



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de Doutorado

Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea: estudo *in vitro* e *in vivo*

Autora: Cheisy Daiana Freitas Moreira

Orientadora: Prof. Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Prof. Herman Sander Mansur

Maio de 2018

Cheisy Daiana Freitas Moreira

Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea: estudo *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia dos Materiais

Orientadora: Prof. PhD. Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
2018

M837h	<p>Moreira, Cheisy Daiana Freitas. Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea [manuscrito]: estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> / Cheisy Daiana Freitas Moreira. - 2018. xvii,133 f., enc.: il.</p> <p>Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira. Coorientador: Herman Sander Mansur.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Bibliografia: f. 113-133.</p> <p>1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Hidrogéis - Teses. 4. Quitosana - Teses. 5. Gelatina - Teses. 6. Vidros bioativos - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães, 1960 - . II. Mansur, Herman Sander, 1962- . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título. CDU: 620(043)</p>
-------	---

*Dedico este trabalho a minha família,
pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, desafios e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, por me proporcionarem segurança, sabedoria e disciplina. Obrigada mamãe e papai, vocês me ensinaram a ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu padrasto, por me tratar como filha e me oferecer condições para investir em meus estudos. Muito obrigada, se não fosse pelo seu incentivo eu não teria chegado até aqui.

Ao meu marido, irmãos e amigos, pela compreensão nos momentos em que precisei trocar o lazer por horas de estudo.

À Professora Marivalda Pereira, pela orientação e amizade. Obrigada pela confiança depositada em mim e em minha proposta de trabalho.

Ao Professor Herman Mansur, pela coorientação e apoio em todas as etapas de realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, especialmente Talita Martins, Breno Barrioni, Layla Mosqueira, Andréia Grossi, Diogo Maia, Priscila Mol, Sandhra Carvalho e Agda Oliveira, pelo companheirismo e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFMG, pela disponibilidade de infraestrutura do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros (LCTP). Agradeço especialmente ao Professor Ricardo Sousa, pela confiança e atenção dedicada a mim.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais por fornecerem equipamento e suporte técnico para os experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

Ao Centro de Nanociência, Nanotecnologia e Inovação-CeNano², por fornecerem equipamento e suporte técnico para os experimentos envolvendo espectroscopia, análise DLS e potencial zeta.

Ao Professor Dagoberto Brandão e Patricia Trigueiro pelas análises envolvendo microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Análises Químicas (LAQ-DEMET/UFMG, INCT-Acqua) por fornecerem equipamento e suporte técnico para os experimentos envolvendo Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

Ao Professor Marcos Augusto de Sá e Júlia Moraes, do Departamento de Morfologia (ICB/UFMG) pelo suporte técnico na realização dos experimentos *in vivo*.

À Professora Maria de Fátima Leite, Rodrigo Florentino e Andressa França, do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG) pelo suporte técnico na realização dos testes de toxicidade *in vivo*.

À Professora Cleuza e Bárbara Okano do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (Escola de Veterinária/UFMG) por fornecerem suporte técnico para realização dos experimentos envolvendo testes *in vivo*.

Ao Professor Sidney Silva, do Departamento de Materiais (CEFET-MG) por ceder dispositivo para realização dos testes de seringabilidade.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE NOTAÇÕES	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	4
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Ossos</i>	5
3.1.1. <i>Estrutura óssea</i>	5
3.1.2. <i>Reparo de defeitos ósseos</i>	7
3.2. <i>Biomateriais e Medicina Regenerativa</i>	9
3.3. <i>Hidrogéis</i>	12
3.3.1. <i>Aspectos Gerais</i>	12
3.3.2. <i>Hidrogéis Termossensíveis e Aplicações Biomédicas</i>	14
3.4. <i>Quitosana</i>	17
3.4.1. <i>Estrutura e propriedades</i>	17
3.4.2. <i>Aplicações como biomaterial</i>	20
3.5. <i>Colágeno/ Gelatina</i>	21
3.5.1. <i>Estrutura Molecular e Propriedades</i>	21
3.5.2. <i>Aplicações como biomaterial</i>	25
3.6. <i>Vidro Bioativo</i>	26
3.6.1. <i>Aspectos Gerais</i>	26

3.6.2.	Aplicações Biomédicas	31
4.	METODOLOGIA	34
4.1.	<i>Etapas de desenvolvimento do trabalho.....</i>	34
4.2.	<i>Matéria-Prima</i>	35
4.3.	<i>Síntese das nanopartículas de vidro bioativo</i>	35
4.4.	<i>Caracterização da matéria-prima.....</i>	36
4.5.	<i>Síntese dos hidrogéis termossensíveis</i>	39
4.6.	<i>Caracterização dos hidrogéis.....</i>	40
4.6.1.	Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microtomografia Computadorizada (Micro-CT).....	40
4.6.2.	Análise de Potencial Zeta	41
4.6.3.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	41
4.6.4.	Avaliação da termossensibilidade por Ensaio Reológico.....	42
4.6.5.	Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis.....	42
4.6.6.	Avaliação da injetabilidade.....	43
4.6.7.	Avaliação da capacidade de absorção de água	44
4.6.8.	Ensaio de imersão em solução SBF.....	44
4.6.9.	Caracterização biológica <i>in vitro</i> dos hidrogéis	46
4.6.10.	Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia <i>in vivo</i>	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1.	<i>Caracterização das matérias-primas</i>	53
5.1.1.	Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	53
5.1.2.	Análise por Difração de Raios X (DRX)	56
5.1.3.	Avaliação do comportamento térmico:.....	57
5.1.4.	Determinação do grau de desacetilação da quitosana	59
5.1.5.	Análise estrutural das nanopartículas de vidro bioativo	61
5.2.	<i>Caracterização dos hidrogéis termossensíveis.....</i>	64
5.2.1.	Análise qualitativa do comportamento termorresponsivo dos hidrogéis.....	64
5.2.2.	Análise de Potencial Zeta	65
5.2.3.	Caracterização química por FTIR	68
5.2.4.	Análise microestrutural dos hidrogéis.....	71
5.2.5.	Avaliação da capacidade de absorção de água	74

5.2.6.	Avaliação da termossensibilidade por ensaio reológico	76
5.2.7.	Avaliação da seringabilidade	79
5.2.8.	Avaliação da injetabilidade.....	80
5.2.9.	Ensaio de imersão em solução SBF.....	81
5.2.10.	Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia <i>in vitro</i>	93
5.2.11.	Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia <i>in vivo</i>	98
6.	CONCLUSÕES.....	109
7.	CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO	111
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
9.	REFERÊNCIAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura hierárquica do tecido ósseo em diferentes escalas de comprimento.	5
Figura 2. Representação esquemática das células do tecido ósseo.	6
Figura 3. Representação do processo típico de reparo em defeitos ósseos.	9
Figura 4. Exemplos de hidrogéis físicos interligados por (a) interações eletrostáticas; (b) interações hidrofóbicas e (c) ligações de hidrogênio.	12
Figura 5. Representação esquemática da formação de hidrogel químico utilizando agente reticulante.	13
Figura 6. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas poliméricos LCST e UCST. ...	14
Figura 7. Representação esquemática da mudança de conformação da cadeia polimérica em uma solução do tipo LCST.	15
Figura 8. Representação estrutural da quitina e quitosana.	18
Figura 9. Ilustração do comportamento da quitosana em diferentes valores de pH.	19
Figura 10. Representação da estrutura do colágeno e dos principais aminoácidos formadores.	22
Figura 11. Ilustração das principais etapas envolvidas no processo de produção da gelatina.	23
Figura 12. Métodos de tratamento do colágeno para obtenção da gelatina Tipo A e Tipo B.	24
Figura 13. Representação dos cinco estágios envolvidos na formação da camada de HCA na superfície do vidro bioativo em contato com fluido corporal.	27
Figura 14. Diagrama composição x capacidade de ligação com tecido para vidros SiO ₂ -Na ₂ O-CaO-P ₂ O ₅	28

