEZ-FLOREZ et al., 2014).

Presente em todo o esqueleto, hidroxiapatita (HAP) equivale, em massa, a cerca de 66% do osso humano. Ela é responsável pela resistência a compressão e dureza desse tecido, cujas propriedades oferecem sustentação e proteção as demais estruturas do corpo, e é também onde ocorre a produção de células tronco (BIANCO et al., 2001; PACUREANU, 2012).

A HAP também possui elevada capacidade de troca iônica. Essa pode ter substituições tanto catiônica (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Na^+ , K^+) como aniônica (CO_3^{2-} , F^- , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$). Isso faz com que esse mineral participe ativamente nas interações químicas do corpo humano, ou seja, possui elevada bioatividade (GINEBRA et al., 2012).

O osso é constituído por cartilagens, tecidos ósseos, nervosos, adiposos, etc. Sendo assim, esse possui várias estruturas, canais, regiões com composição e funcionalidades diferentes. Simplificando, o tecido ósseo pode ser dividido em cortical e trabecular (Figura 2). O primeiro fica do lado externo do osso e é mais rígido e denso, correspondendo a 85% da massa esquelética. O segundo, que inclui os 15% restantes, é recoberto pelo primeiro, ele é poroso e pode ter elasticidade e força compressiva 10 vezes menor que o tecido cortical (GONSALVES, 2016). Mas de forma geral, sua composição é relativamente simples, podendo ser dividida em composição inorgânica e orgânica. A parte inorgânica corresponde à hidroxiapatita, correspondendo a 66% em massa. Já a parte orgânica, corresponde aos 34% restante, dos quais 95% é composta de colágeno (PACUREANU, 2012).

Comparada com a hidroxiapatita óssea, a sintética não é tão diferente, e vem se mostrando uma ótima candidata para implantes e enxertos ósseos, mostrando-se capaz de prevenir osteomielite (DESAI et al., 2013). Sua síntese é relativamente simples, e normalmente é necessária a presença de algum de seus sais, e pode ocorrer em solução ácida, básica, e até à seco (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

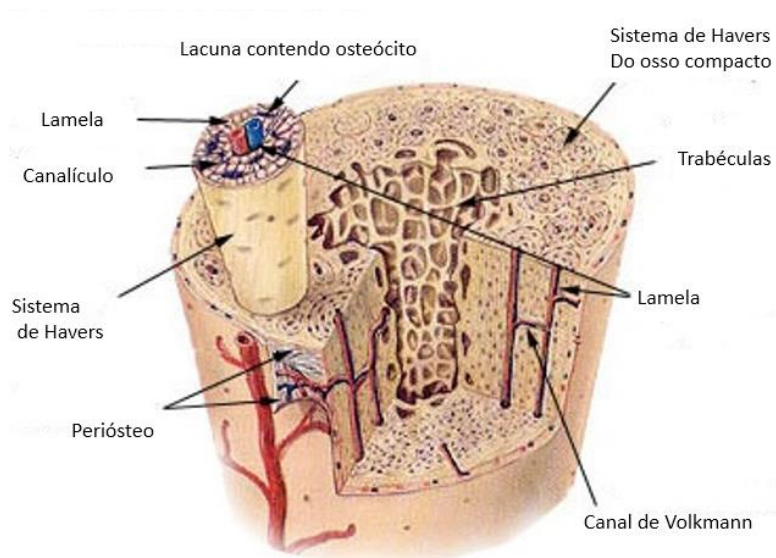


Figura 2 – Osso cortical e tubecular.
Fonte: Adaptado de National Cancer Institute (20--).

Porém, a hidroxiapatita sozinha, ainda não é o melhor material para substituição óssea, pois possui baixa capacidade de carregamento mecânico (CAI, 2009). Por isso, várias outras substâncias vêm sendo incorporadas junto a ela, principalmente compostos orgânicos que tenham propriedades semelhantes às do colágeno.

3.3 APATITA NA ÁREA MÉDICA

Compósitos de apatita vêm sendo pesquisados e desenvolvidos com o objetivo de serem aplicados como substitutos de tecido ósseo ou para recobrir próteses. Esta última aplicação, tem sido muito utilizada. Neste processo, uma camada de apatita é depositada sobre uma prótese como as de titânio, por exemplo (SON et al., 2011). A apatita, como já foi dito anteriormente, não é rejeitada pelo corpo humano e portanto, a incorporação de próteses é facilitada.

Quando voltado para a área médica, encontra-se as mais diversas variedades de compósitos com apatita, alguns desses compósitos são associadas com: gelatina (HAP/GEL), colágeno (HAP/COL) e quitosana (HAP/QUI) (CHEN et al., 2006; LIU et

al., 2009; XIANMIAO et al. 2009). Todos os compósitos citados já foram ou estão sendo pesquisados para utilização como enxerto.

O compósito HAP/COL mostra-se muito semelhante ao tecido encontrado nos ossos (CHOLAS et al., 2016), porém, possui alto custo de obtenção. Um composto que possui propriedades semelhantes ao colágeno é a quitosana, que vem tomando lugar nesse ramo de pesquisa (GONSALVES, 2016).

3.4 QUITOSANA

A quitosana (Figura 3) é um copolímero catiônico linear, constituído por subunidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações o-glicosídicas (PILLAI et al., 2009). Ela é um polímero biodegradável, solúvel em água, biocompatível e estimuladora de atividade celular, dentre outras potencialidades. (BARABÁS et al., 2013). Uma outra vantagem, já citada, é sua semelhança morfológica com o colágeno.

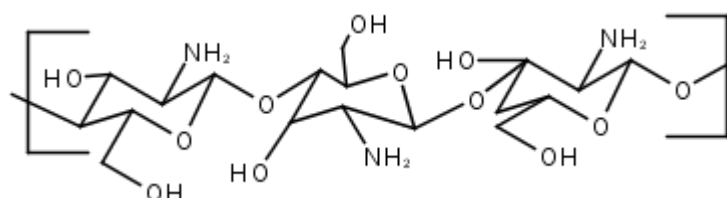


Figura 3 – Representação da estrutura da quitosana.
Fonte: Própria

A quitosana (QUI) vem sendo aplicada em diversas áreas, mostradas na Tabela 2. Essa gama de aplicação pode ser atribuída principalmente aos seus grupamentos OH, os quais podem ser substituídos, com o intuito de alterar as propriedades químicas e físicas desse polímero (ANDRADE, 2000).

Tabela 2 - Áreas de emprego de quitina e quitosana.

Área	Emprego
Biomédica	Biomembranas artificiais Sutura cirúrgica

Farmacêutica	Agente cicatrizante Aditivo de medicamentos Liberação controlada de drogas Controle de colesterol Lente de contato
Cosmética	Umectante Fungicida Bactericida
Indústria de Alimentos	Aditivos alimentares Nutrição animal Embalagem biodegradável para alimentos
Biotecnologia	Imobilização de enzimas e de células Separação de proteínas Cromatografia Agente bactericida
Indústria Têxtil e de papel	Tratamento de Superfície
Papel para Indústria Fotográfica	Filmes

Fonte: ANDRADE, 2000.

Apesar desse polímero ser produzido naturalmente, o meio mais comum de sua obtenção é pela desacetilação da quitina (Figura 4). Essa, que por sua vez, costuma ser extraída de animais marinhos meio marinho, principalmente de camarões e outros crustáceos (ROBERTS, 1992). Porém, a quitina também pode ser extraída de outras fontes, como do exoesqueleto de insetos.

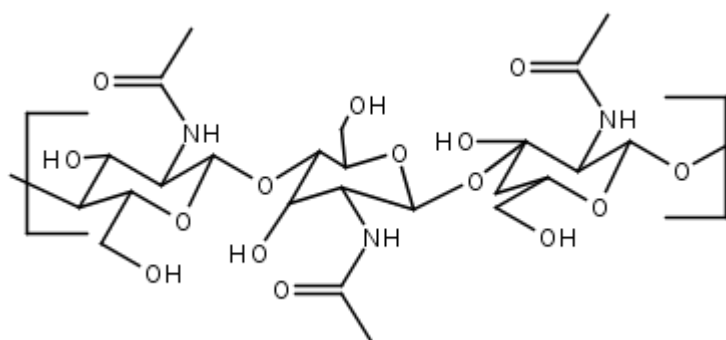


Figura 4 – Representação da estrutura da quitina.

