

Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura

*Rubens SPIN-NETO^a, Chaíne PAVONE^b, Rubens Moreno de FREITAS^c,
Rosemary Adriana Chiérici MARCANTONIO^d, Elcio MARCANTONIO-JÚNIOR^d*

^a*Doutorando e Mestre em Periodontia, Faculdade de Odontologia,
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil*

^b*Mestranda em Periodontia, Faculdade de Odontologia,
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil*

^c*Graduando em Odontologia, Faculdade de Odontologia,
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil*

^d*Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia,
UNESP, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil*

Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio-Jr E. Chitosan based biomaterials with medical and dental application: literature review. Rev Odontol UNESP. 2008; 37(2): 155-161.

Resumo: A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceos, e que representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É originada a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino. Características biológicas como biocompatibilidade e biodegradabilidade fizeram com que fossem encontradas diversas aplicações para este biomaterial na área da saúde. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão de literatura sobre os processos de obtenção e as aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana. Estudos sobre fatores como métodos de esterilização e genotoxicidade desses biomateriais ainda são raros e fundamentais para que, aliados àqueles sobre a aplicabilidade das diferentes formulações possíveis a partir da quitosana, permitam que possamos conferir, na prática clínica cotidiana, o papel que se espera deste biomaterial de vanguarda.

Palavras-chave: *Quitosana; quitina; uso terapêutico.*

Abstract: Chitosan is a hydrophilic biopolymer obtained from chitin, material that is present mainly in crustacean shells, and represents the second more abundant polysaccharide in nature. Originated from partial chitin deacetylation, usually by alkaline treatment, biologic characteristics such as biocompatibility and biodegradability made that several application for this biomaterial could be found, mostly in health sciences area. The objective of this paper was to make a literature review about the attainment protocols and clinical application of chitosan biomaterials. Studies about the sterilization methods and these biomaterial's genotoxicity are rare and elemental to allow that these new biomaterials could perform the entire expected in daily clinic.

Keywords: *Chitosan; chitin; therapeutic use.*

Introdução

Os biomateriais são definidos como aqueles materiais não vivos utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico⁴⁸. Muitos deles são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, inclusive do tecido ósseo, pois não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica, além de apresentarem disponibilidade ilimitada¹⁰.

Recentemente, pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais capazes de serem associados a outras substâncias que favoreçam a formação óssea, especialmente os biopolímeros naturais, em particular a quitosana, que pode apresentar potencial na reparação de defeitos ósseos, a despeito das limitações de outros biomateriais³³.

A quitosana (Figura 1a) é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina (termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento), e que designa um polissacarídeo abundante na natureza (Figura 1b), perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente⁴¹.

Este material é proveniente principalmente de carapaças de crustáceos, sendo também encontrado em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. No entanto, toda a quitina comercialmente produzida é obtida dos resíduos das indústrias de processamento de crustáceos enquanto alimento. A quitosana é um polissacarídeo originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina (Figura 2), geralmente por tratamento alcalino⁴.

Características como biocompatibilidade e a biodegradabilidade são suas propriedades fundamentais⁴⁰, e, devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, dentre elas: na agricultura, na indústria de alimentos e, recentemente, na área médica^{40,42}.

Neste trabalho, nosso objetivo foi fazer uma revisão de literatura sobre os processos de obtenção e as aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana com base em artigos publicados e indexados no Medline, publicados nos últimos 10 anos, obtidos após pesquisa na base de dados Scopus.

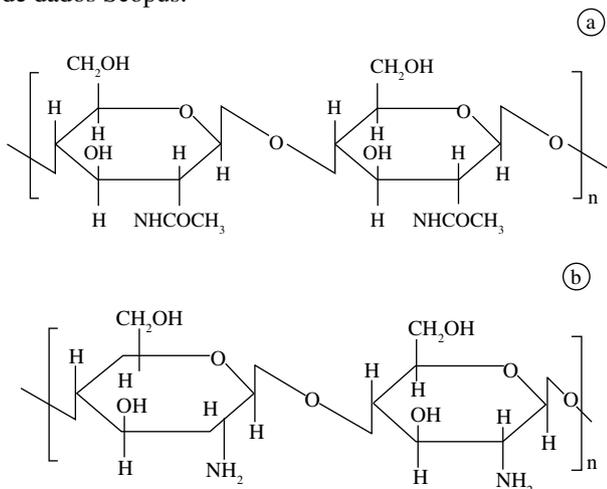


Figura 1. Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).