Figura 15. Representação esquemática do processo sol-gel para obtenção do vidro bioativo.	29
Figura 16. Ilustração das diferentes formas de vidro bioativo obtidos pela rota sol-gel.	30
Figura 17. Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho.	34
Figura 18. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo. [134].....	36
Figura 19. Representação esquemática do aparato para análise de seringabilidade.	43
Figura 20. Representação esquemática do aparato para teste de injetabilidade.	43
Figura 21. Diagrama esquemático do ensaio MTT.....	47
Figura 22. Espectro FTIR: (a) quitosana/gelatina e (b) vidro bioativo, utilizados na produção dos hidrogéis.	54
Figura 23. Padrões de DRX das matérias-primas.	56
Figura 24. Curvas TGA/DTG das matérias-primas: (a) quitosana; (b) gelatina; (c) vidro bioativo.	58
Figura 25. Curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	60
Figura 26. Caracterização estrutural das nanopartículas de BG: (a) imagens MEV (30.000x); (b) análise EDS.	62
Figura 27. Caracterização estrutural das nanopartículas de BG: topografia por MFA...	62
Figura 28. Isotermas de sorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poro de nanopartículas por BET (a) e distribuição de diâmetro por análise DLS (b).	63
Figura 29. Fotografias dos hidrogéis produzidos à temperatura ambiente e à 37 °C: (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.	64
Figura 30. Representação esquemática das possíveis interações entre Q/ β -GP à temperatura ambiente.....	65

Figura 31. Representação esquemática dos grupos responsáveis pela medição de potencial zeta.....	67
Figura 32. Espectro FTIR dos hidrogéis produzidos (4000-650 cm^{-1}).....	69
Figura 33. Ampliação do espectro FTIR dos hidrogéis produzidos (2000-650 cm^{-1})... ..	70
Figura 34. Imagens MEV (500X): (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB. Barra de escala: 200 μm	72
Figura 35. Histogramas de distribuição do tamanho de poros e imagens obtidos por micro-CT dos hidrogéis: (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.	73
Figura 36. Avaliação do grau de absorção de água dos hidrogéis imersos em solução PBS: (a) absorção de água ao longo do tempo; (b) absorção de água no equilíbrio.....	75
Figura 37. Curvas reológicas representativas dos hidrogéis: (a) 100Q; (b) 100Q/VB, (c) 90Q, (d) 90Q/VB, (e) 70Q, (f) 70Q/VB.	77
Figura 38. Curva representativa força x deslocamento dos hidrogéis testados em uma agulha 22G1 ^{1/4}	80
Figura 39. Perfil de perda de massa dos hidrogéis imersos em SBF: (a) 100Q, 100Q/VB; (b) 90Q, 90Q/VB; (c) 70Q, 70Q/VB.	82
Figura 40. Liberação de íons Si, Ca e P na solução de SBF.	85
Figura 40. Liberação de íons Si, Ca e P na solução de SBF.	85
Figura 41. MEV da superfície dos hidrogéis sem vidro bioativo após imersão em SBF por 1 dia e 28 dias: (a) 100Q; (b) 90Q; (c) 70Q.....	87
Figura 42. MEV da superfície dos hidrogéis com vidro bioativo após imersão em SBF por 1 dia e 28 dias: (a) 100Q/VB; (b) 90Q/VB; (c) 70Q/VB.	88
Figura 43. Espectros FTIR dos hidrogéis após imersão em solução SBF. (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.	89

Figura 44. Espectros FTIR dos hidrogéis após imersão em solução SBF (1200-700 cm^{-1}): (a) 100Q/VB; (b) 90Q/VB; (c) 70Q/VB.	91
Figura 45. Padrão DRX dos hidrogéis antes e depois da imersão em SBF.	92
Figura 46. Viabilidade celular por MTT após 72h (a) células embrionárias de rim humano (HEK293 T) e (b) células de osteosarcoma humano (SAOS).	93
Figura 47. Imagens de microscopia de células HEK293 T pelo ensaio LIVE/DEAD. Células viáveis (fluorescência verde) e células mortas (fluorescência vermelha) após 72 h: (a) grupo controle, (b) 90Q, (c) 90Q/VB, (d) 70Q e (e) 70Q/VB. Barra de escala: 200 μm . Setas vermelhas = hidrogel, aumento 200x)	96
Figura 48. Imagens de microscopia de células SAOS pelo ensaio <i>LIVE/DEAD</i> . Células viáveis (fluorescência verde) e células mortas (fluorescência vermelha) após 72 h: (a) grupo controle, (b) 90Q, (c) 90Q/VB, (d) 70Q e (e) 70Q/VB. Barra de escala: 200 μm . Setas vermelhas = hidrogel, aumento 200x).....	97
Figura 49. Efeito da injeção subcutânea dos hidrogéis em: (a) área do implante; (b) massa corporal; (c) enzima aspartate aminotransferase (AST); (d) enzima alanine aminotransferase (ALT).....	99
Figura 50. Corte histológico do tecido subcutâneo após 7 dias de contato com os hidrogéis.....	100
Figura 51. Corte histológico do fígado de camundongos após 7 dias de contato com os hidrogéis.....	100
Figura 52. Visualização coronal (a), radiográfica (b), transversal (c) e sagital (d) das reconstruções microtomográficas da tíbia de rato com defeito produzido em laboratório.	102
Figura 53. Parâmetros morfométricos dos ossos tratados com os hidrogéis durante 7 dias. (a) BV/TV (% tecido ósseo); (b) Tb.Th (espessura trabecular); (c) Tb.N (número de trabéculas); (d) Tb.Sp (separação trabecular); (e) BMD (densidade mineral óssea); (f) Op.Po (porosidade aberta).	103