Fonte: Própria.

Como fonte de quitina para síntese da QUI o besouro *Broca-de-Raiz* (*Strategus aloeus*), é um bom candidato, pois é considerado uma praga agrícola, causando grande prejuízo econômico, pois costumam se alimentar de palmeiras, como o Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), planta da qual é extraída o óleo de dendê (BEDFORD, 1980; JALIGOT et al., 2000; TONET et al., 1999).

A desacetilação pode ser realizada por meio de vias ácidas ou básicas, porém, quando utilizadas soluções ácidas há a possibilidade de rompimento da estrutura do polímero. Por isso, costuma-se optar pela via básica, utilizando NaOH. Além disso, o tempo da reação, concentração da solução alcalina e temperatura durante a síntese podem ser modificadas para alterar algumas propriedades do produto, como a densidade e o próprio grau de desacetilação (ROBERTS, 1992).

Geralmente, a quitina desacetilada é considerada como quitosana quando tem um grau de desacetilação superior a 60%. A quitosana, ao contrário de sua matriz, é solúvel em água, principalmente se essa estiver acidificada. Isso pode facilitar a incorporação de substâncias como a hidroxiapatita, podendo gerar compósitos mais homogêneos (ROBERTS, 1992).

3.5 COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA/QUITOSANA (HAP/QUI)

O compósito HAP/QUI é uma blenda do mineral hidroxiapatita e do biopolímero quitosana. Essa junção faz com que se comportem de forma semelhante ao tecido ósseo. Nesse material, a quitosana atua como suporte para a hidroxiapatita nanoparticulada, que promove trocas iônicas devido sua alta reatividade e outras propriedades (GONSALVES, 2016). Nesse sistema, pode-se relacionar a quitosana realizando a mesma função estrutural que o colágeno no osso humano.

A comparação da capacidade de compressão entre esse material sintético e o tecido ósseo humano traz otimismo. Segundo CAI et al. (2009), HAP/QUI em proporções 70/30 (m/m) chegaram a suportar uma compressão de 180 MPa, não ficando longe do tecido humano, que pode suportar até 221 MPa (CARTER et al., 1976).

É necessário dizer que a aplicação médica do compósito HAP/QUI pode ser até mais interessante e promissor que a HAP/COL, que possui maior semelhança química com o osso humano. Afinal, a quitosana tem mostrado uma série de efeitos benéficos ao organismo, como: atoxicidade, hidroflicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades antimicrobianas (AZEVEDO et al., 2007). Ainda, esse polímero já mostrou capacidade de acelerar a cicatrização de queimaduras e feridas (AOYAGI et al., 2007; JAYAKUMAR et al., 2011). Dadas essas benéficas propriedades, os compósitos HAP/QUI vêm sendo estudados amplamente na área biomédica (CAI et al., 2009; LARANJEIRA et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DE QUITOSANA À BASE DE QUITINA EXTRAÍDA DE BESOUROS (*STRATEGUS ALOEUS*)

4.1.1. Purificação Da Quitina

Primeiramente, foi necessário a purificação da quitina para sintetizar a quitosana. Para isso foi utilizada a metodologia utilizada por Macedo (2017), onde os exoesqueletos dos besouros sofreram desmineralização, desproteínização e por fim, despigmentação, nessa sequência.

Para a desmineralização (Figura 5), uma determinada quantidade de partes desse animal foi dispersa numa solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹ de forma que houvesse 50 mL de solução para cada grama de inseto. Essa mistura ficou sob agitação constante a 20 °C durante 2 horas. Em seguida, a amostra foi filtrada à vácuo e lavada diversas vezes com água destilada até o pH se manter constante. Por fim, a fração retida no filtro foi levada à estufa para secagem, a 40 °C durante 24 horas.



Figura 5 - Desmineralização da quitina.
Fonte: Própria.

Após a secagem, a amostra foi submetida ao processo de desprotenização (Figura 6). Nessa etapa, a massa foi dispersa em 50 mL de uma solução aquosa de NaOH 10%, sob agitação constante, e em temperatura de 70 °C, durante 3 horas. Em seguida, o material sólido foi separado por filtração à vácuo e lavado com água destilada até atingir a neutralidade. Por fim, o material foi levado à estufa para secagem, novamente a 40 °C durante 24 horas.



Figura 6 - Desproteínação da quitina.
Fonte: Própria.

Para a despigmentação (Figura 7), a amostra restante dos processos anteriores foi dispersa em 50 mL de Hipoclorito de sódio (NaClO) 2% sob agitação constante por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esta etapa, a solução foi filtrada para a

separação da quitina (Figura 8), que foi lavada com água destilada e em seguida, submetida a secagem a 40 °C, por um período de 24 horas.



Figura 7 – Processo de despigmentação da quitina. Início do processo à esquerda, e, produto final à direita.

Fonte: Própria.

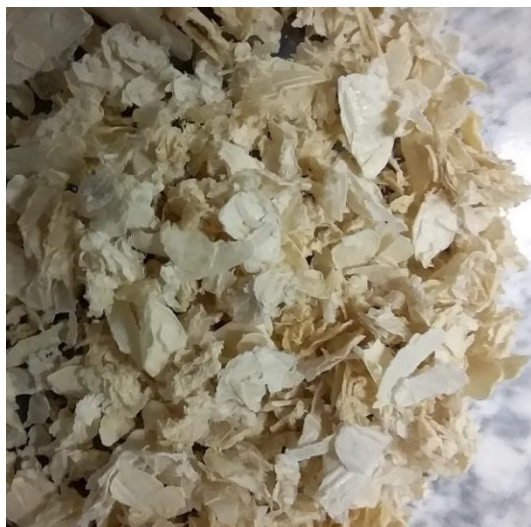


Figura 8 - Quitina extraída de *Strategus aloues*.

Fonte: Própria.

4.1.2. Desacetilação Da Quitina

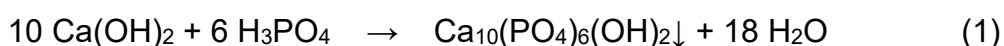
A desacetilação da quitina foi feita para a obtenção da quitosana (Figura 9). A quitina foi adicionada numa solução aquosa de NaOH, na concentração de 500 g L⁻¹. Esse foi mantida sob agitação vigorosa a temperatura de 90 °C por um período de 48 horas, com o objetivo de produzir quitosana com grau de desacetilação de no mínimo, 82%. Esse método foi uma adaptação daqueles descritos por Roberts (1992).



**Figura 9 - Quitosana sintetizada a partir de quitina extraída de *Strategus aloues*.
Fonte: Própria.**

4.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA (HAP)

O método escolhido para a obtenção da HAP foi o método de reação e precipitação por via úmida conforme descrito por Angelo (2008). Neste método, a precipitação da HAP ocorre devido a reação entre soluções de ácido fosfórico, H_3PO_4 , $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de cálcio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (PA), segundo a equação (1) química a seguir:



Em comparação com outros métodos sugeridos na literatura, este método foi escolhido em virtude da simplicidade da reação, do baixo custo dos reagentes, da facilidade de sua compra e do grau de pureza adequado. O subproduto da reação é a água, não causando maiores problemas quanto à utilização do produto da reação como biomaterial.

Com o objetivo de obter uma HAP estável e pouco solúvel em meios biológicos, tendo em vista a sua aplicação como biomaterial, as proporções dos reagentes nas reações executadas foram ajustadas para o valor da razão Ca/P igual a 1,67. O meio

reacional constituiu um sistema com volume final de aproximadamente 300 mL, adicionando-se quantidades iguais de cada uma das soluções durante a análise.

No processo de adição do ácido, a solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi mantida em um béquer a $50\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2^\circ\text{C}$), sob agitação constante ($\pm 250\text{ rpm}$). Em seguida, foi adicionada lentamente a solução de H_3PO_4 , controlando-se o gotejamento para ± 2 gotas/segundo (2 a 5 mL/min) (Figura 10). Durante o procedimento, o pH da solução foi verificado utilizando fita indicadora (papel universal), e foi ajustado, quando necessário, a valores entre 10-12 com a adição de solução de NH_4OH 40% (v/v).