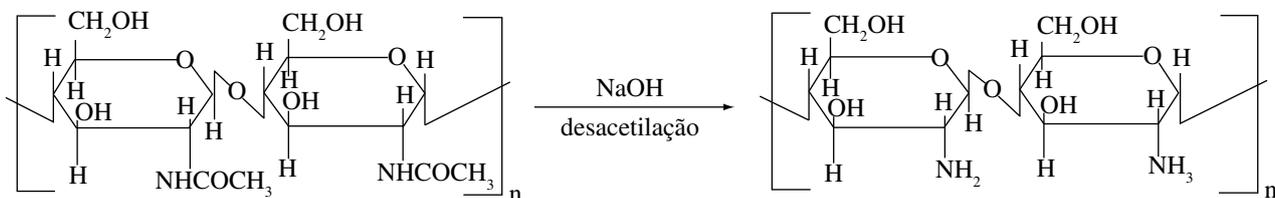


Figura 2. Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana.

Revisão de literatura

Quitina e quitosana

A quitina é um dos mucopolissacarídeos mais abundantes na natureza, atuando como uma substância estrutural para crustáceos, insetos e algumas espécies de fungos, sendo degradada pela enzima quitinase. Na natureza, a quitina é encontrada como um material esbranquiçado, duro e anelástico, com baixíssima solubilidade e reatividade química, sendo também não imunogênico. Por ser altamente nitrogenada, é utilizada rotineiramente como material quelante em reações químicas²⁵.

A quitina é facilmente obtida a partir das cascas de crustáceos, ou ainda da parede celular dos fungos do gênero *mycelia*, estando geralmente associada com a indústria alimentícia, que descarta diariamente toneladas desse material. Partindo-se da matéria-prima bruta, após lavagem abundante, banhos ácidos retiram todo o conteúdo mineral das cascas, e banhos básicos promovem sua desproteínização, aliada a uma leve desacetilação³⁸.

Os exoesqueletos dos crustáceos contêm pigmentos que não se encontram complexados com materiais inorgânicos ou proteínas, não sendo eliminados pelos tratamentos mencionados. Estes pigmentos podem ser eliminados por extração com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização, ou por tratamento com KMnO_4 , NaClO , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou H_2O_2 ²¹.

A quitosana é exatamente o produto da desacetilação da quitina, sendo quimicamente conhecida como seu derivado N-desacetilado, embora o correto grau de desacetilação que diferencie a quitina da quitosana não esteja totalmente definido²⁵. A literatura costuma aceitar materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o acético e o fórmico, como sendo quitosana³⁸.

Para obter tal material, a quitina deve ser processada em solução de hidróxido de sódio a 40%, durante um período médio de três horas, a uma temperatura de 120 °C. Dessa maneira, para a obtenção de 1 kg de quitosana desacetilada a 75%, a partir de cascas de camarão, são necessários cerca de 6,3 kg de HCl para desmineralização, 1,8 kg de NaOH para desproteínização e desacetilação, e 1,5 t de água para

a ocorrência total das reações. Com tudo isso, o custo da quitina purificada, no mercado internacional, gira em torno de US\$ 750 por quilograma³⁸.

Na intenção de se trabalhar com biomateriais obtidos da quitosana, normalmente parâmetros como o peso molecular e o grau de desacetilação são modificados, de acordo com as características que se espera do biomaterial.

Diferentes graus de desacetilação da quitosana são obtidos com a variação do tempo e da concentração do banho de hidróxido de sódio utilizado, além da temperatura em que a reação ocorre. Para aferição do grau de desacetilação obtido, são utilizadas principalmente metodologias baseadas em espectrometria de infravermelho (IRS), cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^{26,37}.

Em relação ao peso molecular, aditivos inseridos no momento da reação de desacetilação, tais como o borohidreto de sódio, são capazes de produzir alterações consideráveis, por diminuir a despolimerização das cadeias de quitina, produzindo quitosana com peso molecular maior. Em valores observados através de HPLC, a quitina que possui peso molecular que varia entre 1×10^6 e $2,5 \times 10^6$ kDa, após o processo de desacetilação, dá origem à quitosana com peso molecular que varia entre 1×10^5 e 5×10^5 kDa^{27,49}.