- Figura 54. Fotografia do procedimento cirúrgico para criação de defeito ósseo para avaliação de regeneração *in vivo*. 104
- Figura 55. Visualização coronal (a), radiográfica (b), transversal (c) e sagital (d) das reconstruções microtomográficas da tíbia de rato com defeito produzido em laboratório. 105
- Figura 56. Parâmetros morfométricos dos ossos tratados com os hidrogéis após 30 dias: (a) BV/TV (% tecido ósseo); (b) Tb.Th (espessura trabecular); (c) Tb.N (número de trabéculas); (d) Tb.Sp (separação trabecular); (e) BMD (densidade mineral óssea)... 106
- Figura 57. Imagens 3D Micro-CT dos defeitos ósseos: (a) grupo controle após 2d; (b) grupo controle após 30d; (c) grupo tratado com 70Q/VB após 30 dias. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Notação e composição química das amostras propostas.....	40
Tabela 2. Grupos experimentais para ensaio de regeneração óssea <i>in vivo</i>	51
Tabela 3. Principais bandas vibracionais associadas à quitosana, gelatina e vidro bioativo.	55
Tabela 4. Resultados de TGA para a decomposição térmica das matérias-primas.	59
Tabela 5. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo.....	61
Tabela 6. Valores de Potencial Zeta das matérias-primas e dos hidrogéis produzidos..	66
Tabela 7. Temperatura de gelificação, tempo de gelificação e valores de G' e G'' dos hidrogéis produzidos.....	78
Tabela 8. Seringabilidade dos hidrogéis por uma agulha 21G1 ^{1/4}	79
Tabela 9. Injetabilidade dos hidrogéis utilizando máquina de ensaios.....	81

LISTA DE NOTAÇÕES

ATR	Reflectância total atenuada (do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BCP	Cerâmica bifásica de fosfato de cálcio
BG	Vidro bioativo (do inglês, <i>bioactive glass</i>)
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>)
DRX	Difração de Raios X
DTG	Análise termogravimétrica diferencial (do inglês, <i>Derivative Thermogravimetric Analysis</i>)
ECM	Matriz extracelular (do inglês, <i>extracellular matrix</i>)
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> .
FTIR	Espectroscopia por Reflexão Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
G'	Módulo de perda (ou módulo elástico)
G''	Módulo de armazenamento (ou módulo viscoso)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GD	Grau de desacetilação
GE	Gelatina
GLY	Glicina

GME	Associação de Fabricantes de Gelatina da Europa (do inglês, <i>Gelatine Manufacturers of Europe</i>)
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês, <i>generally regarded as safe</i>)
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxiapatita Carbonatada (do inglês, <i>hydroxyl carbonate apatite</i>)
ICP-OES	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
LCST	Temperatura de solução crítica inferior (do inglês, <i>lower critical solution temperature</i>)
MA	Massa da amostra
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M _f	Massa final (estado expandido)
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada de Raios X
MM	Massa molar
M _r	Massa restante
MTT	Reagente “brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio”
M ₀	Massa inicial
n	Número de mols
PDLLA	Poli(D-L-lático)

PEO	Poli(óxido de etileno)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PI	Ponto isoelétrico
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PNIPAn	Poli(N-isopropilacrilamida)
PVA	Poli(álcool vinílico)
Q	Quitosana
SBF	Fluido corporal simulado (do inglês, <i>simulated fluid body</i>)
TCP	Tricálcio fosfato (do inglês, <i>tri-calcium phosphate</i>)
TEOS	Tetraetil ortosilicato (do inglês, <i>tetraethyl orthosilicate</i>)
TEP	Trietil fosfato (do inglês, <i>triethyl phosphate</i>)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, <i>thermogravimetric analysis</i>)
UCST	Temperatura de solução crítica superior (do inglês, <i>Upper Critical Solution Temperature</i>)
VB	Vidro bioativo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>)
β -GP	β -glicerofosfato

RESUMO

Hidrogéis são redes poliméricas hidrofílicas capazes de reter uma grande quantidade de água em sua estrutura, sem se dissolver. Atualmente, as pesquisas da área biomédica estão voltadas para o desenvolvimento de hidrogéis injetáveis, que sofrem gelificação *in situ* por um estímulo térmico. Neste estudo, novos hidrogéis compósitos baseados nos biopolímeros quitosana e gelatina associados a nanopartículas de vidro bioativo foram preparados. Esses nanocompósitos foram extensivamente caracterizados do ponto de vista estrutural, composição química e comportamento *in vitro* e *in vivo*. Análises de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e Potencial Zeta permitiram elucidar alguns aspectos relacionados ao processo de gelificação dos hidrogéis, que ocorre por meio de interações eletrostáticas influenciadas pela mudança de temperatura. Análise de potencial zeta à 37°C variou de $+3.1 \pm 1.4\text{mV}$ a $+6.9 \pm 3.2\text{mV}$ e revelou o caráter catiônico dos hidrogéis, que podem ser capazes de interagir com moléculas negativamente carregadas da matriz extracelular (ECM). Ensaio reológico, de seringabilidade e injetabilidade confirmaram a viabilidade de administração dos hidrogéis via seringa e agulha de pequeno calibre. Os resultados de ensaio reológico mostraram que a adição de vidro bioativo e gelatina aumentaram as propriedades elásticas dos hidrogéis, que apresentaram módulo de elasticidade (G') variando de 5,4Pa nos hidrogéis de quitosana à 12,4Pa nos hidrogéis com maiores quantidades de gelatina e quitosana. Além disso, esses sistemas mostraram uma redução no tempo de gelificação, o que é desejável para aplicações clínicas, pois pode evitar a lixiviação dos hidrogéis quando implantado na matriz extracelular. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* confirmaram a natureza biocompatível das formulações. Além disso, os hidrogéis foram injetados em defeitos ósseos e os resultados sugeriram maior formação de tecido ósseo, quando comparado à regeneração do osso sem o biomaterial. Os hidrogéis apresentaram características físico-químicas e biológicas que os tornam excelentes candidatos para utilização como matrizes injetáveis temporárias para regeneração óssea.

Palavras-chave: hidrogéis termossensíveis, matrizes injetáveis, quitosana, gelatina, vidro bioativo.

ABSTRACT

Hydrogels are hydrophilic polymeric network capable of retaining a large amount of water in their structure, without dissolving. Currently, biomedical researches are focused on the development of injectable hydrogels, which undergo gelation *in situ* by a thermal stimulus. In this study, new composite hydrogels based on the biopolymers chitosan and gelatin associated with bioactive glass nanoparticles were prepared. These nanocomposites were extensively characterized from a structural point of view, chemical composition and *in vitro* and *in vivo* behavior. Infrared Spectroscopy (FTIR) and zeta potential analyzes have allowed to elucidate some events related to the gelation process of the hydrogels, which occur through electrostatic interactions influenced by the temperature change. The zeta potential at 37 °C ranged from $+3.1 \pm 1.4\text{mV}$ to $+6.9 \pm 3.2\text{mV}$ and showed the cationic nature of these hydrogels, which are capable of interacting with negatively charged molecules from native extracellular matrix (ECM). Rheological, seringability and injectability tests confirmed the administration viability of hydrogels via syringe and needle. The rheological test results showed that the addition of bioactive glass and gelatin increased the elastic properties of the hydrogels, presenting elastic modulus (G') increasing from 5.4Pa for pure chitosan hydrogels to 12.4Pa for hydrogel composites with higher contents of gelatin and bioactive glass. Moreover, these systems showed a reduction in gelation time, which is desirable for clinical applications and may avoid the lixiviation of the hydrogels when implanted in ECM. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays confirmed the biocompatible nature of the formulations. In addition, the hydrogels were injected into tibial defects and showed better results in the formation of new tissue when compared to bone regeneration without the biomaterial. Hydrogels exhibited the physicochemical and biological characteristics that make them promising candidates for use as temporary injectable matrices for bone regeneration.