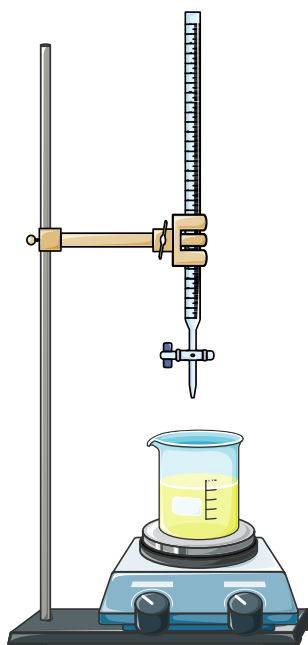


Figura 10 - Esquema da síntese da hidroxiapatita.
Fonte: Própria.

Após o gotejamento, a agitação e o aquecimento permaneceram constantes por mais 30 minutos para completar a síntese e verificar as possíveis alterações no pH do meio reacional. Quando necessário, o pH foi ajustado como descrito anteriormente. O conteúdo do béquer foi mantido em processo de envelhecimento, por 24 horas, à temperatura ambiente, para formação e estabilização da fase HAP.

Ao término do período de envelhecimento, o pH foi verificado novamente, o excesso de água foi retirado, e o produto insolúvel foi lavado com água destilada até o pH atingir valores próximos a neutralidade. O produto presente no béquer foi seco

completamente em estufa à 110°C por 24 horas, para a retirada da água. Após a secagem, o resíduo foi desaglomerado, devido sua dureza, em almofariz de ágata.

Para a estabilização da fase HAP, as amostras foram calcinadas em cadinhos de cerâmica, com taxa de aquecimento de 10°C/min até ser atingido 1000 °C em atmosfera de ar. O período de residência a 1000 °C foi de 1 hora.

4.3 PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA/QUITOSANA (HAP/QUI)

Primeiramente, foi preparada uma dispersão de quitosana 2% (m/v) dissolvendo-se o polímero em uma solução de ácido acético, 1% (v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 horas (Figura 11).

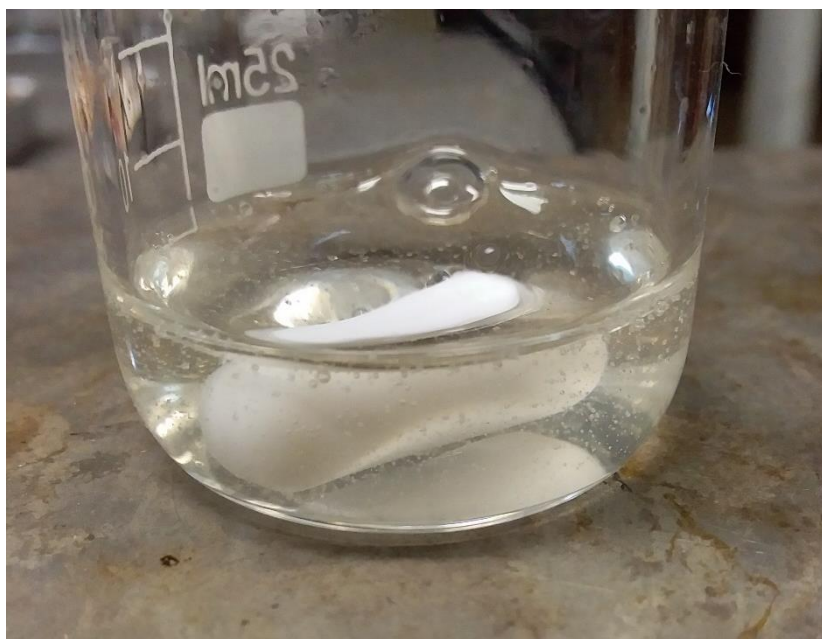


Figura 11 - Quitosana 2%, diluída em meio ácido.
Fonte: Própria.

Para comparar a eficácia da quitosana extraída de besouros, uma amostra de quitosana comercial da Sigma-Aldrich, com baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85%, foi utilizada como amostra controle (AC).

Os compósitos HAP/QUI foram preparados em uma proporção de 70% de HAP e 30% de QUI em massa. A HAP formada foi adicionada aos poucos sob o hidrogel de quitosana, sob agitação constante a temperatura ambiente (Figura 12). Após o processo de adição, a mistura permaneceu sob agitação constante e em temperatura

de 60 °C, em banho maria, até a evaporação completa da água e formação de um material sólido (Figura 13).

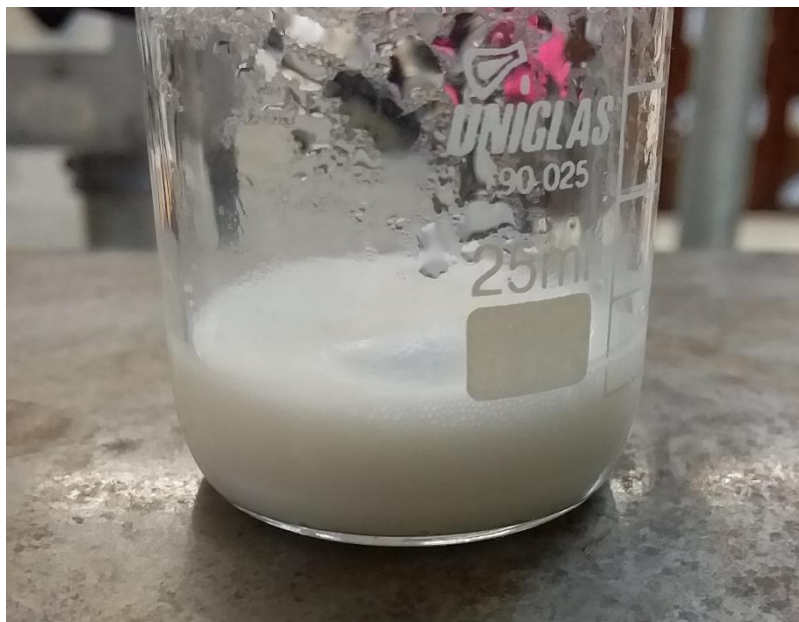


Figura 12 - Mistura contendo HAP e QUI.
Fonte: Própria.



Figura 13 - Compósito HAP/QUI, após secagem.
Fonte: Própria.

O compósito sintetizado a partir da matriz polimérica extraída dos besouros foi nomeado (HAP/QUI-b) e o compósito controle, sintetizado a partir da quitosana comercial Sigma Aldrich (HAP/QUI-a).

4.4 TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para observar se os compósitos formados poderiam ou não causar danos ao corpo humano, foi analisada a capacidade de rompimento da parede celular de glóbulos vermelhos por esses materiais.

Os ensaios de atividade hemolítica foram realizados utilizando metodologia descrita por Bulmus (2003), com modificações. Primeiramente, amostra de sangue humano foi coletada (aproximadamente 3 mL) em tubos à vácuo contendo EDTA, para que não houvesse coagulação do sangue, e adicionado em um tubo Falcon de 15 mL. Depois, esse foi centrifugado à 2500 rpm durante 10 minutos à 6 °C (Figura 14). Em seguida, o plasma do sangue foi retirado utilizando uma micropipeta.



Figura 14 - Sangue humano após centrifugação.
Fonte: Própria.

Após retirar o plasma as células sanguíneas remanescente no frasco foram lavadas (Figura 15). Para tal, 10 mL de uma solução de NaCl 150 mM foi incorporada e a mistura homogeneizada. Essa mistura foi levada à centrifuga por 10 minutos à 2500 rpm e 6°C, e em seguida, o líquido sobrenadante foi retirado e descartado. Esse

processo de lavagem foi realizado 3 vezes. A lavagem utilizando a solução foi necessária para que não houvesse rompimento das membranas celulares das hemácias por osmose.



Figura 15 - Processo de lavagem das hemácias. Primeira lavagem (à esquerda) e a última lavagem realizada (à direita).

Fonte: Própria.

Após as lavagens, restou somente as hemácias no tubo, que corresponderam à 1,5 mL. As hemácias foram suspensas em 8,5 mL de NaCl 150 mM, formando assim uma solução de hemácias 10% (Figura 16).