A quitosana normalmente é insolúvel em soluções aquosas, com pH superior a 7. Entretanto, em ácidos, os grupos amino livres são protonados e a molécula torna-se altamente solúvel em pH ácido³¹.

A solubilidade da quitosana estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}^{3+}$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a sua solvatação em água³⁹. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos $-\text{NH}_2$ é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações.

A dissolução da quitosana dá origem a géis, que podem ser utilizados diretamente ou transformados em outros materiais na tentativa de utilização como biomateriais. Fatores como pH do solvente utilizado, concentração e peso molecular da quitosana estão diretamente relacionados à viscosidade do gel obtido, bem como às propriedades do biomaterial final. Embora a literatura seja pobre ao fornecer dados sobre os diferentes resultados obtidos para diferentes solventes utilizados e valores dos parâmetros supracitados^{26,37,38}, essas informações são importantíssimas para a sua aplicabilidade.

Aplicabilidade da quitosana

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas três décadas, e vão desde o simples uso como excipientes para a indús-

tria farmacêutica, ou métodos de “*drug-delivery*”^{6,28-30}, até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas¹². No que se refere às aplicações biomédicas, a quitosana conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, com propriedades de adsorção, permitindo que seja utilizada até mesmo em terapias genéticas, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da adsorção de partículas de quitosana carreando fragmentos de genes através da parede intestinal, inativando alérgenos de origem alimentar²².

Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo material para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções^{6,32-36,40,41}.

Na área odontológica, este biomaterial foi apresentado primeiramente na forma de gel, obtido a partir de diferentes granulções e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e, portanto, não deve ter um alto grau de escoamento. Os autores também descrevem que a apresentação do gel pode variar de acordo com a relação entre o polímero e o solvente, obtendo-se assim as diferentes consistências desejadas, de acordo com as diferentes concentrações utilizadas, embora ensaios clínicos sobre os resultados dessas variações ainda não tenham sido publicados⁷.

Os “Sistemas de liberação de fármacos” (“*Drug-delivery systems*”) surgiram na década de oitenta e representam biomateriais utilizados pela indústria como agentes facilitadores na entrega de drogas sistêmicas ou locais, capazes de proporcionar taxas de liberação controladas e prolongadas dessas drogas, de maneira a se obter uma resposta ótima com o mínimo de efeitos colaterais. A quitosana, por ser um biomaterial seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação de medicamentos no meio gastrointestinal, na mucosa oral, canais radiculares, dentinas cariadas ou bolsas periodontais, e os estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram com o uso da quitosana nesta aplicação, visto que explicitam as qualidades dessa substância como agente de liberação de fármacos, principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada^{28-30,38,43}.

No que diz respeito à administração por via oral, a quitosana apresenta a vantagem de não ser absorvida pelo organismo. Por outro lado, apresenta propriedades muco adesivas, o que favorece sua utilização para promover o transporte de proteínas, fármacos e outras moléculas através da mucosa, tanto no estômago, como no intestino, ou mesmo por via nasal^{8,9,14}.

Recentemente, foi proposto utilizá-la como material para a entrega de antibióticos para redução bacteriana local em aplicações orais^{5,19}. A aplicação do gel de quitosana, por exemplo, pode prover uma permanência longa nos tecidos designados, penetração de drogas associadas, aliados à alta eficácia e aceitabilidade¹³.

Além disso, a quitosana por si só parece apresentar ação bacteriostática e vem sendo testada em odontologia no tratamento de infecções bacterianas^{2,17,36,44}. Na área médica, o crescimento de *Escherichia coli* foi inibido na presença de concentrações superiores a 0,025% de quitosana, que também inibiu o crescimento de *Fusarium*, *Alternaria* e *Helminthosporium*, provavelmente pela ação dos grupos amino catiônicos da quitosana sobre os grupos aniônicos da parede celular desses microorganismos, causando o resultado observado¹¹.

Biomateriais de quitosana também têm sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular 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 cicatrização⁴⁶.

Alguns autores citam que a quitosana fomenta o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente⁴⁷. 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.

Devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, este polímero pode atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea²³.

Os polímeros de quitosana vêm sendo testados com sucesso no tratamento de lesões ósseas periodontais e defeitos ósseos, sucesso esse representado pela neoformação óssea observada histologicamente ou ainda por parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem e sangramento à sondagem^{1,24,33}, e uma grande variedade de testes clínicos

realizados para promover os materiais à base de quitosana não reportaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão pelo corpo humano³.

