

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXACTAS  
ESCOLA DE ENGENHARIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**

Sandra Daniela Motta Rodríguez

**COMPÓSITOS DE GELATINA-HIDROXIAPATITA CONTENDO DOXICICLINA  
OBTIDOS POR ABORDAGEM BIOMIMÉTICA, COM POTENCIAL OSTEOGÊNICO E  
PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

Belo Horizonte  
2022

Sandra Daniela Motta Rodríguez

**Compósitos de Gelatina-Hidroxiapatita contendo Doxiciclina obtidos por Abordagem Biomimética, com potencial osteogênico e prospecção tecnológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Esperanza Cortés

Belo Horizonte  
2022

Ficha Catalográfica

M921c Motta Rodríguez, Sandra Daniela.  
2022 Compósitos de gelatina-hidroxiapatita contendo doxiciclina obtidos por abordagem biomimética, com potencial osteogênico e prospecção tecnológica [manuscrito] /  
D Sandra Daniela Motta Rodríguez. 2022.

1 recurso online (139 f. : il., gráfs., tabs., color.) : pdf.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química (Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica).

Inclui bibliografia.


1. Inovações tecnológicas – Teses. 2. Biofarmacêutica – Teses. 3. Biotecnologia – Teses. 4. Engenharia de tecidos – Teses. 5. Compósitos poliméricos – Teses. 6. Ossos – Regeneração – Teses. 7. Sistemas deliberados de drogas poliméricas – Teses. I. Cortés Segura, Maria Esperanza, Orientadora. II. Título.

CDU 043


**“COMPÓSITOS DE GELATINA-HIDROXIAPATITA CONTENDO DOXICICLINA  
OBTIDOS POR ABORDAGEM BIOMIMÉTICA, COM POTENCIAL OSTEOGÊNICO  
E PROSPEÇÃO TECNOLÓGICA”.**

**SANDRA DANIELA MOTTA RODRÍGUEZ, Nº DE REGISTRO 2020740847.**

Dissertação **Aprovada** pela Banca Examinadora constituída pelos Professores  
Doutores:

Documento assinado digitalmente  
 MARIA ESPERANZA CORTES SEGURA  
Data: 22/11/2022 09:24:23-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professora Doutora Maria Esperanza Cortés Segura (Orientadora)  
(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Documento assinado digitalmente  
 NELCY DELLA SANTINA MOHALLEM  
Data: 24/02/2023 15:42:21-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professora Doutora Nelcy Della Santina Mohallem  
(Departamento de Química - UFMG)

MARCELO GOMES  
SPEZIALI:0466348363  
1


Assinado de forma digital por MARCELO GOMES  
SPEZIALI:0466348363  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=(EM BRANCO),  
ou=16636540000104, ou=AC PRODEMGE RFB,  
ou=Presencial, ou=RFB e-CPF A3, ou=Secretaria da Receita  
Federal do Brasil - RFB, cn=MARCELO GOMES  
SPEZIALI:0466348363  
Dados: 2022.11.23 14:47:40 -03'00'

Professor Doutor Marcelo Gomes Speziali  
(Universidade Federal de Ouro Preto)

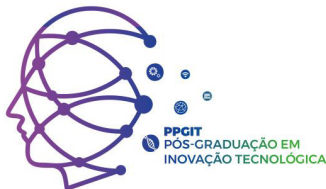
Belo Horizonte, 21 de novembro de 2022.

**ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 7ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, DA DISCENTE SANDRA DANIELA MOTTA RODRÍGUEZ, Nº DE REGISTRO 2020740847.**

Aos 21 (vinte e um) dias do mês de novembro de 2022, às 14 horas, na Sala 3403 da Faculdade de Odontologia da UFMG, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores: Maria Esperanza Cortés Segura do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica da UFMG (Orientadora), Nelcy Della Santina Mohallem do Departamento de Química da UFMG e Marcelo Gomes Speziali da Universidade Federal de Ouro Preto, para julgamento da Dissertação do Mestrado em Inovação Tecnológica - Área de Concentração: Inovação Tecnológica, Biofarmacêutica e Biotecnológica da discente Sandra Daniela Motta Rodríguez, Dissertação intitulada: **“COMPÓSITOS DE GELATINA-HIDROXIAPATITA CONTENDO DOXICICLINA OBTIDOS POR ABORDAGEM BIOMIMÉTICA, COM POTENCIAL OSTEOGÊNICO E PROSPEÇÃO TECNOLÓGICA”**. A Presidente da Banca abriu a sessão e apresentou a Comissão Examinadora, bem como esclareceu sobre os procedimentos que regem da defesa pública de dissertação. Após a exposição oral do trabalho pela discente, seguiu-se com arguição pelos membros da Banca Examinadora, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da discente e do público, tendo deliberado unanimemente pela sua **APROVAÇÃO**. Nada mais havendo para constar, lavrou-se e fez a leitura pública da presente Ata que segue assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora e pelo coordenador do PPGIT. Belo Horizonte, 21 de novembro de 2022.

Documento assinado digitalmente  
 MARIA ESPERANZA CORTES SEGURA  
Data: 22/11/2022 09:22:15-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professora Doutora Maria Esperanza Cortés Segura (Orientadora)  
(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)



Documento assinado digitalmente



NELCY DELLA SANTINA MOHALLEM

Data: 24/02/2023 15:42:21-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professora Doutora Nelcy Della Santina Mohallem  
(Departamento de Química - UFMG)


MARCELO GOMES

SPEZIALI:046634836

31

Professor Doutor Marcelo Gomes Speziali  
(Universidade Federal de Ouro Preto)

Assinado de forma digital por MARCELO GOMES  
SPEZIALI:04663483631  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=(EM BRANCO),  
ou=16636540000104, ou=AC PRODEMGE RFB,  
ou=Presencial, ou=RFB e-CPF A3, ou=Secretaria da  
Receita Federal do Brasil - RFB, cn=MARCELO GOMES  
SPEZIALI:04663483631  
Dados: 2022.11.23 14:46:01 -03'00'



Professor Doutor Ado Jório de Vasconcelos  
Coordenador do PPG em Inovação Tecnológica da UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

*Esta é uma oportunidade de parar por um segundo e olhar para o meu passado, cada uma das decisões que tomei foram as certas para alcançar cada uma das conquistas da minha vida e, mais importante, aprender e seguir em frente.*

*Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à vida por cada uma das pessoas que tive o prazer de conhecer neste lindo processo, pessoas que fizeram a diferença e continuarão fazendo ao longo do tempo.*

*Aos meus pais, meu avô, meus irmãos e minha sobrinha, pelo apoio incondicional, companhia e palavras de força quando precisei.*

*À minha cachorrinha Nistha, porque mesmo tão longe, a ilusão de estarmos juntas novamente me levanta todos os dias e me motiva a continuar.*

*Aos meus primos, tios e demais familiares que de uma ou outra forma sempre tentaram estar presentes apoiando-me ainda na distância.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Esperanza Cortés, pela orientação desse trabalho, sua sabedoria, seus ânimos de fazer sempre as coisas melhor, pelo aprendizado da pesquisa e da vida, a dedicação, a paciência, amizade e confiança.*

*Ao Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra, pelo ensino, apoio e amizade.*

*Aos meus amigos da graduação que estiveram presentes durante todo o meu processo de formação.*

*A meus amigos queridos que se converteram na minha família, Lida Arias, Luis M. Chávez, Nicolás Orjuela, Pedro Passos, Bruna Vidal, Daniel Grajales, Manuel Ramírez, Manuela Puerta, Alfonso Martínez, Alix Bastidas, Mayra Téllez, Lisandra e Omar, obrigada de mais.*

*A minha professora de graduação, Tebbie que me acompanhou durante a minha formatura como Engenheira e esteve atenta ao meu processo de mestrado.*

*Aos meus colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais – LEMB, e do Laboratório de Biomateriais e Microbiologia – LMB pelo aprendizado e bons*

*momentos, e demais colegas do departamento de química e odontologia, pelo apoio recebido.*

*Ao Centro de Microscopia da UFMG, ao Laboratório de Difração de Raios X do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDNT) pelas análises realizadas.*

*Aos técnicos dos Laboratórios do Departamento de Química pela sua ajuda e atendimento gentil, inclusive durante o período da pandemia.*

*As secretarias da Pós-Graduação em Inovação Êni Rocha e Leticia Peres Morato Goncalves pela gestão e apoio.*

*Aos colegas e funcionários dos Departamentos de Química e Odontologia, por esses anos de convívio, pelos cafés, pela ajuda e pelas boas conversas.*

*Ao Departamento de Química e o Departamento de Odontologia Restauradora, pela infraestrutura e suporte.*

*As agências de financiamento as pesquisas CNPq, CAPES e Fapemig pelo apoio financeiro.*

*Enfim a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa história. Meu carinho e muito obrigada.*



***“Comece a fazer o que você quer agora. Nós não estamos vivendo na eternidade. Nós temos apenas esse momento, brilhando como uma estrela em nossas mãos – e derretendo como um floco de neve.”***

***Francis Bacon***

## RESUMO

No mundo, a prevalência de doenças e distúrbios ósseos tem apresentado tendência crescente, intensificando-se cada vez mais, com aproximadamente 2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo realizados por ano. O tecido ósseo desenvolvido artificialmente tem sido visto como um potencial alternativo ao uso convencional de enxertos ósseos. Devido à sua oferta ilimitada e à não transmissão de doenças, os biopolímeros, estão se tornando cada vez mais populares para várias aplicações biomédicas devido às suas muitas vantagens, incluindo citocompatibilidade e degradação não tóxica. A maioria dos materiais poliméricos que contribuem para o desenvolvimento de andaimes geralmente não fornecem as propriedades mecânicas e de degradação desejadas para a matriz porque tem poucas ligações entre as cadeias poliméricas, pelo qual a reticulação é um método simples no qual ligações químicas ou físicas são estabelecidas entre cadeias poliméricas para modificar as propriedades mecânicas, biológicas e de degradação dos materiais poliméricos. Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo no Capítulo 1 analisar o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos utilizados na substituição de tecidos biológicos nas fronteiras tecnológicas com base numa análise bibliométrica a partir do estado da arte com as bases de dados *Scopus* e *Web of Science*, iniciando com uma categorização anual dos artigos obtidos em cada base, seguida de uma análise dos países/regiões mais produtivos com suas citações, continuando com uma distribuição dos jornais e artigos mais citados e finalizando com um mapeamento e análise da coocorrência das principais palavras-chave obtidas em cada artigo, e uma patentometria a partir do estado da técnica com as bases de dados *Lens.org* e *Orbit Intelligende da Questel* e o código IPC A61K9/00. Foram obtidos dados para analisar o panorama dos países/regiões e instituições mais produtivas, análise categórica, legalidade, os países que protegem tecnologias no Brasil, e uma análise focada na evolução da inovação no Brasil nos últimos anos. No Capítulo 2, foram desenvolvidos dois andaimes poliméricos híbridos de gelatina – hidroxiapatita (HA) com 1 e 5% *p/v*, reticuladas com 0.7% *p/v* de EDC e concentrações de doxiciclina 0.3, 0.7 e 1.2% *p/v*. Foram caracterizados por porosidade, espectroscopia de absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), difração de raios X (DRX), termogravimetria (TG/DTG) e microscopia eletrônica de varredura MEV. Foram avaliados os comportamentos do pH, capacidade de swelling, degradação e biodegradação enzimática, o perfil de liberação de doxiciclina, o efeito do reticulante nos andaimes, e a concentração mínima inibitória (CMI) da doxiciclina com *S. Aureus*. Ao final, foram realizados testes de viabilidade indiretos em fibroblastos (L919) e pré-osteoblastos (MC3T3) e teste de adesão e proliferação de pré-osteoblastos (MC3T3) sobre os andaimes. Os resultados concluíram que o andaime desenhado de 1% *p/v* de hidrogel liofilizado, 0.7% *p/v* do reticulante EDC e 0.3% *p/v* de doxiciclina mostrou uma maior proliferação em células pré-osteoblásticas, com perfis de liberação do fármaco e biodegradação enzimática estável e compatível com o tempo de regeneração óssea.

**Palavras – chave:** *Andaime. Doxiciclina. Osteogênese. Biomaterial.*

## ABSTRACT

Worldwide, the prevalence of disorders and bone diseases has shown an increased and intensified trend, with approximately 2 million bone graft procedures performed per year. Artificially developed bone tissue has been seen as a potential alternative to the conventional use of bone grafts. Due to their unlimited supply and non-transmission of diseases, biopolymers are becoming increasingly popular for various biomedical applications due to their many advantages, including cytocompatibility and non-toxic degradation. Most polymeric materials that contribute to the development of scaffolds generally do not provide the desired mechanical and degradation properties for the matrix because they have few bonds between the polymer chains, whereby crosslinking is a simple method in which chemical or physical bonds are established between polymeric chains to modify the mechanical, biological and degradation properties of polymeric materials. In this scenario, the purpose of Chapter 1 is to analyze the use of scaffolds or biomedical composites from hydrogels to release drugs used in the replacement of biological tissues at the technological frontiers based on a bibliometric analysis from the state of the art with Scopus and Web of Science databases, starting with an annual categorization of the articles obtained in each database, followed by an analysis of the most productive countries/regions with their citations, continuing with a distribution of the most cited journals and articles and ending with a mapping and analysis of the co-occurrence of the main keywords obtained in each article, and a patentometry based on the state of the art with the Lens.org and Orbit Intelligende da Questel databases and the IPC code A61K9/00. Data were obtained to analyze the panorama of the most productive countries/regions and institutions, categorical analysis, legality, the countries that protect technologies in Brazil, and an analysis focused on the evolution of innovation in Brazil in recent years. In Chapter 2, two hybrid polymeric scaffolds of gelatin – hydroxyapatite (HA) with 1 and 5% *w/v* were created, crosslinked with 0.7% *w/v* of EDC and doxycycline concentrations of 0.3, 0.7, and 1.2% *w/v* were developed. Porosity, Fourier transform infrared absorption spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), thermogravimetry (TG/DTG), and scanning electron microscopy (SEM) were used to analyze them. The behavior of pH, swelling capacity, degradation, and enzymatic degradation, the doxycycline release profile, the influence of crosslinker on scaffolding, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of doxycycline against *S. aureus* were assessed. At the end on the scaffolds, indirect viability tests were performed on fibroblasts (L919), and pre-osteoblasts (MC3T3). And an adhesion and proliferation test were made on pre-osteoblasts (MC3T3) cells. The results indicated that the scaffold composed of 1% *w/v* lyophilized hydrogel, 0.7% *w/v* EDC crosslinker, and 0.3% *w/v* doxycycline improved pre-osteoblastic cell proliferation, with drug release profiles and steady enzymatic biodegradation consistent with bone regeneration time.

**Key – words:** Scaffold. Doxycycline. Osteogenesis. Biomaterial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de coleta e extração de dados.....	27
Figura 2. Distribuição do número de artigos sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos publicados por ano de 2007 a 2022 nas bases <i>Scopus</i> e <i>Web of Science</i> .....	28
Figura 3. Distribuição dos 10 principais países/regiões produtivos no <i>Scopus</i> (A) e <i>Web of Science</i> (B) com o número de citações .....	29
Figura 4. Mapeamento das palavras-chaves encontradas na base de dados <i>Scopus</i> . Visualização e exploração do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos .....	33
Figura 5. Mapeamento das palavras-chaves encontradas na base de dados <i>Scopus</i> , sendo apresentado A. Grupo 1 (vermelho), B. Grupo 2 (verde), C. Grupo 3 (azul), e D. Grupo 4 (amarelo).....	34
Figura 6. Mapeamento das palavras-chaves encontradas na base de dados <i>Web of Science</i> . Visualização e exploração do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos .....	39
Figura 7. Mapeamento das palavras-chaves encontradas na base de dados <i>Scopus</i> , sendo apresentado A. Grupo 1 (vermelho), B. Grupo 2 (verde), C. Grupo 3 (azul), e D. Grupo 4 (amarelo).....	40
Figura 8. Visualização em rede da engenharia de tecido ósseo na regeneração óssea como cluster principal das palavras-chave frequentemente relacionadas no estudo comparando os dados obtidos nas bases de dados A. <i>Scopus</i> e B. <i>Web of Science</i> .....	42
Figura 9. Distribuição da quantidade de pedidos de patentes sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos por ano de 2007 a 2022 .....	47
Figura 10. Análise categórica das áreas tecnológicas de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis na liberação de fármacos no <i>Orbit Intelligence</i> .....	48
Figura 11. Número de patentes registradas pelos 10 principais requerentes na área do o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no <i>Orbit</i> ..	49
Figura 12. Status legal das patentes sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no <i>Orbit</i> .....	50

Figura 13. Distribuição da quantidade de patentes protegidas pelos 10 principais escritórios produtivos na área do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no Orbit.....	51
Figura 14. Imagens dos andaimes de gelatina – HA húmida (A) e seca (B).....	68
Figura 15. Imagens dos andaimes de gelatina – HA com Doxiciclina húmida (A) e seca (B).....	69
Figura 16. Micrografias MEV sendo apresentado Hidrogel de gelatina – HA sem reticular na magnitude de 150X (A.1) e 5000X (A.2) Andaime 1. reticulado na magnitude de 150X (B.1) e 5000X (B.2) e Andaime 2. reticulado a 400 $\mu$ m (C.1) e 10 $\mu$ m (C.2).....	80
Figura 17. Caracterização por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) sendo apresentado Hidrogel de gelatina – HA sem reticular (A) Andaime 1. reticulado (B) e Andaime 2. reticulado (C) .....	82
Figura 18. Difractogramas de raios-X do hidrogel e os andaimes reticulado.....	83
Figura 19. Espectros de absorção na região de infravermelho da gelatina e seus compósitos com HA. ..	84
Figura 20. Curvas TG: análise da estabilidade térmica (Preto) e DTG: derivada da massa com respeito ao tempo (Vermelho) do hidrogel e dos andaimes submetidos a temperaturas entre 20 e 600 $^{\circ}$ C sendo A. Hidrogel de gelatina – HA, B. Andaime 1, e C. Andaime 2. ....	85
Figura 21. Variação do pH dos andaimes reticulados contendo HA e gelatina, após 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.....	88
Figura 22. Variação do pH dos andaimes reticulados contendo HA e gelatina, após 24, 48, 72, 96 e 120 horas .....	89
Figura 23. Porcentagem de <i>swelling</i> dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados.....	90
Figura 24. Perfil de degradação dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados., em solução fisiológica (PBS, pH 7,4) .....	91
Figura 25. Perfil de degradação dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados, em solução enzimática com colagenase tipo I (PBS, pH 7,4) .....	92
Figura 26. Perfil de carregamento e liberação de fármaco usando diferentes adições de EDC, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4) .....	94
Figura 27. Perfil de liberação de fármaco dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4). ....	95
Figura 28. Imagens dos andaimes no teste de biodegradação in vivo com Colagenase, sendo o andaime sem fármaco (A) e com fármaco (B).....	96
Figura 29. Inibição do <i>S Aureus</i> com as diferentes diluições de doxiciclina .....	97

Figura 30. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos L929 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas. ....	99
Figura 31. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos L929 tratados com eluatos de 5 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas .....	100
Figura 32. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas.....	100
Figura 33. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 5 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas.....	101
Figura 34. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 4 dias.....	102
Figura 35. Adesão in vitro de células pré-osteoblásticas MC3T3 aos andaimes .....	103
Figura 36. Adesão das células MC3T3 sobre os andaimes 1.0 (A), 1.1 (B), 1.2 (C) e 1.3 (D). Escala 20 $\mu$ m (_1) e 10 $\mu$ m (_2) respectivamente .....	104
Figura 37. Adesão das células MC3T3 sobre os andaimes 2.0 (A), 2.1 (B), 2.2 (C) e 2.3 (D). Escala 20 $\mu$ m (_1) e 10 $\mu$ m (_2) respectivamente .....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os 5 principais periódicos para publicações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos no <i>Scopus</i> . .....	30
Tabela 2. Os 5 principais periódicos para publicações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos na <i>Web of Science</i> .....	31
Tabela 3. Top 5 Palavras-chave na base de dados de <i>Scopus</i> .....	32
Tabela 4. Top 5 Palavras-chave na base de dados de <i>Web of Science</i> .....	38
Tabela 5. Parâmetros de busca no estado da técnica dos materiais biomédicos de liberação de fármacos utilizados para substituição de tecidos biológicos .....	45
Tabela 6. Top 5 países/regiões com proteções de patentes no Brasil .....	52
Tabela 7. Principais características dos hidrogéis.....	59
Tabela 8. Composição dos compósitos preparados .....	70
Tabela 9. Graus de citotoxicidade .....	78
Tabela 10. Perda de massa dos compósitos observadas nas curvas TG .....	86
Tabela 11. Densidades e porosidades dos andaimes .....	87
Tabela 12. Degradação dos andaimes depois de 7 dias .....	93
Tabela 13. Concentração de doxiciclina liberada a partir de cada andaime .....	95
Tabela 14. Concentração de doxiciclina liberada a partir de cada andaime .....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI – Caldo de infusão de cérebro e coração

CCD – N,N-diciclohexilcarbodiimida

CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

DMEM – Meio de cultura Dulbecco's Modificado Eagle Medium

DRX – Difração de Raios X

DTA – Análise térmica diferencial

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

ET – Engenharia de Tecidos

EUA – Estados Unidos da América

FT – IR – Espectroscopia de absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier

GA – Glutaraldeído

GP – Genipina

HA – Hidroxiapatita

IPC – Classificação Internacional de Patentes

MCTI – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

MEC – Matriz extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de varredura

MIT – Massachusetts Institute of Technology

MMP – Metaloproteinases de matriz



MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NPs – Nanopartículas

OCDE – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMPI – Organização Mundial da Propriedade Intelectual

PBS – Solução Tampão de Fosfato

PCT – Tratado de Cooperação de Patentes

PNI – Política Nacional de Inovação

P&D – pesquisa e desenvolvimento

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SBF – Soro Fetal Bovino

SDS – dodecilsulfato de sódio

TG – Análises termogravimetria

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1. CAPÍTULO 1 – Andaimos biomédicos: Prospecção tecnológica</b> .....	24
<b>1.1. Introdução</b> .....	24
<b>1.2. Análise Bibliométrico</b> .....	26
1.2.1 Metodologia.....	26
1.2.2 Desenvolvimento anual e distribuição de países dos artigos referentes aos andaimos ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos .....	27
1.2.3 Distribuição de periódicos e artigos mais citados em cada base de dados .....	30
1.2.4 Mapeamento e análise de coocorrência das principais palavras-chave .....	32
<b>1.3. Patentometria simplificada</b> .....	44
<b>2. CAPÍTULO 2 – Síntese e caracterização de andaimos de gelatina – HA contendo doxiciclina com potencial osteogênico</b> .....	56
<b>2.1. Introdução</b> .....	56
<b>2.2. Revisão da Literatura</b> .....	58
2.2.1. Engenharia de tecidos (ET) e matriz extracelular (MEC).....	58
2.2.2. Hidrogel .....	59
2.2.3. Gelatina .....	60
2.2.4. Agente de reticulação Carbodiimida .....	61
2.2.5. Hidroxiapatita.....	62
2.2.6. Doxiciclina .....	64
<b>2.3. Objetivo Geral</b> .....	65
<b>2.4. Objetivos Específicos</b> .....	65
<b>2.5 Materiais e métodos</b> .....	66
2.5.1. Reagentes utilizados .....	66

2.5.3. Métodos.....	67
2.5.3.1. Síntese do compósito de hidroxiapatita – gelatina.....	67
3.5.3.2. Preparação dos andaimes porosos para o estudo de quantidade ótima de reticulante	68
2.5.3.3. Preparação dos andaimes porosos de nanocompósitos e carregamento de fármacos	69
2.5.3.4. Caracterização físico-química dos andaimes .....	70
2.5.3.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
2.5.3.4.2. Difração de raios-X (DRX) .....	71
2.5.3.4.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) .....	71
2.5.3.4.4. Análise Térmica (TG).....	71
2.5.3.4.5. Porosidade Total .....	72
2.5.3.4.6. Variação de pH .....	73
2.5.3.4.7. Teste de Swelling .....	73
3.5.3.4.8. Degradação dos andaimes.....	74
2.5.3.4.9. Biodegradação <i>in-vitro</i> dos andaimes.....	74
2.5.3.4.10. Estudo de reticulante .....	75
2.5.3.4.11. Estudo de liberação de doxiciclina .....	75
2.5.3.5. Estudos in vitro.....	76
2.5.3.5.1. Análise antimicrobiana .....	76
2.5.3.5.2. Cultivo de células .....	77
2.5.3.5.3. Ensaio de Citotoxicidade.....	77
2.5.3.6. Análises estatísticas.....	79
<b>2.6. Resultados</b> .....	<b>80</b>
2.6.1. Caracterização físico-química dos andaimes.....	80
2.6.1.1. Morfologia dos Andaimes .....	80
2.6.1.2. Difração de raios-X.....	83

2.6.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT – IR).....	84
2.6.1.4. Análise térmica.....	85
2.6.1.5. Porosidade total .....	87
2.6.1.6. Teste de variação de pH .....	88
2.6.1.7. Swelling Test.....	90
2.6.1.8. Degradação dos andaimes .....	91
2.6.1.9. Biodegradação <i>in-vitro</i> .....	92
2.6.1.10. Estudo reticulante.....	94
2.6.1.11. Estudo liberação doxíclicina na longitude de onda de 290 nm .....	95
2.6.2. Testes Biológicos in vitro dos andaimes .....	97
2.6.2.1. Análise antimicrobiana.....	97
2.6.2.2. Citotoxicidade dos andaimes.....	99
2.6.2.3. Adesão e morfologia celular .....	103
<b>2.7 Discussão.....</b>	<b>108</b>
<b>2.8. Conclusões.....</b>	<b>121</b>
<b>Referências.....</b>	<b>123</b>

## INTRODUÇÃO

A incidência mundial de doenças e desordens ósseas tem apresentado uma tendência ascendente acentuada, especialmente em populações onde o envelhecimento é acompanhado por um aumento da obesidade e da pouca atividade física (AMINI *et al.*, 2012). Com um total estimado de 2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo realizados a cada ano, as estruturas de reparo ósseo continuam sendo uma linha de pesquisa promissora devido à crescente demanda e ao baixo estoque de substitutos ósseos (CODREA *et al.*, 2021).

O osso tem uma capacidade de reparo intrínseco quando os defeitos traumáticos, patológicos e cirúrgicos são menores do que o que foi definido como defeitos de tamanho crítico (<5 cm). Falhas maiores ainda podem ser cicatrizadas com o apoio de biomateriais biodegradáveis com propriedades osteocondutoras ou osteogênicas (AWAD *et al.*, 2020). O tecido ósseo desenvolvido artificialmente tem sido visto como um potencial alternativo ao uso convencional de enxertos ósseos, devido à sua oferta ilimitada e à não transmissão de doenças (AMINI *et al.*, 2012).

Recentemente, o campo da engenharia de tecidos (ET) aumentou exponencialmente devido à crescente demanda por tecidos artificiais (ANN L COKER; NALAWANSHA, DHANUSHA A. PFLUM, 2017; IKADA, 2006). Os biopolímeros, entendendo-se como os polímeros feitos a partir de recursos naturais, estão se tornando cada vez mais populares para várias aplicações biomédicas devido às suas muitas vantagens, incluindo citocompatibilidade e degradação não tóxica (REDDY *et al.*, 2015).

Os Scaffolds ou andaimes biopoliméricos são estruturas artificiais, com características físico-químicas e porosidade pré-determinadas. A maioria dos materiais poliméricos que contribuem para o desenvolvimento de andaimes geralmente não fornecem as propriedades mecânicas e de degradação desejadas para a matriz porque tem poucas ligações entre as cadeias poliméricas. Portanto, a reticulação é necessária para criar ligações covalentes entre as cadeias poliméricas criando polímeros tridimensionais com alta massa molecular. A reticulação é um método simples no qual ligações químicas ou físicas são estabelecidas entre cadeias poliméricas para modificar

as propriedades mecânicas, biológicas e de degradação dos materiais poliméricos. (REDDY *et al.*, 2015). Entre todos os métodos de reticulação, a reticulação química parece ser o mais comum e eficaz.

Andaimes também podem ser preparados com base em gelatina que é um produto da hidrólise parcial do colágeno nativo e se caracteriza por sua não toxicidade, não carcinogenicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esse é amplamente utilizado em campos farmacêuticos e médicos, como materiais para curativos, andaimes de engenharia de tecidos e veículos de entrega de medicamentos (YANG *et al.*, 2018). Contudo, os andaimes preparados a partir da gelatina apresentam fraca resistência mecânica e de hidrólise, junto com uma liberação imediata de fármacos associados a eles. Uma das formas encontradas para melhorar essas características é a síntese de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA), na matriz de gelatina o que melhora as propriedades físico-químicas da rede polimérica (DRESSLER *et al.*, 2011). Além disso, a administração local de fármacos antimicrobianos melhora significativamente a cicatrização e regeneração de novos tecidos (Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: Characterization and antibiotic drug release KIM, H. W. *et al.*, 2005).

Assim essa pesquisa visa o desenvolvimento de andaimes de compósitos de Gelatina-Hidroxiapatita contendo Doxiciclina obtidos por abordagem Biomimética, com potencial osteogênico, desenvolvimento, e prospecção tecnológica. Os hidrogéis mimetizam a matriz extracelular e favorecem o crescimento tecidual (HOCH *et al.*, 2016) de forma mais favorável do que os polímeros de origem sintética. (KLEIN *et al.*, 2010; MALAFAYA *et al.*, 2007)

Dessa maneira para a realização do presente projeto é importante compreender como está acontecendo o desenvolvimento das tecnologias associadas para se obter um produto tecnológico inovador com base nas informações já existentes e suas limitações. Tendo em consideração que, a inovação começa com o uso da criatividade na pesquisa e assim, conseguir desenvolver um produto que possa ser comercializado no futuro, implementando novas alternativas de produtos e processos a partir de estudos existentes. Nesse caso, o mais importante para essa pesquisa é a geração de produtos

seguros e eficazes para o paciente. Dada esta ampla visão de inovação, desde a análise de artigos e patentes, até o desenho de andaimes biomédicos utilizados na regeneração óssea, esta dissertação é apresentada em dois capítulos.

No Capítulo 1, é relatada uma bibliometria e uma prospecção tecnológica simplificada analisando as patentes dos andaimes feitos a partir de hidrogéis. Para isso foi realizada uma análise de artigos e patentes com base em uma equação de busca projetada, onde são abordadas as discussões sobre os principais países/regiões, instituições, citações e legalidade global, para conhecer o atual ambiente tecnológico em que se deseja trabalhar, finalizando com uma análise crítica da evolução da inovação no Brasil. E no Capítulo 2, este trabalho propõe o desenvolvimento de matrizes poliméricas híbridas reticuladas compatíveis com o corpo humano, que sejam sinergicamente associadas a biocerâmicas de hidroxiapatita sintetizadas, juntamente com a doxiciclina, resultando em andaimes bioativos com melhores propriedades físico-químicas e biológicas que podem estimular a proliferação celular de MC3T3 pré-osteoblastos, demonstrando uma osteogênese *in-vitro*.

## 1. CAPÍTULO 1 – Andaimos biomédicos: Prospecção tecnológica

### 1.1. Introdução

Os sistemas de liberação de fármacos podem ser usados para superar as barreiras anatômicas, fisiológicas e físico-químicas melhorando a biodisponibilidade do fármaco e a eficácia terapêutica (LAFFLEUR & KECKEIS, 2020; WEN; JUNG; LI, 2015). Nos últimos 15 anos, a literatura descreveu várias estratégias para fornecer liberação prolongada de fármacos. As abordagens atualmente propostas para o uso de andaimos ou compósitos biomédicos como sistemas de liberação de fármacos usados para substituição de tecidos biológicos demonstram o estado atual de inovação do estudo da tecnologia.

Nesta seção da dissertação será apresentado uma prospecção tecnológica simplificada a partir de uma análise bibliométrica a partir do estado da arte (artigos científicos) e uma aproximação da uma patentometria a partir do estado da técnica (patentes) do uso de andaimos ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos utilizados para substituição de tecidos biológicos, visando encontrar as oportunidades para o desenvolvimento de novas tecnologias a partir da inovação dos países.

Na vista de compreender a análise realizada, além de conhecer o ponto desde o qual o mundo científico tem se focado pesquisando nos biomateriais para liberação de fármacos é preciso entender os tipos de pesquisas que existem, como é o desenvolvimento de novos produtos, e qual a diferença entre invenção e inovação.

O manual Frascati da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2018) divide a pesquisa e desenvolvimento (P&D) em três atividades: pesquisa básica, pesquisa aplicada e desenvolvimento experimental. A pesquisa básica é o trabalho experimental ou teórico realizado para adquirir novos conhecimentos sobre os fundamentos subjacentes dos fenômenos e fatos observáveis, sem qualquer aplicação ou uso imediato em vista; pesquisa aplicada é quase o mesmo



que pesquisa básica, exceto que é direcionada a um objetivo prático específico; o desenvolvimento experimental é um processo sistemático baseado no conhecimento existente adquirido em pesquisa e/ou experiência prática, direcionado à produção de novos materiais, produtos, processos, sistemas e serviços; ou melhorar substancialmente os produtos, processos o serviços já produzidos ou instalados (OECD, 2018)

A inovação é definida como a combinação de pesquisa, desenvolvimento e sua interação com as condições econômicas e sociais presentes em cada país ou região, por meio da interação dos agentes de inovação e do ambiente em que desejam implementar, enquanto a invenção refere-se a uma parte integrante da inovação (OECD/EUROSTAT, 2018)

É necessário realizar uma prospecção tecnológica, para saber qual é o nível de inovação em um determinado tema global, bem como saber se o tema de interesse é relevante para a sociedade. Este capítulo foi dividido em duas seções; começou com uma análise bibliométrica, com base em uma equação de busca com relação ao uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos utilizados na substituição de tecidos biológicos. Os artigos de pesquisa obtidos a partir de duas bases de dados (*Scopus* e *Web of Science*) foram analisados, iniciando com uma categorização anual dos artigos obtidos em cada base, seguida de uma análise dos países/regiões mais produtivos com suas citações, continuando com uma distribuição de os jornais e artigos mais citados e finalizando com um mapeamento e análise da coocorrência das principais palavras-chave obtidas em cada artigo.

Na segunda seção foi realizada uma patentometria inicial, onde, com base na mesma equação de busca utilizada na bibliometria, foram analisadas as patentes disponibilizadas em duas bases de dados (*Lens.org* e *Orbit Intelligence da Questel*) dos países/regiões e instituições mais produtivas, análise categórica, legalidade, e os países que protegem tecnologias no Brasil, finalizando com uma análise focada na evolução da inovação no Brasil nos últimos anos.

## 1.2. Análise Bibliométrico

A análise bibliométrica, que inclui análise de palavras comuns, análise de rede social e análise de cluster, é uma técnica de pesquisa científica e quantitativa que examina publicações. Usa estatísticas quantitativas para identificar *hotspots* ou tendências emergentes, bem como as contribuições de autores, revistas, institutos ou nações (AGARWAL *et al.*, 2016)

O software conhecido como VOSviewer (<http://www.vosviewer.com>) gera um mapa de palavras-chave e simultaneidade de buscador de bancos de dados (VAN ECK; WALTMAN, 2010). Esse foi o software selecionado para a realização dos mapeamentos tecnológicos devido às opções que oferece para trabalhar a partir de diferentes bases de dados, além da sua facilidade de utilização.

Recentemente, diversos estudos bibliométricos têm investigado a literatura na área de clínica médica e biomedicina (PANAGOPOULOS *et al.*, 2020; PERAZZO *et al.*, 2019; WANG; MANIRUZZAMAN, 2022; ZHU *et al.*, 2022; ZOU *et al.*, 2019), manter a pesquisa atual em mente é importante, porque as revisões de literatura são uma ferramenta básica para construir novas ideias e avançar novas pesquisas, destacando inconsistências no conhecimento atual. No entanto, ainda falta uma análise completa e gráfica da evolução e tendências no uso de andaimes ou compósitos biomédicos de liberação de fármacos utilizados para substituição de tecidos biológicos.