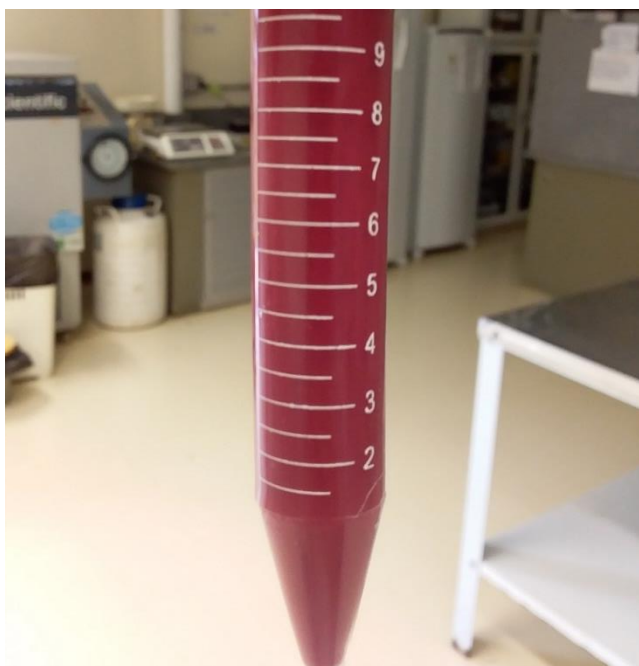


Figura 16 - Solução de hemácias 10%.
Fonte: Própria.

Em outro tubo Falcon, foi adicionado 0,7 mL da solução de hemácias, 2,8 mL da solução salina e 100 μ g de compósito HAP/QUI (Figura 17). A proporção utilizada foi a mesma que de Bulmus et al. (2004), já a quantidade de amostra, foi a mesma utilizada numa das amostras de Palanivelu et al. (2014). Essa mistura foi levada à estufa por 1 hora à 37 °C. Após o tempo de incubação, o tubo foi centrifugado à 2000 rpm por 6 minutos (Figura 18). O sobrenadante foi extraído e teve sua absorvância medida à 541 nm num espectrofotômetro. Esse comprimento de onda é referente a ligação Fe-O presente na hemoglobina contida nas hemácias.

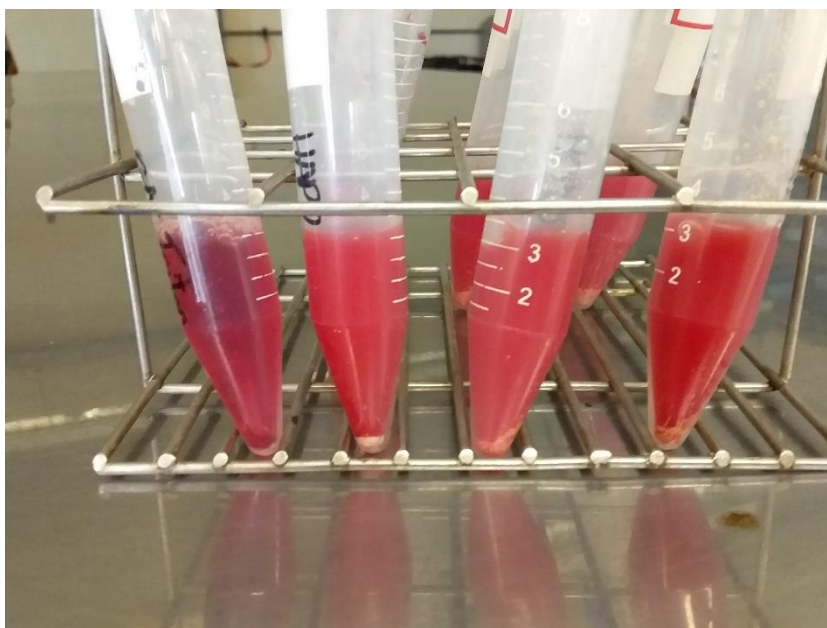


Figura 17 - Soluções de hemácias contendo as amostras.
Fonte: Própria.

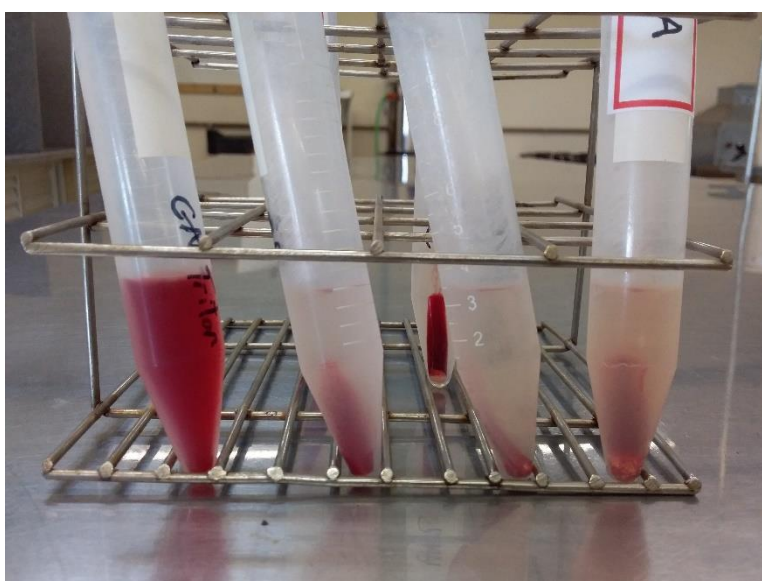


Figura 18 - Soluções de hemácias contendo as amostras após centrifugação.
Fonte: Própria.

Um tubo contendo somente solução salina e a solução de hemácias 10%, foi utilizado como controle negativo para a capacidade hemolítica. Para o controle positivo, foi utilizada uma solução Triton-X 1% substituindo solução salina. O Triton-X, um surfactante, teve o papel de romper as membranas celulares das hemáceas, o que acarretou na liberação da hemoglobina para a solução.

4.5 CARACTERIZAÇÃO

4.5.1 Difractometria de Raios X (DRX)

O material sintetizado foi caracterizado pelo equipamento de Difração de raios X (Rigaku, modelo MiniFlex 600), com intervalo de leitura de 5 a 110° no modo 2 θ , abertura de fenda de divergência 1,625°, fenda de recepção 0,3° usando passos 0,02° no modo *step scan* com varredura de 2 segundos por passo, radiação CuK α (λ = 1,5406 Å), tensão de 40 kV e corrente de 15 mA. Estas análises foram realizadas na Central de análises da UTFPR - Pato Branco.

4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

No intuito de confirmar a agregação da quitosana à hidroxiapatita, foram realizadas a análise dos materiais formados num espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho, modelo Spectromer Frontier, da PerkinElmer, na região de 4000-400 cm⁻¹, mediante o uso de pastilhas de KBr (Aldrich), com acumulação de 32 varreduras e resolução de 2 cm⁻¹. As análises foram realizadas na Central de análises da UTFPR - Pato Branco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Os difratogramas apresentados na Figura 19 demonstram semelhança entre a quitosana sintetizada a partir de quitina extraída de besouros (QUI-b) e a amostra de

referência Sigma Aldrich (QUI-a) no principal pico referente à quitosana, localizado em $19,2^\circ$. Além do pico citado, um pico em $9,2^\circ$, presente na amostra QUI-a, é referência na identificação da quitosana, o qual não foi verificado difratograma da amostra QUI-b, o que pode estar relacionado a possíveis impurezas residuais contidas no material sintetizado (ÁLVAREZ et al., 2014).