Keywords: thermosensitive hydrogels, injectable scaffolds, chitosan, gelatin, bioactive glass

1. INTRODUÇÃO

Todos os dias milhares de procedimentos cirúrgicos são realizados a fim de reparar ou substituir tecidos lesionados por alguma doença ou trauma. Entre as estratégias ligadas a reconstrução tecidual, os biomateriais se destacam entre todas as outras por ser uma alternativa mais versátil e passível de desenvolvimento [1]. No Brasil, o mercado de biomateriais tem se expandido muito nos últimos anos devido a pesquisas e desenvolvimento de novos materiais. Estima-se que esse mercado movimentará cerca de 5,18 bilhões de dólares até 2022 [2].

Nas últimas décadas, a medicina regenerativa tem se voltado para o emprego de medidas menos invasivas para tratar os tecidos danificados. Diante disso, os hidrogéis termossensíveis surgem como uma proposta promissora, pois podem ser utilizados como sistemas injetáveis. O fato de poderem ser administrados, via seringa e agulha, diretamente no tecido danificado dispensa processos cirúrgicos, reduzindo o desconforto e risco de complicações para o paciente. Além disso, os hidrogéis possuem a habilidade de tomar a forma da cavidade onde será injetado, podendo ser utilizados em defeitos de tamanho reduzido e irregulares, o que não seria possível utilizando *scaffolds* pré-fabricadas [3].

Os hidrogéis são particularmente interessantes para uso como biomaterial, pois possuem propriedades únicas como alto teor de água, maciez e flexibilidade, propriedades semelhantes aos tecidos naturais. Entre os requisitos para produção de hidrogéis injetáveis destacam-se a biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades reológicas adequadas e gelificação em temperatura e pH fisiológico. Entre os materiais que satisfazem essas exigências, os polímeros de origem natural e seus derivados, como a quitosana e a gelatina, têm sido muito utilizados na produção desses hidrogéis [4].

A quitosana é o principal derivado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular, a quitosana tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas devido a uma série de características que incluem: excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, mucoadesividade, atividade hemostática, baixa toxicidade, etc. [4,5].

Muitas dessas propriedades se devem aos grupos amino presentes na estrutura, que ficam carregados positivamente em $\text{pH} < 6,5$ e são capazes de interagir com biomoléculas negativamente carregadas. No entanto, o fato de ser solúvel somente em soluções ácidas pode ser um fator limitante em algumas aplicações. Por isso, é comum fazer modificações químicas nas cadeias da quitosana ou combiná-la a outros compostos a fim de lhe conferir novas propriedades.

A gelatina é um biopolímero obtido por meio da hidrólise parcial do colágeno, a proteína estrutural de maior ocorrência em animais. Ambos são muito utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e biomédica. No entanto, estudos demonstram que a gelatina apresenta uma resposta antigênica muito menor do que o colágeno, sendo por isso a escolha preferencial para algumas aplicações. Além disso, a gelatina é um material de baixo custo, apresenta solubilidade em água e também é biodegradável e biocompatível. A presença de grupos amino ($-\text{NH}_2$) e carboxila ($-\text{COOH}$) nas moléculas de gelatina conferem propriedades interessantes e permite a interação com biomoléculas da matriz extracelular. Apesar de sua versatilidade, suas aplicações podem ser limitadas devido a sua baixa resistência mecânica. Por isso, é muito comum a associação da gelatina com outros polímeros ou materiais cerâmicos [6].

O vidro bioativo é um material cerâmico que possui capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, resultando na formação de uma forte ligação entre o material e o tecido [7]. Desde sua descoberta, há cerca de 45 anos, o vidro bioativo tem sido muito estudado e aplicado clinicamente como enxerto ósseo em aplicações odontológicas e ortopédicas. Atualmente, as pesquisas se inclinam para o uso do vidro bioativo em compósitos.

Diante das características citadas acima, acredita-se que a combinação do vidro bioativo com sistemas poliméricos permita a obtenção de nanocompósitos bioativos com grande potencial para aplicações biomédicas. Dessa forma, este trabalho surge com a proposta de desenvolver hidrogéis multicomponentes com o objetivo de obter materiais com propriedades mecânicas e biológicas superiores. Para isso, hidrogéis termossensíveis baseados em quitosana, gelatina e nanopartículas de vidro bioativo foram sintetizados e caracterizados para verificar sua utilização como matrizes injetáveis temporárias para regeneração óssea. Até o momento, não é de nosso conhecimento a existência de sistemas

semelhantes aos propostos neste trabalho. Portanto, o caráter inovador deste estudo consiste na obtenção e avaliação do comportamento termossensível desses novos materiais. Além disso, a viabilidade de uso biomédico desses sistemas foi investigada por meio da avaliação do comportamento *in vitro* e *in vivo* dos hidrogéis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistemas termossensíveis formados por uma estrutura polimérica baseada em quitosana e gelatina reforçada com nanopartículas de vidro bioativo para potencial uso como sistema injetável temporário para regeneração óssea.

2.2. Objetivos Específicos

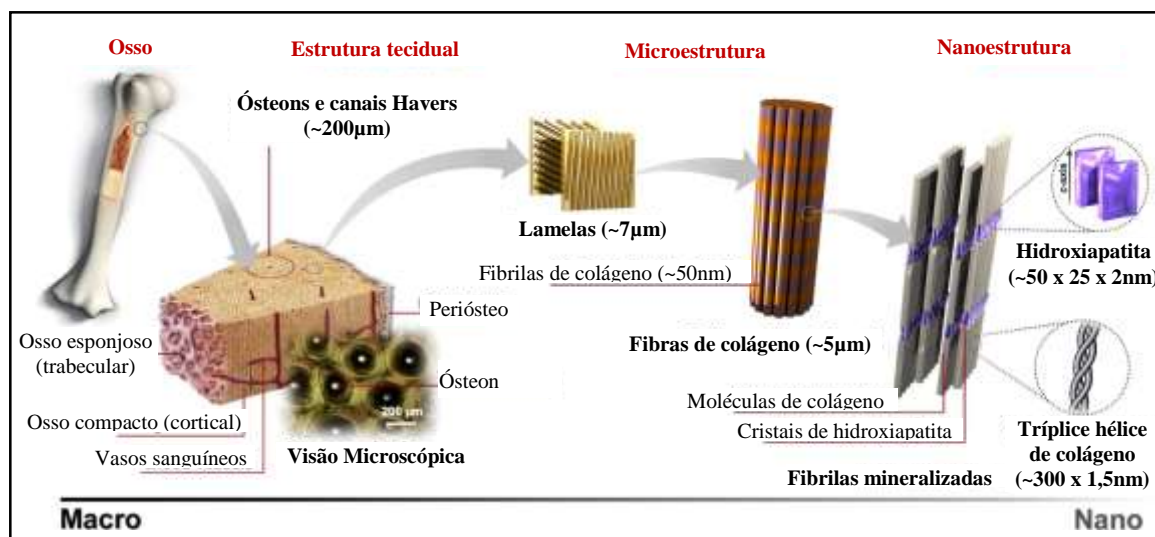
- Caracterizar a matéria-prima do ponto de vista físico-químico, a fim de avaliar a pureza e identificar suas propriedades.
- Obter hidrogéis termossensíveis tricomponentes com diferentes proporções de quitosana, gelatina Tipo A e nanopartículas de vidro bioativo.
- Caracterizar os hidrogéis sintetizados quanto à sua composição química, morfologia e comportamento reológico.
- Caracterizar o comportamento *in vitro* dos hidrogéis imersos em solução de SBF.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos hidrogéis frente a células SAOS e HEK293 T.
- Avaliar a biocompatibilidade tecidual dos hidrogéis injetados no dorso de camundongos.
- Avaliar o reparo ósseo em defeitos criados na tíbia de ratos por meio de análise de Micro-CT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Osso