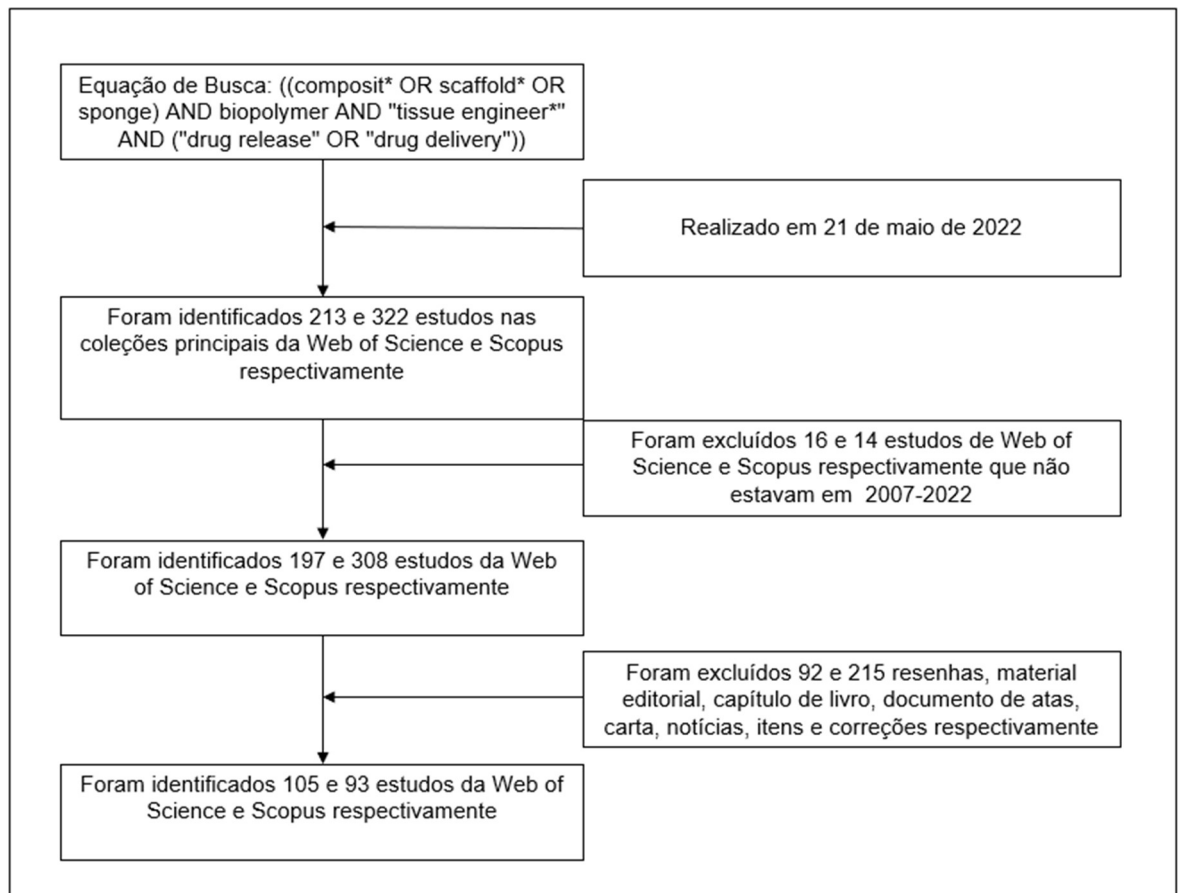
### 1.2.1 Metodologia

Neste estudo, a coleta de dados das publicações realizadas entre 2007 e 2022 foi feita em um único dia (21 de maio de 2022), e o banco de dados foi elaborado como “arquivo delimitado por tabulação” do *Scopus* e *Web of Science*. A estratégia de coleta e extração de dados foi mostrada na Figura 1.

As publicações extraídas tiveram que atender aos seguintes critérios:

- Os termos de pesquisa foram determinados pela equação geral de busca: *((composit\* OR scaffold\* OR sponge) AND biopolymer AND "tissue engineer\*" AND ("drug release" OR "drug delivery"))*;
- O tipo de documento foi "artigo";
- O período de publicação foi nos últimos 15 anos (entre 2007 e 2022) devido a ter o maior número de publicações;
- Foram coletadas as seguintes informações: publicação, autores, países, instituições, periódicos, palavras-chave e citações.

Figura 1. Estratégia de coleta e extração de dados

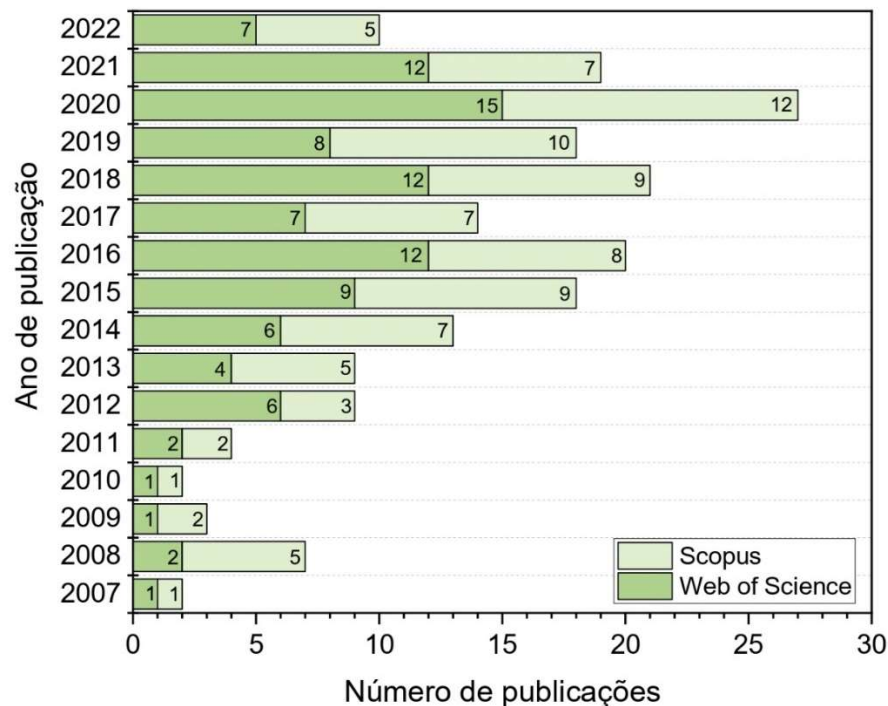


1.2.2 Desenvolvimento anual e distribuição de países dos artigos referentes aos andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos

A busca de indicadores de produção acadêmica na área de biomateriais resultou num total de 105 e 93 artigos acadêmicos da coleção principal da *Web of Science* e *Scopus* respectivamente. Inicialmente, torna-se evidente que o número de artigos científicos obtidos é baixo, o que infere uma oportunidade de explorar ainda mais o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos utilizados na substituição de tecidos biológicos.

Na Figura 2 é apresentada inicialmente a tendência anual de publicações de cada uma das bases de dados em relação ao uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos.

Figura 2. Distribuição do número de artigos sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos publicados por ano de 2007 a 2022 nas bases *Scopus* e *Web of Science*

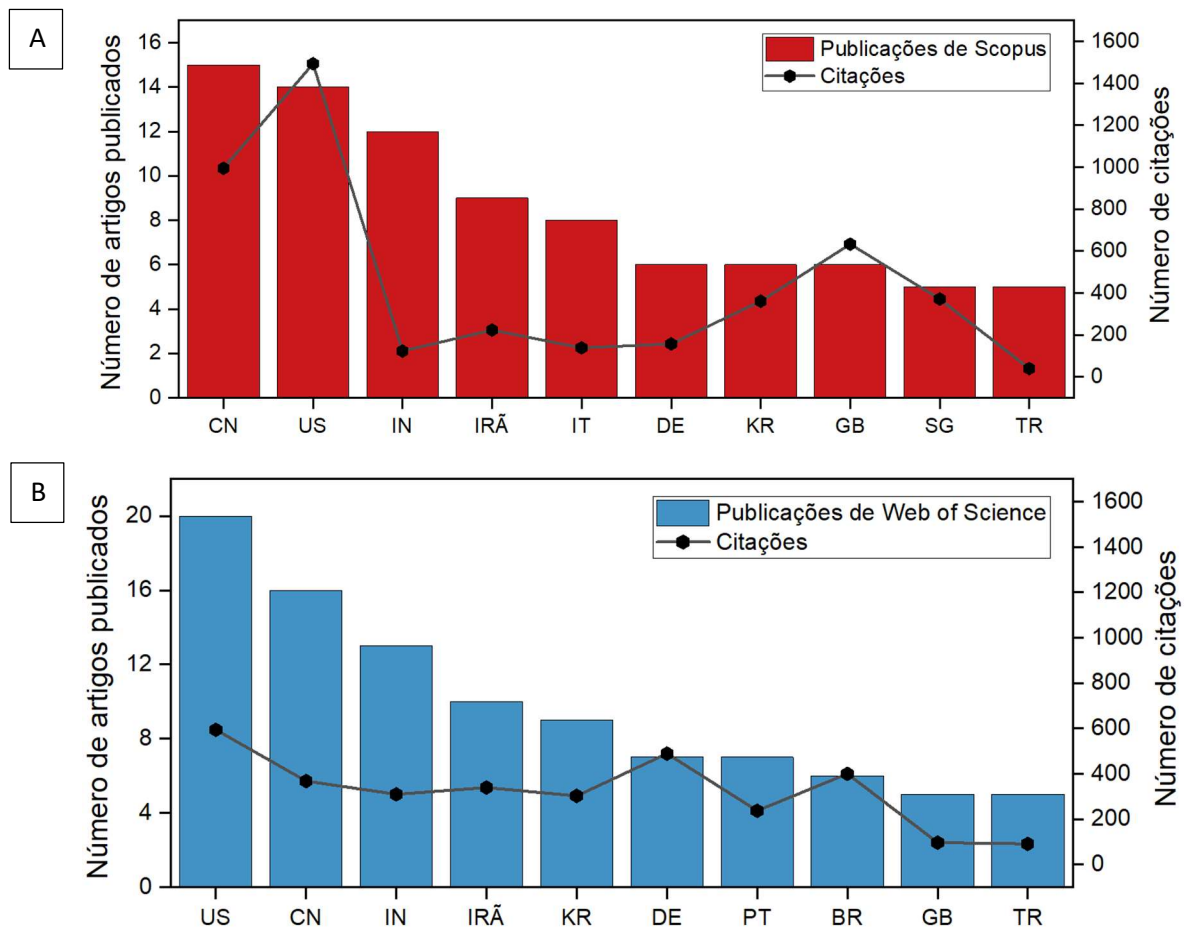


Conforme mostrado na Figura 2, durante os últimos 15 anos tem se evidenciado menos de 100 publicações anuais sobre investigações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos. O número de publicações experimentou um aumento relativamente constante (o decréscimo em 2022 deve-se à falta de dados não publicados). As publicações globais anuais aumentaram

de 1 em 2007 em ambas as bases de dados para 12 na *Scopus* e 7 na *Web of Science* em 2021, um aumento de 1200% e 700% respectivamente. No entanto, a produção de artigos científicos ainda é limitada, embora seja evidente que há um interesse crescente por parte dos pesquisadores nesta linha de pesquisa e da possibilidade de aplicação na saúde.

Na Figura 3 esta apresentada a distribuição por país/citações de cada uma das bases de dados com informações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos.

Figura 3. Distribuição dos 10 principais países/regiões produtivos no Scopus (A) e Web of Science (B) com o número de citações



Especificamente, na base de dados *Scopus*, pesquisadores da China (15 publicações VS 995 citações) contribuíram com o maior número de publicações (FIGURA

3A), seguidos pelos Estados Unidos de América (14 VS 1494), Índia (12 VS 123), Irã (9 VS 223) e Itália (8 VS 138).

Da mesma forma, na base de dados *Web of Science*, pesquisadores dos Estados Unidos de América (20 publicações VS 594 citações) contribuíram com o maior número de publicações (FIGURA 3B), seguidos por China (16 VS 368), Índia (13 VS 309), Irã (10 VS 339) e Coreia do Sul (9 VS 302).

### 1.2.3 Distribuição de periódicos e artigos mais citados em cada base de dados

Para cada uma das bases de dados é utilizada uma medida que reflete o número médio anual de citações de artigos recentes publicados naquele periódico, no caso de *Scopus* essa medida é o *Cite Scord*, e no caso de *Web of Science* é *Impact Factor*, referente ao último ano finalizado (2021).

Tabela 1. Os 5 principais periódicos para publicações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos no *Scopus*.

Rank	Título da Fonte	Categoria	Cite Scord (2021)	Publicações totais (%)	Citações totais
1	<i>Materials Science &amp; Engineering C</i>	Ciência dos Materiais; Engenharia Química	12.6	5	267
2	<i>Acta Biomaterialia</i>	Engenharia; Ciência dos Materiais; Bioquímica, Genética e Biologia Molecular	15.6	4	171
3	<i>Journal of Biomedical Materials Research part A</i>	Ciência dos Materiais; Engenharia	8.8	4	110
4	<i>ACS Applied Materials &amp; Interfaces</i>	Ciência dos Materiais	14.4	3	152
5	<i>Macromolecular Bioscience</i>	Ciência dos Materiais; Bioquímica, Genética e Biologia Molecular	7.7	4	46

No *Scopus*, os artigos selecionados sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos foram publicados em 69 periódicos. A Tabela 1 lista os 5 principais periódicos que publicaram o maior número de artigos, respondendo por 21,5% (20/93) das publicações. *Materials Science &*

*Engineering C* foi o periódico com mais publicações (5 publicações) e o mais citado (267 citações), seguido por *Acta Biomaterialia* e *Journal of Biomedical Materials Research* parte A com 4 publicações cada.

Um total de 93 artigos foram citados 3.837 vezes, com mediana de 14,5 citações e um H-Index de 28. O número de citações dos 3 artigos mais citados variou entre 635 e 283. “*On the nature of biomaterials*”, publicado na *Biomaterials* em 2009, foi o artigo mais citado (635 citações).

Tabela 2. Os 5 principais periódicos para publicações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos na *Web of Science*

Rank	Título da Fonte	Categoria	Impact Factor (2021)	Publicações totais (%)	Citações totais
1	<i>Materials Science &amp; Engineering C-materials for Biological Applications</i>	Ciência dos Materiais	8.46	6	304
2	<i>Carbohydrate Polymers</i>	Química; Ciência de Polímeros	10.72	5	434
3	<i>Journal of Biomedical Materials Research part A</i>	Ciência dos Materiais; Engenharia	4.85	4	104
4	<i>Acs Applied Materials &amp; Interfaces</i>	Ciência dos Materiais; Nanociência e Nanotecnologia	10.38	3	201
5	<i>Acta Biomaterialia</i>	Engenharia; Ciência dos Materiais	10.63	3	270

Na *Web of Science*, os artigos recuperados sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos foram publicados em 76 periódicos. A Tabela 2 lista os 5 principais periódicos que publicaram o maior número de artigos, respondendo por 20,0% (21/105) das publicações. *Materials Science & Engineering C* foi o periódico com mais publicações (6 publicações) com 304 citações, mas o periódico mais citado foi *Carbohydrate Polymers* com 434 citações e 5 publicações.

Um total de 105 artigos foram citados 2.988 vezes, com mediana de 14,0 citações e *H-Index* de 29. O número de citações dos 3 artigos mais citados variou entre 196 e 170. “*Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers-Progress in Techniques, Materials, and Applications*”, publicado no *Advanced Functional Materials* em 2009, foi o artigo mais citado (304 citações).

#### 1.2.4 Mapeamento e análise de coocorrência das principais palavras-chave

O VOSviewer foi utilizado para analisar as palavras-chave derivadas de cada publicação em cada uma das bases de dados e assim identificar as principais áreas e aplicações de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos. As palavras-chave fornecidas pelos autores geralmente representam os principais temas de seu trabalho (PESET *et al.*, 2020). Portanto, a análise bibliométrica das palavras-chave do autor de todas as publicações em um determinado campo poderia refletir os pontos críticos dessa área de pesquisa.

A utilização do VOSviewer inicialmente permitiu extrair e agrupar as principais palavras-chave do banco de dados *Scopus*, na Tabela 3. O Top 5 das palavras-chave com maior coocorrência estão representadas.

Tabela 3. Top 5 Palavras-chave na base de dados de *Scopus*

<b>Rank</b>	<b>Palavra-chave</b>	<b>Coocorrência</b>	<b>Cluster</b>
<b>1</b>	<i>Drug delivery system</i>	89	Vermelho
<b>2</b>	<i>Tissue engineering</i>	78	
<b>3</b>	<i>Biopolymers</i>	72	
<b>4</b>	<i>Tissue scaffold</i>	60	
<b>5</b>	<i>Biocompatible materials</i>	55	

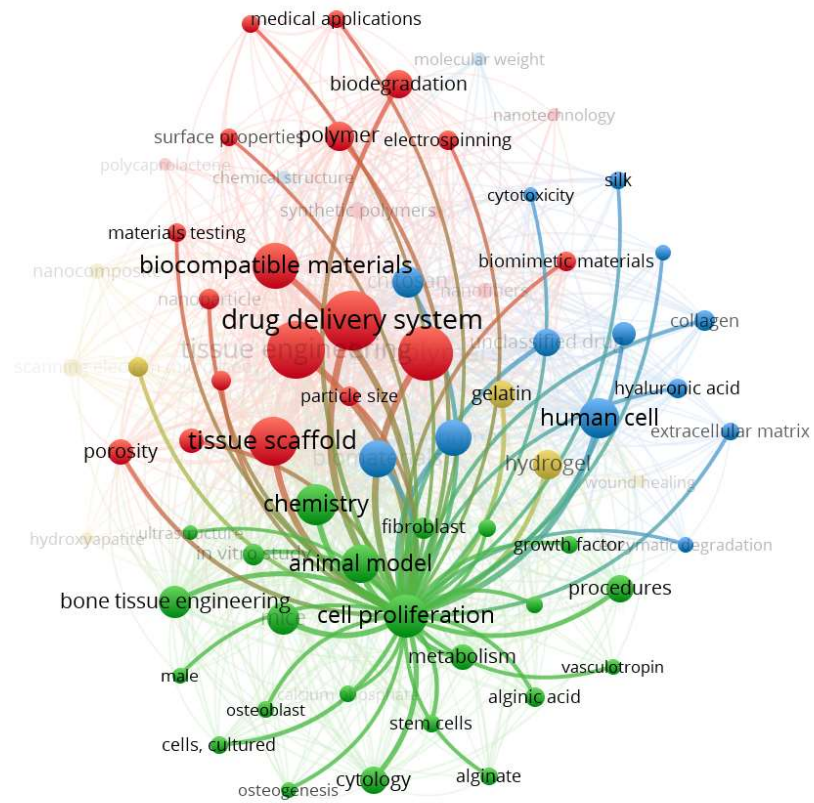
Na Figura 4 está apresentado o mapeamento dos artigos científicos usando a equação de busca acima usando a base de dados *Scopus*. As palavras-chave apresentadas na Tabela 3 são encontradas no centro do mapa da rede de visualização do VOSviewer. O rótulo do nó mostra a palavra-chave e o tamanho de cada nó se refere



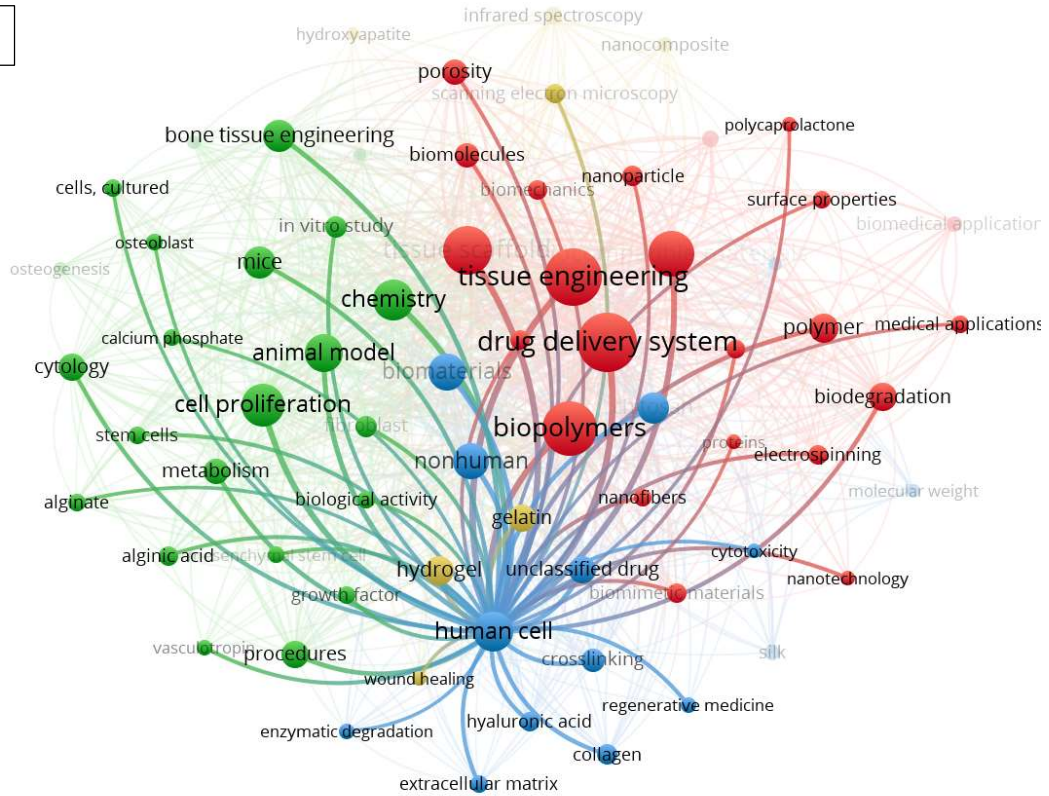




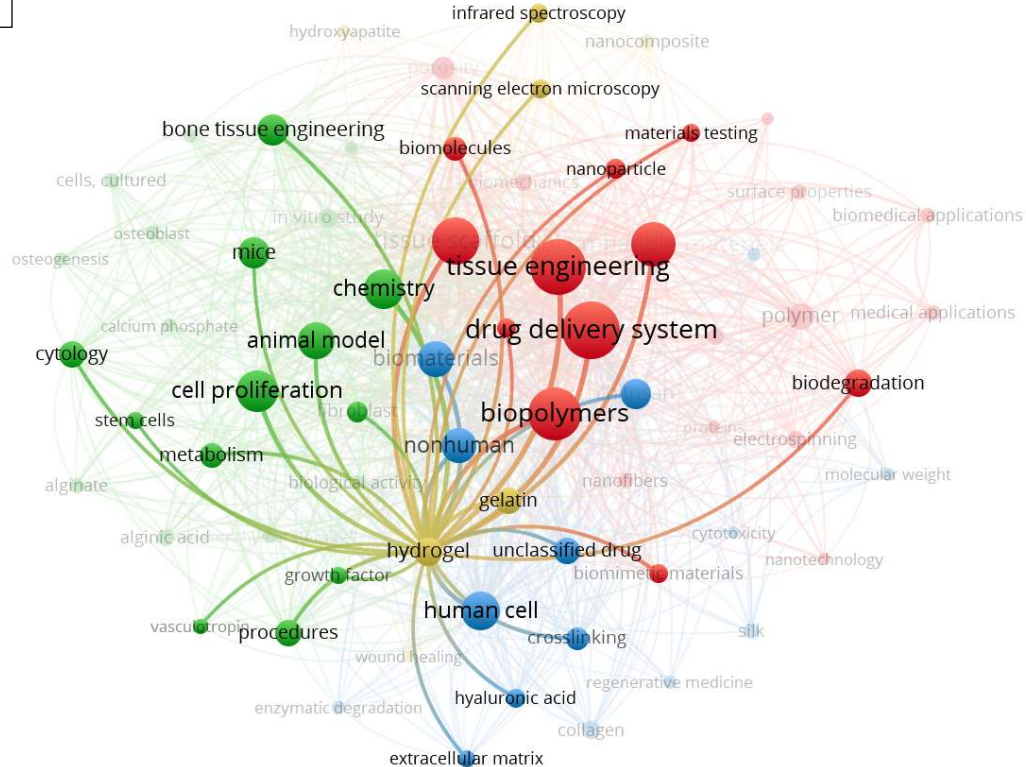
B



C



D



O grupo 1 em vermelho representa a engenharia de tecidos a partir de biopolímeros usados como sistemas de liberação controlada, o grupo 2 em verde representa estudos químicos e biológicos realizados em nível *in vitro* e *in vivo* (animais), o grupo 3 em azul representa estudos *in vitro* realizados especificamente em células humanas e o grupo 4 em amarelo representa as técnicas de caracterização de hidrogéis.

Na Figura 5-A o grupo 1 (cluster vermelho) inclui palavras-chave de alta frequência, como sistema de entrega de medicamentos, biopolímeros, nanopartículas, engenharia de tecidos, suportes de tecidos, biodegradação, aplicações biomédicas, materiais biomiméticos e testes de materiais.

As palavras-chave biopolímeros, biodegradação, materiais biomiméticos e aplicações biomédicas estão relacionadas entre si. Biopolímeros são polímeros de origem natural, com capacidade de formar hidrogéis que mimetizam a MEC e favorecem o crescimento tecidual (HOCH *et al.*, 2016). Atualmente são uma área de interesse muito forte, já que os biopolímeros podem regular a divisão, adesão, diferenciação e migração

celular de forma mais favorável do que os polímeros de origem sintética. (KLEIN *et al.*, 2010; MALAFAYA *et al.*, 2007)

As nanopartículas (NPs) são pequenas partículas com um diâmetro <100 nm. Em geral, o tamanho de partícula, composição, forma, carga superficial e funcionalidade da superfície, desempenham um papel importante no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, atualmente as nanopartículas estão sendo investigadas para melhorar a biodisponibilidade e alcançar liberação em uma dose mais baixa internamente sem toxicidade, superando as desvantagens dos sistemas de entrega convencionais (DE JONG; BORM, 2008; MITCHELL *et al.*, 2021)

Por exemplo, o estudo feito por NIU *et al.*, (2021), um Hidrogel e um filme híbrido funcional foram gerados a partir da incorporação de nano folhas de mica esfoliadas em uma matriz de quitina regenerada por meio de um sistema de dissolução alcalina (KOH/ureia).

As Figuras 5-B grupo 2 (cluster verde) e 5-C grupo 3 (cluster azul) estão relacionados entre si, pois ambos se referem a testes in vitro e in vivo, como testes de citotoxicidade ou proliferação celular, classes de células como fibroblastos ou osteoblastos e diferentes tipos de materiais utilizados como alginato, colágeno ou ácido hialurônico. Para a esponja de colágeno impregnada com fito-nanopartículas, feita por SUNDAR *et al.*, (2022) discutida anteriormente, uma concentração de dose ideal de MJSN foi avaliada realizando um teste de contato direto com fibroblastos de camundongo L929, seguido por ensaios de MTT e LDH para avaliar a citocompatibilidade, a viabilidade celular e a citotoxicidade. Ao confirmar a citocompatibilidade das esponjas, elas podem ser propostas para aplicações duplas de liberação sustentada de fármacos e regeneração tecidual na cicatrização de queimaduras, que continua sendo uma necessidade clínica não atendida na reconstrução de tecidos.

Por último, o grupo 4 (cluster amarelo) tem relação com as caracterizações físico-químicas pelas quais se podem definir as principais propriedades dos materiais. Para a esponja de colágeno impregnada com fito-nano, feita por SUNDAR *et al.*, (2022), foi

realizada uma caracterização por meio de espectroscopia UV-vis, FTIR, DRX, DLS, potencial Zeta, SEM e TEM.

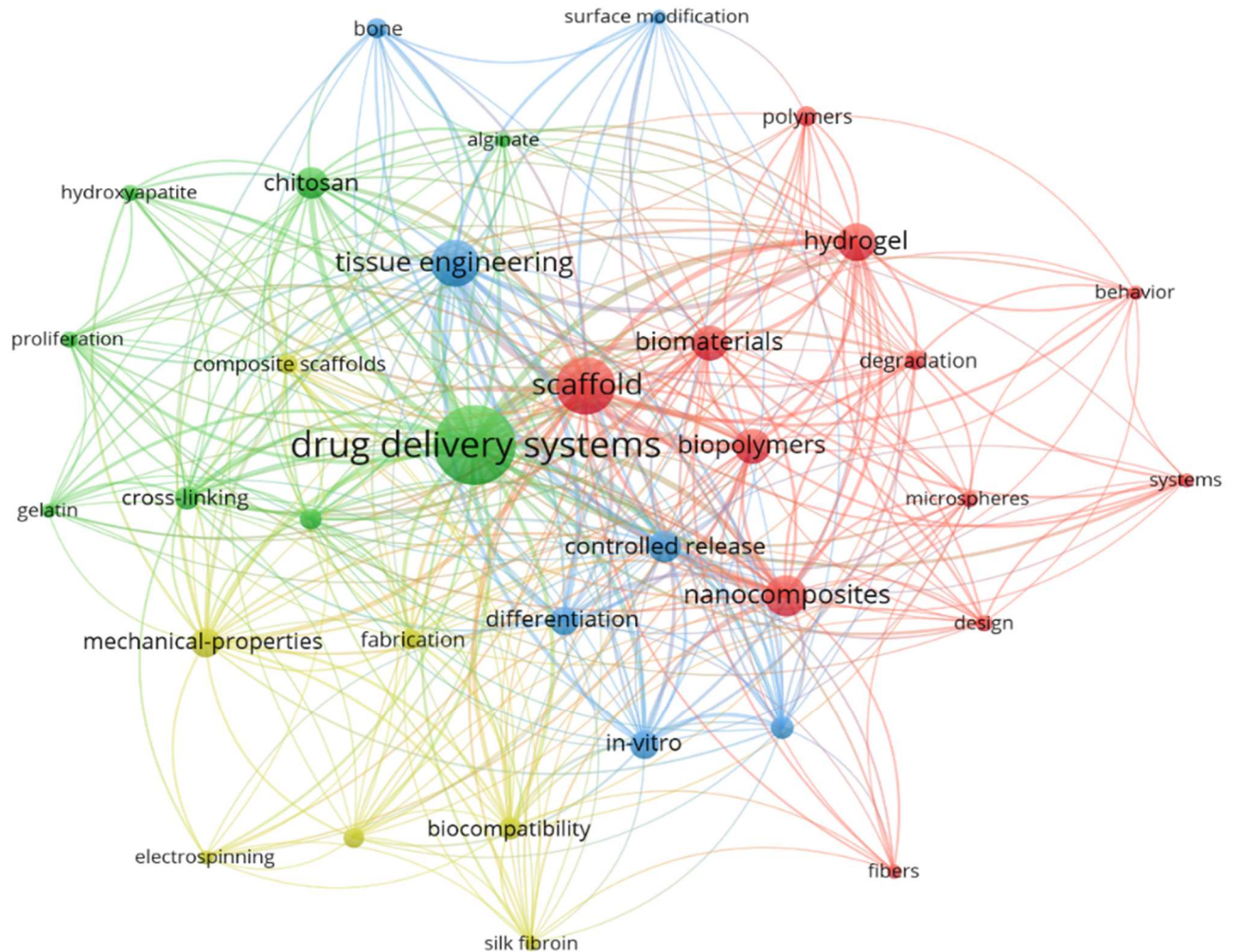
Em geral, projetos resultantes da união de vários materiais ou projetos híbridos abrem caminho para resolver problemas atuais em biomateriais usados na indústria médica, bem como aplicações sustentáveis para muitos propósitos futuros, como dispositivos vestíveis, engenharia de tecidos e entrega de medicamentos.

Do mesmo jeito, foi realizado novamente o procedimento de análise com a base de dados Web of Science, na Tabela 4. se apresentam as 5 principais palavras-chave com maior coocorrência do banco de dados da Web of Science, e na Figura 6 está apresentado o mapeamento das palavras-chave da tecnologia.

Tabela 4. Top 5 Palavras-chave na base de dados de Web of Science

<b>Rank</b>	<b>Palavra-chave</b>	<b>Coocorrências</b>	<b>Cluster</b>
<b>1</b>	Drug delivery system	71	Verde
<b>2</b>	Scaffold	43	Vermelho
<b>3</b>	Tissue engineering	31	Azul
<b>4</b>	Nanocomposites	25	Vermelho
<b>5</b>	Hydrogel	22	

Figura 6. Mapeamento das palavras-chave encontradas na base de dados Web of Science. Visualização e exploração do uso de andaimes ou compostos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos

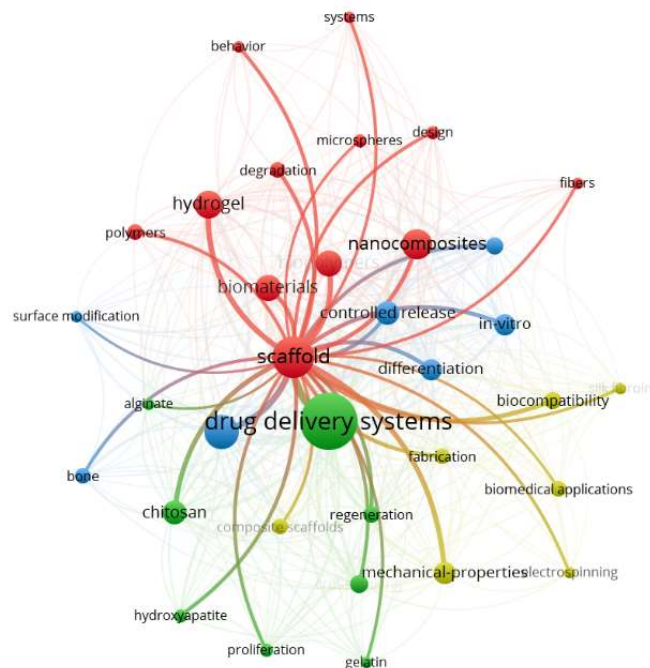


No Web of Science, foram encontrados 105 artigos de investigação usando a mesma equação de busca inicial. Analisando os 105 artigos do Web of Science no VOSviewer, foram encontradas um total de 767 palavras-chave, para as quais foi realizada da mesma forma que no Scopus a limpeza dos dados por meio de um arquivo de dicionário de sinônimos VOSviewer. Além, cinco (5) foi definido como o número mínimo de ocorrências por palavra citada pelos autores, o que deu um total final de 34 palavras-chave apresentadas na Figura 6. Na rede analisada, podem ser visualizados 4

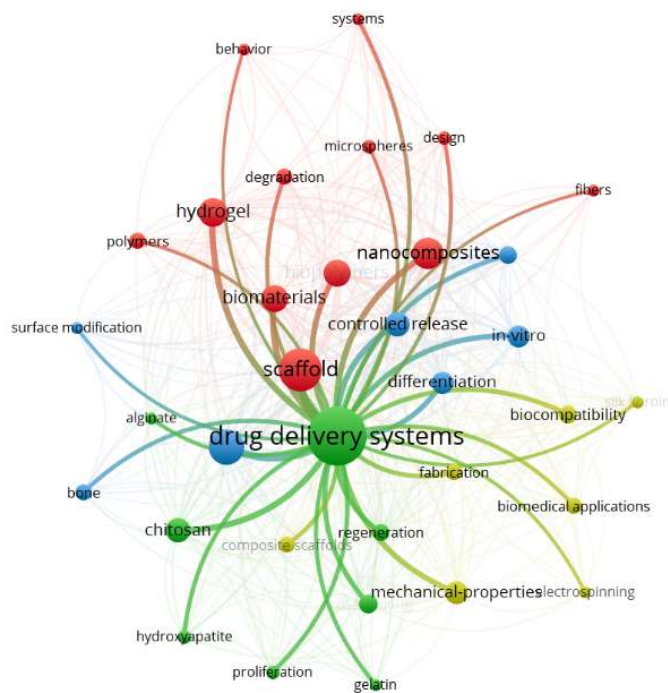
clusters de cor vermelho, verde, azul e amarelo, e cada um deles podem ser observados melhor na Figura 7.

Figura 7. Mapeamento das palavras-chave encontradas na base de dados Scopus, sendo apresentado A. Grupo 1 (vermelho), B. Grupo 2 (verde), C. Grupo 3 (azul), e D. Grupo 4 (amarelo).