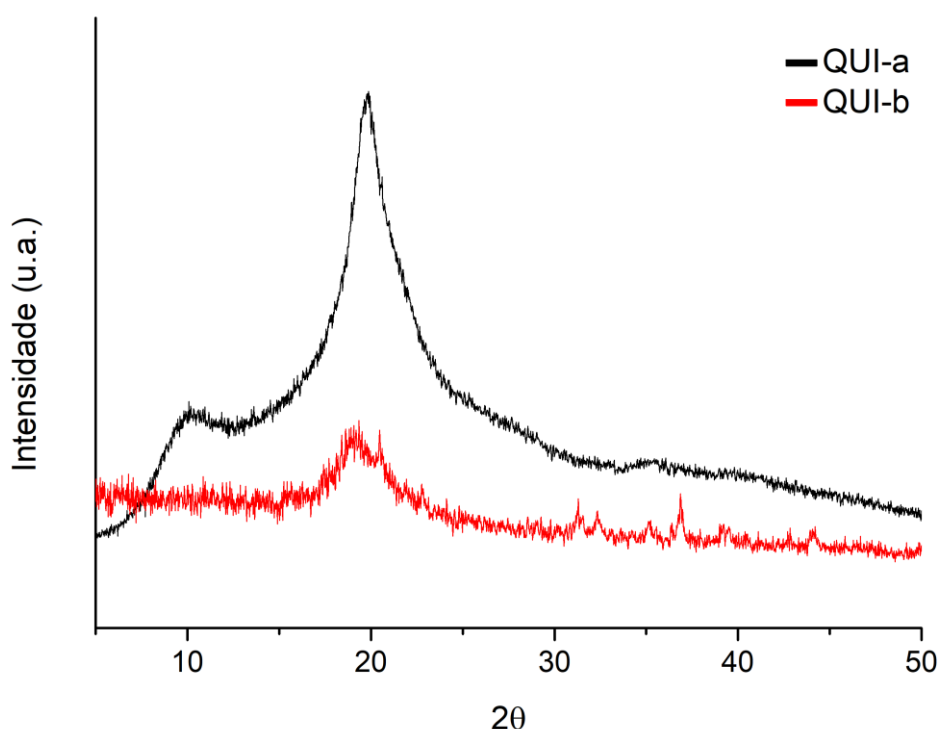


Figura 19 - Difratograma da quitosana comercial (QUI-a) e sintetizada (QUI-b).
Fonte: Própria.

Quanto a intensidade pronunciada de ruído apresentada por QUI-b, esta foi similar aos resultados obtidos por ANDRADE et al., (2012), e ÁLVAREZ et al., (2014). O primeiro estudo, teve como estudo utilizou quitosana produzida a partir de camarões e caranguejos e obteve difratogramas apresentando uma quitosana amorfa. Já no estudo de ÁLVAREZ et al., (2014), foram obtidos sinais com cristalinidade variável pra quitosana extraída de cinco corpos de frutificação de espécies distintas de fungos.

Sendo assim, apesar das impurezas impedirem a visualização de um possível pico em $9,2^\circ$, os resultados obtidos sugerem que a amostra sintetizada QUI-b possui características próximas à quitosana de referência, corroborando a obtenção da

quitosana a partir da fonte alternativa (Exoesqueleto de besouros *Strategus aloeus*).

Na Figura 20, estão apresentados os difratogramas da HAP controle (sem adição de quitosana) e dos compósitos QUI-a e QUI-b. Primeiramente, a HAP foi identificada pelos seus picos característicos em $25,9^\circ$, $31,6^\circ$; $32,9^\circ$ e $33,9^\circ$ theta (Figura 21). Para tal, foi utilizada a carta cristalográfica 72-1243 da *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). A HAP, por sua vez, apresentou picos relativamente estreitos, característicos de materiais cristalinos (ANGELO, 2008).

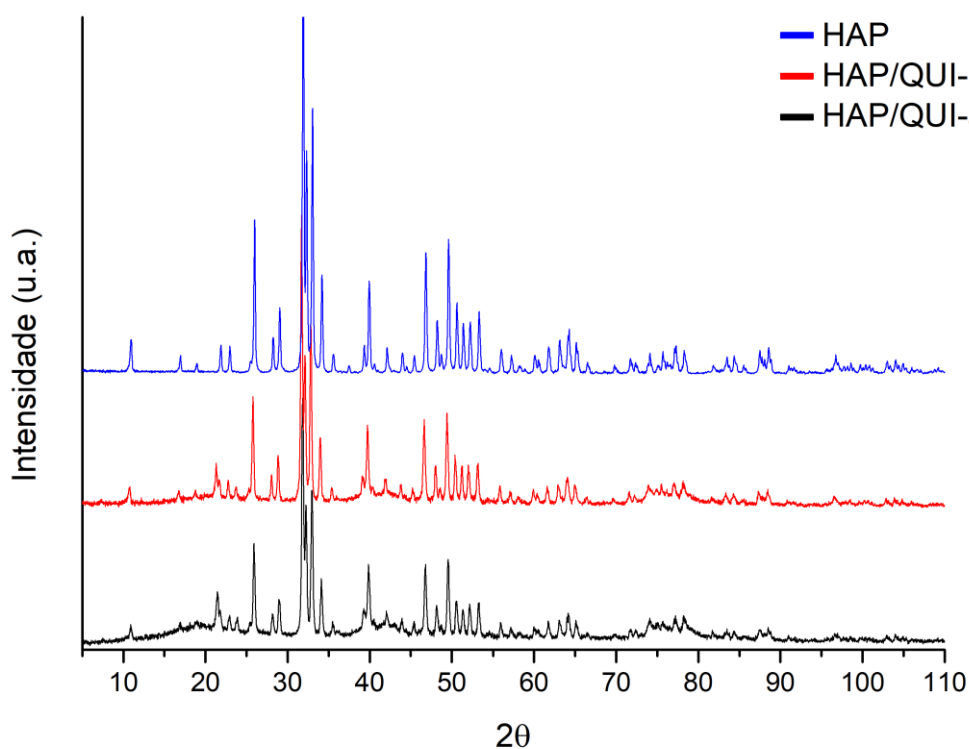


Figura 20 - Difratogramas da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).
Fonte: Própria

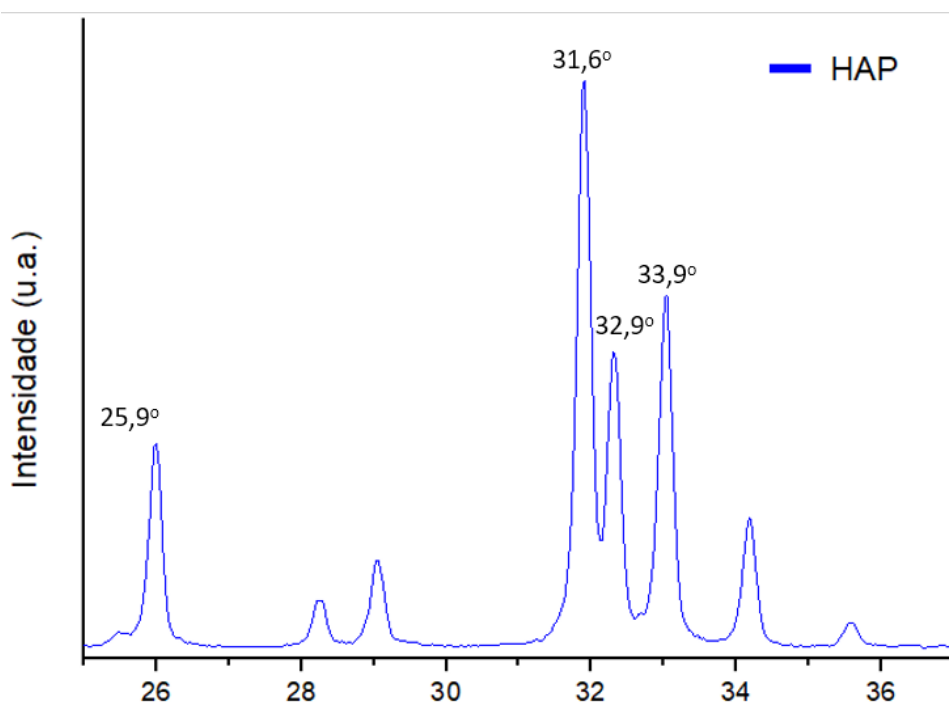


Figura 21 - Difratograma da amostra controle (HAP) ampliada com os principais picos indicados.

Fonte: Própria.

Conforme demonstrado na figura 22, pode-se observar que em ambos os compósitos, a HAP foi a fase majoritária. Ainda, também é possível verificar que, para o compósito HAP/QUI-a houve perda de cristalinidade e a presença de picos pouco intensos atribuídos a quitosana. Ainda, verifica-se que o pico em 25,9° sofre um decréscimo de intensidade, o que pode estar relacionado com o processo de síntese dos compósitos, uma vez que, o ácido acético pode dissolver parcialmente os cristais de HAP (XIANMIAO, 2009).