Membranas feitas de quitosana, com potencial para utilização em técnicas de regeneração tecidual guiada, têm sido testadas. Dados iniciais sugerem um período de degradação dependente do grau de acetilação da quitosana utilizada, fator que também interfere na resistência mecânica do biomaterial avaliado, e a possibilidade de associação de outras substâncias à quitosana nas membranas⁵¹. Além disso, a resposta tecidual inflamatória ante a implantação dessas membranas em tecido subcutâneo de ratos foi moderada⁴⁵.

A própria estrutura química da quitosana, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas⁴⁶.

Ao associarmos as características que fazem da quitosana um potencial agente liberador de drogas e aquelas relacionadas às suas propriedades reparadoras teciduais, vislumbramos os biomateriais dela obtidos no campo da engenharia tecidual. Materiais capazes de carrear fatores de crescimento, e que sejam biocompatíveis e biodegradáveis como a quitosana, surgem como a vedete de pesquisas nessa área¹⁶.

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 morfogenéticas ósseas ou fatores de crescimento vascular em sua composição, e que podem ser utilizados como moldes para crescimento celular, para posterior implantação em defeitos extensos^{20,50}.

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 regeneração tecidual otimizada, quando comparada ao uso dessas proteínas isoladamente¹⁵.

Porém, o grande problema que existe quando se pretende aplicar a quitosana em regiões com comprometimento sistêmico, tais como defeitos ósseos críticos, é o fato de sua esterilização se tornar necessária. Métodos comuns para a esterilização de produtos médicos e farmacêuticos incluem a exposição ao calor seco, vapor pressurizado, óxido de etileno e radiação gama. Antes de qualquer um desses métodos ser considerado como o método de escolha para a esterilização dos biomateriais de quitosana, seus efeitos sobre as propriedades do polímero devem ser mais bem estudados¹⁸. Isso traz à tona alguns problemas deste

biomaterial, que, quando exposto a temperaturas maiores que 120 °C, sofre alterações em seu grau de solubilidade, aparência e estrutura física, e quando exposto à radiação gama, sofre fissuras e um decréscimo de viscosidade que é dose-dependente¹⁸, o que provavelmente irá alterar suas propriedades biológicas.

Considerações finais

Biomateriais à base de quitosana são uma realidade na área da saúde, e sua aplicação vem sendo estudada em vários campos, desde a indústria farmacêutica, até a engenharia tecidual.

Obtidos a partir de matéria-prima abundante e de baixo custo, no caso a quitina, estes biomateriais podem ser de grande valia no âmbito da saúde pública nos chamados países em desenvolvimento. Qualquer que seja o campo de aplicação, biomateriais obtidos da quitosana têm potencial para apresentar uma melhor relação custo/benefício do que seus similares atualmente no mercado, obtidos de outras fontes, e, na maioria das vezes, produzidos com tecnologia importada.

Aliado a essa vantagem, fatores como a facilidade de obtenção, possibilidade de manipulação em diferentes formas, desde as mais viscosas, como os géis, até elaborados suportes celulares e carreadores de fatores de crescimento, além da biocompatibilidade e da biodegradabilidade, fazem com que a quitosana se mantenha como foco de pesquisas, atual e relevante, dentro da odontologia e da medicina.

Como desvantagem, surge principalmente a ausência de um consenso científico sobre o correto método de esterilização que deva ser utilizado nos biomateriais de quitosana, fator esse essencial para que as diferentes formulações obtidas sejam aprovadas pelas agências e federações que regulamentam o comércio e a aplicação de novos biomateriais no Brasil e internacionalmente.

Estudos a respeito de fatores como a genotoxicidade dos biomateriais de quitosana também não foram encontrados durante a revisão, parâmetro esse essencial para que esses biomateriais possam ser utilizados em humanos, sem o risco de causar acidentes genéticos, induzindo à mutagenicidade ou atuando como fator teratogênico.

Mais estudos que discorram sobre os fatores supracitados e também sobre a aplicabilidade das diferentes formulações possíveis a partir da quitosana, explorando a variação de parâmetros como peso molecular, grau de acetilação, concentração e forma de apresentação, muitos deles já em fase de realização, serão fundamentais para que a quitosana possa cumprir na prática clínica cotidiana o papel que dela se espera como biomaterial de vanguarda.