A

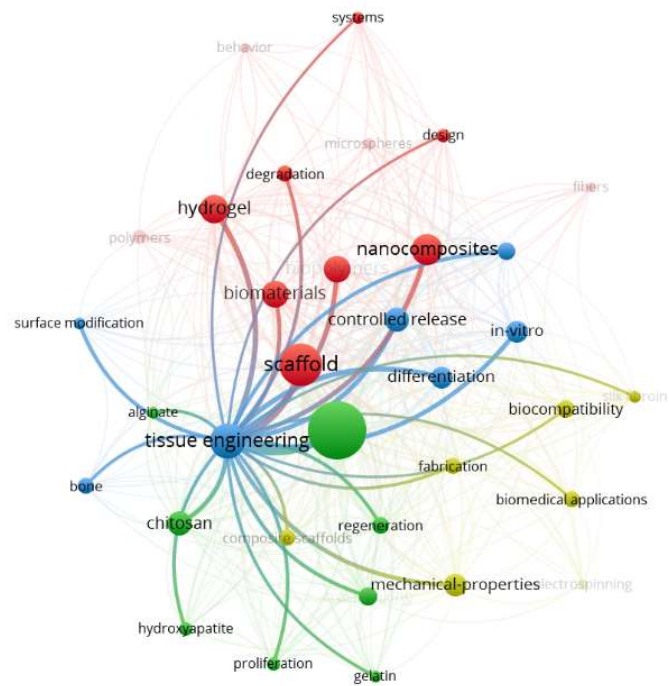


B

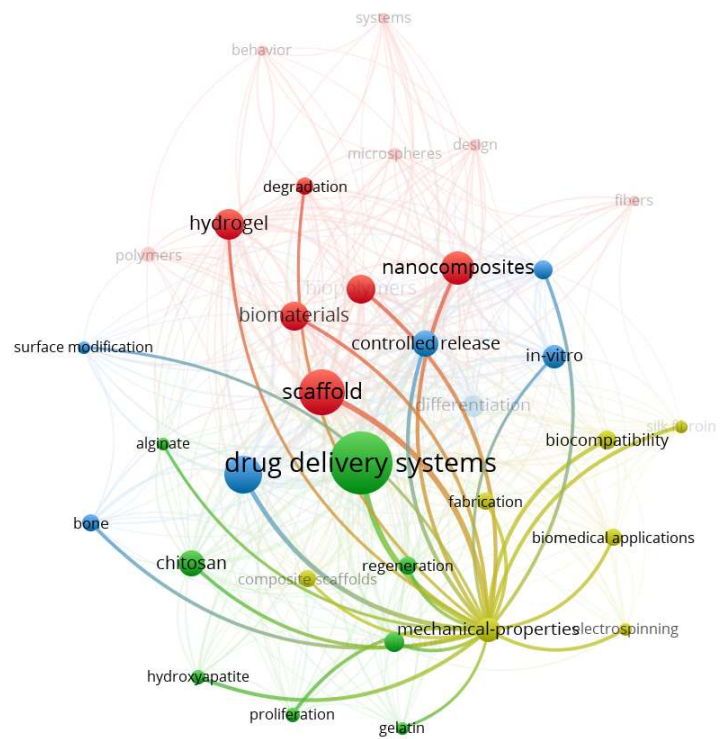




C



D



O grupo 1 em vermelho representa os tipos de biomateriais e nano compósitos como hidrogéis e andaimos, o grupo 2 em verde representa os sistemas de liberação de

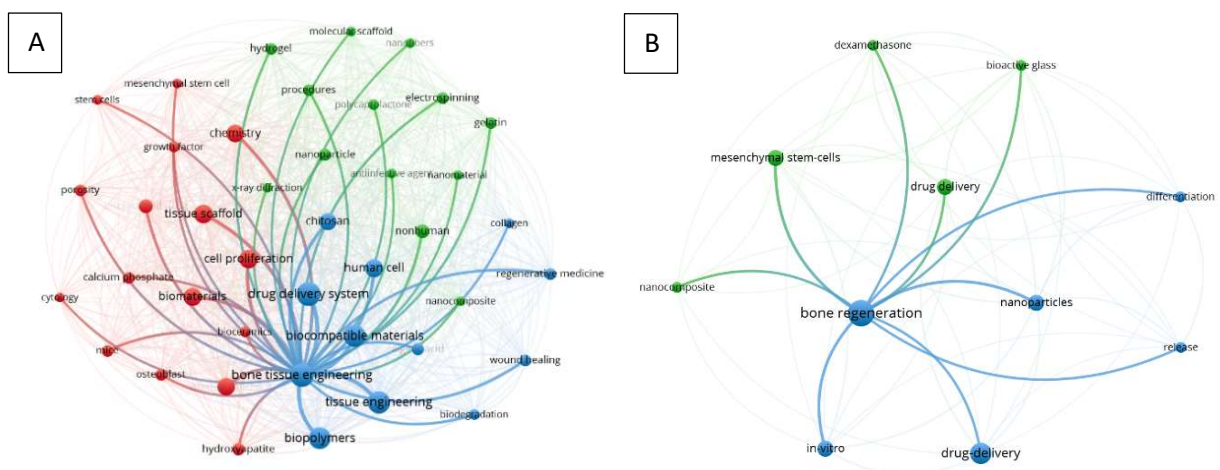
fármacos, o grupo 3 em azul representa a engenharia de tecidos e o grupo 4 em amarelo representa as propriedades e características mecânicas e biológicas dos materiais.

Pode-se observar que os mapeamentos gerados com o VOSviewer para ambas as bases (Figuras 4 e 6) são muito semelhantes entre si, o mapeamento gerado com os dados do Scopus fornece uma visão mais geral do que o gerado com os dados do Web of Science, porém ambos permitem identificar as mesmas áreas e aplicações de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos.

Na bibliometria realizada, observou-se que não há grande relevância com relação aos tecidos para recuperação óssea, por isso foi proposta uma segunda equação de busca visando verificar o estado da arte (artigos científicos) usando regeneração ou melhora óssea.

*((composit\* OR scaffold\* OR sponge) AND biopolymer AND ("tissue engineer\*") AND ("bone regenerat\*" OR "bone enhance\*") ("drug release") OR ("drug delivery"))* foram as palavras-chave usadas na base de dados de Scopus e Web of Science. Na Figura 8 está apresentado o mapeamento dos artigos científicos usando a equação de busca acima usando a base de dados Scopus.

Figura 8. Visualização em rede da engenharia de tecido ósseo na regeneração óssea como cluster principal das palavras-chave frequentemente relacionadas no estudo comparando os dados obtidos nas bases de dados A. Scopus e B. Web of Science



Foram encontrados no *Scopus* 12 e no *Web of Science* 7 artigos de investigação usando a equação de busca mencionada acima, com um total de 856 e 75 palavras-chave respectivamente, além de definir como 5 e 2 o número mínimo de ocorrências por palavra citada pelos autores, o que deu um total final de 41 e 11 palavras-chave para *Scopus* e *Web of Science* respectivamente, apresentadas na Figura 8.

Na Figura 8. podemos observar que os dois mapeamentos têm como cluster principal regeneração e engenharia do tecido ósseo junto com sistemas de liberação controlada. Por exemplo, estudos realizados por BENEDINI *et al.*, (2020), avaliaram, por meio de dois tipos de compósitos baseados em uma biocerâmica (nano-hidroxiapatita sintética, HA) e um biopolímero (alginato de sódio, ALG), a regeneração óssea. Além disso, os materiais foram carregados com ciprofloxacina (CIP) para a obtenção, não apenas de um material adequado para um preenchimento, mas com propriedades antibacterianas.

---

### 1.3. Patentometria simplificada

A necessidade de desenvolver e implementar mais produtos bioinertes, biocompatíveis e bioativos na medicina tem aumentado as oportunidades ao nível da investigação e industrial (KRISHNAN; LAKSHMI, 2013; ØDEGAARD *et al.*, 2020), para o qual, as tecnologias baseadas em andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos utilizados na substituição de tecidos biológicos continuam a ser foco de interesse.

Entre os materiais de maior interesse, os biopolímeros podem produzir materiais com propriedades ajustáveis, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, renovabilidade, baixo custo, disponibilidade, que são criticamente importantes para projetar materiais para uso em aplicações biomédicas (BISWAS *et al.*, 2022). Os andaimes de biopolímeros tem o formato e composição de matrizes extracelulares (MEC) que possuem características físico-químicas e porosidade pré-determinadas, beneficiando a liberação do fármaco e o crescimento celular, gerando suporte mecânico, enquanto o tecido celular afetado se recupera (REDDY *et al.*, 2015; SLAUGHTER *et al.*, 2009).

Com a ideia de avaliar o potencial tecnológico da tecnologia apresentada no presente trabalho, foi realizado um estudo de prospecção tecnológica dos materiais biomédicos de liberação de fármacos utilizados para substituição de tecidos biológicos usando a plataforma internacional paga para a busca e análise de patentes *Orbit Intelligence da Questel* e a base de livre acesso *Lens.org* usando os parâmetros de busca da Tabela 1.

A Plataforma *Orbit Intelligence* foi selecionada porque o sistema possui ferramentas de análise estatística, que permitem gerar uma exibição gráfica de grandes conjuntos de patentes. A cobertura da base da *Orbit Intelligence* é de 96 países e 100 escritórios de patentes com dados de 8,6 milhões de empresas (PIACENTE *et al.*, 2015). Além disso, a *Orbit Intelligence* é um dos principais provedores de informações de propriedade intelectual usadas para conduzir pesquisas acadêmicas (FAGUNDES *et al.*, 2014).

O banco de dados gratuito *Lens.org* foi selecionado porque este site é uma ferramenta gratuita de pesquisa de patentes que possui uma interface de fácil entendimento para sua correta y rápida utilização, além disso, depende de atualizações frequentes do banco de dados. *Lens.org* tem acesso a Espacenet, o Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos (USPTO), WIPO e bancos de dados de patentes australianos (SPEZIALI, 2020).

Tabela 5. Parâmetros de busca no estado da técnica dos materiais biomédicos de liberação de fármacos utilizados para substituição de tecidos biológicos

<b>Parâmetros de busca</b>	<b>Dados</b>
Equação de busca	Title, abstract, claim, description: ((composit* OR scaffold* OR sponge) AND biopolymer AND "tissue engineer*" AND ("drug release" OR "drug delivery"))  IPC: (A61K9/00)
Base de dados	<i>Orbit</i> <sup>a</sup> – <i>Lens</i> <sup>b</sup>
Intervalo de tempo	2007 até 2022
Tipo de documentos	Família de patentes
Data da busca	06/09/2022
Resultados	199 <sup>a</sup> – 65 <sup>b</sup>

Como apresentado na Tabela 1, usou-se a mesma equação de busca da Bibliometria como estratégia para comparar os resultados de busca nas bases de dados apresentadas. Conseguiu-se auxiliar mais a busca, ou introduzir o código de classificação Internacional de Patentes (IPC) da aplicação do material, cuja descrição segue abaixo.

*A – Human necessities*

*A61 – Medical or veterinary science; hygiene.*

A61K – *Preparations for medical, dental, or toilet purposes.*

A61K9/00 – *Medicinal preparations characterized by special physical form*

A mesma faixa temporal específica (2007 – 2022) também foi utilizada, essa faixa específica foi definida para identificar tecnologias emergentes e novas tendências de produtos para a indústria de materiais biomédicos para liberação de medicamentos utilizados para substituição de tecidos biológicos. Os dados foram extraídos em 6 de setembro de 2022 para o maior número de patentes publicadas até o momento.

A publicação de patentes segue uma dinâmica própria, com procedimentos de publicação específicos de acordo com os diferentes países, especialmente no que diz respeito à fase de confidencialidade (18 meses a partir da data de depósito) dos documentos, o que significa que qualquer dado ou ferramenta de busca recupera apenas documentos que já foram definitivamente publicados (MOTTA; QUINTELLA, 2012).

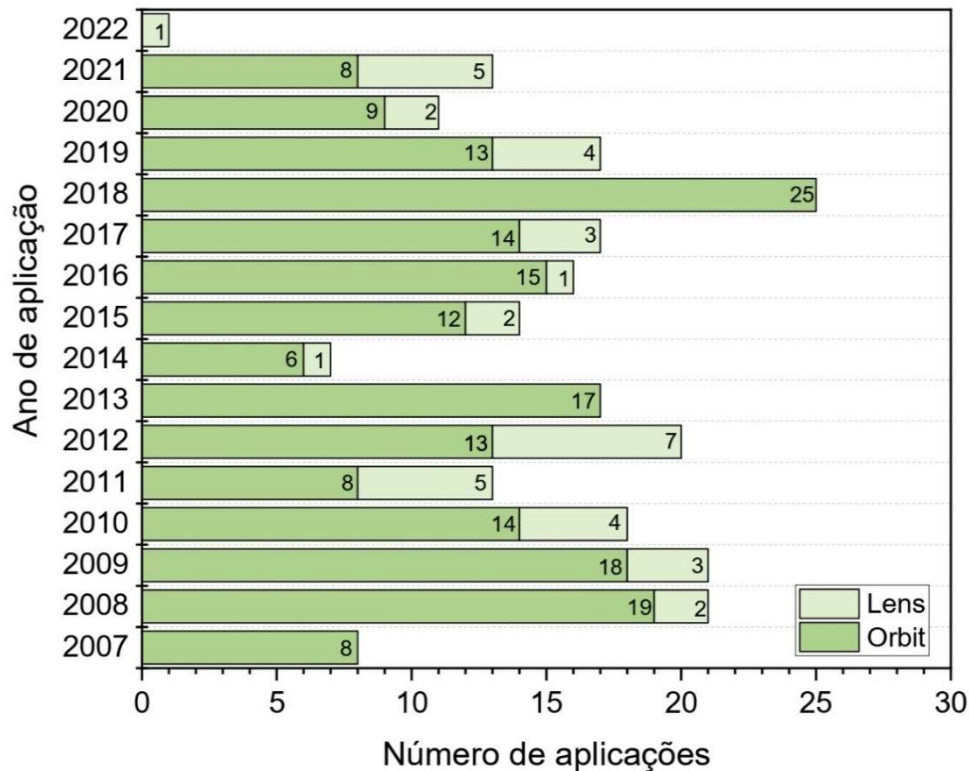
Conforme a Figura 9, a evolução do pedido de patente é observada ao longo do tempo, ou que indica a atual dinâmica inventiva sobre a tecnologia. Durante os últimos 15 anos, os resultados de pedidos de patentes anuais sobre investigações do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos resultou em 199 pedidos de patente no *Orbit Intelligence* e 40 pedidos de patente no *Lens.org*.

Nota-se um maior registro dos dados na base de dados com acesso por subscrição (*Orbit Intelligence*) com um aumento de 397.5% no número de patentes recuperadas comparado com a base de dados de acesso aberto (*Lens.org*), daqui a importância de fazer a busca num escopo maior para que a análise final não resulte limitada.

Da mesma forma, é evidente um perfil mais ou menos constante de pedidos de patentes, o que sugere que a tecnologia está atualmente em fase de estabilização, demonstrando um interesse contínuo e constante por parte dos atores da área. As poucas patentes presentes nos últimos dois anos se devem à falta de informações nas

bases de dados devido ao atraso de 18 meses no processamento entre o depósito do pedido e sua publicação.

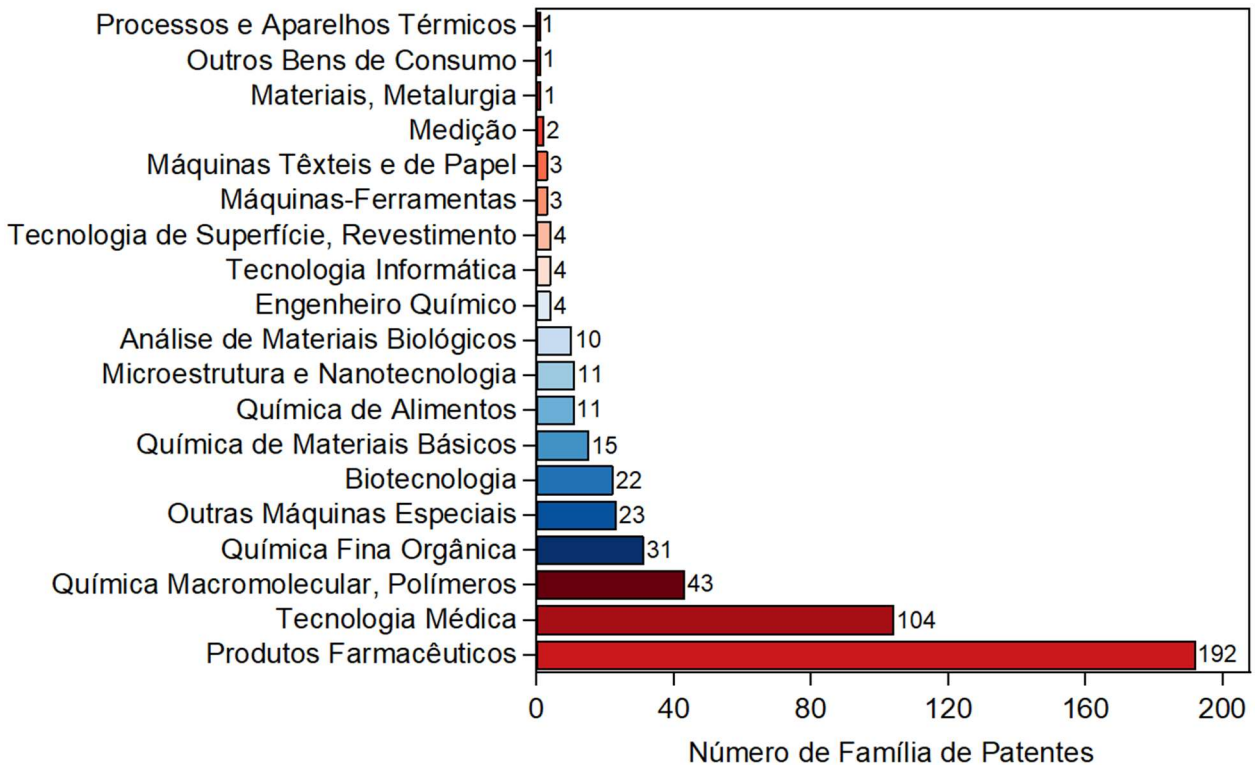
Figura 9. Distribuição da quantidade de pedidos de patentes sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos por ano de 2007 a 2022



Levando em conta a grande diferença de resultados, a análise patenteométrica foi realizada com as famílias de patentes obtidas com a plataforma *Orbit Intelligence*. Com as patentes achadas, realiza-se uma categorização dos diferentes tipos de domínio técnico a fim de avaliar tendências e perspectivas futuras na liberação de fármacos e na substituição de tecidos biológicos.

Na Figura 10, apresentam-se os resultados gráficos da base de dados de *Orbit Intelligence* em relação ao número de família de patentes e domínio tecnológico de cada uma das patentes encontradas. O domínio técnico é obtido com os grupos gerados a partir dos códigos IPC, onde uma patente pode ser identificada em vários campos técnicos.

Figura 10. Análise categórica das áreas tecnológicas de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis na liberação de fármacos no *Orbit Intelligence*



O gráfico apresenta de modo geral, que as principais áreas tecnológicas de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis na liberação de fármacos se encontram nos produtos farmacêuticos com 192 famílias de patentes neste campo, seguido pela Tecnologia médica com 104 famílias de patente e Química macromolecular, polímeros com 43 famílias de patentes identificadas.

Na Patente número US20200297856-A1, destaca-se a fabricação de um gel a partir de um material polimérico como quitosana e/ou alginato, juntamente com um fator biológico dos grupos anti-VEGF, fatores de atração de células-mãe e citocinas beta do fator de crescimento transformante, em que o gel é indicado para o tratamento de lesões da placa de crescimento ou placa epifisária presente na extremidade dos ossos longos, responsável por fornecer sinais para que os ossos longos continuem a crescer à medida que as crianças crescem.



A Figura 11 representa as 10 instituições com maior número de pedidos de patentes nos últimos 15 anos.

Figura 11. Distribuição da quantidade de patentes registradas pelos 10 principais requerentes na área do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no Orbit

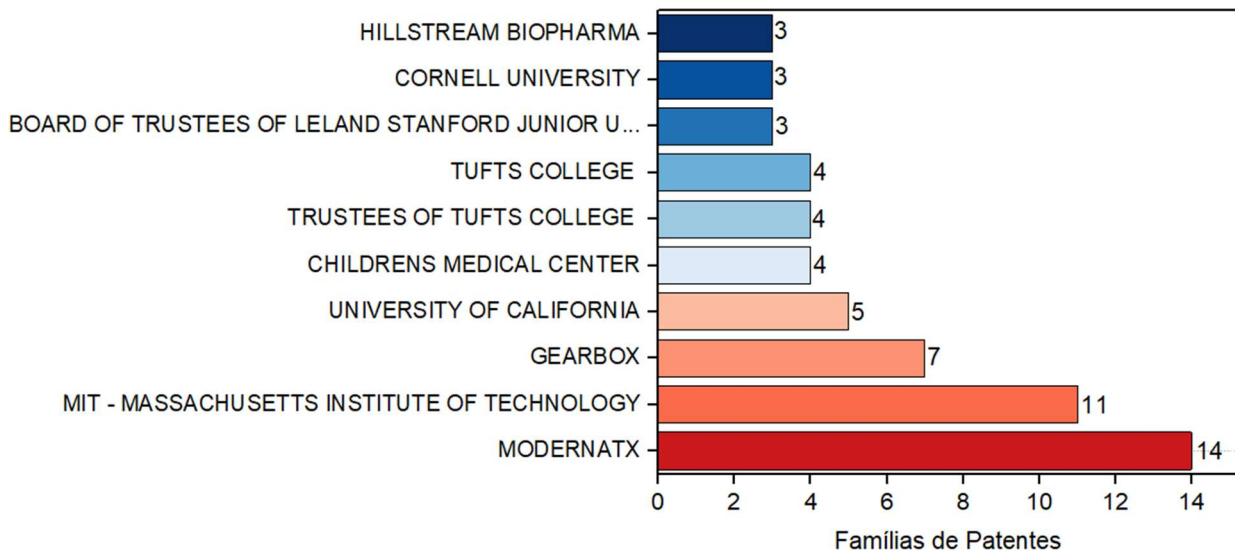


Figura 11. Número de patentes registradas pelos 10 principais requerentes na área do o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no Orbit

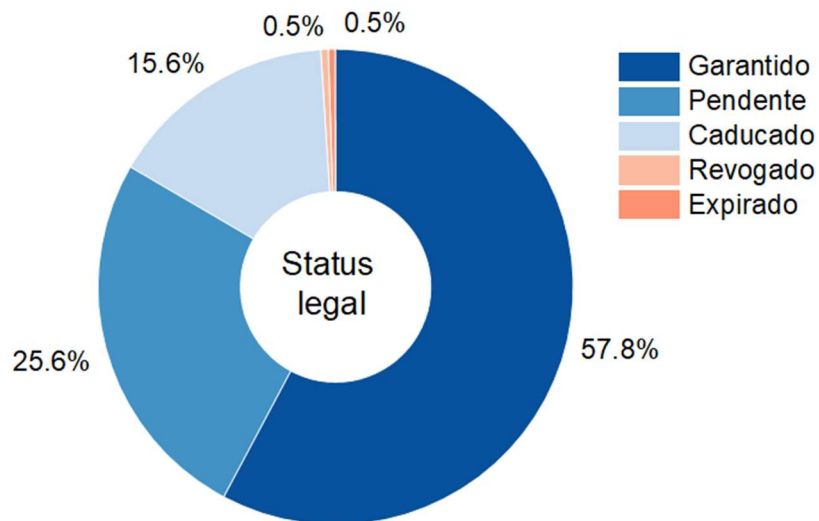
Com um total de 58 publicações de patentes, o que representa 27% do total de pedidos. De maneira geral, a *Modernatx* se destacou por ser a instituição que mais apresenta pedidos de patentes, com um total de 14 pedidos de patentes, o que equivale a 7,0% do total de patentes solicitadas. O segundo lugar foi ocupado pelo *Massachusetts Institute of Technology* (MIT), que fez 11 pedidos de patentes com 5,5% de participação, e em terceiro lugar está a instituição *Gearbox*, com um total de 7 pedidos de patentes representando 3,5% do total das solicitações geradas. As três instituições com mais pedidos de patentes representam 16,1% dos pedidos de patentes com um total de 32 pedidos de patentes.

Uma observação importante é o fato de que dos dez (10) principais requerentes, seis (6) são universidades, pelo qual pode-se afirmar que a maioria de patentes geradas na área do o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para

liberação de fármacos fazem parte de uma área mais de pesquisa para futuras inovações que patentes para inovar atualmente.

Em relação com o status legal de cada uma das patentes recuperadas, a Figura 12 mostra o status legal de cada uma das 199 patentes recuperadas com a plataforma *Orbit Intelligence*.

Figura 12. Status legal das patentes sobre o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no Orbit



Das 199 famílias de patentes, 115 (57,8%) foram concedidas, 51 (25,6%) estão pendentes de aceitação, 31 (15,6%) já caducaram, 1 (0,5%) foi revogada e 1 (0,5%) já expirou. A situação legal indica a maturidade do setor, neste caso, como há em sua maioria patentes em vigor e patentes pendentes de aceitação, observa-se que o setor de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos é atrativo para pesquisadores mais ainda não muito para a indústria. Também, outro ponto para ter em consideração é o fato de que as empresas e universidades tem patentes depositadas por um tema de status a nível social, mais que para sua utilização.

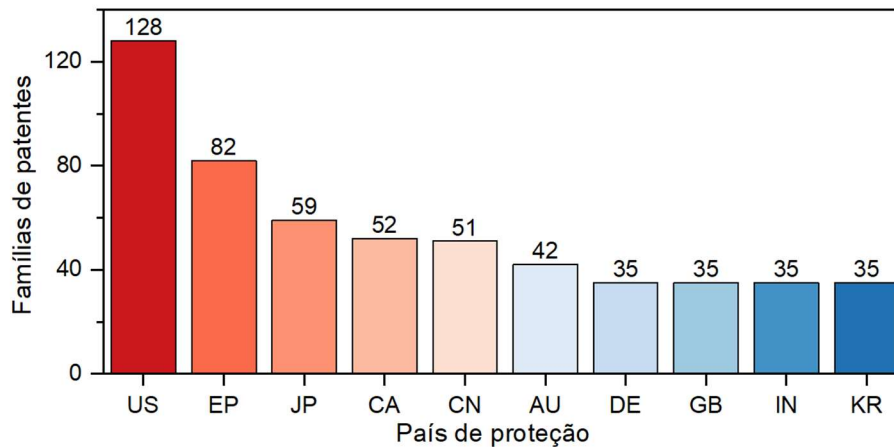
As patentes caducadas por falta de pagamento na taxa de manutenção podem representar uma oportunidade de crescimento para o setor industrial, pois são tecnologias prontas para serem replicadas, onde cada patente pode responder às necessidades de um consumidor, projetos esquecidos podem ressurgir com novos

potenciais pedidos e algumas patentes expiram prematuramente, pois as taxas são não pagas, dando-lhe uma oportunidade contra os concorrentes.

Atualmente não há pedido de “patente internacional universal”, portanto, a patente deve ser protegida por territórios, sejam países ou regiões. Portanto, um pedido de patente deve ser depositado em cada escritório nacional de patentes de interesse, ou um pedido internacional pode ser depositado sob o Tratado de Cooperação de Patentes (PCT), administrado pela OMPI.

A Figura 13 mostra os 10 principais países/regiões com maior número de patentes protegidas para o uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos.

Figura 13. Distribuição da quantidade de patentes protegidas pelos 10 principais escritórios produtivos na área do uso de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos de 2007 a 2022 no Orbit



Esta representação ilustra o número de patentes depositadas protegidas nos diferentes escritórios nacionais. Este gráfico inclui países de extensão para documentos da EP.

Ressaltando-se que cada entidade pode depositar um pedido de patente em vários países. A Figura 13. demonstra a estratégia de proteção do depositante e, portanto, ajuda a identificar o mercado-alvo. Diante do exposto, percebe-se que o maior mercado de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos se encontra nos Estados Unidos, União Europeia e Japão. Especificamente,

pesquisadores dos EUA (128 publicações de patente) contribuíram com o maior número de patentes (Figura 12), seguidos pelo EP (82), Japão (59), Canada (52), e China (51).

Tabela 6. Top 5 países/regiões com proteções de patentes no Brasil

<b>Rank</b>	<b>País</b>	<b>No. de Patentes</b>
<b>1</b>	Organização Europeia de Patentes	20
<b>2</b>	Austrália	17
<b>3</b>	China	17
<b>4</b>	Japão	16
<b>5</b>	Estados Unidos	16

No ranking dos países com maior proteção de patentes, o Brasil está posicionado na 14<sup>a</sup> posição com um total de 20 pedidos de patentes. Na Tabela 6. Observa-se o número de patentes protegidas no Brasil por outros países, sendo a organização europeia de patentes, aquela com as patentes mais protegidas no Brasil, com um total de 20 patentes, seguidas por 17 na Austrália e 17 na China.

O número de patentes protegidas por outros países no Brasil deixa claro que o Brasil é um país onde há produção industrial e mercado na área de andaimes ou compósitos biomédicos a partir de hidrogéis para liberação de fármacos, o que leva outros países a decidirem proteger suas patentes e tecnologias neste país. No entanto, é evidente que Brasil não é um dos principais competidores a nível mundial.

Do ponto de vista geral, o Brasil deve estimular o progresso tecnológico do país. A partir de uma participação direta, o governo por meio de investimentos públicos pode fornecer o estímulo necessário criando uma sinergia entre universidades, empresas e governo gerando crescimento econômico e desenvolvimento social a partir do conhecimento adquirido.

Mundialmente, para gerar sinergia entre universidades, empresas e governo, são criados centros de inovação, onde no caso do Brasil, destaca-se o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), definido como: “Instalações físicas onde se realizem ações coordenadas para a promoção da inovação, por meio de governança, integração, qualificação, atração de investimentos e conexão empreendedora, podendo reunir, em um mesmo espaço físico, startups, aceleradoras, incubadoras, empresas de diversos portes, instituições âncoras, universidades, centros de pesquisas, investidores e instituições de fomento à inovação ao empreendedorismo” (BRASIL, 2019)

Da mesma forma, o Brasil tem implementado estratégias para fortalecer a capacidade de inovação do país. Por exemplo, a lei de inovação (Lei nº 10.973/2004) e a Lei do Bem (Lei nº 11.196/2005) deram início aos fundos setoriais de financiamento de projetos para a união de universidades, centros de pesquisa e setor produtivo. Existem atualmente 16 fundos setoriais no Brasil, dos quais 14 são para setores específicos e 2 são transversais (SILVA *et al.*, 2021).

Entre as medidas mais recentes estão o Decreto 10.534, de 28/10/2020, pelo qual o governo institui a Política Nacional de Inovação – PNI, para orientar, coordenar e articular estratégias, programas e ações para o crescimento da inovação no país, a Portaria No. 6.762, de 17/12/2019, que institui o programa nacional de apoio a ambientes inovadores – PNI e a lei complementar nº 182, de 01/06/2021, que estabelece o regime jurídico das startups e do empreendedorismo inovador (SILVA *et al.*, 2021).

Para verificar se as estratégias implementadas na busca pelo avanço da inovação no Brasil estão dando certo, uma pesquisa de inovação da PINTEC é realizada a cada três anos com base na terceira edição do Manual de Oslo e no modelo proposto pela Oficina de Estatística da Comunidade Europeia (*Statistical Office of the European Communities* – EUROSTAT) (IBGE, 2017)

Em sua última edição publicada, avaliando o triênio de 2015 – 2017, confirmou-se a diminuição do número de empresas inovadoras beneficiadas por algum tipo de apoio do governo, registrando um percentual de 33,6%, enquanto nos períodos 2009 – 2011

(35,7 %) e 2012 – 2014 (36,0%), apresentando um decréscimo de 2,4 pontos percentuais entre os últimos estudos (IBGE, 2020).

As empresas que se beneficiaram do financiamento para aquisição de novos equipamentos para modernização tecnológica ou produção de novos produtos apresentaram um decréscimo no triênio de 2015 – 2017, registrando-se uma percentagem de 14,1%, relativamente ao triênio anterior de 2012 – 2014 com um percentual registrado de 31,4%, o que é preocupante por ser o principal incentivo para melhorar a inovação nas empresas, embora parte dessa queda esteja associada ao aumento da participação das despesas em atividades internas de P&D (de 31,5% para 37,4%) (IBGE, 2020).

Adicionalmente, houve aumento das empresas beneficiárias da Lei do Bem (Lei nº 11.196/2005), onde o percentual aumentou de 3.5% no período 2012 – 2014 para 4.7% no período 2015 – 2017 (IBGE, 2020).

Apesar das estratégias implementadas para melhorar a inovação no Brasil, é evidente a diminuição do apoio total do governo, sendo um fator direto a diminuição do apoio à aquisição de máquinas e equipamentos. Segundo as empresas, os principais obstáculos para inovar são os riscos econômicos excessivos (81,8%), os altos custos da inovação (79,9%), a falta de pessoal qualificado (65,5%) e finalmente, a falta de fontes de financiamento (63,9 %) (IBGE, 2020). Portanto, as empresas se abstêm de inovar principalmente devido às condições de mercado.

No entanto, apesar das dificuldades de inovar para as empresas brasileiras, no ranking da *Global Innovation Index* (GII) do ano 2021 o qual classifica as economias mundiais de acordo com suas capacidades de inovação, o Brasil teve a posição 57. Melhorando com respeito aos anos anteriores (62 no ano 2020 e 66 no ano 2019) (GII, 2021).

Dessa maneira, como foi verificado no presente estudo, o desenvolvimento da área de biomateriais e sistemas de liberação controlada de fármacos é de grande relevância econômica e social. A produção científica mundial na área de biomateriais

está crescendo. Contudo, verificou-se que o Brasil não exerce um papel protagonista dentro da produção científica e patentária nessa área.

Será necessário, no entanto, a participação efetiva do governo para fomentar as parcerias entre a universidade e empresas a fim de diminuir o risco de investimento associado para inovar produtos e processos, visto que a maior inovação no Brasil está voltada para a melhora e substituição de maquinaria industrial.

Concluindo, é hora de acelerar o desenvolvimento tecnológico e aumentar a inovação para agregar valor à produção econômica nacional. De fato, a nação vem pagando um alto preço por sua falta de avanço tecnológico. À medida que a qualidade da pauta de exportação é deteriorada, a nação volta cada vez mais a ser exportadora de mercadorias com pouco valor agregado. O setor público carece tanto de maior eficiência quanto de menores custos, o que o torna incapaz de atender às demandas de maneira satisfatória. Estes são apenas alguns dos casos significativos que ilustram os desafios nacionais para afrontar.

De modo geral, o setor de serviços tem pouco valor agregado e pouca interação com o setor industrial. Internacionalmente os países têm interesse na produção de bens para a saúde no Brasil, o que pode gerar para o país oportunidades de geração de renda e melhora econômica interna.

## 2. CAPÍTULO 2 – Síntese e caracterização de andaimos de gelatina – HA contendo doxiciclina com potencial osteogênico

### 2.1. Introdução

Os tecidos humanos são compostos principalmente por células e uma matriz extracelular (MEC), a qual desempenha um papel fundamental ao fornecer uma rede forte e flexível ativando e estimulando funções celulares específicas, gerando um maior crescimento (BASSI *et al.*, 2020; PUTNAM; MOONEY, 1996).

No estudo para projetar novos tecidos biocompatíveis, o interesse por biopolímeros, ou polímeros feitos a partir de recursos naturais, tem aumentado devido às suas vantagens, incluindo citocompatibilidade e degradação não tóxica (PUGLIESE *et al.*, 2018). Os andaimos biopoliméricos são estruturas artificiais, naturais ou sintéticas com características físico-químicas e porosidade pré-determinadas (REDDY *et al.*, 2015).

Atualmente, na área de engenharia de tecidos (ET), diversas matrizes extracelulares (MEC) estão sendo exploradas, como filmes, nanopartículas, hidrogéis e estruturas 2D e 3D compostas por biopolímeros, para suas aplicações *in-vitro* e *in-vivo*. (ORYAN *et al.*, 2018; PUGLIESE *et al.*, 2018). No entanto, é necessário que a MEC artificial seja funcional mecanicamente e biologicamente, o critério dependerá da otimização do material para desempenhar suas funções específicas e da semelhança entre o tecido imitativo e o tecido humano (Kim *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2018).

A maioria dos materiais poliméricos que contribuem para o desenvolvimento de andaimos geralmente não fornecem as propriedades mecânicas e de degradação desejadas para a matriz. Portanto, um processo com "agentes de reticulação" ou "reticulantes" é realizado para melhorar as propriedades.

Além disso, a seleção de um biomaterial apropriado, o ajuste fino de sua microestrutura, sua eficácia biológica e as propriedades físico-químicas dos reagentes de reticulação são fatores importantes a serem considerados ao projetar materiais do



andaime (REDDY *et al.*, 2015). Por exemplo, a gelatina é um produto de hidrólise parcial do colágeno nativo e é caracterizada por sua não toxicidade, não carcinogenicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade; é amplamente utilizado em campos farmacêuticos e médicos, como materiais para curativos, andaimes de engenharia de tecidos e veículos de entrega de medicamentos (DONG *et al.*, 2021).

Os andaimes de gelatina têm uma estrutura 3D porosa que beneficia a adesão celular. No entanto, apresentam fraca resistência mecânica e de hidrólise. Para melhorar essas características, são estabilizados por reticulação do material, favorecendo também a sua estabilidade durante a implantação (YANG *et al.*, 2018).

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA), é um composto mineral natural que constitui o componente inorgânico da matriz óssea. Projetar um composto de gelatina com hidroxiapatita pode gerar maior estabilidade na fabricação em um andaime, como exemplo de um composto bifásico simples, o HA poroso pode ser revestido com gelatina para aumentar as propriedades mecânicas dos materiais e melhorar a liberação de fármacos (DRESSLER *et al.*, 2011)

O carregamento de medicamentos dentro dos andaimes é uma grande vantagem, pois o sistema material-medicação com administração local melhora significativamente a cicatrização e regeneração de novos tecidos.

Neste capítulo, é proposto o desenvolvimento e estudo de matrizes poliméricas híbridas reticuladas de gelatina e hidroxiapatita juntamente com doxiciclina, avaliando o potencial osteogênico *in-vitro* por meio do estímulo gerado na proliferação celular de pre-osteoblastos MC3T3.