3.1.1. Estrutura óssea

Os tecidos mineralizados, como ossos e dentes podem ser considerados nanocompósitos, onde componentes biomineralizados se encontram imersos em uma matriz orgânica. Na Fig. 1 é ilustrada a organização hierárquica do tecido ósseo, da escala macro (na ordem de cm) à escala nano (1 a 300nm). Sua nanoestrutura é composta por, aproximadamente, 10% de água e duas fases distintas: uma fase mineralizada, que corresponde a cerca de 65-70% do tecido, formada, principalmente, por nanocristais de hidroxiapatita; e uma fase orgânica, composta majoritariamente por moléculas de colágeno Tipo I [8]. Nessa estrutura, os cristais de hidroxiapatita (HA) encontram-se orientados e alinhados com as moléculas de colágeno, que se arranjam em fibrilas auto-organizadas; essas, por sua vez, se organizam em camadas paralelas dando origem as lamelas, que se dispõem concêntricamente em torno dos vasos sanguíneos para formar os ósteons. Finalmente, os ósteons podem se organizar de forma mais densa, originando o osso cortical; ou de forma menos compacta, originando o osso esponjoso ou trabecular [8,9].

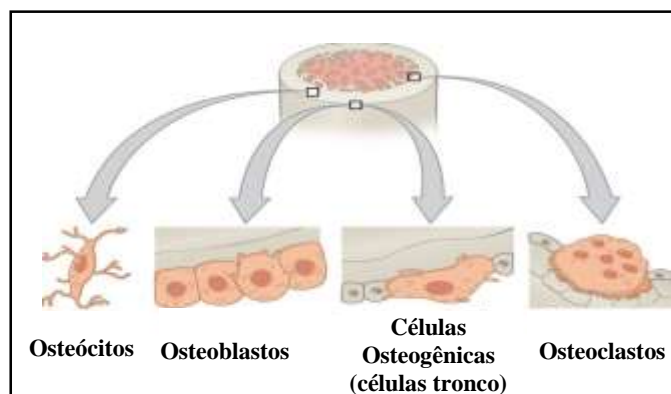


Adaptado de Sadat-Shojai et al. [8].

Figura 1. Representação da estrutura hierárquica do tecido ósseo em diferentes escalas de comprimento.

O osso é um órgão rígido, que desempenha papel importante no suporte de stress mecânico. Suas propriedades mecânicas são normalmente atribuídas à organização hierárquica muito bem ordenada e intrincada entre as fibras de colágeno, que proporcionam ductilidade ao osso, e aos cristais de hidroxiapatita, que são responsáveis pela dureza e resistência à compressão [9].

No tecido ósseo destacam-se quatro tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteogênicas (Fig. 2). Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, sendo responsáveis pela produção da matriz extracelular óssea e sua mineralização. À medida que a matriz secretada vai sendo mineralizada e circunda os osteoblastos sua estrutura é modificada, originando os osteócitos. Os osteócitos encontram-se localizados em um espaço chamado lacuna, de onde formam-se canalículos, que são responsáveis pela difusão de nutrientes e a comunicação entre os osteócitos. Os osteoblastos e osteócitos não possuem capacidade mitótica e são repostos no organismo pela ação das células osteogênicas. Com alta atividade mitótica, essas células são capazes de se diferenciar, dando origem aos osteoblastos.



Adaptado de Betts et al [10].

Figura 2. Representação esquemática das células do tecido ósseo.

Apesar da aparência inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico, onde há constante formação de novo tecido e reabsorção do tecido velho, lesionado ou desnecessário. As células responsáveis pela reabsorção óssea são os osteoclastos, que são originadas de monócitos e macrófagos, e são encontradas na superfície óssea. Durante toda a vida do

organismo, os osteoblastos agem continuamente formando novos tecidos enquanto os osteoclastos promovem a reabsorção dos tecidos velhos. Dessa forma, ocorre uma constante, porém sutil, remodelação óssea, que consiste em um mecanismo de substituição ou reconstrução óssea, de modo a preservar sua integridade física e manter suas funções [10]. O processo de remodelação óssea é um processo complexo e seu detalhamento não está no escopo do presente trabalho. Excelentes trabalhos detalham o processo de remodelação óssea, assim como os fatores responsáveis por sua regulação [11,12].

3.1.2. Reparo de defeitos ósseos

Os processos envolvidos em reparos ósseos bem sucedidos envolvem a formação do novo tecido, que pode ocorrer de três maneiras distintas, descritas a seguir: osteogênese, osteocondução e osteoindução [13–15].

A osteogênese ocorre quando osteoblastos viáveis provenientes de um material transplantado contribuem para a formação do novo tecido. Esse processo ocorre, por exemplo, quando há enxerto de osso esponjoso autógeno, medula, periósteo e enxertos vascularizados. Esse também é o processo natural que ocorre na ausência de material de enxerto.

Osteocondução é o termo utilizado quando ocorre crescimento ósseo em uma superfície. Materiais osteocondutores são aqueles capazes de servir de arcabouço para o crescimento de células osteoblásticas que migrarão das proximidades do defeito ósseo para a superfície ou poros do biomaterial.

A osteoindução envolve o processo de estimulação de células osteoprogenitoras para se diferenciarem em osteoblastos, que iniciarão a formação do novo tecido ósseo. Neste caso, o material inserido no defeito será capaz de promover estimulação das células não-diferenciadas, seja pela presença do grupo de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) ou por reações específicas entre o material e a matriz extracelular, que promovam diferenciação celular.

O padrão-ouro quando se trata de regeneração e reparo ósseo é o material que promova a osteoindução, osteocondução e osteogênese. Os enxertos ósseos autólogos são os materiais capazes de promover esse conjunto de processos, mas o limitado suprimento de osso e a morbidade do sítio doador são algumas dificuldades que limitam seu uso. Portanto, uma das estratégias utilizadas atualmente no reparo e regeneração óssea consiste na produção de materiais que mimetizem a composição mineral do osso e possam promover respostas metabólicas mais próximas possíveis dos materiais autólogos [13].