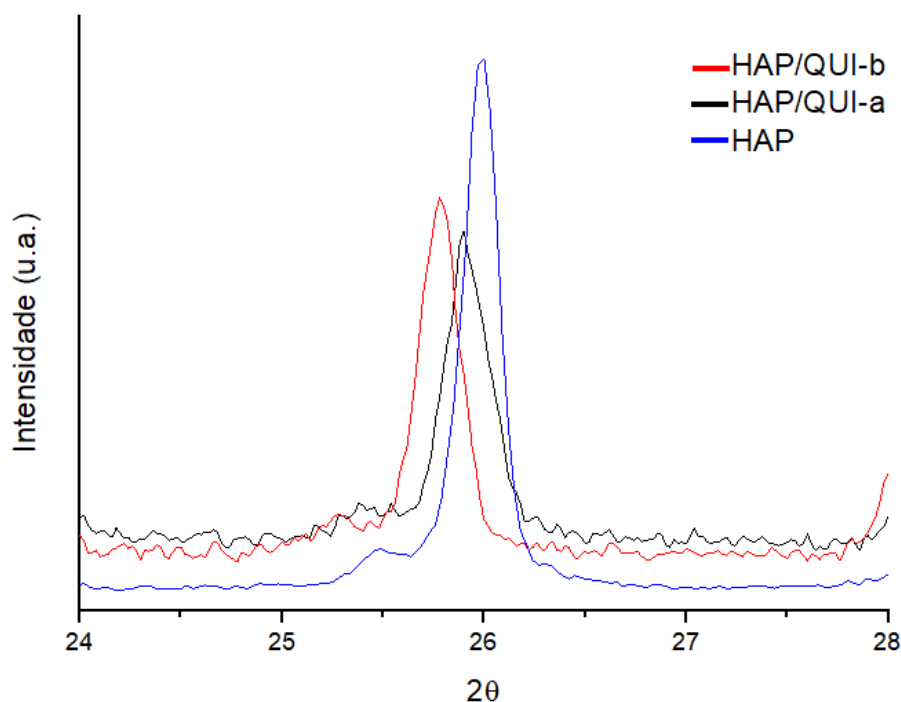


Figura 22 - Difratogramas da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b) ampliada no pico de 25,9°.

Tendo em vista que a HAP possui grande capacidade de interação e/ou troca iônica, e, portanto, pode ter sofrido modificações estruturais durante a formação dos compósitos HAP/QUI, calculou-se o tamanho médio de cristalito (D_m) dos materiais (Tabela 3) empregando-se a equação de Scherrer (1). O pico utilizado para o cálculo do diâmetro médio de cristalito foi o pico em 25,9°. Optou-se por esse, ao invés do pico 31,9° (mais intenso), pois nele há uma sobreposição do pico em 33°.

$$D_m = \frac{\kappa\lambda}{\beta\cos\theta} \quad (2)$$

Onde:

κ = constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,9).

λ = comprimento de onda da radiação $\text{CuK}\alpha$ (0,15406 nm).

β = largura total do pico à meia altura.

θ = ângulo de difração de Bragg.

Tabela 3 - Tamanho de cristalito médio (Dm) da amostra controle (HAP) e dos compósitos (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).

Amostra	Dm (nm)
HAP	56,6
HAP/QUI-a	36,9
HAP/QUI-b	43,2

Autoria própria.

Analisando a Tabela 3, fica evidente que a incorporação das quitosanas causou um efeito na HAP, fazendo que essa sofresse uma desestruturação, diminuído o tamanho de seus cristalitos. Essa diminuição do Dm condiz com os resultados obtidos por XIANMIAO et al., (2009). Estes pesquisadores reportaram que compósitos sintetizados utilizando-se diferentes razões HAP:QUI apresentaram valores de Dm reduzidos, indicando que nos compósitos com maior porcentagem de quitosana, a cristalinidade do compósito diminui. Quando houve 100% de HAP, o Dm calculado a partir do pico 25,9° foi de 39,94 nm, já quando houve uma razão HAP:QUI de 6:4 o Dm decresceu para 29,92 nm. Essa mudança pode ter relação com o meio reacional da síntese do compósito. Como a incorporação da HAP à quitosana ocorreu em meio ácido, dada a dispersão dos íons, esta pode ter favorecido a troca dos mesmos. Assim, o meio reacional pode ter favorecido ligações de hidrogênio entre grupos O–H da HAP e grupos O–H da QUI, formando assim, um compósito homogêneo (XIANMIAO et al., 2009). Logo, o fato da HAP/QUI-b apresentar estrutura relativamente mais cristalina que a HAP/QUI-a pode indicar que houve uma síntese de quitosana com grau de desacetilação inferior à da comercial, pois como mostrado por Macedo (2017), a quitina se demonstra mais cristalina em comparação quitosana. Com isso, pode ser que HAP/QUI0b apresente quitina em sua estrutura.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

Na figura 23 pode-se observar que a quitosana com base polimérica de *Strategus aloeus* apresenta as mesmas bandas que a referência comercial. Ainda,

esses dados são muito similares aos obtidos por MACEDO (2017), indicando que o método utilizado possui reprodutibilidade.

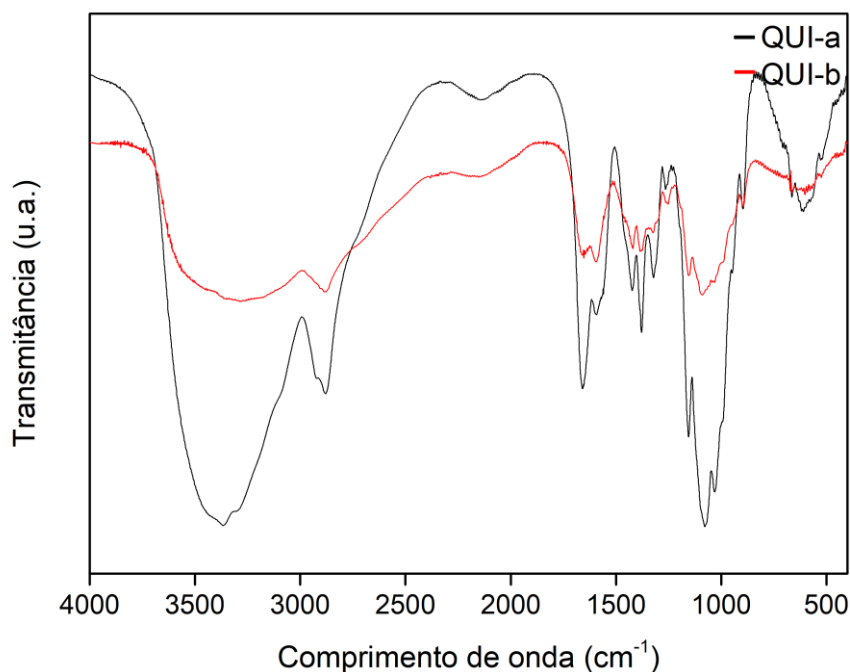


Figura 23 – Espectros de IVTF da quitosana comercial (QUI-a) e sintetizada (QUI-b).
Fonte: Própria

A banda forte e larga localizada em 3450 cm^{-1} é referente ao estiramento O–H e –NH₂ da quitosana. As bandas em 2920 , 2880 , 1430 , 1275 e 1245 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C–H numa ligação H–C–H (PAWLAK et al., 2003). A banda em 1730 cm^{-1} , é associada à uma ligação C=O (PAWLAK et al., 2003). As bandas em 1650 e 1550 cm^{-1} são atribuídas à uma ligação C=O e uma vibração N–H contidas num grupamento amida, respectivamente (PAWLAK et al., 2003). As bandas em 1415 e 1320 são pertencentes a ligações O–H e C–H contidos no grupo pinano da quitosana. Em 1255 cm^{-1} apresenta-se uma ligação C–O. As bandas 1150 e 1040 cm^{-1} são referentes à ligação –C–O–C–, pertencente às ligações glicosídicas na estrutura da quitosana (PAWLAK et al., 2003).

É importante destacar que as amostras QUI-a e QUI-b apresentaram todas essas ligações em comum, visualizadas pela técnica de IV-TF e portanto, é possível

inferir que houve a formação de quitosana com base polimérica oriunda de besouros, e que essa é semelhante ao produto comercial.