## 2.2. Revisão da Literatura

### 2.2.1. Engenharia de tecidos (ET) e matriz extracelular (MEC)

Nos últimos anos, o campo da ET tem aumentado exponencialmente, tornando-se uma estratégia promissora para reparar cartilagens e tecidos ósseos danificados, para o qual é necessário um material biocompatível, biodegradável, com propriedades mecânicas estáveis, com a capacidade de promover a diferenciação celular, o transporte de fatores de crescimento, a adesão ao tecido nativo e a formação de novo tecido até a recuperação do tecido lesado (LIU *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Os tecidos humanos são compostos por células e uma MEC. A MEC, sendo o principal componente do microambiente celular, cumpre o papel fundamental de participar da maioria dos comportamentos celulares básicos, desde a proliferação, adesão e migração até a diferenciação e morte celular, o que torna o desenho da MEC artificial uma das principais linhas de pesquisa na área de ET (HYNES, 2009; KIM *et al.*, 2011; QI *et al.*, 2018).

As MECs artificiais são classificadas em dois tipos: MECs baseadas em polímeros naturais e aquelas baseadas em polímeros sintéticos. As MECs baseadas em polímeros naturais consistem em proteínas estruturais e funcionais, proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos encontrados no tecido natural. Os polímeros de origem natural utilizados apresentam vantagens sobre os polímeros de origem sintético, pois possuem excelentes propriedades biológicas, incluindo adesão celular, propriedades mecânicas semelhantes às dos tecidos naturais, biodegradabilidade e biocompatibilidade (KIM *et al.*, 2011; ROSSO *et al.*, 2005).

As MEC à base de polímeros sintéticos são geralmente fabricadas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para evitar a rejeição do órgão em relação ao corpo estranho, evitando assim uma reação crônica. Uma das vantagens desses materiais é sua grande capacidade de reprodução em alta escala, mantendo suas características mecânicas e tempo de degradação. No entanto, a principal desvantagem dos polímeros

sintéticos é a possível resposta pró-inflamatória após o implante, devido à falta de reconhecimento celular (KIM *et al.*, 2011; ROSSO *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Hidrogel

Os hidrogéis são redes poliméricas com poros de tamanho nano ou submicrônico, gerados pela gelificação de uma solução precursora de polímero (SLAUGHTER *et al.*, 2009). Devido à sua alta porosidade, teor de água semelhante ao tecido, injetabilidade, permeabilidade ajustável, degradabilidade e propriedades mecânicas, o hidrogel atraiu muita atenção como veículo de entrega celular (ZHU; MARCHANT, 2011). As principais características dos hidrogéis são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Principais características dos hidrogéis

<b>Composição polimérica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homopolimérica</li> <li>• Copolimérica</li> <li>• Multipolimérica</li> </ul>
<b>Fonte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Natural</li> <li>• Sintética</li> <li>• Híbrida</li> </ul>
<b>Reticulação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Química</li> <li>• Física</li> <li>• Enzimática</li> </ul>
<b>Configuração</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristalina</li> <li>• Semicristalino</li> <li>• Amorfo</li> </ul>
<b>Aparência física</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matriz</li> <li>• Filme</li> <li>• Microesfera</li> </ul>
<b>Carga elétrica da rede</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Iônica</li> <li>• Neutra</li> <li>• Eletrólito anfotérico</li> <li>• Zwitteriônico</li> </ul>

FONTE: A Autora

Os hidrogéis à base de polissacarídeos e proteínas são interessantes para aplicações biomédicas devido à sua capacidade de renovação, biodegradabilidade, biocompatibilidade e versatilidade (DASSANAYAKE *et al.*, 2016). No entanto, os hidrogéis devem apresentar estabilidade mecânica e química sob condições fisiológicas. A reticulação química e física são estratégias viáveis para conectar as cadeias de biopolímeros, melhorando a estabilidade química e mecânica do hidrogel (HU *et al.*, 2019; THAKUR *et al.*, 2018).

Em geral, o glutaraldeído (GA) é o agente de reticulação mais utilizado em hidrogéis, embora a toxicidade possa ser um problema (TAKIGAWA; ENDO, 2006). Derivados de carbodiimida, grupos fosfato, ácido bórico, acrilamidas, aldeídos e compostos epóxi também têm sido frequentemente usados para preparar materiais biomédicos (ALAVARSE *et al.*, 2022). As matrizes resultantes quando reticuladas com compostos derivados de carbodiimidias têm a vantagem de alta estabilidade mecânica, são menos tóxicas que o GA e os subprodutos são solúveis em água. (LI *et al.*, 2013).

Os hidrogéis têm sido usados como andaimes, proporcionando integridade estrutural às construções de tecidos, controlando a entrega de fármacos e proteínas a tecidos e culturas e servindo como adesivos ou barreiras entre as superfícies dos tecidos e os materiais. (SLAUGHTER *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Gelatina

A gelatina é um polímero de origem natural obtido por hidrólise parcial ácida ou alcalina ou por degradação térmica ou enzimática da proteína estrutural do colágeno animal (DONG *et al.*, 2021). Devido à sua origem natural, possui excelente biocompatibilidade e biodegradação. Quando comparada ao colágeno, a gelatina é barata e não gera antigenicidade *in vivo*. Além disso, a presença dos tripeptídeos Arg-Gly-Asp em sua estrutura interna promove a adesão, proliferação e diferenciação celular, o que torna o polímero uma opção muito versátil para uma ampla gama de aplicações biomédicas. (FAN; WANG, 2017; THEIN-HAN; XU, 2013).

Na indústria médica e farmacêutica, a gelatina é amplamente utilizada para a fabricação de hidrogéis, recipientes de nanoesferas e microesferas, nanofibras, aditivos

farmacêuticos, veículos de transplante de células, infusões intravenosas, microesferas de administração de drogas injetáveis e implantes. (ALIPAL *et al.*, 2019; GOMEZ-GUILLEN *et al.*, 2011).

Apesar de suas propriedades brilhantes, a gelatina possui baixa resistência mecânica e deve ser reticulada para manter as estruturas desejadas durante a manipulação e fornecer a resistência necessária no local de ação. Agentes de reticulação são introduzidos na gelatina por meio do uso de agentes químicos, como glutaraldeído (GA), carbodiimidias e genipina (GP); o uso de enzimas, como transglutaminase e tirosinases e métodos físicos, como tratamento desidrotérmico, e radiação ultravioleta (YANG *et al.*, 2018). No entanto, a reticulação física não é altamente recomendada, pois em temperaturas moderadamente altas a rede física perde sua estabilidade e se decompõe. (SAMADIAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2018).

Na área de sistemas de administração de fármacos, é possível modular a capacidade de carga e a cinética de liberação do fármaco variando o grau de reticulação e ajustando a interação eletrostática entre o fármaco e a gelatina por meio de uma seleção de diferentes tipos de gelatina (tipo A ou B, tipo A de pele de porco ou de pele de peixe e tipo B de bovino) (BAYDIN *et al.*, 2022). Independentemente da aplicação específica, os veículos à base de gelatina apresentam efeitos colaterais reduzidos em comparação com a administração de compostos livres, com perfil farmacocinético e eficácia farmacológica melhorados. (SANTORO *et al.*, 2014).

#### 2.2.4. Agente de reticulação Carbodiimida

Os compostos de carbodiimida são não tóxicos, são biocompatíveis e fornecem ligações amida de "comprimento zero" entre os grupos carboxílicos e amino (LAI, 2010; SKOPINSKA-WISNIEWSKA *et al.*, 2021). As carbodiimidias mais comumente usadas são 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N,N-dicicloexilcarbodiimida (CCD). EDC é um reticulante solúvel em água capaz de ativar grupos carboxila para produzir O-acilisourea sob condições ácidas. (KHUNMANEE *et al.*, 2017; NAKAJIMA; IKADA, 1995).

Embora os andaimes reticulados com carbodiimida tendam a ter propriedades mecânicas mais pobres, uma superfície mais macia e um menor tempo de degradação em comparação com os andaimes reticulados com GA, eles oferecem a vantagem de menor citotoxicidade do que o GA, e o excesso de reticulante é facilmente removido por lavagem com água ou por diálise (LAI, 2010; MA *et al.*, 2020; ORYAN *et al.*, 2018).

O pH ideal para ativar os grupos carboxílicos com EDC é em condições levemente ácidas. Em  $\text{pH} < 7$ , ocorre a protonação do EDC e a ionização dos grupos carboxila. A protonação do nitrogênio (na molécula EDC) reduz a densidade eletrônica do carbono e facilita o ataque nucleofílico por grupos carboxilato. Em um ambiente ácido, as amins primárias seriam protonadas e não reativariam o ataque nucleofílico (CAMMARATA *et al.*, 2015; SLUSAREWICZ *et al.*, 2010).

Cammarata, Hughes e Ofner, (2015) relataram que o excesso de carbodiimida em meio alcalino é indesejável para a formação de ligações amida, e Jafari-Sabet, Nasiri e Ataee, (2016) mostraram que o excesso de EDC piora as propriedades mecânicas dos andaimes.

A reticulação através da carbodiimida pode ocorrer em diferentes condições experimentais; a reticulação através da carbodiimida parece estar completa após 12 h, mas o tempo de reação relatado na literatura varia de 0,5 h a 48 h (MENEZES *et al.*, 2020; SEHGAL; VIJAY, 1994; ZHANG *et al.*, 2005). A reticulação pode ocorrer a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , à temperatura ambiente, ou a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas a síntese em temperaturas mais altas não foi encontrada (CLAASSEN *et al.*, 2017; KONDAVEETI *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2016). Portanto, a seleção de condições de reação adequadas é importante para obter reações de reticulação eficientes através da carbodiimida.

#### 2.2.5. Hidroxiapatita

Compósitos cerâmicos e andaimes são materiais de implante populares no campo da odontologia, ortopedia e cirurgia plástica. Para a engenharia de tecido ósseo, especialmente as cerâmicas ou cimentos de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  são materiais de implante adequados devido às suas propriedades osteocondutoras (KARAGEORGIU; Æ, 2005).

No geral, a alta densidade e a lenta biodegradabilidade das cerâmicas não são benéficas para fins de engenharia de tecidos. Para resolver esses problemas, a macroporosidade pode ser introduzida frequentemente em combinação com fatores de crescimento osteoindutivos e células (HABRAKEN *et al.*, 2007)

A hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) é uma cerâmica bioativa de fosfato de cálcio. Assemelha-se ao principal componente inorgânico do osso natural. É utilizada amplamente em várias aplicações biomédicas como terapia gênica, medicina regenerativa, sistema de liberação de fármacos e engenharia de tecidos, devido à sua excelente biocompatibilidade, osteocondutividade, estabilidade química e bioatividade (NIHMATH; RAMESAN, 2017; SHAKIR *et al.*, 2015).

O fenômeno da bioatividade da HA é baseado na adsorção de íons de cálcio e fosfato (e, em menor grau, alguns outros, como íons de magnésio) de meios circundantes, como fluidos de tecidos, fluidos corporais simulados (SBF) ou meios de cultura em cultura celular *in-vitro* (ZALEWSKA *et al.*, 2022). Os íons de cálcio interagem com a HA carregado negativamente. Este complexo atrai íons fosfato levando à precipitação de apatita amorfa de baixa solubilidade na superfície da HA (KIM, H. *et al.*, 2005). O fenômeno é maior no caso de hidroxiapatitas altamente porosas e em nanoescala, por possuírem uma maior área de superfície de contato nos poros (KLIMEK *et al.*, 2016).

No entanto, a hidroxiapatita sintetizada pelo método de precipitação possui baixa cristalinidade, baixa solubilidade e baixa processabilidade, o que limita muito sua aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Portanto, materiais poliméricos tem sido incorporados à hidroxiapatita sintética para fabricar a estrutura óssea (FENG *et al.*, 2020). Além disso, vários estudos mostraram que a HA ou seus derivados podem ser explorados como um composto modelo para estudar a biomineralização no corpo humano (EIDEN-ASSMANN *et al.*, 2002; IJIMA *et al.*, 2006; JEE *et al.*, 2011).

Técnicas de fabricação mais avançadas foram empregadas, nas quais nanopartículas de HA foram precipitadas dentro de redes de gelatina para formar andaimes capazes de entrega de fármacos. Os nanocompósitos resultantes tinham alta

porosidade (~ 90%), uma estrutura ordenada e, o mais importante, a capacidade de controlar a entrega de antibiótico (tetraciclina) através da densidade de reticulação de gelatina e quantidade de proteína de incorporação de HA (Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: Characterization and antibiotic drug release KIM, H. W. *et al.*, 2005).

#### 2.2.6. Doxíciclina

A doxíciclina é um antibiótico derivado da oxitetraciclina, especificamente é uma tetraciclina semissintética de segunda geração, que afeta bactérias gram-positivas e gram-negativas e alguns parasitas, e é frequentemente utilizada no tratamento de infecções bacterianas (CAO *et al.*, 2022; HAFEZI MOGHADDAM *et al.*, 2020). É altamente atraente devido à sua baixa toxicidade e por ser uma das tetraciclinas mais eficientes contra infecções do sistema nervoso central (NAU; SO, 2010). Além disso, a doxíciclina possui outras atividades farmacológicas que a tornam um potencial candidato à reutilização terapêutica, em particular para neuro proteção celular (BORTOLANZA *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA *et al.*, 2017).

Também tem sido usado na regeneração óssea. El-habashy *et al.*, (2021) desenvolveram andaimes utilizando misturas biopoliméricas de gelatina, álcool polivinílico e ácido hialurônico e integrados com nanopartículas compostas de doxíciclina/hidroxiapatita/policaprolactona (DX/HA/PCL) por impressão 3D. Por meio de uma análise de disseminação celular, tomografia computadorizada e histomorfometria em modelo tibial de coelho confirmaram a osteocondução, biorreabsorção, imunotolerância e potencial regenerativo ósseo.

Outros estudos, como o realizado por Sun *et al.*, (2009) demonstraram que a doxíciclina, juntamente com outros fármacos antitumorais, pode ter efeitos antitumorais sinérgicos, inibindo proteínas antiapoptóticas, como a proteína X associada a Bcl-2 (BAX), bem como inibindo proteínas envolvidas na angiogênese e na migração de células tumorais, como a interleucina-8 (IL-8) e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9).



### 2.3. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar andaimes biomiméticos a partir de matrizes poliméricas híbridas de gelatina com hidroxiapatita, e testar a incorporação da doxiciclina para avaliar o potencial osteogênico.

### 2.4. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de HA pura na rede de gelatina;
- Reticular os hidrogéis de HA – gel com e sem doxiciclina;
- Caracterizar físico-quimicamente os andaimes de HA – Gel por porosimetria, Microscopia Eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG/DTG), difração de raios X (DRX) e Espectroscopia de absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR);
- Avaliar as alterações de pH, a capacidade de swelling, degradação e biodegradação enzimática dos andaimes;
- Avaliar o efeito do reticulante do carregamento da doxiciclina nos andaimes;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* de doxiciclina associada aos andaimes;
- Avaliar a concentração mínima inibitória da doxiciclina frente a *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos andaimes em cultura celular de fibroblastos de camundongo (L929) e pre-osteoblastos de camundongo (MC3T3);
- Avaliar a adesão e proliferação dos pré-osteoblastos de camundongo (MC3T3) sobre os andaimes;

## 2.5 Materiais e métodos

Os materiais utilizados são descritos a seguir;

### 2.5.1. Reagentes utilizados

---

#### Fosfato de Amônio monobásico

---

Fórmula molar:  $(\text{NH}_4)\cdot\text{H}_2\text{PO}_4$  p.a.,  $\geq 99,0\%$  (RT)

Massa molar: 115.03

Fabricante: Dinâmica

Lote: 98043

---

#### Nitrato de Cálcio tetra hidratado

---

Fórmula molar:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  p.a.,  $\geq 99,0\%$  (RT)

Massa molar: 236.15

Fabricante: Dinâmica

Lote: 118968

---

#### Gelatina bovina tipo B

---

Aspecto: pó amarelo-claro

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: G6650

---

#### Cloridrato de 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) -n'- etilcarbodiimida

---

Fórmula molar:  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$  p.a.,  $\geq 99,0\%$  (RT)

Massa molar:  $191,70 \text{ g mol}^{-1}$

Aspecto: pó branco creme

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: E7750 – 5G

---

### Doxiciclina

---

Fórmula molar:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  p.a.,  $\geq 99,0\%$  (RT)

Massa molar: 444,4 g/mol

Aspecto: Pó amarelo

Fabricante: Araújo farmácia de manipulação; sobre demanda

---

### Outros Reagentes

---

Hidróxido de amônio, acetona, água destilada, água MiliQ, PBS.

#### 2.5.3. Métodos

##### 2.5.3.1. Síntese do compósito de hidroxiapatita – gelatina

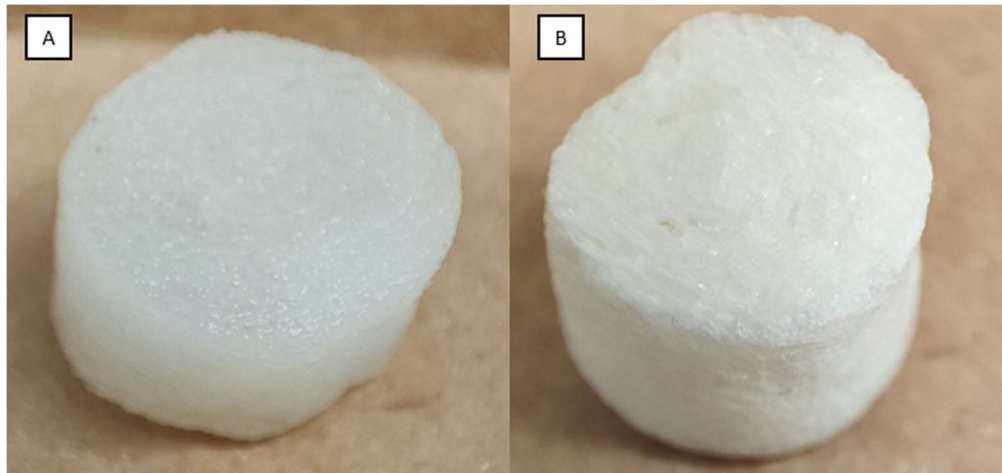
A síntese dos nanocompósitos de hidroxiapatita e gelatina, contendo doxiciclina, foi desenvolvida com base nos protocolos propostos por KIM, KNOWLES E KIM, (2005).

A primeira solução foi feita com fosfato de amônio monobásico  $[(\text{NH}_4) \cdot \text{H}_2\text{PO}_4]$  em água deionizada [0.27 M], com adição de 5% (P/V) de gelatina tipo B (bovina) em pó sob agitação durante uma hora a uma temperatura de 45°C, acabado o tempo de agitação, ajusta-se o pH para 10 com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 25%.

A segunda solução foi preparada usando-se nitrato de cálcio tetra hidratado  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em água deionizada [0.55 M] com adição de 5% P/V de gelatina tipo B em pó sob agitação durante uma hora a uma temperatura de 45°C. Os precursores de Ca e P foram dissolvidos em água destilada separadamente, na razão  $\frac{[\text{Ca}]}{[\text{P}]} = 1,67$ .

Em seguida, verteu-se cuidadosamente, gota a gota, a primeira solução (fosfato de amônio) sobre a segunda solução (nitrato de cálcio). Este processo foi feito mantendo agitação vigorosa e temperatura à 45°C por 24 horas. Nesta fase, a solução final foi congelada na geladeira a -8°C para armazenamento.

Figura 14. Imagens dos andaimes de gelatina – HA húmida (A) e seca (B)



#### 3.5.3.2. Preparação dos andaimes porosos para o estudo de quantidade ótima de reticulante

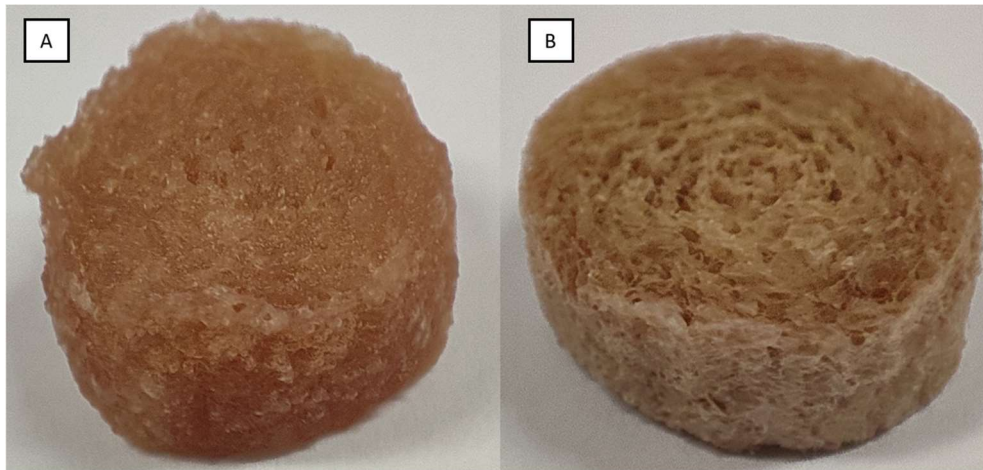
A solução de HA – gel congelada foi liofilizada por 72 h. A partir de testes preliminares para manter as estruturas dos poros e comparar as propriedades físico-químicas, mecânicas e de liberação do fármaco a partir dos materiais foi fixada a proporção de andaime para solvente em 1% (*p/v*) e 5% (*p/v*), a quantidade de fármaco foi fixada em 0.7% (*p/v*) e a quantidade do agente de reticulação variou de 0.1% (*p/v*) a 1.0% (*p/v*) em relação ao solvente. O solvente utilizado foi à base de acetona e água (4:1 *vol*) a uma temperatura de 4°C por 24 h.

Ao final do tempo de reticulação, as amostras foram completamente submersas em etanol 96% por 1 hora, seguida de etanol 70% por 30 minutos e enxaguadas com água destilada três vezes para remover os resíduos químicos e neutralizar o pH dos andaimes. Ao final da lavagem, as amostras foram novamente congeladas a -20°C por

24 h e liofilizadas durante 48 h obtendo andaimes porosos reticulados para a realização do estudo da quantidade do agente de reticulação ótima.

Foi utilizado o Liofilizador Savant Mdulyo D-Freeze Dryer, Thermo Electron Corp do Laboratório de Química Inorgânica do Departamento de Química da UFMG para a secagem dos andaimes

Figura 15. Imagens dos andaimes de gelatina – HA com Doxiciclina húmida (A) e seca (B)



### 2.5.3.3. Preparação dos andaimes porosos de nanocompósitos e carregamento de fármacos

A solução de HA – gel armazenada foi levada durante 24 h a uma temperatura abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  e foi liofilizada por 72 h. A proporção de andaime para solvente foi fixada em 1% ( $p/v$ ) e 5% ( $p/v$ ) a partir de testes preliminares para manter as estruturas dos poros e comparar as propriedades físico-químicas, mecânicas e de liberação do fármaco a partir dos materiais. A quantidade de agente de reticulação foi fixada em 0.7% ( $p/v$ ) e a quantidade de fármaco variou de 0.3% ( $p/v$ ) a 1.2% ( $p/v$ ) em relação ao solvente, para o qual foi utilizado um solvente à base de acetona e água (4:1 *vol*) a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

Ao final do tempo de reticulação, as amostras foram completamente submersas em etanol 96% por 1 hora, seguida de etanol 70% por 30 minutos e enxaguadas com água destilada três vezes para remover os resíduos químicos e neutralizar o pH dos andaimes. Ao final da lavagem, as amostras foram novamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por

24 h e liofilizadas durante 48 h obtendo andaimes porosos reticulados para a realização dos testes de caracterização e testes in vivo. A identificação dos andaimes compostos está resumida na Tabela 8.

Tabela 8. Composição dos compósitos preparados

<b>Identificação</b>	<b>Composição</b>
<b>Hidrogel Gelatina - HA</b>	HA e gelatina não reticuladas
<b>Andaime 1</b>	HA, gelatina e EDC (1% (p/v))
<b>Andaime 1.1</b>	Andaime 1 e doxiciclina (0.3% (p/v))
<b>Andaime 1.2</b>	Andaime 1 e doxiciclina (0.7% (p/v))
<b>Andaime 1.3</b>	Andaime 1 e doxiciclina (1.2% (p/v))
<b>Andaime 2</b>	HA, gelatina e EDC (5% (p/v))
<b>Andaime 2.1</b>	Andaime 2 e doxiciclina (0.3% (p/v))
<b>Andaime 2.2</b>	Andaime 2 e doxiciclina (0.7% (p/v))
<b>Andaime 2.3</b>	Andaime 2 e doxiciclina (1.2% (p/v))

Os andaimes contendo o fármaco foram utilizados apenas para os testes in vitro, devido que a concentração utilizada é muito baixa, gerando uma diferença biológica, mas não físico-química ou mecânica no material. Para os testes in vitro, os andaimes foram esterilizados por várias lavagens com álcool 70%, seguidas de 30 minutos sob luz UV de cada lado.

#### 2.5.3.4. Caracterização físico-química dos andaimes

##### 2.5.3.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos andaimes foi estudada por MEV, As imagens de varredura foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura - FEI Quanta 200 FEG do Centro de Microscopia da UFMG, onde foi usada uma tensão de aceleração de 15 kV e magnificações de até 5000x. As análises do MEV foram realizadas juntamente com a análise de EDS (espectroscopia de raios X por energia dispersiva) para cada material, o

qual forneceu informação qualitativa sobre o teor da composição dos componentes químicos nas amostras.

#### 2.5.3.4.2. Difração de raios-X (DRX)

A difração de raio-X foi realizada para determinar o grau de cristalização dos cristais de hidroxiapatita sintetizados dentro da rede da gelatina, utilizando-se tubo de cobre e radiação de  $\text{CuK}\alpha=1,54051 \text{ \AA}$ , operando a 30 kV e 30 mA, com variação do ângulo  $2\theta$  de 20 a 70 graus e uma taxa de varredura de  $2\theta.\text{min}^{-1}$ , do difratômetro SHIMADZU, XRD7000 X-RAY, do Departamento de Química da UFMG. Os perfis de difração foram plotados no programa OriginPro 2022b.

#### 2.5.3.4.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho foi realizada para verificar os grupos funcionais dos andaimes contendo HA, Gelatina e EDC. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum GX situado no Laboratório de Espectrometria de massas do Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram obtidos a partir de pastilhas de KBr na região de  $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ , e a intensidade dos picos nos espectros indica o material. Os espectros foram gerados utilizando o programa OriginPro 2022b.

#### 2.5.3.4.4. Análise Térmica (TG)

As curvas de TG/DTG foram obtidas no equipamento TA Instruments, Modelo SDT Q600 do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais LEMB/DQ-UFMG. As amostras foram postas em cadinhos de Alumina com uma massa entre 5 e 10 mg. Os parâmetros de operação do equipamento foram: Fluxo de Nitrogênio de  $100 \text{ mL. min}^{-1}$ , sob uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $600^\circ\text{C}$ . Foi utilizado em média 5 mg das amostras para cada análise. Os dados obtidos foram plotados no programa *OriginPro 2021b*.

A partir das análises foi possível determinar o perfil térmico dos materiais dos compósitos. Os gráficos foram analisados usando o software OriginPro 2022b para caracterizar a perda de massa.

#### 2.5.3.4.5. Porosidade Total

A porosidade dos andaimes foi determinada por meio das densidades real e aparente.

A determinação da densidade real é realizada com um picnômetro de He, cujo raio atômico é tão pequeno que pode penetrar na porosidade aberta dos andaimes.

A densidade aparente foi determinada a partir de um picnômetro volumétrico de 10 ml e a massa dos andaimes conhecida. Inicialmente foi pesado o picnômetro vazio, depois o picnômetro preenchido com mercúrio e por último preenchido com a amostra e mercúrio. A densidade aparente foi determinada utilizando a Eq (1)

$$\rho_{aparente} = \frac{m_1}{(m_1 + m_2) - m_3} \quad Eq. (1)$$

$m_1$  = massa conhecida do andaime

$m_2$  = massa do picnômetro preenchido com mercúrio

$m_3$  = Massa do picnômetro com preenchido com mercúrio e o andaime  $m_1$

Com ambas as densidades calculadas, a porosidade total foi calculada, usando a fórmula:

$$PT(\%) = \left(1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{real}}\right) * 100 \quad Eq (2)$$



#### 2.5.3.4.6. Variação de pH

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Lu, Wei e Yan, (2011). As medidas de pH foram realizadas com a amostra de cada andaime imersa em 10 ml de Solução Tampão de Fosfato (PBS), com incubação a 37°C e agitação vigorosa.

O valor do pH para cada amostra foi medido nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos e após cada 24h por 5 dias, usando pHmetro (MS TECNOPON, mPA-210, Brasil). O PBS foi substituído diariamente após cada medida de pH. Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos pela média das medidas de cada amostra.

#### 2.5.3.4.7. Teste de Swelling

Para estudar a capacidade de intumescimento dos andaimes, o teste de Swelling foi realizado de acordo com a metodologia de HAMZA *et al.*, (2020).

Três amostras de cada grupo de andaimes foram pesados, separados e colocados em PBS (pH 7,5) a 37°C. Nos tempos experimentais 30 min, 1 h, 3 h, 5h, 7h, 10 h, 24 h, 48 h e 72 h. Os andaimes foram retirados do PBS, colocados em papel de filtro por 1 segundo para remover a água da superfície e depois pesados. A razão de intumescimento foi calculada usando a Eq. (3) e foi expresso como média  $\pm DP$  ( $n = 3$ ). (desvio padrão)

$$\% \text{ swelling} = \left[ \frac{(W_t - W_i)}{W_i} \right] * 100 \quad (\text{Eq 3})$$

$W_i$  = Massa de cada andaime liofilizado antes de submergir em solução de PBS

$W_t$  = Massa de cada andaime após a remoção do PBS

### 3.5.3.4.8. Degradação dos andaimes

A degradação dos andaimes à base de gelatina foi estudada segundo metodologia adaptada de NINAN *et al.*, (2013).

Três amostras de cada grupo de andaimes foram pesadas, separadas e colocadas em PBS (pH 7,5) a 37°C. Nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias. Os andaimes foram retirados do PBS, lavados em água deionizada e liofilizados. A massa seca do andaime foi registrado. A porcentagem de degradação foi calculada usando a Eq. (2) e foi expresso como média  $\pm DP$  ( $n = 3$ ).

$$\% \text{ degradação} = \left[ \frac{(W_0 - W_1)}{W_1} \right] * 100 \quad (\text{Eq 4})$$

$W_0$  = Massa de cada andaime liofilizado antes de submergir em solução de PBS

$W_1$  = Massa de cada andaime após a remoção do PBS

### 2.5.3.4.9. Biodegradação *in-vitro* dos andaimes

A degradabilidade enzimática dos andaimes foi avaliada com a enzima colagenase tipo I, com estudo através do monitoramento da perda de massa durante o período de incubação. Os testes foram realizados de acordo com a metodologia adaptada de NG; ZHANG; PRABAKAR, (2020).

Amostras de aproximadamente 5 mg dos andaimes liofilizados e esterilizados foram incubadas a 37 °C sob agitação (60 rpm) em 2 mL de uma solução enzimática. A solução enzimática foi preparada dissolvendo colagenase tipo I (200 U/mg, 17100-017, GIBCO™) em tampão Tris/HCl 50 mM contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 7,4). até uma concentração de 30 U/mL.

As amostras foram incubadas por 6 horas, 1, 2, 3, 4 e 7 dias. Após cada período, elas foram retiradas das soluções, colocadas em papel de filtro por 1 segundo para

remover a água da superfície e depois pesados. A taxa de perda de massa foi definida pela Eq (4).

#### 2.5.3.4.10. Estudo de reticulante

O estudo da quantidade de agente de reticulação foi realizado para determinar a % ( $p/v$ ) ideal de agente de reticulação necessária nos andaimes, garantindo a absorção ideal do fármaco, sem a necessidade de usar muito agente de reticulação. Para este teste, foram utilizados andaimes reticulados com diferentes concentrações de agente de reticulação e uma concentração fixa do fármaco.

Em triplicata, 20 mg de andaimes foram colocados em 2 ml de PBS. Em seguida, as soluções foram mantidas sob agitação em uma incubadora a 37.5 °C. Nos períodos de 0, 1.5, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas, os 2 ml de líquido foram removidos e substituídos por PBS novo. As alíquotas foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis a 270 nm para doxiciclina, usando um controle branco de PBS.

Para a determinação das concentrações de doxiciclina, foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas, usando PBS como branco. Foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 270 nm.

Após a obtenção das absorbâncias, a quantidade total de doxiciclina liberada em cada porcentagem de reticulante utilizado foi determinada e a curva de adição de reticulante foi feita sobre a porcentagem do solvente VS a quantidade de fármaco capturada sobre a porcentagem da massa dos andaimes.

#### 2.5.3.4.11. Estudo de liberação de doxiciclina

O estudo da liberação controlada da doxiciclina nos andaimes foi realizado para conhecer a cinética da liberação do fármaco. Em triplicata, 20 mg de andaimes foram colocados em 2 ml de PBS. Em seguida, as soluções foram mantidas sob agitação em uma incubadora a 37.5 °C. Nos períodos de 0, 1.5, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 36, 48, 72 horas, os 2 ml de líquido foram removidos e substituídos por PBS novo. As alíquotas foram

analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis a 270 nm para Doxiciclina, usando como controle branco PBS. Foi selecionada a longitude de onda de 270 nm devido a que o laboratório já tinha estudos onde foi definido esse valor como o padrão.

Para a determinação das concentrações de Doxiciclina, foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas, usando PBS como branco. Foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 270 nm.

#### 2.5.3.5. Estudos in vitro

##### 2.5.3.5.1. Análise antimicrobiana

As propriedades antibacterianas dos andaimes foram investigadas em subculturas de cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 29213) cultivados em aerobiose, no caldo *BHI*, a 37°C por 24 horas. Para atingir a densidade óptica (OD600) e 0,08 de absorbância em espectrofotômetro (cerca de  $1 \cdot 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL).

Para o teste, 10 mg de amostra foram pesados e submersos em 1 ml de caldo *BHI*, e incubados por 24 horas a 37 °C. Após o período de incubação, Foi feito com uma diluição inicial de 50 vezes, e nesta diluição inicial foi feita uma diluição de 2:1 por 6 vezes. 50 µL do cada eluato, foram adicionados, em triplicata na placa, junto com 50 µl de bactéria e incubados durante 24 h. Após o período de incubação, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 600 nm para encontrar a faixa de inibição bacteriana. Em seguida, foram adicionados 50 µl de reagente de XTT, preparado com uma concentração  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , dissolvido em PBS. As placas foram protegidas da luz devido à fotossensibilidade do XTT. Depois de 3 horas de incubação à 37 °C, para formação dos cristais vermelhos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 490 nm.

O crescimento bacteriano foi representado em porcentagem, sendo 100% a leitura obtida de bactérias com crescimento livre e 0% ou controle com clorexidina no espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 490 nm.

#### 2.5.3.5.2. Cultivo de células

Os fibroblastos de camundongo (L929) e pré-osteoblastos (MC3T3) foram cultivados em garrafas contendo DMEM High Glucose (4500 mg.L<sup>-1</sup>), suplementados com 10% de SFB, 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 unidades.mL<sup>-1</sup>/estreptomicina 10 mg.mL<sup>-1</sup>), 1% L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais. Todas as células foram incubadas em estufa umidificada contendo CO<sub>2</sub> a 5%, e uma T de 37.5 °C.

#### 2.5.3.5.3. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através do teste colorimétrico MTT (brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio), utilizado para determinar a viabilidade celular por meio da atividade da enzima redutase mitocondrial em células vivas.

Com uma confluência de 80%, as células foram lavadas com PBS e seguidamente tripsinizadas com tripsina/EDTA 0.25% durante 4 minutos e transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 6x10<sup>3</sup> células/poço, cada placa foi incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o teste, 10 mg de amostra foram pesados e submersos em 1 ml de meio de cultura celular não suplementado, e incubados por 24, 48 e 72 horas a 37 °C, e 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada período, foi feita uma diluição de cada eluato, com uma relação (1:1) usando 300 µL do eluato inicial e 300 µL de meio, obtendo assim um segundo eluato de 5 mg/ml. 100 µL do cada eluato, foram adicionados, em quintuplicada na placa, e incubados durante 24 h. Após o período de incubação, as placas foram lavadas duas vezes com solução de PBS estéril, o meio foi trocado para DMEM low glucose sem vermelho de fenol acrescido do 10 µl de reagente de MTT, com uma concentração 5

mg.mL<sup>-1</sup>, dissolvido em PBS. As placas foram protegidas da luz devido à fotossensibilidade do MTT. Depois de 4 horas de incubação à 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, para formação dos cristais azuis de formazam, foi adicionado 50 µl de solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS). Ao completar 15 minutos em agitação, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 570 nm. A citotoxicidade foi calculada usando a Eq. (3), o grupo controle corresponde as células sem tratamento.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \left[ \frac{\text{Absorbância testada}}{\text{Grupo controle}} \right] * 100\% \quad (\text{Eq 3})$$

Para encontrar a porcentagem de células viáveis, foi considerado o grupo controle com 100% de viabilidade. A citotoxicidade celular foi classificada de acordo com o Padrão Internacional de Organização (ISO 10993-5), descrita em (XIAO *et al.*, 2018), onde os graus 0 e 1 representam não citotoxicidade e, os graus 2, 3, 4 e 5 representam diferentes níveis de citotoxicidade:

Tabela 9. Graus de citotoxicidade

<b>Grau</b>	<b>Viabilidade celular</b>
<b>0</b>	≥ 100%
<b>1</b>	≤ 99%
<b>2</b>	≤ 75%
<b>3</b>	≤ 49%
<b>4</b>	≤ 25%
<b>5</b>	= 0

#### 3.5.3.5.4. Teste de adesão e morfologia celular

O teste de adesão celular foi realizado utilizando a metodologia adaptada de BEGAM *et al.*, (2017).