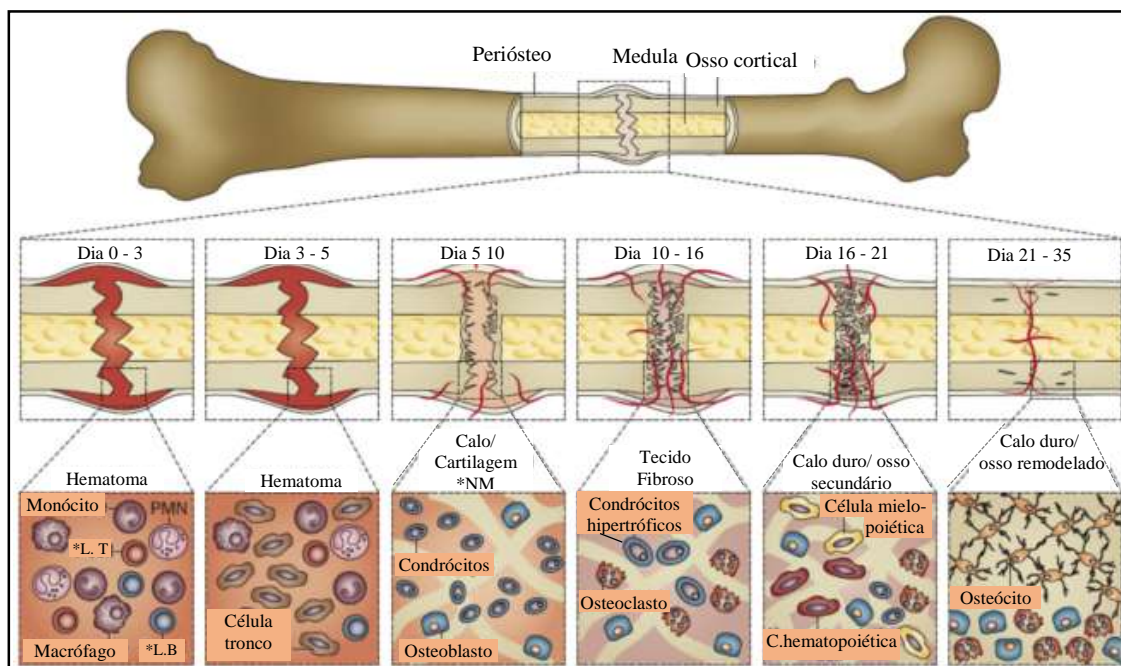
O processo de reparo de um defeito ósseo dependerá de uma série de fatores, como as condições prévias de saúde do órgão e a extensão do defeito. O processo de recuperação óssea em um defeito ou fratura pode ser resumido em algumas etapas principais:

(a) ocorre formação de um hematoma, que é acompanhado por uma resposta inflamatória e recrutamento de moléculas de sinalização envolvidas na regulação da neoformação óssea (entre elas as proteínas BMP);

(b) a proliferação de células no local do defeito gera um calo de fibrocartilagem, que com o passar do tempo sofre calcificação;

(c) a cartilagem calcificada é reabsorvida e os progenitores osteoblásticos iniciam o processo de formação do neotecido ósseo [16,17]. Os principais eventos que ocorrem no processo de reparo ósseo são ilustrados na Fig. 3.

O entendimento sobre o processo de reparo e regeneração do tecido ósseo é um dos pilares para o desenvolvimento de estratégias e biomateriais capazes de auxiliar o processo de neoformação óssea.



Adaptado de Einhorn et al. [18].

(*Abreviações: NM: não-mineralizado; L. T (Linfócito T); L. B (linfócito B); PMN (leucócitos polimorfonucleares).

Figura 3. Representação do processo típico de reparo em defeitos ósseos.

3.2. Biomateriais e Medicina Regenerativa

Lesões, traumas e doenças são alguns dos fatores que podem causar algum dano ou perda de tecidos e órgãos. Como a oferta de órgãos para transplantes ainda é muito menor que a demanda, novas alternativas estão sendo avaliadas a fim de reduzir o número crescente de pacientes na lista de espera. Neste contexto surge a medicina regenerativa, um campo de pesquisa e aplicações clínicas direcionadas para o reparo, substituição ou regeneração de tecidos danificados [19].

A medicina regenerativa é uma área interdisciplinar muito promissora e faz uso de várias abordagens tecnológicas a fim de reestabelecer as funções teciduais sem a necessidade de transplantes ou tratamentos de reabilitação tradicionais. Estas abordagens podem incluir o uso de: terapia gênica, utilização de moléculas solúveis, células-tronco, engenharia de tecidos, biomateriais e reprogramação de células e tecidos [19,20].

Nas últimas décadas, as pesquisas se inclinam para a utilização de células em conjunto com os biomateriais, que podem servir como matrizes para guiar a regeneração ou como veículos para a entrega de células, biomoléculas, fármacos ou fatores de crescimento. Neste contexto surge uma importante área na medicina regenerativa denominada engenharia de tecido, onde os princípios das ciências biológicas e da engenharia de materiais são aplicados em conjunto para reestabelecer as funções do tecido danificado. A técnica consiste basicamente no cultivo de células em matrizes tridimensionais temporárias (*scaffolds*) para formar o novo tecido, que então é implantado no paciente [21].

Os biomateriais desempenham um papel importante na engenharia de tecido, pois fornecem uma estrutura física e mecânica para o crescimento celular, podem incorporar moléculas bioativas e mimetizam o ambiente da matriz extracelular nativa (ECM). Além disso, os biomateriais ainda podem ser implantados sem células, servindo como um estímulo para a regeneração natural do corpo [22].

Diversos materiais poliméricos (sintéticos e naturais) e cerâmicos têm sido aplicados na área clínica. A escolha do biomaterial irá depender da aplicação a que se destina e é importante que apresente algumas propriedades, como: (1) ser biocompatível, pois deve provocar uma mínima resposta imunológica; (2) possuir um tempo de degradação compatível com o crescimento do novo tecido; (3) produzir produtos de degradação não-tóxicos que possam ser facilmente reabsorvidos ou excretados pelo corpo; (4) ter propriedades mecânicas apropriadas para a aplicação a que se destina; (5) apresentar propriedades de superfície, do ponto de vista químico e topográfico, adequadas de modo a controlar e permitir a adesão e proliferação celular [23,24].

Os polímeros de origem sintética mais comumente utilizados na área biomédica incluem os poliésteres como poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Aprovados pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), eles podem ser utilizados em determinadas aplicações clínicas, como suturas e alguns dispositivos implantáveis [25]. Entre as vantagens de se utilizar os polímeros sintéticos estão a facilidade de produção em grande escala, baixo custo e a possibilidade de se fazer modificações estruturais por meio do controle de síntese. No

entanto esses materiais apresentam maior risco de rejeição devido à sua baixa bioatividade [21,26].