Referências

1. Akncbay H, Senel S, Ay ZY. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80:290-6.
2. Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Investig*. 2006;10:102-7.
3. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261-8.
4. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs*. 2005;29:104-13.
5. Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontol Res*. 2005;40:373-7.
6. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998;24:979-93.
7. Gerentes P, Vachoud L, Doury J, Domard A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. *Biomaterials*. 2002;23:1295-302.
8. Guggi D, Bernkop-Schnurch A. In vitro evaluation of polymeric excipients protecting calcitonin against degradation by intestinal serine proteases. *Int J Pharm*. 2003;252:187-96.
9. Guggi D, Kast CE, Bernkop-Schnurch A. In vivo evaluation of an oral salmon calcitonin-delivery system based on a thiolated chitosan carrier matrix. *Pharm Res*. 2003;20:1989-94.
10. Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 1999;70:526-35.
11. Hirano S, Ohe Y, Ono H. Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydr Res*. 1976;47:315-20.
12. Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology*. 1995;13:565-76.
13. Ikin G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm*. 2002;235:121-7.
14. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*. 1998;15:1326-31.
15. Issa JP, do Nascimento C, Bentley MV, Del Bel EA, Iyomasa MM, Sebald W, et al. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. *Micron*. 2007.

16. Issa JP, Nascimento C, Barbosa RES, Melo ASS, Yomasa MM. Morphogenetic protein rhBMP-2 and new bone formation. *Int J Morphol*. 2006;24:323-30.
17. Je JY, Kim SK. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:104-9.
18. Lim LY, Khor E, Koo O. Gamma irradiation of chitosan. *J Biomed Mater Res*. 1998;43:282-90.
19. Liu DZ, Chen WP, Lee CP, Wu SL, Wang YC, Chung TW. Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. *J Microencapsul*. 2004;21:643-52.
20. Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999;20:1133-42.
21. Meyers SP. Preparation of chitin and chitosan. In: Muzzarelli RAA, Peter MG. *Chitin Handbook*. Grottammare: Atec; 1997. p. 475.
22. Moffatt MF, Cookson WOC. Gene therapy for peanut allergy *Nature Med*. 1999;5:380-1.
23. Muzzarelli C, Muzzarelli RA. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *J Inorg Biochem*. 2002;92:89-94.
24. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*. 1994;15:1075-81.
25. Muzzarelli RA, Rocchetti R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Anal Chim Acta*. 1973;64:371-9.
26. Muzzarelli RA, Tanfani F, Scarpini G, Laterza G. The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy. *J Biochem Biophys Methods*. 1980;2:299-306.
27. Muzzarelli RAA, Lough C, Emanuelli M. The molecular weight of chitosan studied by laser light scattering. *Carbohydr Res*. 1987;164:433.
28. Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1998;25:74-82.
29. Needleman IG, Smales FC. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Biomaterials*. 1995;16:617-24.
30. Needleman IG, Smales FC, Martin GP. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1997;24:394-400.
31. Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, Matsushashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci*. 1995;57:851-4.
32. Park IK, Park YH, Shin BA, Choi ES, Kim YR, Akaike T, et al. Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Release*. 2000;69:97-108.
33. Park JS, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 2003;30:443-53.
34. Park YJ, Lee YM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release*. 2000;67:385-94.
35. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*. 2000;21:153-9.
36. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*. 1997;34:21-8.
37. Rathke TD, Hudson SM. Determination of the degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. *Polym Sci, Polym Chem Ed*. 1993;31:749.
38. Ravi Kumar NMV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 2000;46:1-27.
39. Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Campana-Filho SP, Cavalheiro ETG. *Polímeros: Ciência e Tecnologia. Ciência e Tecnologia*. 2003;13 242.
40. Senel S, İkinci G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm*. 2000;193:197-203.
41. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:1467-80.
42. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53:1047-67.
43. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *J Control Release*. 2003;86:235-42.
44. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res*. 1997;76:665-72.
45. Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997;18:567-75.
46. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*. 2001;22:1667-73.
47. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 1999;20:1407-14.

48. Williams KR, Blayney AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials*. 1987;8:254-8.
49. Wu ACM. Determination of molecular weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*. 1988;161:447.
50. Zhang Y, Cheng X, Wang J, Wang Y, Shi B, Huang C, et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344:362-9.
51. Zhang YF, Cheng XR, Chen Y, Shi B, Chen XH, Xu DX, et al. Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. *J Biomater Appl*. 2007;21:333-49.

Recebido: 01/10/2007

Aceito: 08/04/2008