Neste caso, o teste foi realizado com células pré-osteoblásticas MC3T3. De início, as amostras de cada um dos andaimes foram colocadas em triplicata, em poços de placa de 24 poços. Em cada poço,  $1 \times 10^6$  células foram semeadas gota a gota e a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, 300 µL do meio de cultura específico foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, por 2 e 4 horas. Após cada um dos tempos, a adesão celular foi avaliada coletando o meio de cultura de cada poço e contando o número de células presentes no sobrenadante. O número de células aderidas foi quantificado subtraindo o número de células em suspensão da concentração inicial de células semeadas.

Para a observação da morfologia celular sobre o material, as amostras de hidrogel semeadas com as células MC3T3 foram lavadas com PBS estéril duas vezes, no tempo experimental 3 dias. Então, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> por 4 horas. Após a remoção do fixador foi adicionado o tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. As amostras em tampão foram enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG, onde foram realizadas as etapas de fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> e metalização de espessura 10 nm, para a posterior análise em MEV FIB Quanta 200 FEG 3D.

#### 2.5.3.6. Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados com um mínimo de três repetições, e os resultados foram obtidos em experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas através de Análise de variância – ANOVA.

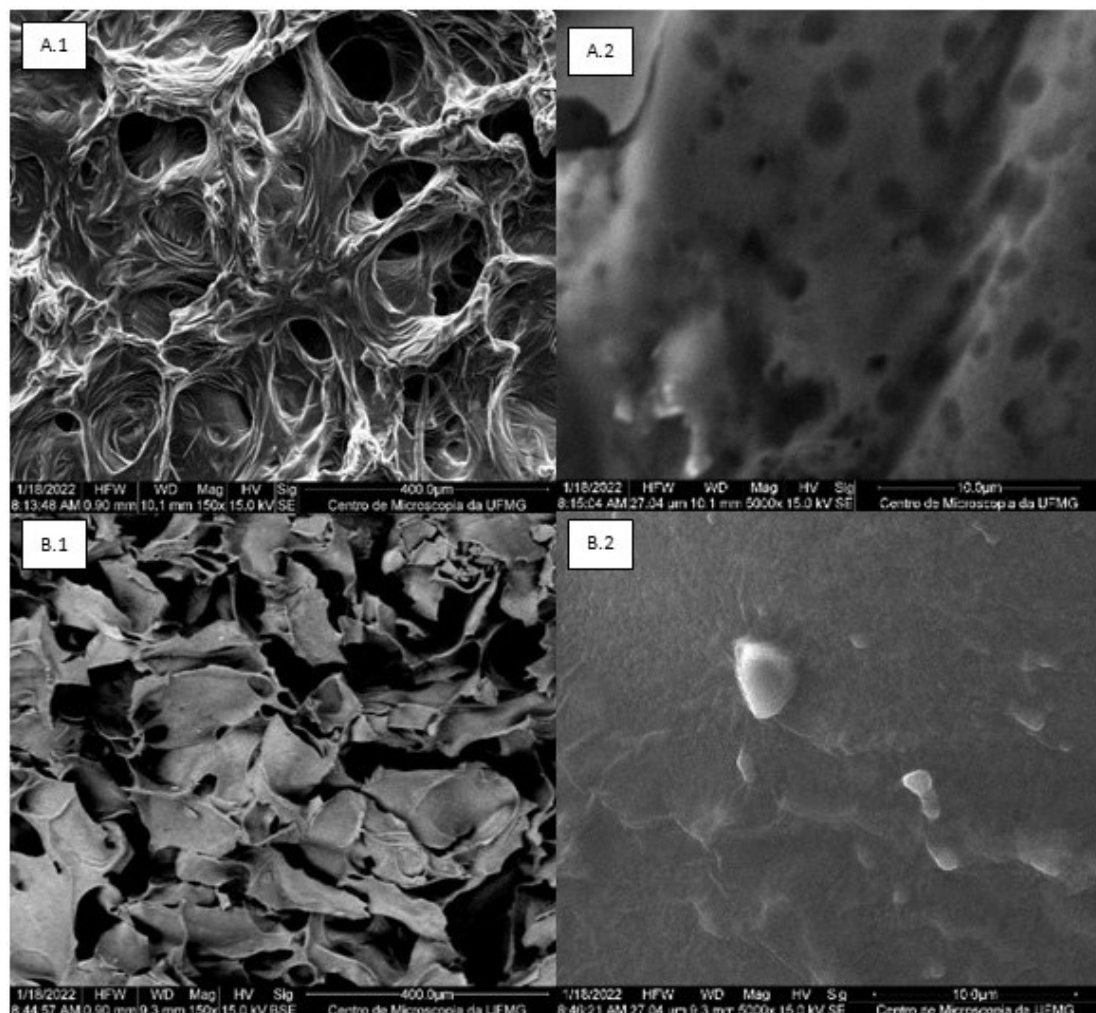
## 2.6. Resultados

### 2.6.1. Caracterização físico-química dos andaimes

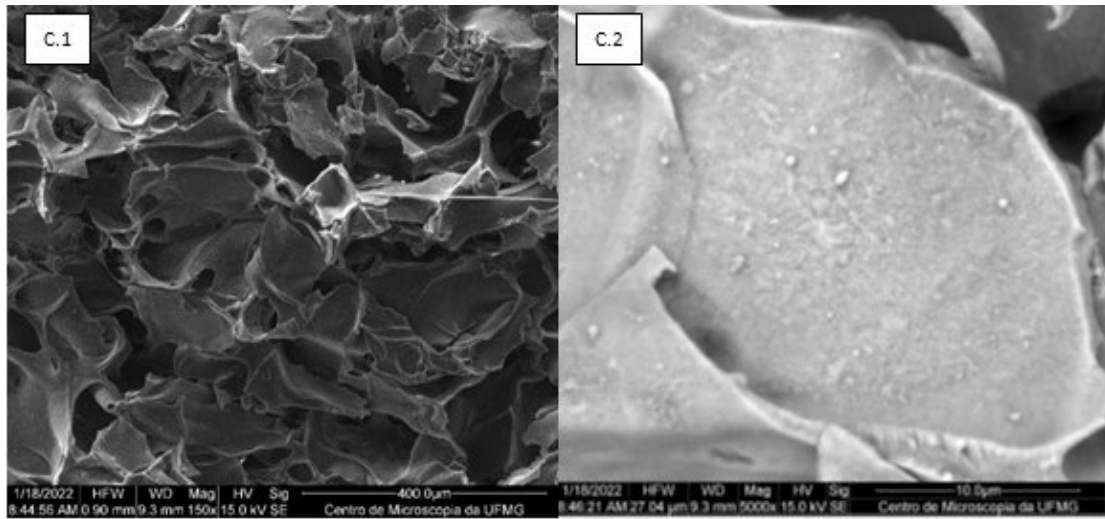
#### 2.6.1.1. Morfologia dos Andaimes

A morfologia do hidrogel de gelatina – HA sem reticular, e dos andaimes foi avaliada por MEV. As micrografias estão apresentadas na Figura 14. A caracterização EDS semi-qualitativo está apresentada na Figura 15. Estruturalmente, não há mudanças ou variações significativas entre os dois tipos de andaimes reticulados.

Figura 16. Micrografias MEV sendo apresentado Hidrogel de gelatina – HA sem reticular na magnitude de 150X (A.1) e 5000X (A.2) Andaime 1. reticulado na magnitude de 150X (B.1) e 5000X (B.2) e Andaime 2. reticulado a 400  $\mu\text{m}$  (C.1) e 10  $\mu\text{m}$  (C.2)





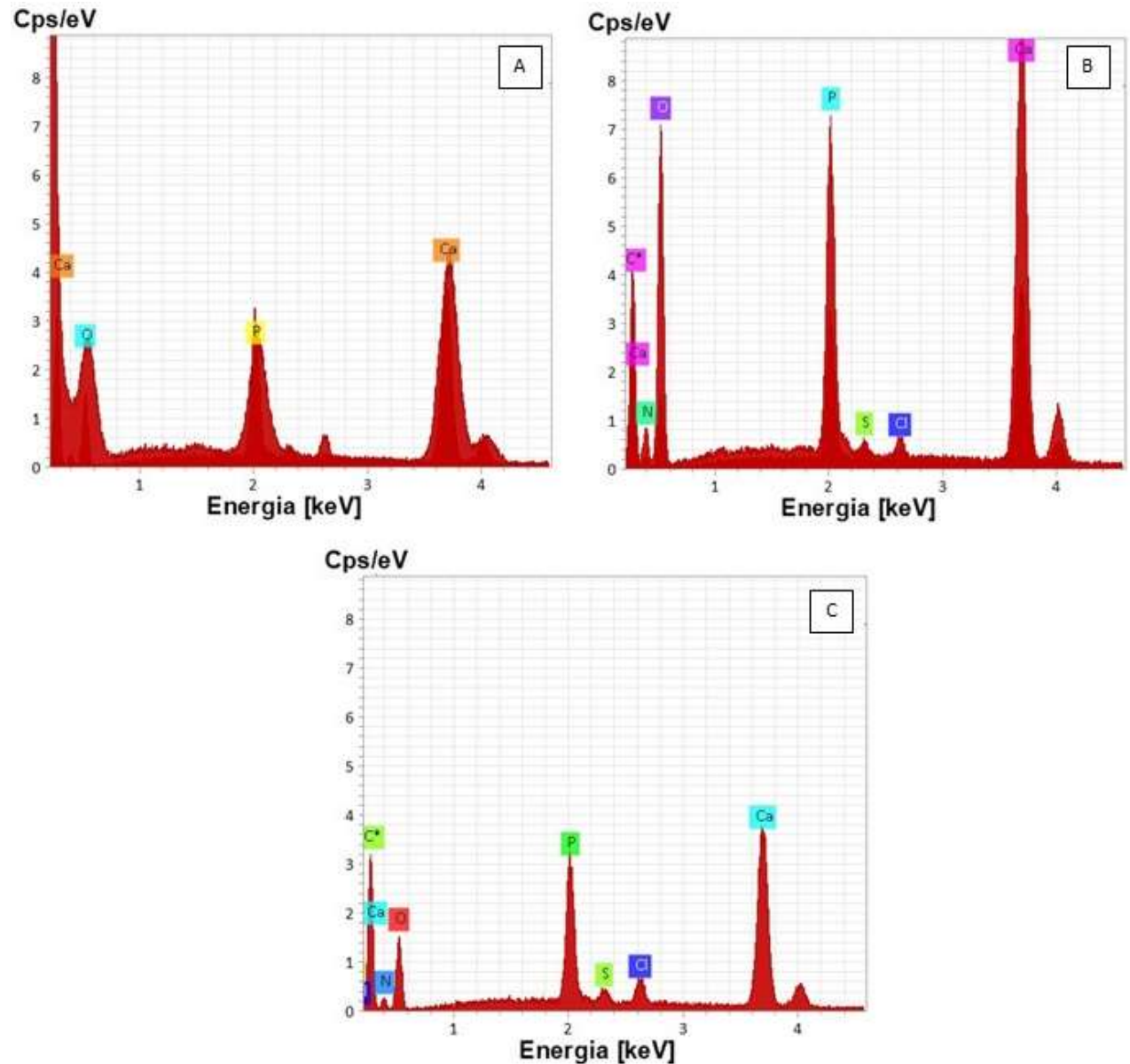


Micrografias dos compósitos obtidas no microscópio eletrônico de varredura, FIB Quanta 200, para análise da morfologia de superfície  
A. Hidrogel de gelatina – HA sem reticular. B. Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*) e C. Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*).

Barra de escala 400  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ .

FONTE: CM-UFMG

Figura 17. Caracterização por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) sendo apresentado Hidrogel de gelatina – HA sem reticular (A) Andaime 1. reticulado (B) e Andaime 2. reticulado (C)



EDS dos compósitos, para análise semi-qualitativo dos elementos químicos presentes nas amostras

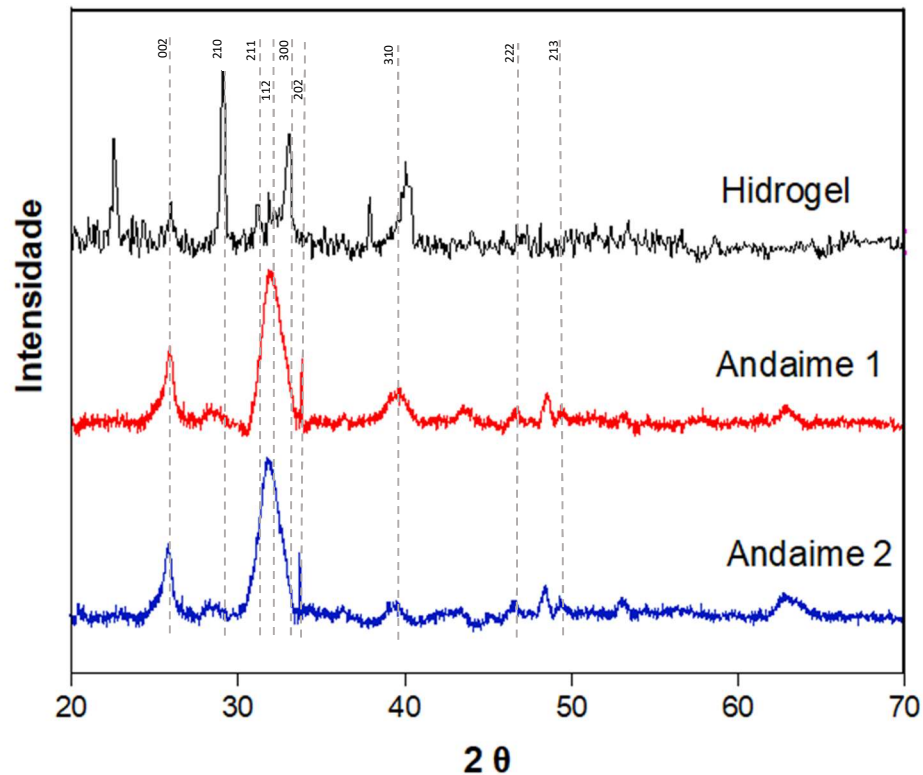
A. Hidrogel de gelatina – HA sem reticular. B. Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*) e C. Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*).

FONTE: CM-UFMG

### 2.6.1.2. Difração de raios-X

Os difratogramas de DRX estão apresentados na Figura 16. Os quais indicam a presença de picos característicos de HA.

Figura 18. Difratogramas de raios-X do hidrogel e os andaimes reticulado



Análise da estrutura e cristalinidade da hidroxiapatita sintetizada dentro da rede de gelatina por meio da difração de raio-X

A. Hidrogel de gelatina – HA sem reticular. B. Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*) e C. Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*).

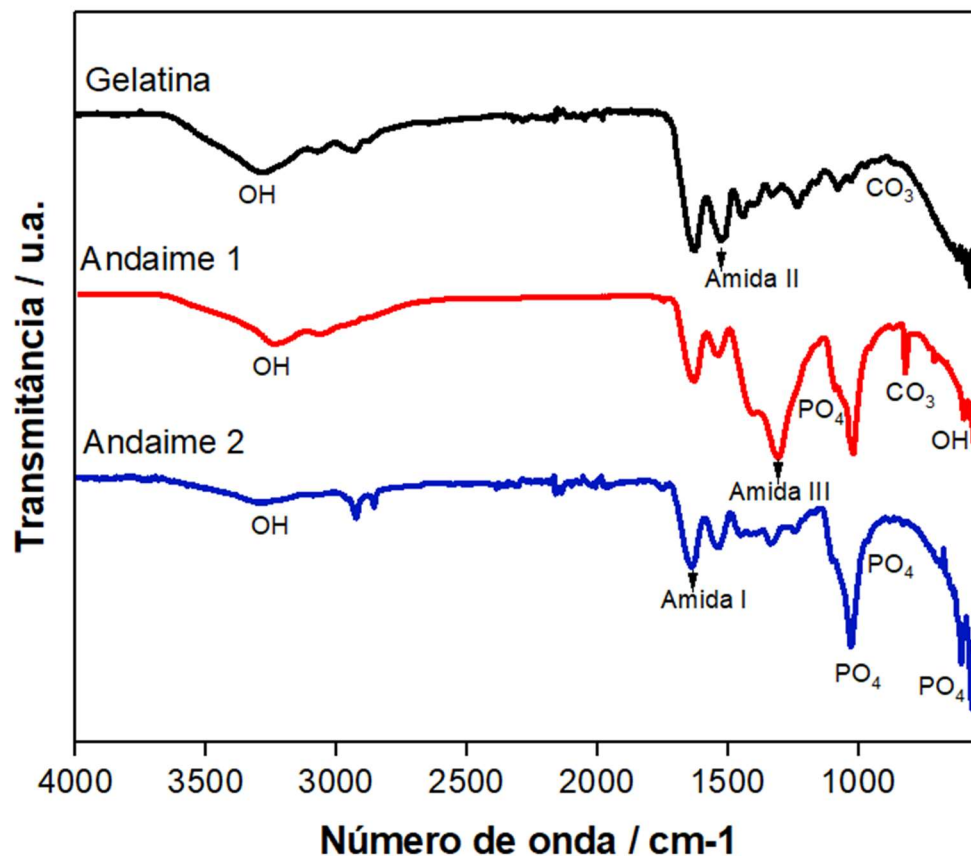
FONTE: A autora, 2022

Analisando os difratogramas, verificam-se picos de difração característicos da hidroxiapatita em  $25.68^\circ$ ,  $28.85^\circ$ ,  $31.78^\circ$ ,  $32.12^\circ$ ,  $32.81^\circ$ ,  $33.85^\circ$ ,  $39.77^\circ$ ,  $46.71^\circ$  e  $49.40^\circ$ , que podem ser associados aos planos *hkl* de 002, 210, 211, 112, 300, 202, 310, 222, e 213 correspondentes ao grupo espacial P63/m da estrutura hexagonal centrossimétrica de acordo com a carta cristalográfica (PDF # 01-074-0565).

### 2.6.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (*FT – IR*)

O *FT – IR* foi realizado para investigar os principais grupos funcionais presentes na gelatina e seus compósitos com HA, as informações estão representadas na Figura 17.

Figura 19. Espectros de absorção na região de infravermelho da gelatina e seus compósitos com HA.



Análise dos grupos funcionais dos compósitos utilizando a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (*FT-IR*)

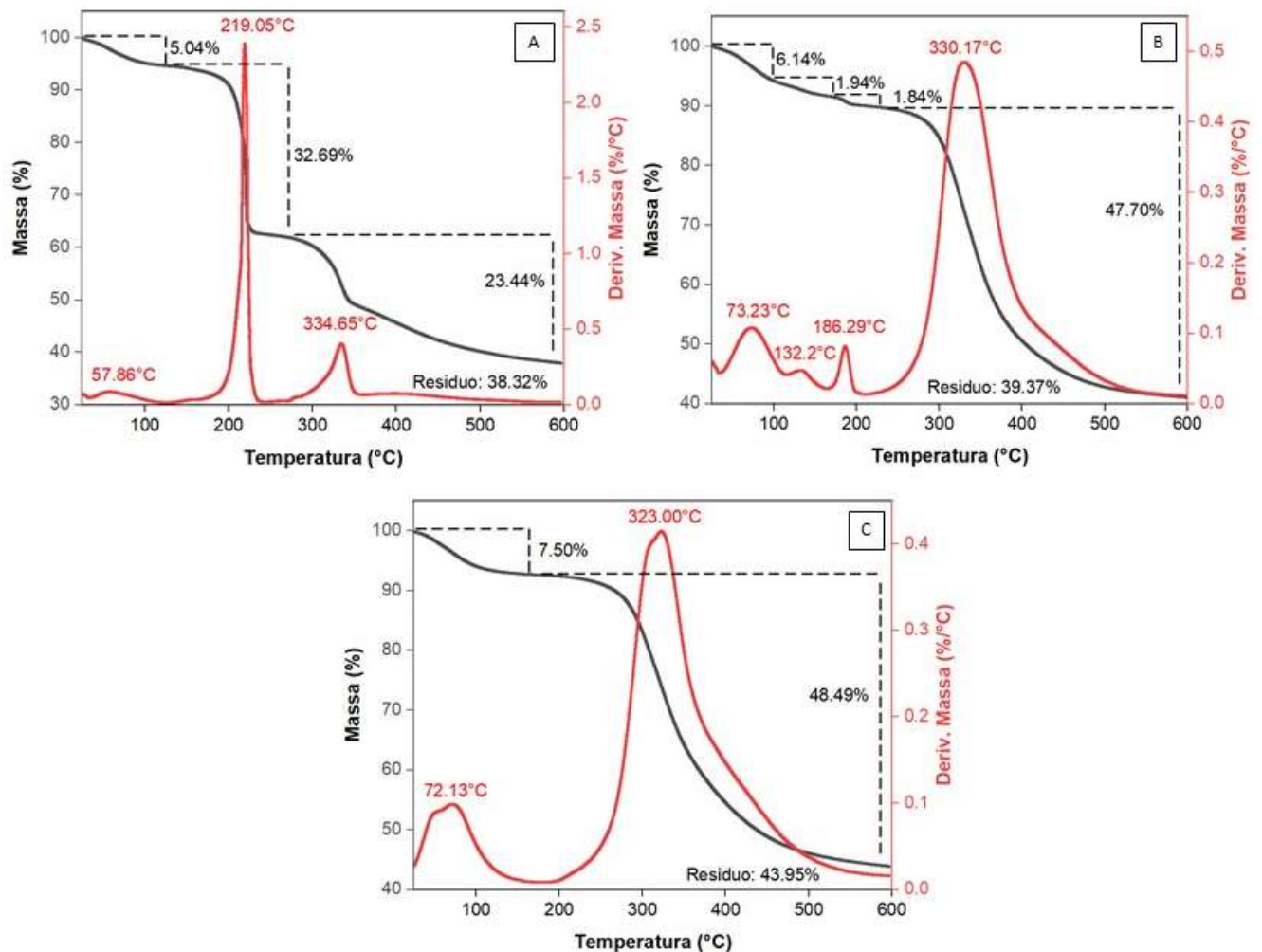
A. Hidrogel de gelatina – HA sem reticular. B. Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*) e C. Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*).

FONTE: A autora, 2022

### 2.6.1.4. Análise térmica

A estabilidade térmica e o comportamento de degradação dos andaimes foram investigados por TG. A Figura 18 mostra as curvas TG dos andaimes e do Hidrogel antes de reticular obtidas quando submetidas a temperaturas entre 25 e 600°C.

Figura 20. Curvas TG: análise da estabilidade térmica (Preto) e DTG: derivada da massa com respeito ao tempo (Vermelho) do hidrogel e dos andaimes submetidos a temperaturas entre 20 e 600 °C sendo A. Hidrogel de gelatina – HA, B. Andaime 1, e C. Andaime 2.



Curvas demonstrando a estabilidade térmica e a perda de massa dos compostos submetidos a temperaturas entre 25 e 600 °C.

FONTE: A autora, 2022

Na Tabela 10 observa-se a massa residual de cada material.

Tabela 10. Perda de massa dos compósitos observadas nas curvas TG

<b>Amostra</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
HA - Gel	61,68
HA - Gel + EDC (1% <i>p/v</i> )	60,63
HA - Gel + EDC (5% <i>p/v</i> )	56,05

Os materiais obtidos apresentaram perfis bastante semelhantes entre si, sendo evidenciada uma constante perda de massa à medida que a temperatura aumenta. A perda de massa inicial dos andaimos e o hidrogel não reticulado ocorreu na faixa de 70 a 100°C, o que pode ser devido à perda de água absorvida (% de umidade), e solvente e decomposição de impurezas voláteis nos materiais, que corresponde a um 7% aproximadamente da massa dos materiais de maneira geral (SEBASTIAN *et al.*, 2020).

### 2.6.1.5. Porosidade total

Encontrando as densidades dos andaimes, por meio da *Eq. (2)* foi determinada a porosidade. As densidades e porosidade dos andaimes estão evidenciadas na Tabela 11.

Tabela 11. Densidades e porosidades dos andaimes

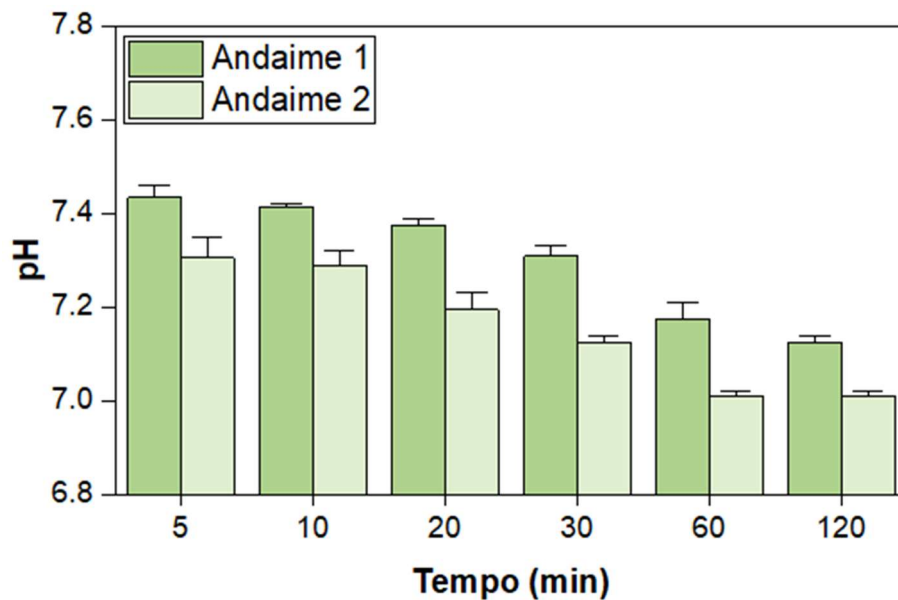
<b>Identificação</b>	<b><math>\rho_{real}</math></b>	<b><math>\rho_{aparente}</math></b>	<b>Porosidade (%)</b>
<b>Andaime 1</b>	$0.026 \pm 1.82E^{-3}$	$0.007028 \pm 5E^{-6}$	73
<b>Andaime 2</b>	$0.039 \pm 2.73E^{-3}$	$0.007053 \pm 5E^{-6}$	82

FONTE: A autora, 2022

### 2.6.1.6. Teste de variação de pH

As variações de pH dos andaimes em PBS estão dispostas nas Figuras 19 e 20. A Figura 19 apresenta os valores de pH nos primeiros 120 minutos do experimento, e a Figura 19 apresenta os 5 dias do teste, com medições cada 24 horas.

Figura 21. Variação do pH dos andaimes reticulados contendo HA e gelatina, após 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos



Avaliação do pH dos andaimes, imersos em fluido corporal artificial (pH 7,4), medido nos diferentes tempos experimentais, no intervalo de 5 a 120 minutos.

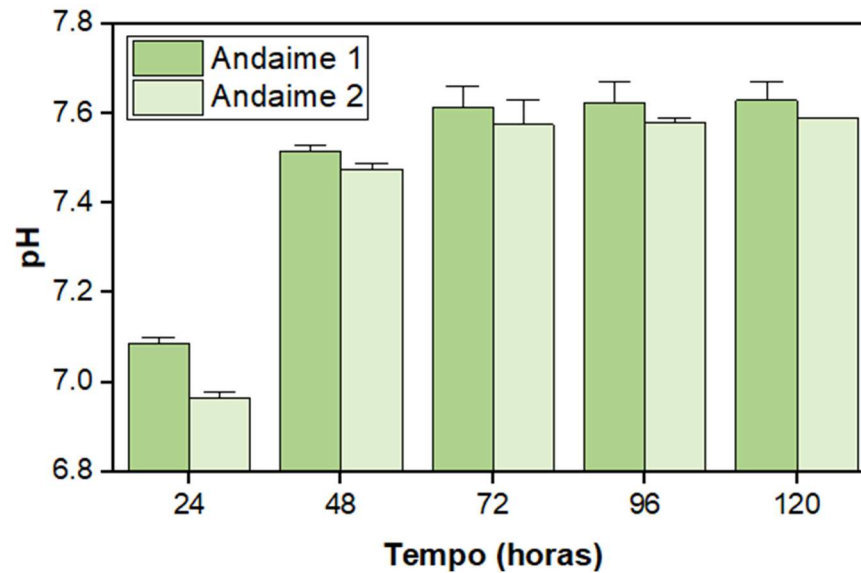
Não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*). Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*).

FONTE: A autora, 2022.



Figura 22. Variação do pH dos andaimes reticulados contendo HA e gelatina, após 24, 48, 72, 96 e 120 horas



Avaliação do pH dos andaimes, imersos em fluido corporal artificial (pH 7,4), medido nos diferentes tempos experimentais, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

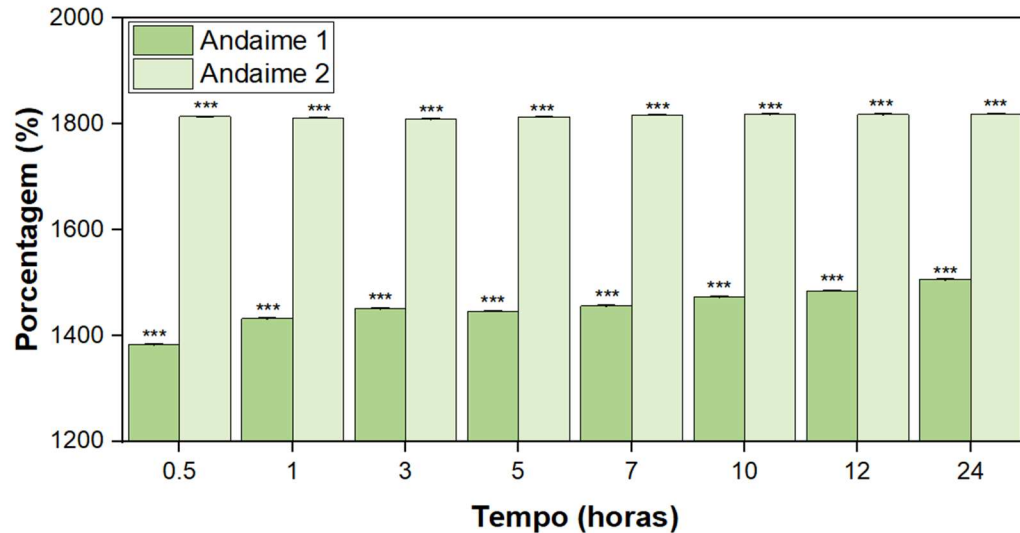
Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*). Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*).

FONTE: A autora, 2022.

### 2.6.1.7. Swelling Test

A capacidade de swelling ou intumescimento dos andaimes está apresentada na Figura 21.

Figura 23. Porcentagem de *swelling* dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados



O comportamento de swelling dos andaimes desidratados, imersos em PBS, pH 7,4 a 37 °C, foi estudado nos tempos experimentais 30 minutos, 1, 3, 5, 7, 10, 12 e 24 horas.

Os dados apresentados são as médias das triplicatas (\*\*\*) P < 0,001).

Andaime 1 – gelatina e HA (1% p/v) e reticulante EDC (0,7% p/v). Andaime 2 – gelatina e HA (5% p/v) e reticulante EDC (0,7% p/v).

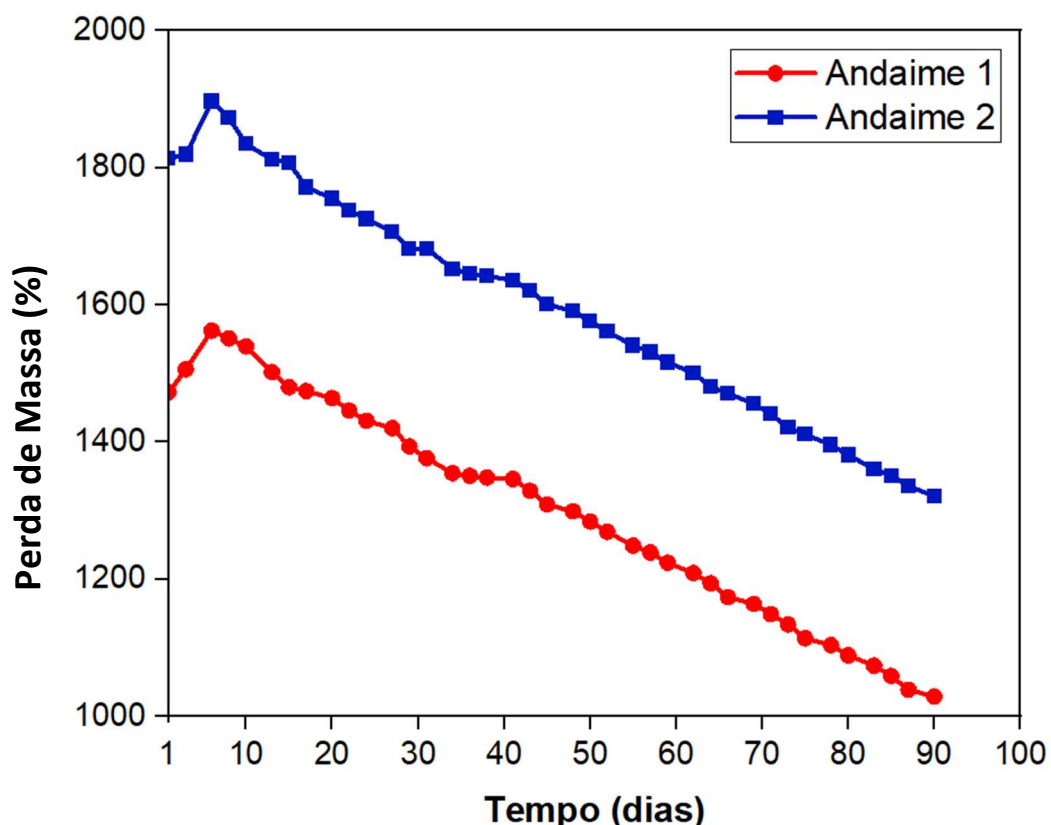
FONTE: A autora, 2022.

Comparando os dois grupos entre si, em cada tempo experimental, houve diferença estatística significativa P < 0,001.

### 2.6.1.8. Degradação dos andaimes

O estudo de degradação monitora a perda de massa em função do período de incubação. As curvas de degradação estão representadas na Figura 22. Lembrando que 100% do eixo Y se refere à quantidade de andaime pesado a seco no início do teste (20 mg).

Figura 24. Perfil de degradação dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados., em solução fisiológica (PBS, pH 7,4)



A avaliação da degradação dos andaimes desidratados em tampão PBS pH 7,4 foi feita através da imersão na solução fisiológica, num período de 91 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas ( $P < 0,001$ ).

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*). Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*).

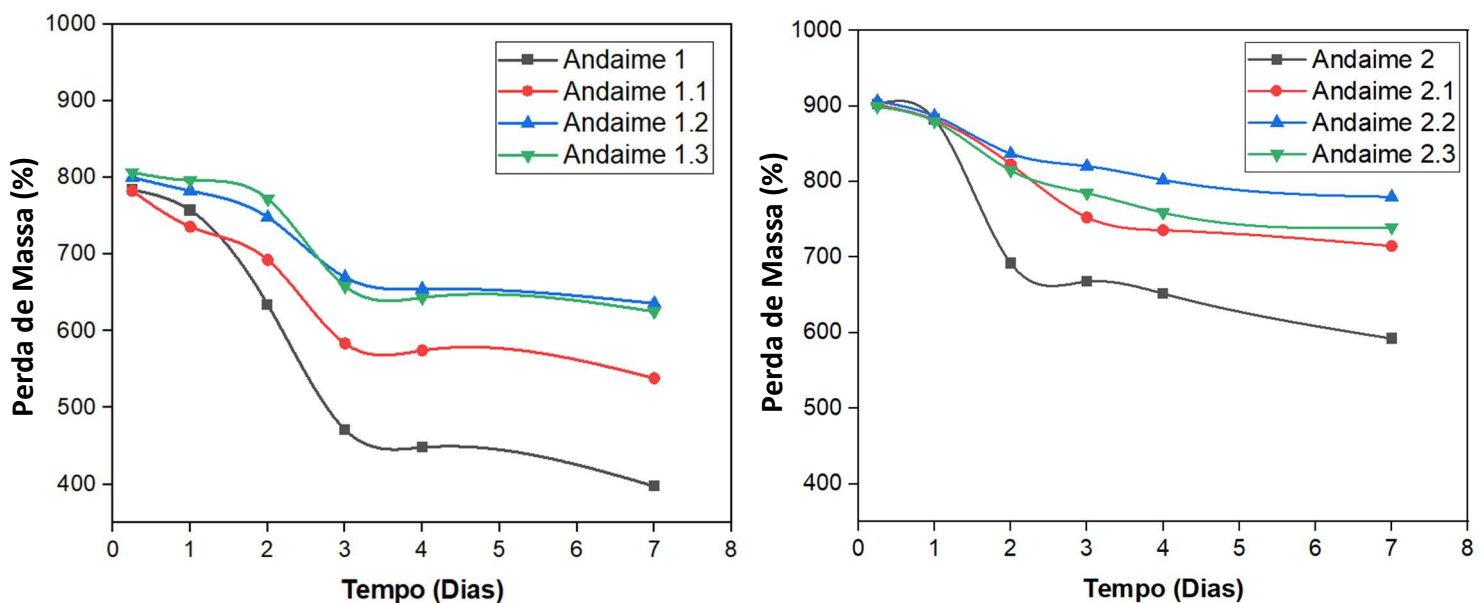
FONTE: A autora, 2022.