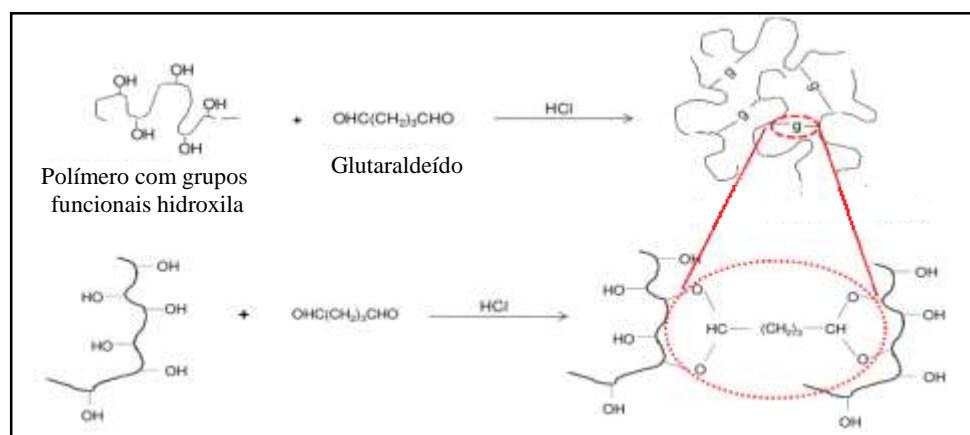
Os biopolímeros de origem natural mais utilizados na medicina regenerativa incluem as proteínas (colágeno, gelatina, elastina, queratina) e os polissacarídeos (quitina, amilose, celulose e glicosaminoglicanos). Como apresentam estrutura similar às macromoléculas encontradas na matriz extracelular, a resposta inflamatória a esse tipo de material é usualmente muito baixa. Além disso, ao contrário dos materiais sintéticos, os polímeros naturais são biologicamente bioativos e geralmente apresentam excelente interação com as células, promovendo melhor adesão e crescimento celular. No entanto, esses materiais geralmente apresentam baixas propriedades mecânicas e, devido à origem natural, se tornam um desafio à fabricação de *scaffolds* e dispositivos de forma homogênea e reproduzível [21,27].

Os materiais cerâmicos como a hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP) e os vidros bioativos tem sido muito utilizados na medicina, principalmente na regeneração óssea. Esses materiais apresentam boa biocompatibilidade já que são estruturalmente similares à fase inorgânica do tecido ósseo. Além disso, admite-se que os íons cálcio secretados por esses materiais na matriz extracelular melhoram o processo de mineralização dos osteoblastos, promovendo a regeneração do tecido. Apesar disso, esses materiais apresentam algumas limitações de uso, pois são frágeis e apresentam dificuldade para serem moldados para implantes [28].

Como cada material apresenta diferentes propriedades e certas limitações, os estudos na área de biomateriais estão voltados para o desenvolvimento de compósitos polímero/cerâmica. Dessa forma, é possível aliar as propriedades de cada material, de forma a obter um dispositivo com propriedades mecânicas e biológicas superiores [29].

Dependendo da aplicação, os biomateriais podem ser processados por meio de diferentes técnicas, originando materiais na forma de fibras, partículas, espumas/esponjas porosas ou na forma de hidrogéis injetáveis. Como, atualmente, o foco da medicina regenerativa é um tratamento minimamente invasivo, os hidrogéis injetáveis tem ganhado cada vez mais destaque na área, pois além da simplicidade de entrega ainda são estruturalmente

Já os hidrogéis químicos ou permanentes são aqueles em que as redes poliméricas são unidas por meio de ligações covalentes (reticulação). A reticulação química pode ocorrer entre os grupos funcionais dos polímeros formadores da rede ou com a inserção de um reticulante. Na Figura 5 é ilustrada a formação do hidrogel químico com adição de glutaraldeído, reticulante amplamente utilizado em polímeros naturais e sintéticos [34].



Adaptado de Gulrez et al. [34]

Figura 5. Representação esquemática da formação de hidrogel químico utilizando agente reticulante.

Em ambos os casos, o balanço entre os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos das cadeias e a densidade de ligações cruzadas irão determinar a capacidade de absorção de líquido (grau de expansão) e as propriedades mecânicas do hidrogel. Quanto maior o número de grupos hidrofílicos, maior será a capacidade de retenção de água enquanto um aumento na densidade de reticulação provoca uma diminuição na flexibilidade das cadeias, que ficam mais rígidas, se expandem menos e retém menos água [35]. O teor significativo de água presente nos hidrogéis é uma das propriedades mais importantes para aplicações biomédicas pois conferem flexibilidade semelhante aos tecidos naturais e permite a difusão de nutrientes entre o hidrogel e a matriz extracelular [36].

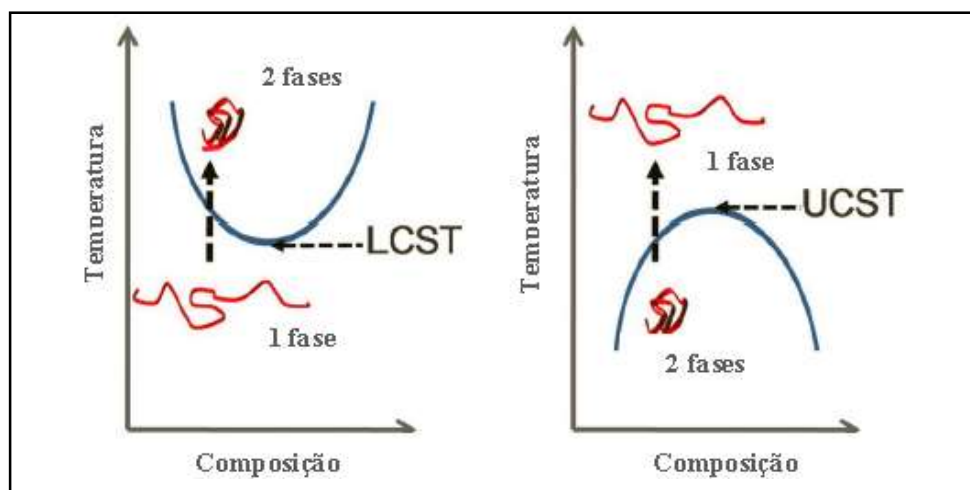
O processo de reticulação, seja físico ou químico, promove uma mudança na estrutura do sistema, levando à formação de uma rede tridimensional entre as cadeias poliméricas. Dessa forma, o sistema inicialmente viscoso (sol) adquire caráter elástico (gel). O grande diferencial desse tipo de material é que, ao contrário de uma solidificação clássica, após

a transição (gelificação ou gelação), a estrutura permanece extremamente aberta e impregnada pela fase líquida [37].