O espectro da amostra controle (HAP), ainda sem a incorporação de QUI (Figura 24), apresenta uma banda estreita localizada em 3573 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupamento O–H. Há bandas de baixa intensidade em 1670 e em 1454 cm^{-1} , pertencentes aos estiramentos C=O e C–O, associados ao CO_3^{2-} , respectivamente. O decréscimo de intensidade nessas bandas, indica que a HAP sintetizada possui baixo grau de carbonatação, o que era desejável, uma vez que carbonatos não fazem parte da composição do osso humano. Ainda, a banda em 450 cm^{-1} pode ser atribuída ao CO_3^{2-} . As bandas em 1090 e 1048 cm^{-1} são conferidas à presença de PO_4^{3-} na amostra. As ligações P=O e P–O também podem ser confirmadas pelas bandas em 632 , 602 e 569 cm^{-1} (REHMAN et al., 1997; XIANMIAO, 2009).

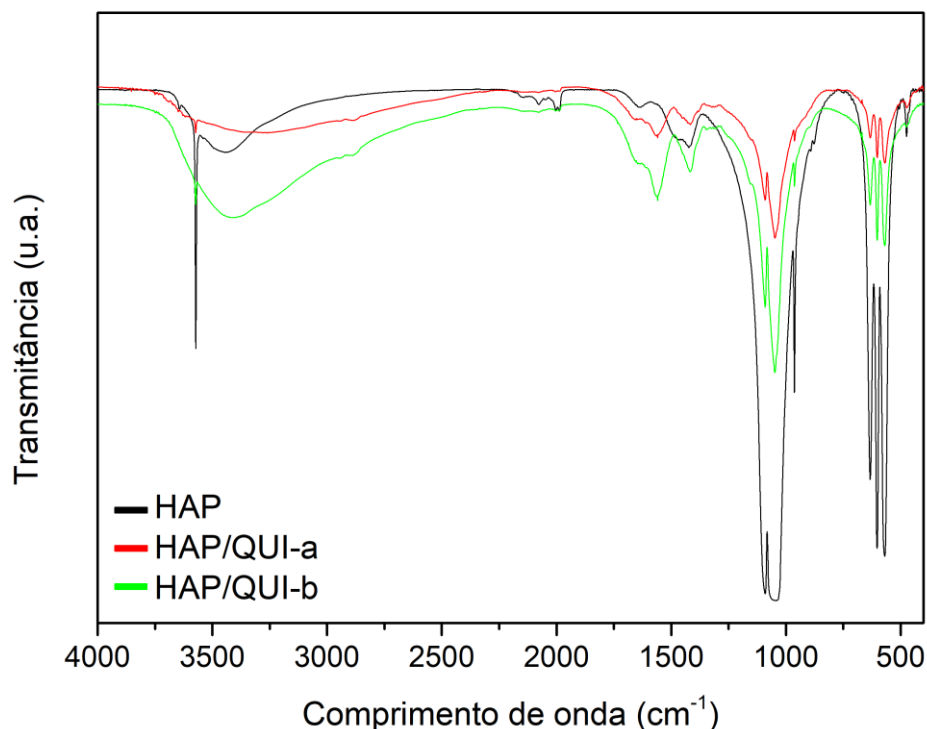


Figura 24 – Espectro de FTIR da amostra controle (HAP) e dos compósitos sintetizados (HAP/QUI-a e HAP/QUI-b).
Fonte: Própria.

Comparando os compósitos formados com a HAP pode-se observar que as principais bandas, em 3573 cm^{-1} , na região entre 1200 e 1000 cm^{-1} e entre 600 e 500 cm^{-1} tiveram claramente uma diminuição de intensidade.

Esses resultados são condizentes com os espectros FTIR obtidos no trabalho de Xianmiao et al. (2009), os quais observaram até mesmo o desaparecimento da banda em 3573 cm^{-1} quando utilizaram uma proporção de HAP:QUI de 4:6. Também é possível ver uma forte interação entre o grupamento O–H da HAP e os grupamentos O–H e N–H da QUI (Figura 21) (XIANMIAO et al., 2009). Além disso, é possível averiguar a presença de bandas condizentes com aquelas presentes na Figura 18, pertencentes à QUI, como a banda larga entre 3500 e 3100 cm^{-1} , pertencente ao estiramento axial O–H; e as bandas em 1730 e 1550 cm^{-1} , associadas à ligações C=O.

A formação do compósito é sugerida também pela visualização de um decréscimo da banda situada em 1090 e 1048 cm^{-1} (Figura 21), indicando a interação entre a quitosana e os íons fosfatos da HAP (XIANMIAO et al., 2009).

Outro indício de formação do compósito está na presença de bandas em 1654 cm^{-1} apenas nos compósitos, constatando que há formação também de ligações de hidrogênio entre –NH_2 e O–H, semelhante ao que é encontrado em componentes do tecido ósseo (LI et al., 2011).

Ainda, se pode sugerir a ligação entre os íons Ca^{2+} da estrutura da HAP com o grupamento –NH_2 da quitosana, formando um composto de coordenação, conforme o esquema citado por Xianmiao et al. (2009), descrito na Figura 25.

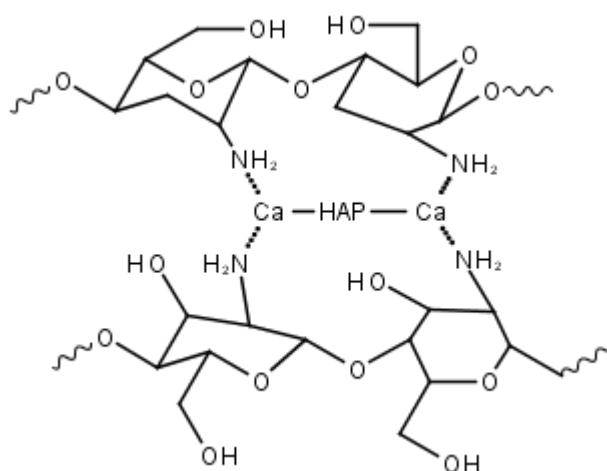


Figura 25 - Interação do Ca e HAP com o grupamento –NH_2 da quitosana.
Fonte: Xianmiao et al. (2009).

Portanto, os métodos de caracterização discutidos até aqui, mostram uma inter-relação corroborando a formação do compósito HAP/QUI. O decréscimo de intensidade do pico de DRX característico de formação da fase HAP em 25,9° junto ao decréscimo das bandas FTIR atribuídas a HAP, confirmam a formação e incorporação da QUI obtida a partir de besouros à HAP.

5.3 CAPACIDADE HEMOLÍTICA

Com as absorvâncias das amostras lidas a 541 nm (Tabela 4), foi possível calcular a capacidade hemolítica das amostras utilizando a equação (3), utilizada por Palanivelu et al. (2014).

Tabela 4 - Absorbância das amostras à 541 nm.

Amostra	Abs
X-Triton	7,350
HAP	0,129
HAP/QUI-a	0,127
HAP/QUI-b	0,118

Autoria própria.

Aplicando os dados da Tabela 3 na equação (3)

$$\%H = \frac{(A_{amostra})}{(A_{triton})} * 100 \quad (2)$$

Onde:

%H = capacidade hemolítica

Aamostra = absorvância da amostra

Atriton = absorvância do X-Triton

Obteve-se os resultados dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Capacidade hemolítica da amostra controle (HAP) e dos compósitos HAP/QUI-a e

HAP/QUI-b.

Amostra	%H
HAP	1,75±0,03
HAP/QUI-a	1,73±0,02
HAP/QUI-b	1,61±0,04

Autoria própria.

A partir dos dados obtidos, é possível verificar que a capacidade de hemólise das amostras foram praticamente nulas, quando comparadas com o controle positivo X-Triton. Quando comparada a capacidade hemolítica da HAP com os resultados obtidos por PALANIVELU et al. (2014), que trabalharam com a HAP, a desse trabalho se mostrou mais promissor. No artigo, foram obtido valores de capacidade de hemólise entre 6 e 18%, muito superiores ao desse trabalho. Como teste indicativo, entende-se, quanto menor o valor de %H, menor será a chance de rejeição por parte do corpo humano. Porém, são necessários testes específicos para confirmar compatibilidade.

Um fator pode ter sido crucial para a diferença obtida por Palanivelu et al. (2014) é o pH. Pois, esse já mostrou ser um fator crucial para %H, onde uma mesma amostra pode ter uma diferenciação de %H de quase 100% quando o pH muda de 5,8 a 7,4, (BULMUS et al., 2004) de forma que o meio ácido pode estimular a hemólise devido ao desvio hidrofílico que causa no material (BULMUS et al., 2004). No trabalho, as análises se deram em meio ácido, e neste ensaio em meio neutro, podendo explicar a diferença de %H obtida.