Comparando os dois grupos entre si, em cada tempo experimental, houve diferença estatística significativa  $P < 0,001$ .

### 2.6.1.9. Biodegradação *in-vitro*

O estudo de biodegradação *in vitro* monitora a perda de massa em função do período de incubação, quando o material é exposto à enzima colagenase. As curvas de degradação estão representadas na Figura 23. Lembrando que 100% do eixo Y se refere à quantidade de andaime pesado a seco no início do teste (5 mg).

Figura 25. Perfil de degradação dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados, em solução enzimática com colagenase tipo I (PBS, pH 7,4)



A avaliação da biodegradação dos andaimes desidratados em tampão Tris/HCl 50 mM contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM (pH 7,4), e uma concentração de 30 U/ml de colagenase tipo I foi feita através da imersão na solução enzimática, num período de 7 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas ( $P < 0,001$ ).

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina

FONTE: A autora, 2022.

Na Tabela 12. É evidenciado o percentual de degradação após 7 dias do início do teste, onde se observa a diferença entre os andaimes com e sem doxiciclina.

Tabela 12. Degradação dos andaimes depois de 7 dias

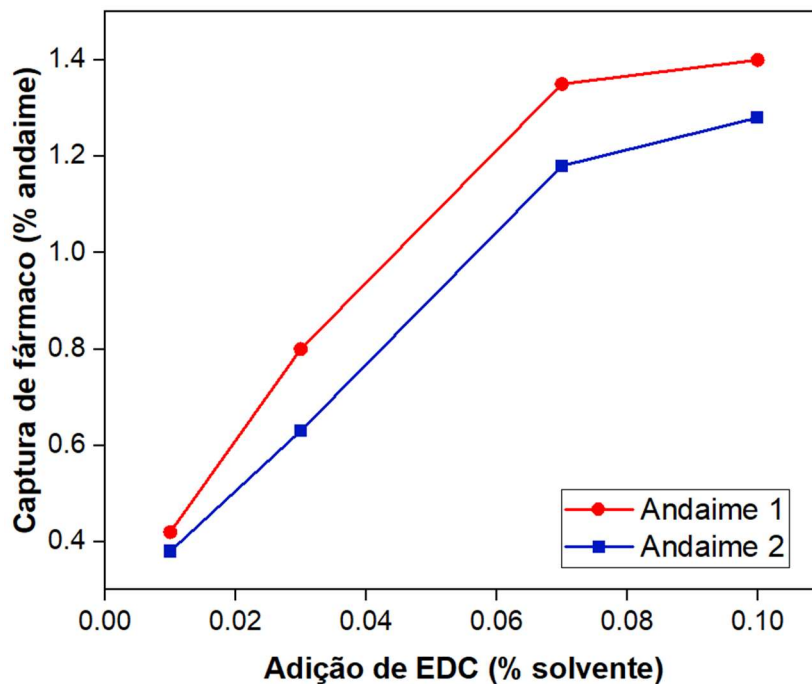
<b>Identificação</b>	<b>Degradação (%)</b>	<b>Identificação</b>	<b>Degradação (%)</b>
Andaime 1	49,32	Andaime 2	34,87
Andaime 1.1	29,21	Andaime 2.1	20,71
Andaime 1.2	20,53	Andaime 2.2	13,96
Andaime 1.3	22,50	Andaime 2.3	17,73

FONTE: A autora, 2022

### 2.6.1.10. Estudo reticulante

O perfil de captura e liberação do fármaco foi muito afetado pelo grau de reticulação (Figura 24). Durante a reticulação, o fármaco doxiciclina, dissolvida em solvente, migrou e foi absorvido na rede gelatina – HA por uma diferença de concentração, e ficou preso dentro da estrutura.

Figura 26. Perfil de carregamento e liberação de fármaco usando diferentes adições de EDC, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4)



A avaliação do carregamento de doxiciclina dos andaimes desidratados em tampão PBS pH 7,4 foi feita através da imersão na solução fisiológica, num período de 4 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas ( $P < 0,005$ ).

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*) e Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) com variações de reticulante EDC (0.1, 0.3, 0.7 e 1.0% *p/v*)

FONTE: A autora, 2022.

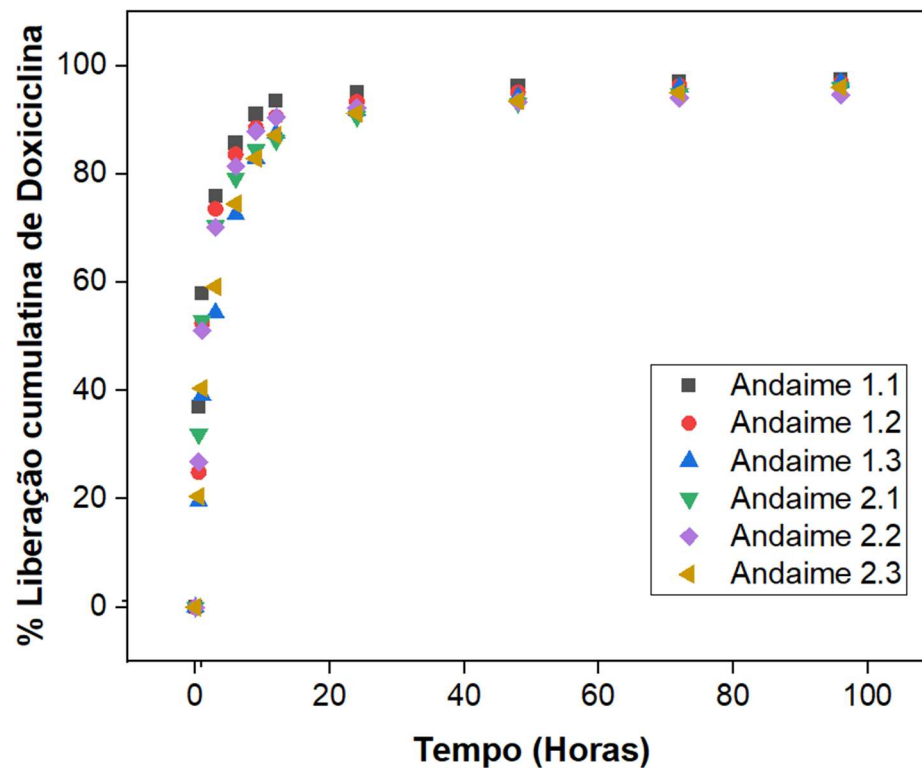
### 2.6.1.11. Estudo liberação doxíciclina na longitude de onda de 290 nm

O perfil de liberação do fármaco dos andaimes é representado na Figura 25, assim, como as quantidades liberadas de fármaco na tabela 13.

Tabela 13. Concentração de doxíciclina liberada a partir de cada andaime

Identificação	Concentração (mg/L)	Identificação	Concentração (mg/L)
Andaime 1.1	97,42	Andaime 2.1	81,52
Andaime 1.2	135,70	Andaime 2.2	132,44
Andaime 1.3	193,91	Andaime 2.3	172,80

Figura 27. Perfil de liberação de fármaco dos andaimes contendo HA e gelatina reticulados, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4).



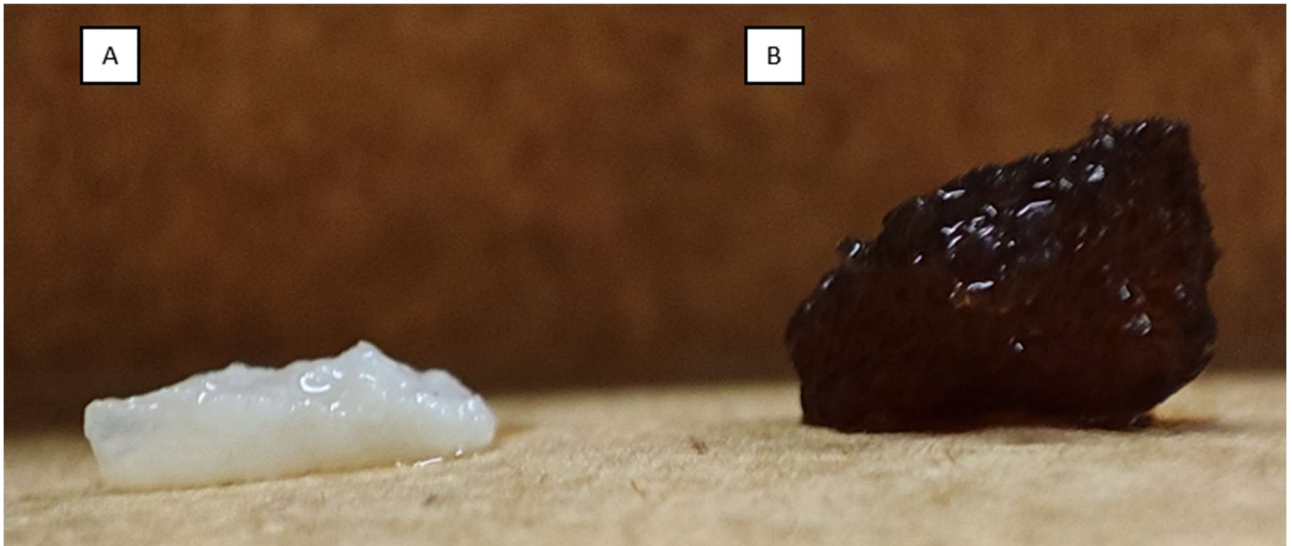
A avaliação da liberação de doxíciclina dos andaimes desidratados em tampão PBS pH 7,4 foi feita através da imersão na solução fisiológica, num período de 4 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas ( $P < 0,005$ ).

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 1.1, 2 e 3 e o Andaime 1 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxíciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC

(0.7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022

Figura 28. Imagens dos andaimes no teste de biodegradação in vivo com Colagenase, sendo o andaime sem fármaco (A) e com fármaco (B)



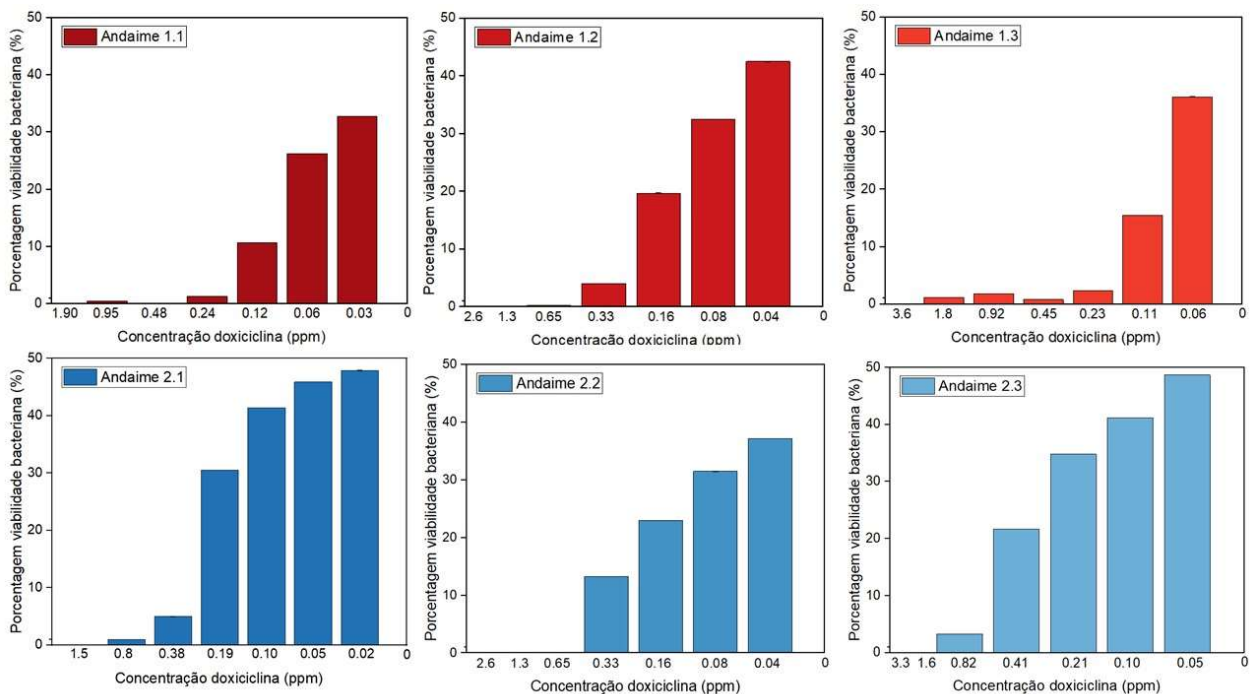


## 2.6.2. Testes Biológicos in vitro dos andaimes

### 2.6.2.1. Análise antimicrobiana

O crescimento bacteriano, para saber a faixa da concentração mínima inibitória dos andaimes foi testada em subculturas de cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A Figura 26. representa a inibição e crescimento bacteriano em cada concentração dos eluatos de 24 horas com cada um dos andaimes.

Figura 29. Inibição do *S. Aureus* com as diferentes diluições de doxiciclina



As bactérias *S. aureus* foram tratadas com várias diluições a partir dos eluatos (10 mg/mL), com uma incubação de 24 h. Tendo como controle positivo clorexidina e controle negativo bactéria crescendo livremente.

Teste ANOVA. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0.001$ )

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

Os resultados da faixa de concentração de cada um dos andaimes estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Concentração de doxiciclina liberada a partir de cada andaime

<b>Identificação</b>	<b>Faixa de inibição da doxiciclina (mg/L)</b>	<b>Identificação</b>	<b>Faixa de inibição da doxiciclina (mg/L)</b>
Andaime 1.1	0.48 – 0.24	Andaime 2.1	0,8 – 0,38
Andaime 1.2	0.65 – 0.33	Andaime 2.2	0,65 – 0,33
Andaime 1.3	0.45 – 0.23	Andaime 2.3	0,82 – 0,41

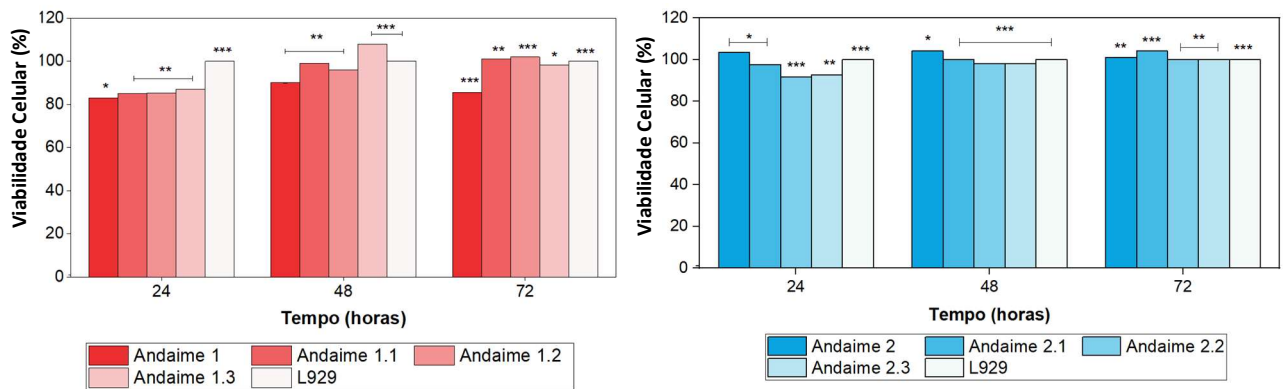
FONTE: A autora, 2022

### 2.6.2.2. Citotoxicidade dos andaimes

A citotoxicidade dos andaimes foi testada indiretamente em cultura de fibroblastos L929 e pré-osteoblastos MC3T3. A citotoxicidade foi realizada indiretamente usando duas diluições: 10 mg/ml e 5 mg/ml. Os resultados da viabilidade celular estão representados nas Figuras 27,28, 29, 30 e 31.

As células fibroblásticas L929 (Figura 27 e 28) foram tratadas com os meios que estiveram no contato com os andaimes durante 24, 48 e 72 horas por 24 horas. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Teste ANOVA (\*\* $P < 0,05$ ), \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,001$ ).

Figura 30. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos L929 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxícliclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas.



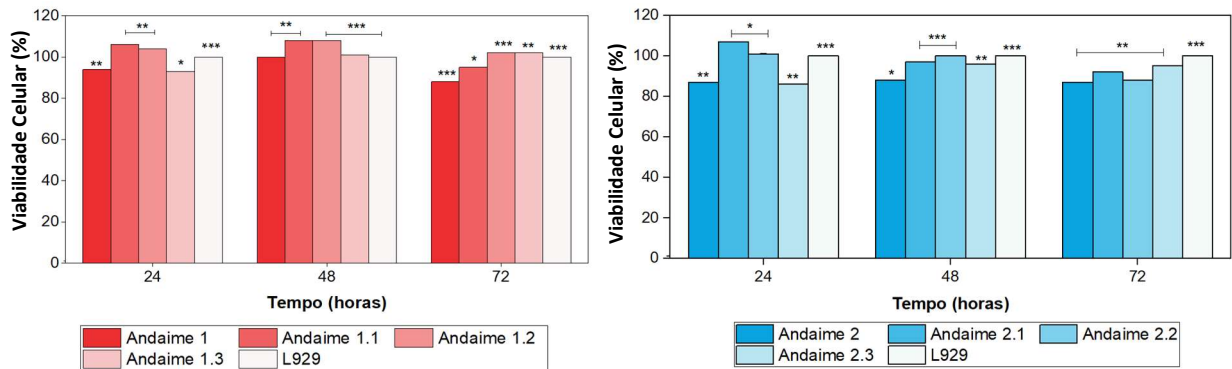
As células fibroblásticas L929 foram tratadas com eluatos dos andaimes (10 mg/mL) por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ )

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

Figura 31. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos L929 tratados com eluatos de 5 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxíciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas



As células fibroblásticas L929 foram tratadas com eluatos dos andaimes (5 mg/mL) por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

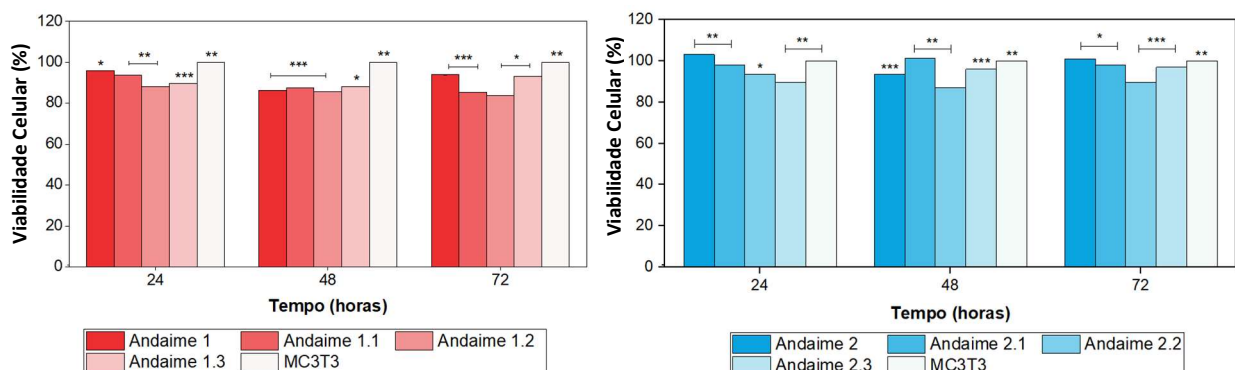
Teste ANOVA (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ )

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1, 2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 2.1, 2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

As células pre-osteoblásticas MC3T3 (Figura 29 e 30) foram tratadas com os meios que estiveram no contato com os andaimes durante 24, 48 e 72 horas por 24 horas. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Teste ANOVA (\*\* $P < 0,05$ ), \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,001$ )

Figura 32. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxíciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas



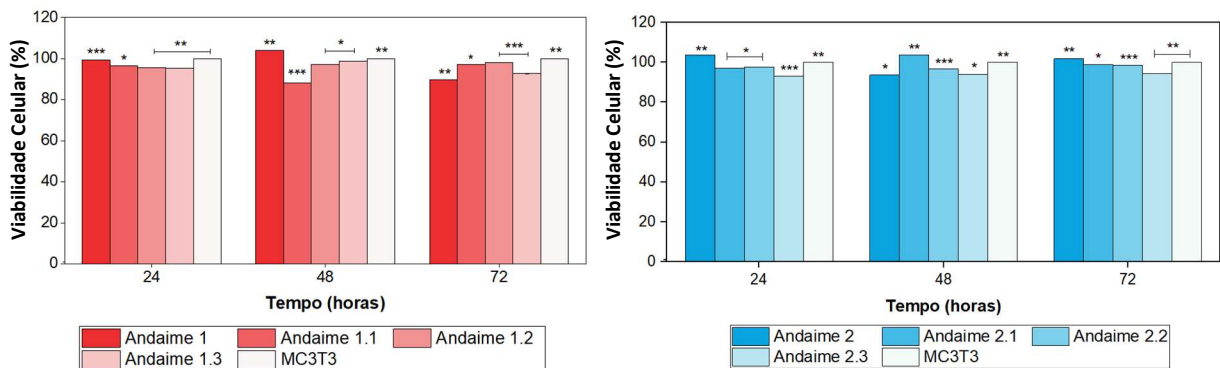
As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram tratadas com eluatos dos andaimes (10 mg/mL) por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA (\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*P < 0.001)

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

Figura 33. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 5 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 24 horas



As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram tratadas com eluatos dos andaimes (5 mg/mL) por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

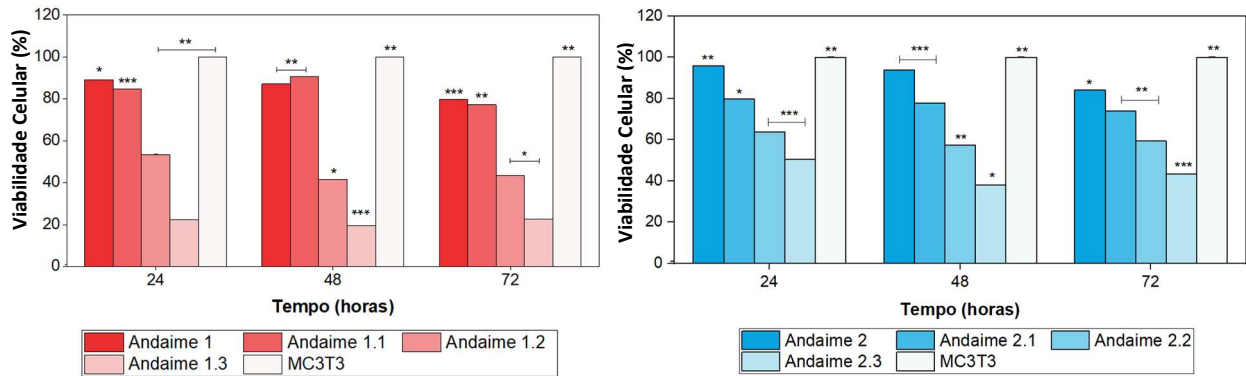
Teste ANOVA (\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*P < 0.001)

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

Conforme evidenciado, nenhum dos eluatos apresentou citotoxicidade, pelo que se optou por realizar um teste complementar. As células pre-osteoblásticas MC3T3, foram tratadas com os meios que estiveram no contato com os andaimes durante 24, 48 e 72 horas por 4 dias. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Os resultados estão apresentados na Figura 29. ANOVA (\*\* P < 0,05), \*\* P < 0,01, \* P < 0,001).

Figura 34. Porcentagem de viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3 tratados com eluatos de 10 mg/ml contendo andaimes de HA, gelatina em diferentes concentrações de Doxiciclina, em diferentes tempos, incubados durante 4 dias



As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram tratadas com eluatos dos andaimes (10 mg/mL) por 24, 48 e 72 h avaliado 4 dias depois. A citotoxicidade dos andaimes foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA (\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*P < 0.001)

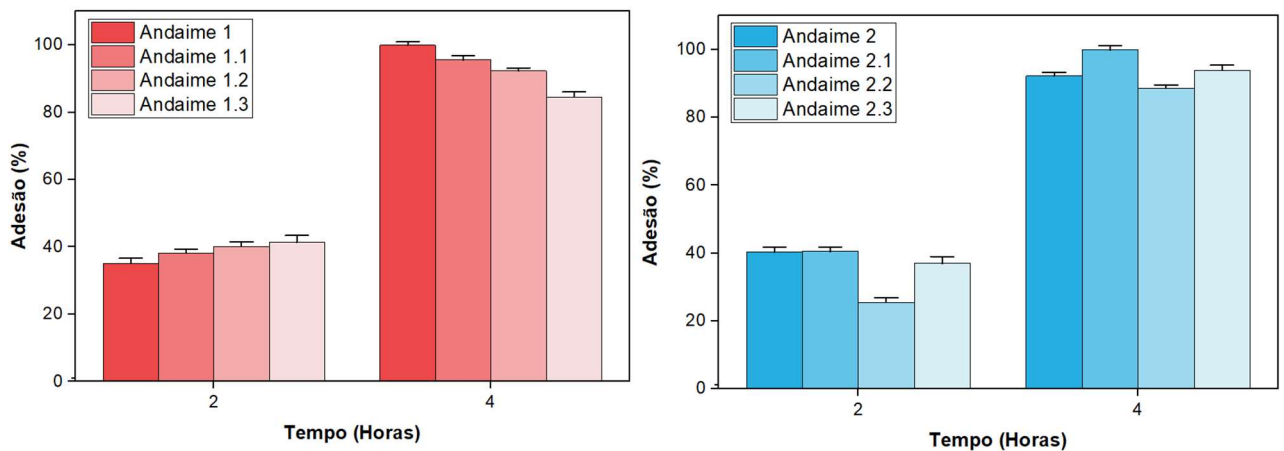
Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0.7% *p/v*), Andaime 2.1,2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

FONTE: A autora, 2022.

### 2.6.2.3. Adesão e morfologia celular

A adesão celular foi testada em dois métodos: pela contagem de células e por imagens em MEV. O resultado da porcentagem de células MC3T3 aderidas ao material após 2 e 4 horas está representado na Figura 32. As micrografias das células aderidas estão nas Figuras 34 e 34.

Figura 35. Adesão in vitro de células pré-osteoblásticas MC3T3 aos andaimes



As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram semeadas sobre os andaimes e após 2 e 4 horas, o meio de cultura foi aspirado e a quantidade de células em suspensão foi contada.

Teste ANOVA, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1, 2 e 3 e o Andaime 1 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina, Andaime 2 – gelatina e HA (5% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 2.1, 2 e 3 e o andaime 2 com 0,3 – 0,7 e 1,2% *p/v* de doxiciclina.

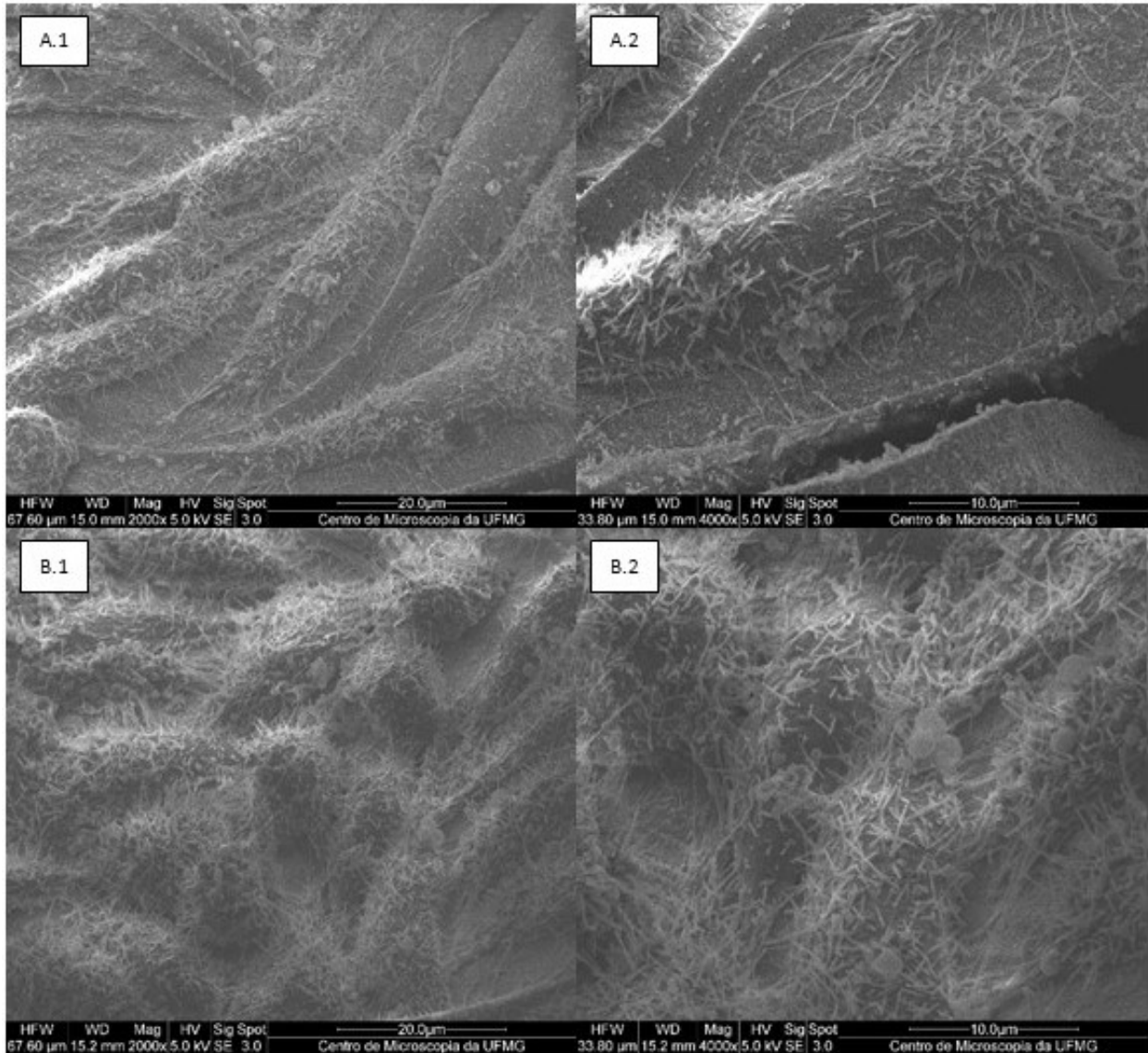
FONTE: A autora, 2022.

Após o tempo experimental 2 h, as MC3T3 expostas nos andaimes apresentavam aproximadamente 40% de adesão, com exceção do andaime 2.2, que apresenta menor adesão, com 25,5%. No tempo 4 h, houve adesão desde 85% até 100%.

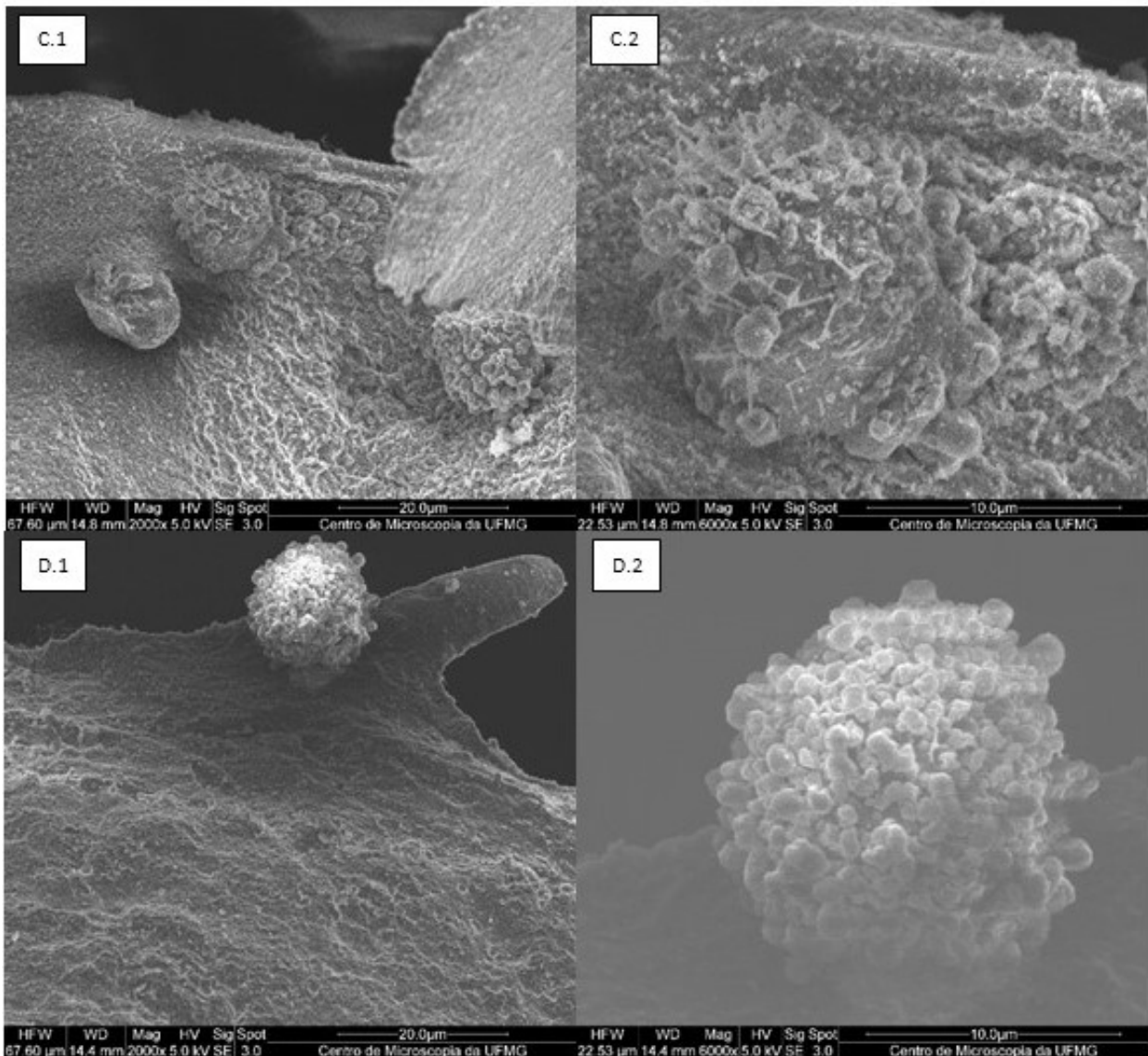
Para a visualização da morfologia das células aderidas sobre o material desenvolvido foram realizadas as micrografias em MEV. Nas imagens obtidas, pode-se observar a adesão das células MC3T3 após o tempo experimental de 3 dias. Muitas ramificações podem ser visualizadas em ambas as células. As MC3T3 exibiram morfologia espalhada característica de adesão celular adequada, segundo a literatura.

Os poros foram preenchidos completamente por células com prolongamentos citoplasmáticos.

Figura 36. Adesão das células MC3T3 sobre os andaimos 1.0 (A), 1.1 (B), 1.2 (C) e 1.3 (D). Escala 20  $\mu\text{m}$  (\_.1) e 10  $\mu\text{m}$  (\_.2) respectivamente

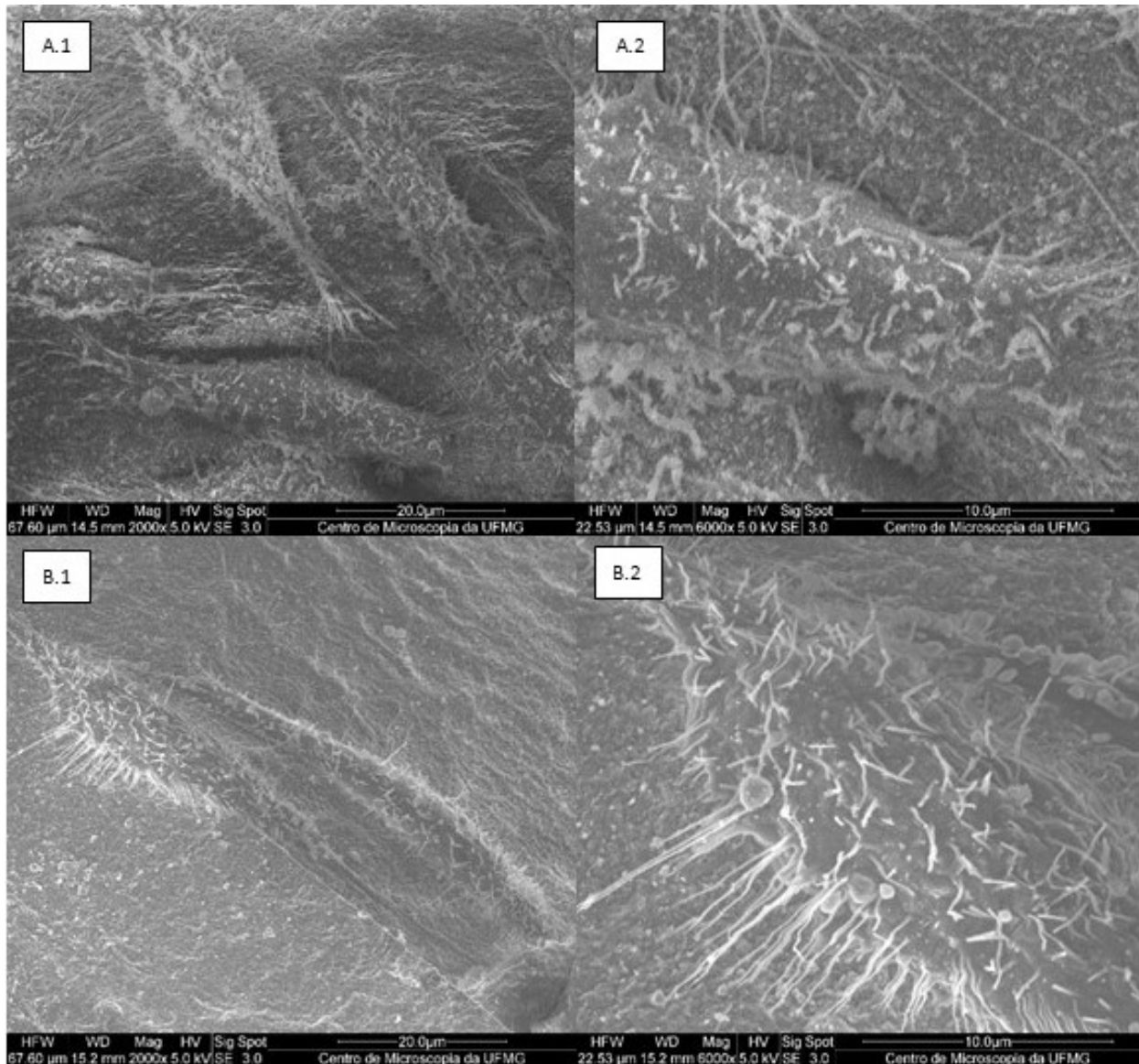


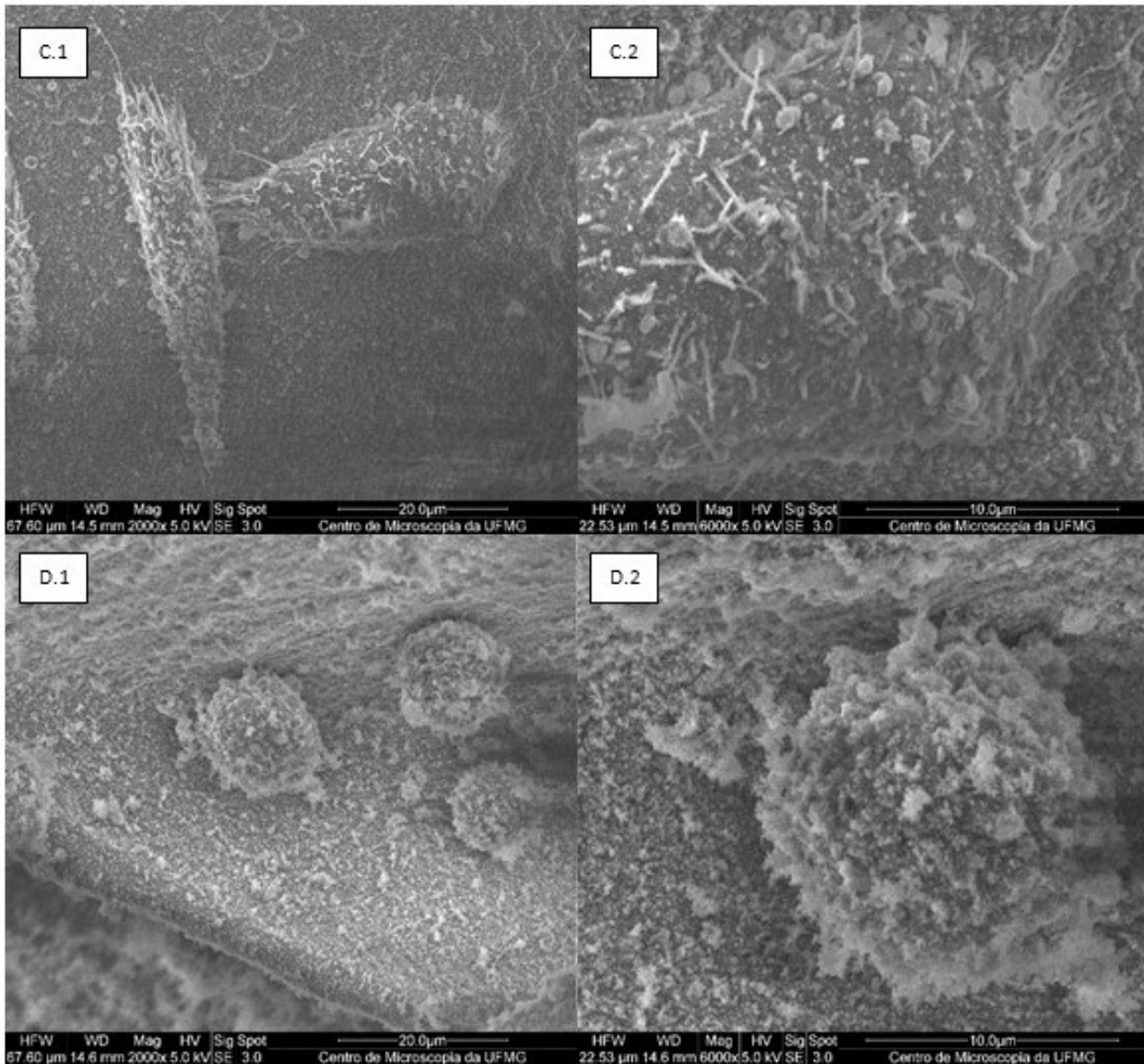




Micrografias dos andaimos obtidas no microscópio eletrônico de varredura, FIB Quanta 200 FEG, para observação da morfologia celular dos pré-osteoblastos MC3T3 sobre os andaimos, após 3 dias de semeadura. Imagens obtidas no Centro de Microscopia da UFMG  
 Andaime 1 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 1 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxiciclina respectivamente  
 FONTE: CM-UFMG

Figura 37. Adesão das células MC3T3 sobre os andaimos 2.0 (A), 2.1 (B), 2.2 (C) e 2.3 (D).  
Escala 20  $\mu\text{m}$  (\_.1) e 10  $\mu\text{m}$  (\_.2) respectivamente





Micrografias dos andaimes obtidas no microscópio eletrônico de varredura, FIB Quanta 200 FEG, para observação da morfologia celular dos pré-osteoblastos MC3T3 sobre os andaimes, após 3 dias de semeadura. Imagens obtidas no Centro de Microscopia da UFMG Andaime 2 – gelatina e HA (1% *p/v*) e reticulante EDC (0,7% *p/v*), Andaime 1.1,2 e 3 e o Andaime 2 com 0.3 – 0.7 e 1.2% *p/v* de doxiciclina respectivamente  
 FONTE: CM-UFMG

## 2.7 Discussão

Nesse estudo, os andaimes à base de gelatina contendo hidroxiapatita e diferentes concentrações de doxiciclina foram desenvolvidos e caracterizados. Várias análises foram feitas na tentativa de se obter um compósito com características ideais. Inicialmente foram usados dois tipos de andaimes, o andaime 1%*p/v* (Andaime 1) e o andaime 5%*p/v* (Andaime 2), então, foram feitas análises MEV-EDS, DRX, FT-IR, TG, determinação de porosidade, solubilidade em água, swelling, degradação enzimática, e estudo de pH, depois várias concentrações de doxiciclina foram adicionadas e a atividade antimicrobiana e o efeito do reticulante foram determinadas bem como, liberação de doxiciclina, ensaio de citotoxicidade celular *in-vitro* no fibroblastos L929 e pre-osteoblastos MC3T3 e adesão e morfologia celular nas células pre-osteoblásticas MC3T3.

A morfologia do hidrogel de gelatina – HA sem reticular e dos andaimes foi avaliada por MEV. As micrografias estão apresentadas na Figura 14. O hidrogel de gelatina – HA não reticulado possui uma estrutura de poros homogênea, bem desenvolvida com configuração oval. Em seguida, na seção (B.1 e C.1) é evidenciada a mudança de estrutura, após a reticulação do material. A estrutura do material torna-se irregular com uma nova configuração laminada e o tamanho dos poros diminui. Como o tamanho de poro das matrizes de hidrogel diminui com o grau de reticulação, tal diminuição pode ser atribuída ao agente de reticulação utilizado (EDC), que participa da reação entre moléculas contendo grupos carboxílicos e amina livres para formar ligações amida. (YANG *et al.*, 2018).

Observa-se a degradação sofrida pelo hidrogel (Figura 14 – A.2), devido à sua baixa estabilidade térmica. Ao observar as ampliações designadas na Figura 14 – B.1 e C.1 na mesma aproximação de 5000X, fica evidente que não há degradação térmica da matriz extracelular da gelatina e, verifica-se que o HA se encontra homogeneamente dentro da matriz polimérica da gelatina.

Na síntese de HA, os precursores iônicos de Ca e P ficam facilmente dentro das cadeias de gelatina devido aos grupos funcionais de gelatina, favorecendo a ligação. A mistura subsequente de ambas as soluções sob condições ajustadas facilitou a formação

de nanocristais de HA. As nanopartículas de HA ficaram distribuídas homogeneamente por toda a rede de gelatina e a distribuição não foi afetada pela gravidade, presumivelmente devido à gelatina viscosa e ao rápido congelamento do compósito ao final da síntese. Na prática, uma configuração de poros tão bem desenvolvida é impossível de obter apenas com partículas de HA por meio de uma rota de processamento de baixa temperatura. Nos Anexos pode-se observar que quando a HA já sintetizada é misturada com a gelatina, não há incorporação homogênea dentro da rede gelatinosa, o que resulta em um material mais quebradiço e instável.

Os espectros de EDS apresentados na Figura 15 são uma caracterização qualitativa que identifica apenas picos característicos dos elementos presente na composição dos compósitos. O EDS do hidrogel mostra a presença de cálcio, fósforo, carbono e oxigênio correspondente à composição dos polímeros e HA. No caso dos andaimes, também é evidente a presença de cloro e nitrogênio, componentes presentes no reticulante.

Para confirmar se a hidroxiapatita foi obtida, os difratogramas de DRX mostrados na Figura 16 indicam a presença de picos de HA característicos nos nanocompósitos, embora alguns dos picos não fossem distintos devido ao efeito de mascaramento da matriz de gelatina em baixos níveis de partículas de HA. Como uma sugestão, devido à fraca divisão dos picos de HA entre  $31,78^\circ$  e  $32,12^\circ$  correspondentes aos planos (211) e (112), pode-se atribuir possivelmente a uma baixa cristalinidade, como é suposto também por os autores KIM, HAE WON; SONG; KIM, (2005).

A partir dos dados de espectroscopia *FT – IR* na Figura 17, foram evidenciados os principais grupos funcionais que compõem cada material. A gelatina pura mostrou bandas de *OH* ( $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ ), Amida I em  $\sim 1650$  (estiramento da ligação  $C = O$ ), Amida II em  $\sim 1550$  (estiramento da ligação  $N - H$  e estiramento da ligação  $C - H$ ) e Amida III em  $\sim 1250$  (ligação  $C - N$  afinando em fase com flexão de ligação  $N - H$ )  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, as bandas presentes em  $\sim 1380$  e  $\sim 1440\text{ cm}^{-1}$  também são devidas a aminoácidos na estrutura da gelatina, como glicina, prolina e hidroxiprolina. (BILLIET *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2008; SARAIVA *et al.*, 2015).

Nos nanocompósitos HA - Gel, as bandas de  $PO_4$  ( $\sim 570$ ,  $\sim 600$ ,  $\sim 960$  e  $\sim 1030$ - $1090\text{ cm}^{-1}$ ) e  $OH$  ( $\sim 630\text{ cm}^{-1}$ ) apareceram claramente junto com as bandas de gelatina, as características de algumas bandas de baixa intensidade, possivelmente devido ao ressecamento do material.

Com base nessas observações estruturais e de fase, é possível afirmar que a gelatina, mesmo desnaturada do colágeno, retém consideráveis grupos biológicos característicos, principalmente aminoácidos. Além disso, as bandas da amida sugerem que a gelatina mantém um alto nível de estrutura helicoidal de sequência única. (DE CARVALHO; GROSSO, 2006). Esta evolução estrutural foi facilitada em parte pela reticulação da gelatina, durante a qual a estrutura da gelatina foi ordenada e a estrutura da hélice tripla recuperada em alto grau (TIMKOVICH, 1977). Desta forma, a reticulação da gelatina é muito importante. Sem reticulação, a rede de gelatina entrará em colapso dentro de um fluido por degradação hidrolítica e térmica devido à sua estrutura solta.

Para verificar a termoestabilidade dos materiais após a reticulação, optou-se por realizar a avaliação termogravimétrica para comparar os andaimes reticulados com hidrogel não reticulado, os resultados são apresentados na Figura 18.

Conforme mostrado na Figura 18 – A, a curva TGA do hidrogel de gelatina – HA não reticulado revela que a primeira perda de massa significativa e imediata foi observada a  $220^\circ\text{C}$ , atribuída à decomposição dos aminoácidos da gelatina (NOOEAIID *et al.*, 2020). A segunda perda de massa significativa no hidrogel de gelatina – HA foi observada em uma faixa de  $340^\circ\text{C}$ , correspondendo à continuação da termodecomposição da gelatina, devido à degradação das proteínas juntamente com a quebra das ligações amida (MONTEIRO, 2018; VO *et al.*, 2021). Padrões similares de curva TGA com gelatina pura também foram relatados anteriormente (MUTHYALA *et al.*, 2010; VO *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2002).

Visualizando a Figura 18 – B e C, as curvas dos andaimes obtidas apresentaram perfis bastante semelhantes, a única perda de massa significativa foi observada, na faixa de temperatura entre  $200$  e  $400^\circ\text{C}$ . Esta perda correspondeu a aproximadamente 48% da massa dos andaimes e pode ser atribuída à degradação do polímero de gelatina (Monteiro, 2018; Pawde e Deshmukh, 2008; Vo *et al.*, 2021).

Comparando o perfil de perda de massa dos andaimes, juntamente com o hidrogel de gelatina – HA não reticulado, observa-se que o pico DTG dos andaimes mudou para uma temperatura mais alta (de 219°C a 330°C) em relação ao hidrogel gelatina – HA não reticulado durante a segunda degradação, indicando maior estabilidade dos andaimes polimerizados. Portanto, com base nesses dados, pode-se afirmar que a reticulação com EDC do hidrogel de gelatina - HA resultou em interações muito mais fortes devido ao aumento da estabilidade térmica no compósito polimérico (XIAO *et al.*, 2002).

Na Tabela 10 observa-se a massa residual de cada material. Sendo 61.68, 60.63 e 56.05% para o hidrogel de gelatina – HA não reticulado, andaime 1, e andaime 2, respectivamente. A massa residual está associada à quantidade de HA presente nos materiais, sugerindo que a porcentagem de HA presente está na faixa de 38 – 44% em massa.

A porosidade total dos andaimes encontra-se na Tabela 11. O andaime 1 tem uma porosidade de 72,97% e o andaime 2 uma porosidade de 81,92%, os resultados são esperados. De acordo com a variação de Andaime 1 (1% *p/v*), seria esperado que o efeito do reticulante fosse maior, para o qual seriam esperados menos poros junto com outros menores. Por outro lado, no Andaime 2, sendo 5% *p/v*, o efeito do reticulante sobre o material não seria tão forte, então seriam esperados poros maiores, o que é interessante, pois ajustar o tamanho dos poros e a porosidade, ajudaria a obter densidade, resistência e compatibilidade mecânica semelhantes com os tecidos ósseos, o que pode efetivamente prevenir a osteonecrose e a deformidade da osteogênese ao redor do implante (DEROME *et al.*, 2014).

Em geral, ambos os materiais apresentam uma estrutura porosa perfurada interna, o que em biomateriais é benéfico para a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais. A estrutura porosa também fornece uma alta área de fixação interfacial para vascularização e crescimento ósseo, promovendo a fixação biológica de implantes e osso (LI *et al.*, 2014).

Apesar de encontrar uma série de investigações na literatura, a porosidade ideal e o tamanho dos poros dos implantes para o crescimento ósseo ainda não são bem compreendidos. Em um estudo feito por CHEN *et al.*, (2020), a estrutura porosa ideal

em termos de porosidade e tamanho de poro de um andaime SLM Ti6Al4V ELI para implantes biomédicos foi explorada. Foram preparados vários andaimes com tamanhos de poros de 500, 600 e 700  $\mu\text{m}$  e porosidades de 60% e 70%, e experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar o desempenho biológico dos andaimes porosos. O material que apresentou os melhores resultados foi aquele com porosidade de 60%. No presente trabalho, o material em que se obteve maior adesão celular é o Andaime 1, que possui porosidade de 72,97%, o que sugere que os andaimes de gelatina - HA devem apresentar porosidade inferior a 80%, e possivelmente a porosidade ótima poderia ser menor do 70%.

Os valores de pH registrados no início do teste (Figura 19) permaneceu neutro. No entanto, foi observada uma pequena diminuição no pH. Os menores valores foram com 120 minutos, com um média de 7.1, e os maiores foram com 5 minutos, com média em 7.5. Nos dias subsequentes do experimento, o pH dos andaimes mantiveram-se acima de 7.5 e estabilizaram no 4º dia de experimento, com média em 7,6 como pode ser visto na Figura 20.

Ao reticular os hidrogéis, uma solução de acetona - água (80:20) foi usada como solvente, o pH da acetona naturalmente está em uma faixa de ácido de 5 a 6 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2012). Terminado o processo de reticulação, é realizado um processo de neutralização e limpeza do material com etanol 96%, etanol 70% e água destilada.

O PBS usado para o teste estava em um pH neutro de 7.4. Conforme evidenciado na Figura 19, inicialmente ambos os andaimes tendem a descer levemente o pH do PBS. No entanto, com o passar dos dias, conforme mostrado na Figura 19, o pH se estabiliza e tende a ser neutro, com um leve aumento de pH. A tendência inicial da leve diminuição de pH é atribuída a resíduos de acetona dentro dos andaimes.

Um microambiente neutro é essencial para a preservação e colonização precoce das células na ET. Além, ambientes alcalinos favorecem o crescimento de células osteoblásticas (LIU *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2012). Por exemplo, GALOW *et al.*, (2017) relataram que, em condições alcalinas, os genes reguladores de processos de



diferenciação osteoblástica são ativados com aumentos aproximados de 130% e 230% em pH 7,8 e 8,4, utilizando os dados de pH 7,4 como referência, acelerando sua operação resultando em mineralização significativa após 21 dias de estudo.

O comportamento de *swelling* é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a aplicabilidade biomédica. Uma taxa mais alta de *swelling* normalmente resulta em uma maior área de superfície para a difusão de bioativos no ambiente (HOLBACK *et al.*, 2011). A capacidade de *swelling* dos andaimes está apresentada na Figura 21. O andaime 1 foi o que apresentou menor razão de *swelling* em todos os tempos experimentais. Cada um dos andaimes liofilizados pesava 20 mg, antes de serem imersos no PBS. Entre os tempos de 0,5 h e 24 h, o andaime 1 apresentou um aumento de 123% em seu *swelling*, enquanto o andaime 2, na mesma variação de tempo, apresentou um aumento de apenas 5%. Este aumento é muito baixo, além disso, no caso do andaime 1, durante os primeiros 30 minutos em contato com o PBS, atingiu 90% do seu limite de *swelling* e o andaime 2 atingiu praticamente 100%. Inicialmente, seria esperado um aumento linear entre a proporção de *swelling* e o tempo de imersão até atingir o equilíbrio, então infere-se que o equilíbrio foi alcançado durante os primeiros 30 minutos de imersão dos andaimes em PBS.

Além disso, ao finalizar as 24 horas, os andaimes 1 e 2 apresentaram taxas de *swelling* de 1817,16% e 1506,11%, respectivamente com uma diferença entre os dois de 313,05%. O grau de reticulação de cada andaime teve um efeito evidente no equilíbrio de *swelling* dos compósitos. Descobrimos que a proporção de *swelling* dos andaimes de HA e gelatina diminuiu com o aumento do grau de reticulação. Este resultado está de acordo com os da literatura (CUI *et al.*, 2015; RAGOTHAMAN *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013).

O estudo de degradação dos andaimes monitora a perda de massa em função do período de incubação. As curvas de degradação estão representadas na Figura 22. É necessário garantir que a degradação do nanocompósito não seja muito rápida, pois isso não favorece a integridade do andaime antes da regeneração do novo tecido. O agente de reticulação EDC foi usado a 0,7% *p/v*, estudado e definido como ótimo para modificar a estrutura da gelatina de modo que sua reticulação fosse significativa o suficiente para

melhorar as propriedades mecânicas e a liberação do fármaco com um perfil de degradação suficientemente lento para a estrutura de suporte necessária na regeneração óssea. Observou-se que os compósitos bem reticulados permaneceram por vários meses.

Na prática, o hidrogel de gelatina – HA sem o processo de reticulação dissolveu-se completamente em solução de PBS dentro de 1 h. Em contraste, quando o material foi reticulado com EDC, no teste feito durante 90 dias, os andaimes mantiveram suas estruturas na solução de PBS com uma perda de massa de 30 e 34% de andaime 1 e 2 respectivamente, a partir da absorção máxima de água atingida no dia 3 do teste, ou que verifica que a reticulação realizada proporciona ao sistema maior estabilidade mecânica e estabilidade química.

Na Figura 23 observa-se a perda de massa dos andaimes em relação ao tempo em que são submersos em uma solução enzimática de colagenase tipo I (30U/mL) em tampão Tris/HCl 50 mM contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 7,4).

Em relação à biodegradação dos andaimes depois de 7 dias (Tabela 12) é evidente que os andaimes sem fármaco apresentaram um perfil de degradação extremo. 7 dias após o início do teste, a perda de massa dos andaimes 1 e 2 foi de 49 e 35%, respectivamente. No entanto, os andaimes que apresentaram diferentes concentrações de doxiciclina tiveram uma biodegradação que variou de 29 a 14%, pois a doxiciclina inibe a atividade colagenolítica das metaloproteinases de matriz (MMP), a qual degrada a matriz extracelular de colágeno (CARVALHO *et al.*, 2022). O processo de degradação dos andaimes 1 e 2 é devido à quebra das ligações amida no peptídeo de colágeno causada pela enzima colagenase (TZAFRIRI *et al.*, 2002). No entanto, a doxiciclina ao inibir a atividade colagenolítica das MMPs, protege a matriz de doxiciclina de ser suscetível à degradação rápida.

Adicionalmente, estudos mostram que baixas doses antimicrobianas de doxiciclina inibiram a atividade colagenolítica das MMPs na desmineralização da dentina e modularam a expressão de citocinas inflamatórias, que causa uma diminuição na periodontite (CASTRO *et al.*, 2015; HENRIQUE *et al.*, 2021). Além disso, a doxiciclina

melhora outros processos inflamatórios, como doenças de pele e feridas crônicas (CAPRIO *et al.*, 2015).

Os andaimes de nanocompósitos de gelatina – HA reticulados podem encontrar seu potencial na entrega de moléculas bioativas e na obtenção de efeitos terapêuticos. Como um primeiro passo para a aplicação de liberação de fármacos dos andaimes, a doxíciclina foi carregada e reticulada, e o perfil de carregamento de fármaco foi investigado (Figura 24).

O derivado carbodiimida (EDC) escolhido como agente de reticulação neste estudo é muito mais seguro em termos de toxicidade do que o glutaraldeído convencionalmente utilizado na reticulação da gelatina, pois não deixa subproduto durante a reticulação (GRABAREK; GERGELY, 1990).

Quando as redes de gelatina – HA foram mal reticuladas (com muito pouco agente de reticulação), os andaimes não conseguiam capturar o fármaco com eficiência; em vez disso, a mesma rede de gelatina – HA, enquanto aprisionava o fármaco, liberava-o na solução de reticulação devido à sua estrutura frouxa. O derivado carbodiimida (EDC), como agente reticulante, atuou para unir os grupos carboxila e amina nos aminoácidos da gelatina e formou ligações mais longas para formar cadeias amidas (GRABAREK; GERGELY, 1990). Com isso, a rede de gelatina ficou mais forte química e termicamente, e mais compacta estruturalmente. Com o aumento do EDC em até 0,7% *p/v*, o compósito teve uma estabilidade na quantidade de captura e liberação do fármaco em ambos os andaimes, mas com mais adições de reticulante são observadas alterações insignificantes, para as quais não faria sentido reticular os materiais com mais de 0,7% *p/v*.

Lembrando que a diferença entre o andaime 1 e 2 é a quantidade em massa de hidrogel adicionado em relação ao volume do solvente no momento da reticulação, sendo 1% *p/v* e 5% *p/v* respectivamente, observa-se que o andaime 1 apresenta maior quantidade de fármaco que andaime 2. Isso se deve ao fato de que a porcentagem do reticulante e a porcentagem de fármaco também dependem da porcentagem de solvente,

para o qual andaime 1 tem contato com maior quantidade de EDC e fármaco, em relação ao Andaime 2.

Analisando os resultados da liberação de Doxiciclina mostrados na Figura 25, o sistema mostra um perfil de liberação pronunciada com aproximadamente 60% do conteúdo total do medicamento liberado nas primeiras 3 horas da liberação de doxiciclina nos andaimes, a liberação se estabiliza após 12 horas.

O perfil de liberação do fármaco é afetado principalmente pela absorção de fluidos e degradação da gelatina presente no andaime. Primeiro, os fármacos devem ser liberados por difusão, quando o andaime absorve mais fluidos e incha mais, os fármacos se difundem mais facilmente. Em segundo lugar, os fármacos são liberados diretamente pela perda de material e, nos nanocompósitos de gelatina – HA, a perda de material ocorre tanto pela degradação da gelatina quanto pela liberação iônica de HA (KAMALY *et al.*, 2016).

A liberação do fármaco dos andaimes parece seguir a perda de material. No entanto, embora a perda de material tenha sido praticamente insignificante nas primeiras 100 horas do teste de degradação (Figura 22), a liberação do fármaco apresentou uma taxa reduzida com o tempo, confirmando que a liberação do fármaco não resultou diretamente da perda de material, mas depende em grande parte do mecanismo de difusão. Praticamente, em comparação com a quantidade degradada de andaimes, a liberação do fármaco foi muito maior: quando reticulado com 0,7% de EDC, a perda de massa foi inferior a 1%; no entanto, a quantidade de doxiciclina liberada foi de 85 a 95%.

Polímeros biodegradáveis como ácido poli-lático, gelatina ou quitosana são utilizados como matrizes para partículas cerâmicas ou como adjuvante para cimentos de fosfato de cálcio. O uso desses polímeros pode introduzir uma biodegradação / liberação de fármacos sob medida para o material cerâmico (HABRAKEN *et al.*, 2007). Os andaimes de nanocompósitos de gelatina HA exibiram um perfil de liberação de fármaco bem controlado, mostrando uma liberação de fármaco dependente de sua carga. Quando a adição inicial da doxiciclina foi normalizada, o perfil de liberação foi quase idêntico. Isso

é de especial importância na liberação de fármacos, pois a liberação exata pode ser controlada simplesmente alterando a quantidade da sua carga.

Quando analisada a atividade antimicrobiana o *Staphylococcus aureus* é a principal causa de infecção bacteriana em humanos, causando desde infecções de tecidos moles até pneumonia, sepse e síndrome do choque séptico (DIEKEMA *et al.*, 2001). A penetração em tecidos mais profundos é produzida por procedimentos invasivos em ambientes de saúde, como a introdução de próteses artificiais, gerando processos infecciosos crônicos como a osteomielite (EIFF *et al.*, 2005; GREENLEE-WACKER *et al.*, 2022; KENNEDY *et al.*, 2010), levando em consideração as informações acima, esta bactéria foi escolhida para realizar o teste de inibição bacteriana.

O estudo do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de doxiciclina em cada um dos andaimes está mostrado na Figura 26 e a faixa de concentração inibitória na Tabela 14. Em termos gerais, é evidente que a concentração inibitória mínima de doxiciclina dentro dos andaimes é inferior a 1 ppm, especificamente em uma faixa entre 0,8 e 0,2 ppm.

De acordo com a Figura 25 pelo menos 1 ppm é liberado em todos os tempos analisados (24 – 48, 48 – 72 e 72 – 96 horas), o que garante que a concentração mínima inibitória (CMI) seja mantida ao longo do tempo. Essa concentração encontrada é melhor do que a relatada em outros estudos como KAZEK-K *et al.*, (2020), onde a CMI da doxiciclina para *S. aureus* é de 1 ppm, o que garante que, com o tempo, a doxiciclina liberada será suficiente para manter a inibição bacteriana.

Os testes de MTT feitos com as duas diluições nos fibroblastos L929 avaliadas 24 horas depois de contato (Figuras 27 e 28). Os gráficos mostraram que nenhum dos andaimes apresentaram toxicidade para as linhagens celulares. Os resultados obtidos mostram mais de 87% de citocompatibilidade dos andaimes com as células, apresentando grau 1 ou 0 de citotoxicidade de acordo com a ISO 10993-5, disposta na metodologia de (XIAO *et al.*, 2018).

A baixa citotoxicidade dos andaimes em relação aos fibroblastos se torna importante visto que essas células chegam ao local da lesão nos estágios iniciais e

proliferam rapidamente, levando à cicatrização (HINZ *et al.*, 2007). As células L929 já foram testadas previamente em outros andaimes e hidrogéis contendo os componentes usados e componentes similares aos usados nos andaimes, e os resultados foram similares aos obtidos neste experimento (KARNA *et al.*, 2001; SHANMUGANATHAN *et al.*, 2008)

Em um estudo de Shanmuganathan, Shanumugasundaram e Adhirajan, (2008); foram desenvolvidas microesferas de quitosana carregadas com doxiciclina, o ensaio de MTT em fibroblastos mostrou que as microesferas carregadas com doxiciclina podem melhorar o percentual de viabilidade celular em relação ao fármaco puro, por gerar uma liberação controlada do fármaco.

A viabilidade dos materiais em pré-osteoblastos avaliados nos testes de MTT feitos com as duas diluições avaliadas 24 horas depois de contato (Figuras 29 e 30). Os testes de MTT feitos com as duas diluições nos pré-osteoblastos MC3T3 mostraram que nenhum dos andaimes apresentaram toxicidade para as linhagens celulares. Os resultados obtidos mostram mais de 82% de citocompatibilidade dos andaimes com as células, apresentando grau 1 ou 0 de citotoxicidade de acordo com a ISO 10993-5, relatada na metodologia de (XIAO *et al.*, 2018).

A hidroxiapatita e outras biocerâmicas de fosfato de cálcio são importantes para o reparo ósseo devido à sua excelente biocompatibilidade e bioatividade (HABRAKEN *et al.*, 2007). As células MC3T3 já foram testadas previamente em outros andaimes e hidrogéis contendo doxiciclina, HA pura ou substituída, gelatina e outros componentes similares aos usados nos andaimes, e os resultados foram similares aos obtidos neste experimento (BEERAN, 2021; CHEN *et al.*, 2019; SATHIYAVIMAL *et al.*, 2019).

Os resultados positivos foram os esperados, pois os materiais utilizados para a fabricação dos andaimes já se mostraram biocompatíveis, além disso, uma das principais razões pelas quais os graus 0 e 1 de citotoxicidade foram obtidos tanto em fibroblastos L929 quanto em pré-osteoblastos MC3T3 é devido à liberação controlada de doxiciclina. Quando a doxiciclina é usada como fármaco puro, há uma diminuição significativa na viabilidade celular acima de 200 µg (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2008).

O teste de MTT complementar em pre-osteoblastos MC3T3 avaliado 4 dias depois de contato do eluato com as células é mostrado na Figura 31. Fica evidente que os andaimes sem doxiciclina 1 e 2, juntamente com os andaimes 1.1 e 2.1, que liberaram 48,71 e 40,76 ppm de doxiciclina, respectivamente, continuam apresentando baixa citotoxicidade, com grau 1 de acordo com a ISO 10993-5. No entanto, os materiais que possuem maior quantidade de fármaco (Andaimes 1,2, 1,3, 2,2, 2,3), apresentam baixa viabilidade celular em uma faixa entre 19,6% e 63,7% com graus de citotoxicidade entre 2 e 4.

O material mais citotóxico é o andaime 1.3, onde o eluato de 10 mg/mL apresentou concentração de fármaco de 96,95 ppm (Tabela 13). A citotoxicidade é verificada nas micrografias celulares representadas nas Figuras 33 e 34, onde as células em estado de apoptose são visualizadas nos andaimes 1.2, 1.3, 2.2, 2.3 possivelmente devido à quantidade de doxiciclina presente nos andaimes. Estudos mostram que altas concentrações de doxiciclina podem diminuir a viabilidade celular (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2008).

Nas micrografias celulares muitas prolongações citoplasmáticas podem ser visualizadas em ambas as células. As MC3T3 exibiram morfologia espalhada característica de adesão celular adequada, e muitos prolongamentos citoplasmáticos segundo a literatura. Em geral, é evidente que a doxiciclina ajudou a obter uma maior proliferação comparando as seções B, em relação às seções A em ambas as variações do material. Sendo B o andaime com menos concentração de doxiciclina e A, o andaime utilizado como controle que não contém fármaco.

A adesão de osteoblastos sobre um material desenvolvido para aplicação óssea é um passo fundamental para ancorar a interface do material ao osso. Os andaimes utilizados como controle (Seção A das Figuras 33 e 34) apresentam células alongadas e diferenciadas, o que indica que o andaime, sem a necessidade de fármaco, é um potencial para regeneração tecidual, pois cumpre sua função de adesão celular e por sua vez ajudar na proliferação celular. Esse resultado era esperado, devido ao fato das partículas de HA estarem em tamanho nanométrico, permitindo uma maior área superficial das células com a cerâmica (HUANG; GUI, 2019), para os quais a interação

é maior e isso também oferece maior adesão celular. Esse resultado está de acordo com os resultados relatados por Eren *et al.*, (2019); & Ma *et al.*, (2021).

A proliferação também está relacionada ao efeito da HA dentro das matrizes poliméricas, os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  são cruciais para o metabolismo das células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) (ZALEWSKA *et al.*, 2022). O  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a expressão de proteínas relacionadas ao osso (como osteopontina e sialoproteína óssea) que são mediadas por canais e quinases dependentes de cálcio específicos. Este mecanismo aumenta a diferenciação dos osteoblastos (PARK, 2010). Outra possibilidade é o efeito da gelatina na proliferação celular, isto porque é um componente degradável do colágeno sendo biocompatível e sua capacidade de se ligar e ancorar células (LIAO *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2010). Tanto a HA quanto o colágeno são os principais componentes da MEC nos ossos, usados para regular a morfologia e a função celular (DONG *et al.*, 2022).