A admissão de um pH neutro, se deu devido a ser o pH ótimo de funcionamento para as hemácias e ser o ambiente onde a possibilidade de ocorrência de hemólise é diminuída. Ainda, analisando a Tabela 5, os compósitos foram os que apresentaram uma capacidade hemolítica menor, e entre os compósitos HAP/QUI-a e HAP/QUI-b, a segunda apresentou uma capacidade de hemólise 6,94% menor. Isso pode ser um indício que a QUI-b incorporada à HAP pode causar um efeito menos danoso ao corpo que quando utilizado o compósito com QUI-a.

No entanto, um número maior de diferentes análises seria necessário para afirmarmos a possibilidade de utilização desta fonte alternativa de quitosana como precursora de um biomaterial.

6 CONCLUSÕES

Os resultados das análises de DRX e FTIR mostraram que a rota de síntese adotada a partir da utilização da matriz polimérica oriunda de *Strategus aloeus* foi eficiente para a incorporação deste material na estrutura da HAP, com consequente formação de compósitos HAP/QUI.

Pelos difratogramas de raios X foi possível confirmar a formação de HAP como fase majoritária, com relativo grau de cristalinidade. O cálculo do tamanho médio dos cristalitos, atrelado ao decréscimo do pico em $25,9^\circ$ e perda de cristalinidade observado nos difratogramas dos compósitos HAP/QUI-a e HAP/QUI-b, sugere a possível dissolução dos cristais de HAP e incorporação da quitosana a fase majoritária.

Verificou-se nos espectros FTIR da amostra controle (HAP) e dos compósitos, tanto o de referência (HAP/QUI-a), quanto o sintetizado a partir do exoesqueleto de besouros (HAP/QUI-b) bandas características pertencentes à HAP e a QUI. Quando comparadas, observou-se um decréscimo das bandas características da HAP, principalmente aquelas atribuídas as bandas dos grupos hidroxila e fosfato, indicando a formação do compósito, e que a amostra HAP/QUI-b mostrou propriedades similares à referência HAP/QUI-a.

Por fim, as análises de capacidade hemolítica mostraram que o material sintetizado e estudado apresenta baixa capacidade hemolítica, abaixo de 2%, inclusive, ainda menor para a amostra HAP/QUI-b (1,61%) resultado qual, prospecta promissoras aplicações médicas.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, S. P. O.; CADAVID, D. A. R.; SIERRA, D. M. E.; OROZCO, C. P. O.; VAHOS, D. F. R.; OCAMPO, P. Z.; ATEHORTÚ. Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-7, 2014.

ANDRADE, S. M. B.; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; ROCHA, B. G.; BELERMINO, D. D.; GALVÃO, A. O. Preparação e caracterização de membranas de quitosana de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e caranguejos (*Ucides cordatus*). *Biofar*, v. 7, n. 2, 2012.

ANGELO, L. C. Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF. 2008. 122 f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2008

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. 2007. 89 f. Dissertação de mestrado em Química Inorgânica – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

AOYAGI, S.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 330, p. 138–145, 2007.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. v. 3, p. 27–34, 2007.

BARABÁS, R.; CZIKÓ, M.; DÉKÁNY, I.; BIZO, L. Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials. , 67, n. 11, p. 1414–1423, 2013.

BEDFORD, G. O. Biology, ecology, and control of palm rhinoceros beetles. *Further Annual Reviews.* , 25, p. 309-390. 1980.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, G. Bone marrow stromal stem cell: nature, biology, and potential applications. *Stem Cell Concise Review.* Roma. 2001.

BULMUS, V.; WOODWARD, M.; LIN, L.; MURTHY, N.; STAYTON, P.; HOFFMAN, A. A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of controlled release*, v. 93, p. 105-120, 2003.

CAI, X.; TONG, H.; SHEN, X.; et al. Preparation and characterization of homogeneous chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 7, p. 2693–2703, 2009.

CARTER, D.; HAYES, 2. Bone compressive strength: the influence of density and strain rate. *Science*, 1977.

CHEN, Y.; MAK, A.; WANG, M.; LI, J.; WONG, M. PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. *Surface & Coating Technology*, n. 201, p. 575-580. 2006.

CHOLAS, R.; KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S.; GERVASO, F.; et al. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Materials Science and Engineering C*, v. 63, p. 499–505, 2016.

CZIKÓ, M.; DÉKÁNY, I.; BIZO, L. Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials. v. 67, n. 11, p. 1414–1423, 2013.

DESAI, T.; USKOKOVIC, V. Calcium phosphate nanoparticles: a future therapeutic platform for the treatment of osteomyelitis?. Editorial. 2013.

DOROZHKIN, S. V. Biomaterials Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, v. 31, n. 7, p. 1465–1485, 2010.

GINEBRA, M.; CANAL, C.; ESPANOL, M.; PASTORINO, D.; MONTUFAR, E. Calcium phosphate cements as drug delivery material. *Advanced Drug Delivery Reviews*. n. 64, p. 1090-1100, 2012.

GONSALVES, J. Avaliação da influência de um agente modificador de superfície de partículas na estruturação de compósitos bioativos. 2016. 159 f. Tese (Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Sergipe. São Cristóvão, 2016.

HENCH, L. Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of Department of Materials and Engineering*, Flórida, n. 74, p. 1487-1510, 1991.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. S.; NAIR, S. V; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 3, p. 322–337, 2011.

JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; DUSSERT, S.; VERDEIL, L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Springer-Verlag, v. 19, p. 684-690, 2000.

KAWACHI, E.; BERTRAN, C.; REIS, R.; ALVES, O. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar”. Instituto de Química – UNICAMP, 2000.

LARANJEIRA, M. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, Florianópolis, v. 32, n.3, p. 672-678, mar, 2009.

LI, J.; SUN, H.; SUN, D.; YAO, Y.; YAO, F.; YAO, K. Biomimetic multicomponente polysaccharide/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 885–894, 2011.

LIU, X.; SMITH, L. A.; HU, J.; MA, P. X. Biomaterials Biomimetic nanofibrous gelatin / apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, n. 12, p. 2252–2258, 2009.

MACEDO, J. S. T. Caracterização físico química de α -quitina em exoesqueletos de escarabeídeos (*Strategus sp*) e aproveitamento da biomassa residual para obtenção de quitosana. 2017. 34 f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Pato Branco. Pato Branco, 2017.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, v. 396, p. 153-166, 2003.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Acessado em 08/11/17. Disponível em: <<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>>.

PACUREANU, A. Imaging the bone cell network with nanoscale synchrotron computed tomography. 2012. 173 f. Tese (Mestrado na Institut National des Sciences Appliquées de Lyon). Lyon, 2013.

PALANIVELU, R.; KUMAR, A. R. Synthesis, characterization, in vitro anti-proliferative and hemolytic activity of hydroxyapatite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 127, p. 434-438, 2014.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Material Science: Material in medicine*. V. 8, p. 1-4, 1997.

RODRIGUEZ-FLOREZ, N.; GARCIA-TUNON, E.; MUKADAM, Q.; SAIZ, E.; OLDKNOW, K.; FARQUHARSON, C.; MILLÁN, J.; BOYDE, A.; SHEFELBINE, S. An investigation of the mineral in ductile and brittle cortical mouse bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 30, n. 5, p. 786–795, 2015.

ROBERTS, G. *Chitin Chemistry*. Londres: The Macmillan Press, 1977. 365 p.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANA-KHOSHARGI, E.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 492 p.

SON, J.; APPLEFORD, M.; ONG, J.; WENKE, J.; KIM, J.; CHOI, S.; OH, D. Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 153, n. 2, p. 133–140, 2011.

TONET, R.M.; FERREIRA, L.G. de S.; OTOBONI, J.L. de M. *A cultura da pupunha*. Campinas, p. 41, 1999.

XIANMIAO, C.; YUBAO, L.; YI, Z.; LI, Z.; JIDONG, L.; HUANAN, W. Properties and *in vitro* biological evaluation of nano-hydroxyapatite membranes for bone guided regeneration. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 29-35, 2009.