## 2.8. Conclusões

- Segundo as análises feitas no primeiro capítulo, foi verificado que o desenvolvimento da área de biomateriais e sistemas de liberação controlada de fármacos é de grande relevância econômica e social. A produção científica mundial na área de biomateriais está crescendo. Contudo, verificou-se que o Brasil não exerce um papel protagonista dentro da produção científica e patentária nessa área, No entanto, o Brasil tem aumentado anualmente no *Global Innovation Index* (GII), pelo qual pode-se observar que o país vem implementando recursos para melhorar sua capacidade de inovação, o qual pode ser uma abertura para ser um país com maior produção de bens para a saúde.
- De modo geral, é hora de acelerar o desenvolvimento tecnológico e aumentar a inovação para agregar valor à produção econômica nacional no setor de serviços, já que tem pouco valor agregado e pouca interação com o setor industrial. Internacionalmente os países têm interesse na produção de bens para à saúde no Brasil, o que pode gerar para o país oportunidades de geração de renda e melhora econômica interna.
- Com base nos dados obtidos no segundo capítulo, é possível concluir que se desenvolveu um compósito de materiais poliméricos e cerâmicos, gelatina-hidroxiapatita com propriedades biocompatíveis de uma estrutura biomimética de osso, ideais para a regeneração tecidual, tais como: porosidade, pH, degradação, e swelling, verificando que os andaimes desenhados em conjunto com a incorporação de doxiciclina geram uma maior proliferação em células pré-osteoblásticas. Assim, os andaimes formados por compósitos uma boa alternativa para o desenvolvimento de novos andaimes para o desenvolvimento de tecidos e carregamento de fármacos.
- As características físico-químicas individuais dos materiais favoreceram uma estrutura material termoestável, com perfis de liberação do fármaco e degradação compatível com o tempo de regeneração óssea.

- A adição de doxiciclina no andaime é vantajosa visto que inibiu a atividade colagenolítica das MMPs, resultando em um material mais estável na biodegradação enzimática, obtendo-se andaimes com perfil de degradação adequado para regeneração óssea. Além disso, o material mantém a CMI do *S. aureus* o que resulta em um andaime com efeito antimicrobiano desejável na engenharia de tecidos.
- Os andaimes formados pela adição de reticulante 0.7%*p/v* com adição de hidrogel de gelatina – HA 1% *p/v* e doxiciclina 0.3% *p/v* formou uma estrutura mais rígida e estável à degradação. Da mesma forma, essa superfície dos compósitos favoreceu positivamente a proliferação, mostrou maior viabilidade e adesão celular de pré-osteoblastos.

## Referências

- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; TATAGARI, S.; ESTEVES, S. C.; HARLEV, A.; HENKEL, R.; ROYCHOUDHURY, S.; HOMA, S.; PUCHALT, N. G.; RAMASAMY, R.; MAJZOUN, A.; DAO LY, K.; TVRDA, E.; ASSIDI, M.; KESARI, K.; SHARMA, R.; BANIHANI, S.; KO, E.; ABU-ELMAGD, M.; GOSALVEZ, J.; BASHIRI, A. Bibliometrics: Tracking research impact by selecting the appropriate metrics. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 296–309, 2016.
- ALAVARSE, A. C.; FRACHINI, E. C. G.; DA SILVA, R. L. C. G.; LIMA, V. H.; SHAVANDI, A.; PETRI, D. F. S. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 202, n. January, p. 558–596, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>. Acesso em: 20 jun. 2022, 10:05.
- ALIPAL, J.; MOHD PU'AD, N. A. S.; LEE, T. C.; NAYAN, N. H. M.; SAHARI, N.; BASRI, H.; IDRIS, M. I.; ABDULLAH, H. Z. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 42, p. 240–250, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>. Acesso em: 18 ago. 2022, 14:28.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
- ANN L COKER; NALAWANSHA, DHANUSHA A. PFLUM, M. K. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.
- AWAD, H. A.; O'KEEFE, R. J.; MAO, J. J. Bone tissue engineering. **Principles of Tissue Engineering**, [s. l.], p. 1511–1519, 2020.
- BASSI, M. A.; LOPEZ, M. A.; CONFALONE, L.; GAUDIO, R. M.; LOMBARDO, L.; LAURITANO, D. **Enhanced Reader.pdf**. [S. l.: s. n.], 2020.
- BAYDIN, T.; AARSTAD, O. A.; DILLE, M. J.; HATTREM, M. N.; DRAGET, K. I. Long-term storage stability of type A and type B gelatin gels: The effect of Bloom strength and co-solutes. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 127, n. January, p. 107535, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107535>. Acesso em: 14 sep. 2022, 15:16.
- BEERAN, Y. Morphological , mechanical , and in-vitro bioactivity of gelatine / collagen / hydroxyapatite based scaffolds prepared by unidirectional freeze-casting. [s. l.], v. 102, n. July, 2021.

BEGAM, H.; KUNDU, B.; CHANDA, A.; KUMAR, S. MG63 osteoblast cell response on Zn doped hydroxyapatite ( HAp ) with various surface features. **Ceramics International**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 3752–3760, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.010>. Acesso em: 23 sep. 2022, 10:43.

BENEDINI, L.; LAIUPPA, J.; SANTILLÁN, G.; BALDINI, M.; MESSINA, P. Antibacterial alginate/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering: Assessment of their bioactivity, biocompatibility, and antibacterial activity. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 115, n. April, p. 111101, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111101>. Acesso em: 18 sep. 2022, 19:27.

BILLIET, T.; GASSE, B. Van; GEVAERT, E.; CORNELISSEN, M.; MARTINS, J. C.; DUBRUEL, P. Quantitative contrasts in the photopolymerization of acrylamide and methacrylamide-functionalized gelatin hydrogel building blocks. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1531–1545, 2013.

BISWAS, M. C.; JONY, B.; NANDY, P. K.; CHOWDHURY, R. A.; HALDER, S.; KUMAR, D.; RAMAKRISHNA, S.; HASSAN, M.; AHSAN, M. A.; HOQUE, M. E.; IMAM, M. A. Recent Advancement of Biopolymers and Their Potential Biomedical Applications. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 51–74, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02199-y>. Acesso em: 05 jul. 2022, 20:51.

BORTOLANZA, M.; NASCIMENTO, G. C.; SOCIAS, S. B.; PLOPER, D.; CHEHÍN, R. N.; RAISMAN, R.; ELAINE, V.; BEL, D. Tetracycline repurposing in neurodegeneration : focus on Parkinson ' s disease. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 125, n. 10, p. 1403–1415, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-018-1913-1>. Acesso em: 17 sep. 2022, 12:36.

BRASIL. Portaria nº 6.762, de 17 de dezembro de 2019. Institui o Programa Nacional de Apoio aos Ambientes Inovadores – PNI. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Diário oficial da uniaõ**, [s. l.], p. 1–5, 2019.

CAMMARATA, C. R.; HUGHES, M. E.; OFNER, C. M. Carbodiimide induced cross-linking, ligand addition, and degradation in gelatin. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 783–793, 2015.

CAO, W.; PENG, S.; YAO, Y.; XIE, J.; LI, S.; TU, C.; GAO, C. A nanofibrous membrane loaded with doxycycline and printed with conductive hydrogel strips promotes diabetic wound healing in vivo. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], n. xxxx, 2022.

CAPRIO, R. Di; LEMBO, S.; COSTANZO, L. Di; BALATO, A.; MONFRECOLA, G. Anti-Inflammatory Properties of Low and High Doxycycline Doses : An In Vitro Study. [s. l.], v. 2015, 2015.

CARVALHO, R.; SAWA, E.; ISHIKAWA, A.; FARIAS, M. Five decades of doxycycline : Does nanotechnology improve its properties ? *Arno*. [s. l.], v. 618, n. November 2021, 2022.

CASTRO, M. L.; FRANCO, G. C. N.; BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S.; ANA, L. Down-Regulation of Protease Activated Receptor 2 , Interleukin-17 and Other Pro-Inflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. [s. l.], p. 1–11, 2015.

CHEN, P.; LIU, L.; PAN, J.; MEI, J.; LI, C.; ZHENG, Y. Materials Science & Engineering C Biomimetic composite scaffold of hydroxyapatite / gelatin-chitosan core-shell nanofibers for bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 97, n. November 2018, p. 325–335, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.027>. Acesso em: 02 oct. 2022, 16:28.

CHEN, Z.; YAN, X.; YIN, S.; LIU, L.; LIU, X.; ZHAO, G.; MA, W.; QI, W.; REN, Z.; LIAO, H.; LIU, M.; CAI, D.; FANG, H. Influence of the pore size and porosity of selective laser melted Ti6Al4V ELI porous scaffold on cell proliferation, osteogenesis and bone ingrowth. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 106, n. February 2019, p. 110289, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110289>. Acesso em: 14 sep. 2022, 15:31.

CLAASSEN, C.; SEWALD, L.; TOVAR, G. E. M.; BORCHERS, K. Controlled release of vascular endothelial growth factor from heparin-functionalized gelatin type a and albumin hydrogels. **Gels**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2017.

CODREA, C. I.; CROITORU, A. M.; BACIU, C. C.; MELINESCU, A.; FICAI, D.; FRUTH, V.; FICAI, A. Advances in osteoporotic bone tissue engineering. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–27, 2021.

CUI, N.; QIAN, J.; LIU, T.; ZHAO, N.; WANG, H. Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 126, p. 192–198, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.013>. Acesso em: 23 sep. 2022, 09:16.

DASSANAYAKE, R.; ACHARYA, S.; ABIDI, N. Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications. **Intech**, [s. l.], v. 11, n. tourism, p. 13, 2016. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>. Acesso em: 14 mar. 2022, 15:19.

DE CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Properties of chemically modified gelatin films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 45–53, 2006.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

DEROME, P.; STERNHEIM, A.; BACKSTEIN, D.; MALO, M. Treatment of large bone defects with trabecular metal cones in revision total knee arthroplasty: Short term clinical and radiographic outcomes. **Journal of Arthroplasty**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 122–126, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2013.04.033>. Acesso em: 29 jun. 2022, 18:46.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. Survey of Infections Due to Staphylococcus Species : Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States , Canada , Latin America , Europe , and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Survei. [s. l.], v. 52242, n. Supl 2, 2001.

DONG, Z.; FAN, C.; DENG, W.; SUN, P. Biomaterials Advances Porous gelatin microsphere-based scaffolds containing MC3T3-E1 cells and calcitriol for the repair of skull defect. **Biomaterials Advances**, [s. l.], v. 138, n. January, p. 212964, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212964>. Acesso em: 19 sep. 2022, 12:58.

DONG, Z.; MENG, X.; YANG, W.; ZHANG, J.; SUN, P.; ZHANG, H.; FANG, X.; WANG, D. A.; FAN, C. Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 122, n. January, 2021.

DRESSLER, M.; DOMBROWSKI, F.; SIMON, U.; BÖRNSTEIN, J.; HODOROABA, V. D.; FEIGL, M.; GRUNOW, S.; GILDENHAAR, R.; NEUMANN, M. Influence of gelatin coatings on compressive strength of porous hydroxyapatite ceramics. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 523–529, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2010.11.004>. Acesso em: 04 jul. 2022, 17:47.

EIDEN-ASSMANN, S.; VIERTELHAUS, M.; HEISS, A.; HOETZER, K. A.; FELSCHE, J. The influence of amino acids on the biomineralization of hydroxyapatite in gelatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 481–486, 2002.

EIFF, C. Von; JANSEN, B.; KOHNEN, W.; BECKER, K. Infections Associated with Medical Devices Pathogenesis , Management and Prophylaxis. [s. l.], v. 65, n. 2, p. 179–214, 2005.

EL-HABASHY, S. E.; EL-KAMEL, A. H.; ESSAWY, M. M.; ABDELFATTAH, E. A.; ELTAHER, H. M. 3D printed bioinspired scaffolds integrating doxycycline nanoparticles : Customizable implants for in vivo osteoregeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 607, n. August, p. 121002, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121002>. Acesso em: 07 abr. 2022, 14:29.

EREN, Y.; ÇAK, B.; GÖKÇE, A.; FINDIK, F.; GULSOY, H. O.; GULSOY, N.; MUTLU, Ö.; ÖZACAR, M. Materials Science & Engineering C Novel hydroxyapatite / graphene oxide / collagen bioactive composite coating on Ti6Nb alloys by electrodeposition. [s. l.], v. 101, n. January, p. 292–305, 2019.

FAGUNDES, M. C.; GARCIA, P. A. de A.; MOTTA, G. D. S.; ARMOND-DE-MELO, D. R. Perfil Tecnológico Da Csn : Um Estudo Patentométrico. **Review of Administration and Innovation - RAI**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 276, 2014.

FAN, C.; WANG, D. A. Macroporous Hydrogel Scaffolds for Three-Dimensional Cell Culture and Tissue Engineering. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 451–461, 2017.

FENG, P.; PENG, S.; SHUAI, C.; GAO, C.; YANG, W.; BIN, S.; MIN, A. **In Situ Generation of Hydroxyapatite on Biopolymer Particles for Fabrication of Bone Scaffolds Owning Bioactivity**. [S. l.: s. n.] 2020.v. 12.

GALOW, A. M.; REBL, A.; KOCZAN, D.; BONK, S. M.; BAUMANN, W.; GIMSA, J. Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 10, n. February, p. 17–25, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.001>. Acesso em: 25 jul. 2022, 19:36.

GII. Global Innovation Index 2021 - Brazil ranks. [s. l.], 2021.

GOMEZ-GUILLEN, M. C.; GIMENEZ, B.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>. Acesso em: 07 ago. 2022, 22:12.

GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA, F.; SOCÍAS, S. B.; ÁVILA, C. L.; TORRES-BUGÉAU, C. M.; BARBOSA, L. R. S.; BINOLFI, A.; SEPÚLVEDA-DÍAZ, J. E.; DEL-BEL, E.; FERNANDEZ, C. O.; PAPY-GARCIA, D.; ITRI, R.; RAISMAN-VOZARI, R.; CHEHÍN, R. N. Repurposing doxycycline for synucleinopathies : remodelling of  $\alpha$ -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. **Nature Publishing Group**, [s. l.], n. December 2016, p. 1–13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41755>. Acesso em: 01 jun. 2022, 06:56.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 131–135, 1990.

GREENLEE-WACKER, M. C.; RIGBY, K. M.; SCOTT, D.; PORTER, A. R.; DELEO, F. R.; NAUSEEF, M. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by Human Neutrophils

Prevents Macrophage Efferocytosis and Induces Programmed Necrosis. [s. l.], 2022.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering ☆. [s. l.], v. 59, p. 234–248, 2007.

HAFEZI MOGHADDAM, R.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H.; AMRAEI, R.; HAFEZI MOGHADDAM, Z. Doxycycline drug delivery using hydrogels of O-carboxymethyl chitosan conjugated with caffeic acid and its composite with polyacrylamide synthesized by electron beam irradiation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 154, p. 962–973, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.165>. Acesso em: 17 sep. 2022, 18:35.

HAMZA, M.; SHAHZADI, L.; BATOOL, R.; ZAMAN, S.; SAMAD, A.; FAROOQ, A.; ANWAR, A.; UR, I.; YAR, M. International Journal of Biological Macromolecules Thyroxine-loaded chitosan / carboxymethyl cellulose / hydroxyapatite hydrogels enhance angiogenesis in in-ovo experiments. [s. l.], v. 145, p. 1162–1170, 2020.

HENRIQUE, P.; ANDR, C. B.; MARIN, B.; GIANNINI, M.; ROSALEN, P. L.; CONSANI, S.; FRANÇA, R. Physicochemical properties , metalloproteinases inhibition , and antibiofilm activity of doxycycline-doped dental adhesive. [s. l.], v. 104, n. December 2020, p. 1–10, 2021.

HINZ, B.; PHAN, S.; THANNICKAL, V.; GALLI, A.; BOCHATON, M.; GEBBIANI, G. The Myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*. [s. l.], v. 170 n. 6, p. 1807–1816, 2007.

HOCH, E.; TOVAR, G. E. M.; BORCHERS, K. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 51–66, 2016.

HOLBACK, H.; YEO, Y.; PARK, K. **Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications**. [S. l.]: Woodhead Publishing Limited, 2011. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.1.3>. Acesso em: 16 sep. 2022, 11:43.

HU, W.; WANG, Z.; XIAO, Y.; ZHANG, S.; WANG, J. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials Science**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 843–855, 2019.

HUANG, L. H.; GUI, B. S. Shape - dependent adhesion and endocytosis of hydroxyapatite nanoparticles on A7R5 aortic smooth muscle cells. [s. l.], n. January, p. 1–15, 2019.



HYNES, R. O. The extracellu. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5957, p. 1216–1219, 2009.

IBGE. **Pesquisa de Inovação Notas técnicas - PINTEC**. [S. l.: s. n.], 2017. 2017.

Disponível em:

[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101706\\_notas\\_tecnicas.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101706_notas_tecnicas.pdf). Acesso em: 21 mai. 2022, 09:20.

IBGE. PINTEC - Pesquisa de Inovação 2017. [s. l.], p. 1–4, 2020. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101706>.

Acesso em: 26 jun. 2022, 22:14.

IJIMA, M.; DU, C.; ABBOTT, C.; DOI, Y.; MORADIAN-OLDAK, J. Control of apatite crystal growth by the co-operative effect of a recombinant porcine amelogenin and fluoride. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 114, n. SUPPL. 1, p. 304–307, 2006.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 589–601, 2006.

JAFARI-SABET, M.; NASIRI, H.; ATAEE, R. The Effect of Cross-Linking Agents and Collagen Concentrations on Properties of Collagen Scaffolds. **Journal of Archives in Military Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2016.

JEE, S. S.; KASINATH, R. K.; DIMASI, E.; KIM, Y. Y.; GOWER, L. Oriented hydroxyapatite in turkey tendon mineralized via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. **CrystEngComm**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 2077–2083, 2011.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles : Mechanisms of Controlling Drug Release. [s. l.], 2016.

KARAGEORGIU, V.; Ã, D. K. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. [s. l.], v. 26, p. 5474–5491, 2005.

KARNA, E.; PAŁKA, J.; WOŁCZYNSKI, S. Doxycycline-induced inhibition of prolidase activity in human skin fibroblasts and its involvement in impaired collagen biosynthesis. [s. l.], 2001.

KAZEK-K, A.; NOSOL, A.; JOANNA, P.; MONIKA, Ś.; STUDENT, S.; BRZYCHCZY-W, M. Bioactive Materials Physico-chemical and biological evaluation of doxycycline loaded into hybrid oxide-polymer layer on Ti – Mo alloy. [s. l.], v. 5, n. January, p. 553–563, 2020.

KENNEDY, A. D.; WHITNEY, A. R.; BRAUGHTON, K. R.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, M.; DELEO, F. R. Rapid Neutrophil Destruction following Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. [s. l.], v. 59840, p. 560–575, 2010.

KHUNMANEE, S.; JEONG, Y.; PARK, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. **Journal of Tissue Engineering**, [s. l.], v. 8, 2017.

KIM, H.; HIMENO, T.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. [s. l.], v. 26, p. 4366–4373, 2005.

KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: Characterization and antibiotic drug release. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 686–698, 2005.

KIM, B. S.; PARK, I. K.; HOSHIBA, T.; JIANG, H. L.; CHOI, Y. J.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 238–268, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.10.001>. Acesso em: 23 mai. 2022, 18:54.

KIM, H. W.; SONG, J. H.; KIM, H. E. Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration. **Advanced Functional Materials**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1988–1994, 2005.

KLEIN, T. J.; RIZZI, S. C.; SCHROBBACK, K.; REICHERT, J. C.; JEON, J. E.; CRAWFORD, R. W.; HUTMACHER, D. W. Long-term effects of hydrogel properties on human chondrocyte behavior. **Soft Matter**, [s. l.], v. 6, n. 20, p. 5175–5183, 2010.

KLIMEK, K.; BELCARZ, A.; PAZIK, R.; SOBIERAJSKA, P.; HAN, T.; WIGLUSZ, R. J.; GINALSKA, G. “ False ” cytotoxicity of ions-adsorbing hydroxyapatite — Corrected method of cytotoxicity evaluation for ceramics of high specific surface area. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 65, p. 70–79, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.105>. Acesso em: 11 jul. 2022, 14:17.

KONDAVEETI, S.; BUENO, P. V. de A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; ESPOSITO, F.; LINCOPAN, N.; SIERAKOWSKI, M. R.; PETRI, D. F. S. Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 186, n. November 2017, p. 159–167, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.044>. Acesso em: 04 nov. 2022, 23:11.

KRISHNAN, V.; LAKSHMI, T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 78–83,

2013.

LAFFLEUR, F.; KECKEIS, V. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed?. **International Journal of Pharmaceutics**: X, [s. l.], v. 2, n. March, 2020.

LAI, J. Y. Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1899–1911, 2010.

LI, J.; REN, N.; QIU, J.; JIANG, H.; ZHAO, H.; WANG, G.; BOUGHTON, R. I.; WANG, Y.; LIU, H. Carbodiimide crosslinked collagen from porcine dermal matrix for high-strength tissue engineering scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 61, p. 69–74, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.038>. Acesso em: 14 oct. 2022, 20:23.

LI, Yuhua; YANG, C.; ZHAO, H.; QU, S.; LI, X.; LI, Yuanyuan. New developments of titanium-based alloys for biomedical applications. **Materials**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1709–1800, 2014.

LIAO, H.; WALBOOMERS, X. F.; HABRAKEN, W. J. E. M.; ZHANG, Z.; LI, Y.; GRIJPMA, D. W.; MIKOS, A. G.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Acta Biomaterialia Injectable calcium phosphate cement with PLGA, gelatin and PTMC microspheres in a rabbit femoral defect. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1752–1759, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.020>. Acesso em: 04 sep. 2022, 11:15.

LIU, W.; DAN, X.; LU, W. W.; PAN, H. Importance of Biomaterials In Vivo Microenvironment pH ( $\mu\text{e-pH}$ ) in the Regeneration Process of Osteoporotic Bone Defects. [s. l.], v. 9, p. 449–472, 2018. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-5975-9\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-5975-9_11). Acesso em: 22 oct. 2022, 19:16.

LIU, M.; ZENG, X.; MA, C.; YI, H.; ALI, Z.; MOU, X.; LI, S.; DENG, Y.; HE, N. **Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering**. [S. l.: s. n.], 2017.

LU, J.; WEI, J.; YAN, Y. Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration. [s. l.], p. 607–615, 2011.

MA, P.; WANG, Y.; LI, B.; HOU, H. Cross-linking effects of carbodiimide, oxidized chitosan oligosaccharide and glutaraldehyde on acellular dermal matrix of basa fish (*Pangasius bocourti*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 677–686, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.019>. Acesso em: 12 ago. 2022, 16:46.

MA, P.; WU, W.; WEI, Y.; REN, L.; LIN, S.; WU, J. Materials & Design Biomimetic gelatin / chitosan / polyvinyl alcohol / nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials & Design**, [s. l.], v. 207, p. 109865, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109865>. Acesso em: 23 sep. 2022, 17:21.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 59, n. 4–5, p. 207–233, 2007.

MENEZES, M. do L. L. R.; RIBEIRO, H. L.; ABREU, F. de O. M. d. S.; FEITOSA, J. P. de A.; FILHO, M. de S. M. de S. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 189, n. November 2019, p. 110852, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110852>. Acesso em: 21 jul. 2022, 16:42.

MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E.; PEPPAS, N. A.; LANGER, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 101–124, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>. Acesso em: 03 mar. 2022, 20:55.

MONTEIRO, A. P. de F. Preparação e caracterização de nanofibras magnéticas para liberação controlada de fármacos e hipertermia. [s. l.], p. 118, 2018.

MOTTA, G. da S.; QUINTELLA, R. H. Assessment of non-financial criteria in the selection of investment projects for seed capital funding: The contribution of scientometrics and patentometrics. **Journal of Technology Management and Innovation**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 172–193, 2012.

MUTHYALA, S.; BHONDE, R. R.; NAIR, P. D. Cytocompatibility studies of mouse pancreatic islets on gelatin-PVP semi IPN scaffolds in vitro: Potential implication towards pancreatic tissue engineering. **Islets**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 357–366, 2010.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995.

NAU, R.; SO, F. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid / Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections † PHYSIOLOGY OF THE EXCHANGE OF DRUGS BETWEEN BLOOD AND THE DIFFERENT. [s. l.], v. 23, n. 4, p. 858–883, 2010.

NG, H. W.; ZHANG, Y.; PRABAKAR, S. Monitoring the Degradation of Collagen

Hydrogels. [s. l.], p. 1–11, 2020.

NIHMATH, A.; RAMESAN, M. T. Fabrication, Characterization and Dielectric Studies of NBR/Hydroxyapatite Nanocomposites. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 481–489, 2017.

NINAN, N.; GROHENS, Y.; ELAIN, A.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. Synthesis and characterisation of gelatin / zeolite porous scaffold. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 2433–2445, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.02.014>. Acesso em: 18 ago. 2022, 22:43.

NIU, H.; ZHANG, K.; MYLLYMÄKI, S.; ISMAIL, M. Y.; KINNUNEN, P.; ILLIKAINEN, M.; LIIMATAINEN, H. Nanostructured and Advanced Designs from Biomass and Mineral Residues: Multifunctional Biopolymer Hydrogels and Hybrid Films Reinforced with Exfoliated Mica Nanosheets. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 13, n. 48, p. 57841–57850, 2021.

NOOEAIID, P.; CHUYSINUAN, P.; PENGSIK, C. Journal of Science : Advanced Materials and Devices Polylactic acid microparticles embedded porous gelatin scaffolds with multifunctional properties for soft tissue engineering. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 337–345, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.07.002>.

ØDEGAARD, K. S.; TORGERSEN, J.; ELVERUM, C. W. Structural and biomedical properties of common additively manufactured biomaterials: A concise review. **Metals**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1–23, 2020.

OECD/EUROSTAT. **Oslo Manual 2018: Guidelines for Collecting, Reporting and Using Data on Innovation**. [S. l.: s. n.], 2018. 2018.

OECD. Manual de Frascati 2015: Guía para la recopilación y presentación de información sobre la investigación y el desarrollo experimental. [s. l.], 2018. Disponível em: [https://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/manual-de-frascati-2015\\_9789264310681-es](https://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/manual-de-frascati-2015_9789264310681-es). Acesso em: 24 oct. 2022, 07:46.

ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRI, A.; BAHARVAND, H.; DAEMI, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, n. PartA, p. 678–688, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>. Acesso em: 29 jul. 2022, 15:12.

PANAGOPOULOS, D.; KARYDAKIS, P.; GIAKOUMETTIS, D.; THEMISTOCLEOUS, M. The 100 Most Cited Papers About Brain Metastases. **World Neurosurgery**, [s. l.], v.

138, p. 98–114, 2020.

PARK, G. J. Y. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. [s. l.], p. 1649–1654, 2010.

PENG, H. T.; MARTINEAU, L.; SHEK, P. N. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 997–1007, 2008.

PERAZZO, M. F.; OTONI, A. L. C.; COSTA, M. S.; GRANVILLE-GRANVILLE, A. F.; PAIVA, S. M.; MARTINS-JÚNIOR, P. A. The top 100 most-cited papers in Paediatric Dentistry journals: A bibliometric analysis. **International Journal of Paediatric Dentistry**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 692–711, 2019.

PESET, F.; GARZÓN-FARINÓS, F.; GONZÁLEZ, L. M.; GARCÍA-MASSÓ, X.; FERRER-SAPENA, A.; TOCA-HERRERA, J. L.; SÁNCHEZ-PÉREZ, E. A. Survival analysis of author keywords: An application to the library and information sciences area. **Journal of the Association for Information Science and Technology**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 462–473, 2020.

PETER, M.; GANESH, N.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan – gelatin / nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 687–694, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.050>. Acesso em: 11 mai. 2022, 12:46.

PIACENTE, F. J.; SILVA, V. de C.; BIAGGI, D. E. Produção de etanol de segunda geração a partir da cana-de-açúcar: Estudo de prospecção de patentes. **Espacios**, [s. l.], v. 36, n. 23, 2015.

PROCHASKA, C.; GALLIOS, G. NANO-adsorbents for cobalt removal from wastewater: A Bibliometric analysis of research articles indexed in the Scopus database. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1177, 2021.

PUGLIESE, R.; MARCHINI, A.; SARACINO, G. A. A.; ZUCKERMANN, R. N.; GELAIN, F. Cross-linked self-assembling peptide scaffolds. **Nano Research**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 586–602, 2018.

PUTNAM, A. J.; MOONEY, D. J. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 824–826, 1996.

QI, H.; XIAO, S.; SHI, R.; WARD, M. O.; CHEN, Y.; TU, W.; SU, Q.; WANG, W.; WANG,

X.; ZHANG, Z. **Enhanced Reader.pdf**. [S. l.: s. n.], 2018.

RAGOTHAMAN, M.; PALANISAMY, T.; KALIRAJAN, C. Collagen-poly(dialdehyde) guar gum based porous 3D scaffolds immobilized with growth factor for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 114, p. 399–406, 2014.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>. Acesso em: 11 mai. 2022, 15:16.

REN, K.; HE, C.; XIAO, C.; LI, G.; CHEN, X. Injectable glycopolyptide hydrogels as biomimetic scaffolds for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s. l.], v. 51, p. 238–249, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.026>. Acesso em: 23 jul. 2022, 18:29.

RODRIGUEZ, I. A.; SAXENA, G.; HIXON, K. R.; SELL, S. A.; BOWLIN, G. L. In vitro characterization of MG-63 osteoblast-like cells cultured on organic-inorganic lyophilized gelatin sponges for early bone healing. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 2011–2019, 2016.

ROSSO, F.; MARINO, G.; GIORDANO, A.; BARBARISI, M.; PARMEGGIANI, D.; BARBARISI, A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 203, n. 3, p. 465–470, 2005.

SAMADIAN, H.; MALEKI, H.; ALLAHYARI, Z.; JAYMAND, M. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 420, p. 213432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213432>. Acesso em: 19 sep. 2022, 20:55.

SANTORO, M.; TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 190, p. 210–218, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.014>. Acesso em: 25 sep. 2022, 18:36.

SARAIVA, S. M.; MIGUEL, S. P.; RIBEIRO, M. P.; COUTINHO, P.; CORREIA, I. J. Synthesis and characterization of a photocrosslinkable chitosan-gelatin hydrogel aimed for tissue regeneration. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 78, p. 63478–63488, 2015.

SATHIYAVIMAL, S.; VASANTHARAJ, S.; LEWIS OSCAR, F.; PUGAZHENDHI, A.; SUBASHKUMAR, R. International Journal of Biological Macromolecules Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite ( hydroxyapatite-gelatin-chitosan- fibrin-bone ash ) for bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 844–852, 2019. Disponível em:

em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.058>. Acesso em: 02 oct. 2022, 13:21.

SEBASTIAN, T.; PREISKER, T. R.; GORJAN, L.; GRAULE, T.; ANEZIRIS, C. G.; CLEMENS, F. J. Synthesis of hydroxyapatite fibers using electrospinning: A study of phase evolution based on polymer matrix. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 2489–2496, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.01.070>. Acesso em: 09 ago. 2022, 11:24.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. **A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation**. [S. l.: s. n.], 1994.

SHAKIR, M.; JOLLY, R.; KHAN, M. S.; IRAM, N. e.; KHAN, H. M. Nano-hydroxyapatite/chitosan-starch nanocomposite as a novel bone construct: Synthesis and in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 80, p. 282–292, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.009>. Acesso em: 28 jul. 2022, 09:06.

SHANMUGANATHAN, S.; SHANUMUGASUNDARAM, N.; ADHIRAJAN, N. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. [s. l.], v. 73, p. 201–211, 2008.

SHEN, Y.; LIU, W.; WEN, C.; PAN, H.; WANG, T.; DARVELL, B. W.; LU, W. W.; HUANG, W. Bone regeneration: Importance of local pH - Strontium-doped borosilicate scaffold. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 17, p. 8662–8670, 2012.

SILVA, M. S.; LOPES, J. M.; DANIELLE, D.; PIAU, N.; TELES, E. O. As políticas públicas de inovação e o fomento a criação de centros de inovação tecnológica no brasil. [s. l.], v. 7, p. 2209–2218, 2021.

SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; TUSZYNSKA, M.; OLEWNIK-KRUSZKOWSKA, E. Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents. **Materials**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–17, 2021.

SLAUGHTER, B. V.; KHURSHID, S. S.; FISHER, O. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; PEPPAS, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 21, n. 32–33, p. 3307–3329, 2009.

SLUSAREWICZ, P.; ZHU, K.; HEDMAN, T. Kinetic characterization and comparison of various protein crosslinking reagents for matrix modification. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 1175–1181, 2010.

SPEZIALI, M. G. Cellulose technologies applied to biomedical purposes from the patentometric point of view. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 10095–10117, 2020.



Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03477-z>. Acesso em: 04 sep. 2022, 16:27.

SUN, T.; ZHAO, N.; NI, C.; ZHAO, X.; ZHANG, W.; SU, X.; ZHANG, D.; GU, Q.; SUN, B. Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase ( FAK ). **Cancer Letters**, [s. l.], v. 285, n. 2, p. 141–150, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.004>. Acesso em: 28 oct. 2022, 09:12.

SUNDAR, G.; JOSEPH, J.; CHELLAMMA, P.; JOHN, A.; ABRAHAM, A. Marine collagen polymeric sponge impregnated with phyto - silver nanoparticles for burn therapy. **Polymer Bulletin**, [s. l.], n. 0123456789, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04347-3>. Acesso em: 14 oct. 2022, 12:16.

TAKIGAWA, T.; ENDO, Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. **Journal of Occupational Health**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 75–87, 2006.

THAKUR, G.; RODRIGUES, F. C.; SINGH, K. Crosslinking Biopolymers for Advanced Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 1078, p. 213–231, 2018.

THEIN-HAN, W.; XU, H. H. K. Prevascularization of a gas-foaming macroporous calcium phosphate cement scaffold via coculture of human umbilical vein endothelial cells and osteoblasts. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 19, n. 15–16, p. 1675–1685, 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Safety Data Sheet . م سلا تانايب فرشن Safety Data Sheet. **Material Safety Data Sheet**, [s. l.], v. 4(2), n. 1, p. 8–10, 2012. Disponível em: [https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_US/id/16490607/contents](https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/16490607/contents). Acesso em: 07 sep. 2022, 12:25.

TIMKOVICH, R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 79, n. 1–2, p. 135–143, 1977.

TZAFRIRI, A. R.; BERCOVIER, M.; PARNAS, H. Reaction Diffusion Model of the Enzymatic Erosion of Insoluble Fibrillar Matrices. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 776–793, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75208-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75208-9). Acesso em: 25 sep. 2022, 19:48.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 523–538, 2010.

VO, T. S.; VO, T. T. B. C.; NGUYEN, T. S.; PHAM, N. D. Incorporation of hydroxyapatite in crosslinked gelatin/chitosan/poly(vinyl alcohol) hybrids utilizing as

reinforced composite sponges, and their water absorption ability. **Progress in Natural Science: Materials International**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 664–671, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2021.09.003>. Acesso em: 05 sep. 2022, 18:54.

WANG, J.; MANIRUZZAMAN, M. A global bibliometric and visualized analysis of bacteria-mediated cancer therapy. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. xxx, n. xx, p. 103297, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.023>. Acesso em: 25 jul. 2022, 08:25.

WANG, Y.; SHANG, S.; LI, C. Aligned Biomimetic Scaffolds as a New Tendency in Tissue Engineering. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 3–18, 2015.

WEN, H.; JUNG, H.; LI, X. Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges. **AAPS Journal**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 1327–1340, 2015.

XIAO, C.; LU, Y.; JING, Z.; ZHANG, L. Study on physical properties of blend films from gelatin and polyacrylamide solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 949–955, 2002.

XIAO, S.; WANG, M.; WANG, L.; ZHU, Y. Environment-Friendly Synthesis of Trace Element Zn, Sr, and F Codoping Hydroxyapatite with Non-cytotoxicity and Improved Osteoblast Proliferation and Differentiation. [s. l.], p. 148–161, 2018.

YANG, F.; WANG, J.; HOU, J.; GUO, H.; LIU, C. Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1514–1528, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.058>. Acesso em: 18 mai. 2022, 17:14.

YANG, G.; XIAO, Z.; LONG, H.; MA, K.; ZHANG, Junpeng; REN, X.; ZHANG, Jiang. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20006-y>. Acesso em: 08 jul. 2022, 21:46.

YEUNG, A. W. K.; SOUTO, E. B.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; NOVELLINO, E.; TEWARI, D.; WANG, D.; ATANASOV, A. G.; SANTINI, A. Big impact of nanoparticles: analysis of the most cited nanopharmaceuticals and nanonutraceuticals research. **Current Research in Biotechnology**, [s. l.], v. 2, p. 53–63, 2020.

ZALEWSKA, J.; PRZEKORA, A.; PA, K.; BELCARZ, A. Biomaterials Advances Gypsum-related compensation of ions uptake by highly porous hydroxyapatite ceramics

– Consequences for osteoblasts growth and proliferation. [s. l.], v. 133, n. January, 2022.

ZHANG, R.; TANG, M.; BOWYER, A.; EISENTHAL, R.; HUBBLE, J. A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 22, p. 4677–4683, 2005.

ZHU, S.; LIU, Y.; GU, Z.; ZHAO, Y. Research trends in biomedical applications of two-dimensional nanomaterials over the last decade – A bibliometric analysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 188, p. 114420, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114420>. Acesso em: 29 oct. 2022, 19:15.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 607–626, 2011.

ZOU, Y.; LUO, Y.; ZHANG, J.; XIA, N.; TAN, G.; HUANG, C. Bibliometric analysis of oncolytic virus research, 2000 to 2018. **Medicine (United States)**, [s. l.], v. 98, n. 35, 2019.