Alguns hidrogéis sofrem gelificação em resposta a algum estímulo do meio em que está inserido, como temperatura, pH, força iônica, estímulo magnético, elétrico, entre outros. Esses hidrogéis são chamados de responsivos, sensíveis ou inteligentes e respondem ao estímulo externo mudando seu grau de expansão e outras propriedades físicas da rede polimérica. Entre eles, os termossensíveis tem despertado cada vez mais interesse para aplicações biomédicas, incluindo liberação controlada de fármacos, bioengenharia e engenharia de tecidos [38].

3.3.2. Hidrogéis Termossensíveis e Aplicações Biomédicas

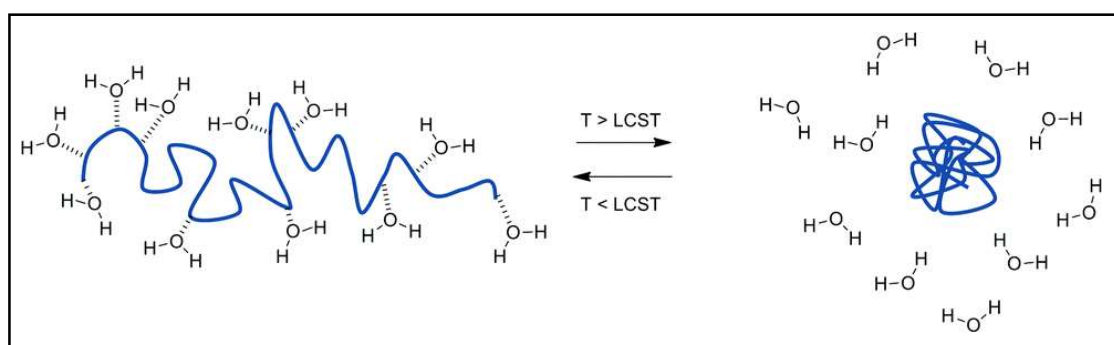
Os hidrogéis termossensíveis são aqueles em que as cadeias sofrem expansão ou agregação quando submetidos a uma mudança de temperatura. Dependendo da composição da rede polimérica, os hidrogéis podem apresentar temperatura de solução crítica inferior (LCST - *Lower Critical Solution Temperature*) ou temperatura de solução crítica superior (UCST - *Upper Critical Solution Temperature*). LCST e UCST correspondem às respectivas temperaturas críticas abaixo e acima da qual o polímero e o solvente são completamente miscíveis, como é representado na Figura 6 [39].



Fonte: Gibson et al. [40].

Figura 6. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas poliméricos LCST e UCST.

Nos polímeros do tipo UCST, as cadeias se expandem com o aumento da temperatura e ficam mais solúveis. Ao contrário, polímeros do tipo LCST sofrem contração e liberam solvente ou fluido de sua estrutura quando são aquecidos acima da temperatura crítica [41]. Hidrogéis do tipo LCST tem sido muito investigados devido a possibilidade de gelificarem na temperatura corporal. Nestes sistemas, em temperaturas abaixo da LCST as cadeias poliméricas se encontram mais flexíveis e estendidas. Dessa forma, as ligações de hidrogênio entre os segmentos hidrofílicos da rede polimérica e as moléculas de água predominam em temperaturas mais baixas, o que justifica sua solubilidade. Por outro lado, quando o sistema é submetido a um aumento de temperatura ($T > LCST$), as interações entre a cadeia polimérica/solvente são enfraquecidas, enquanto as interações intra e intermoleculares entre as cadeias poliméricas são favorecidas. Dessa forma, as cadeias do polímero se agregam, em uma conformação globular, originando o gel [42,43]. Na Fig. 7 é ilustrado o comportamento típico de uma solução polimérica do tipo LCST quando submetido a diferentes temperaturas.



Fonte: Phillips et al. [42]

Figura 7. Representação esquemática da mudança de conformação da cadeia polimérica em uma solução do tipo LCST.

Os hidrogéis termossensíveis do tipo LCST apresentam um enorme potencial para várias aplicações biomédicas, incluindo engenharia de tecido [44], encapsulamento de células e moléculas bioativas [45] e entrega de fármacos [46]. A possibilidade de sofrerem gelificação *in situ* permite que sejam utilizados como sistemas injetáveis e se apresentem como uma forma de tratamento minimamente invasiva. Como apresentam algumas características de fluidos na temperatura ambiente, esses sistemas podem facilmente incorporar células, fármacos e/ou moléculas bioativas e, posteriormente, serem injetados

via seringa e agulha no local a ser tratado. A fluidez ainda permite que o material tome a forma da cavidade a ser tratada, preenchendo até mesmo defeitos irregulares e de tamanhos reduzidos, o que não seria possível com *scaffolds* pré-moldadas. Após determinado tempo *in vivo*, os hidrogéis gelificam e podem fornecer a estrutura mecânica e biológica favoráveis para a regeneração tissular [4].

Alguns hidrogéis de polímeros sintéticos e naturais apresentam temperatura de gelificação próxima à temperatura corporal e apresentam potencial para serem utilizados como materiais injetáveis na área biomédica. Entre os polímeros sintéticos, o poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) é um dos mais estudados para emprego em sistemas injetáveis, pois apresenta temperatura de gelificação próxima aos 32°C em solução aquosa [47,48]. No entanto, o PNIPAm não é biodegradável e algumas mudanças em sua estrutura tem sido estudadas para aumentar seu potencial de uso na área biomédica. Estudos recentes mostram a utilização de copolímeros baseados em PNIPAm como veículos para entrega de células e fatores de crescimento [49] e liberação de fármacos [50]. Além do PNIPAm, também é reportado na literatura o uso de copolímeros em bloco poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO), conhecidos como poloxâmeros ou Plurônico[®]. Comercialmente disponível com diferentes massas molares e razão de composição, o Plurônico[®] tem sido amplamente utilizado em diversas aplicações biomédicas [51].

Entre os polímeros naturais que exibem comportamento termossensível *in situ* destacam-se a celulose e derivados, quitosana e gelatina [3,47]. Entre todos os biopolímeros naturais, a quitosana tem chamado à atenção desde que Chenite et al. [52] desenvolveu um hidrogel termossensível sem a utilização de reticulante químico. Sua proposta se baseou na adição de um sal de caráter básico, β -glicerofosfato (β -GP), que tem a função de neutralizar o pH da solução de quitosana e controlar a temperatura de gelificação do sistema. Controlando os parâmetros de síntese, os pesquisadores conseguiram obter hidrogéis que gelificam em temperatura e pH fisiológico. Testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados e demonstram que esses sistemas apresentam boa biocompatibilidade e podem incorporar fatores de crescimento ou moléculas bioativas. Esses resultados atestam o potencial desses hidrogéis para uso em sistemas injetáveis.

Desde então, uma série de pesquisas vem sendo realizada para elucidar e controlar o processo de gelificação desses sistemas. Em um desses estudos, Ganji e colaboradores [53] investigaram como alguns parâmetros afetam o tempo de gelificação e a taxa de degradação desses sistemas. Seus resultados demonstraram que o aumento da concentração e grau de desacetilação da quitosana promove a formação do gel e diminui o tempo de gelificação. Quanto à degradação, os estudos mostraram que as amostras com menor grau de desacetilação e menor concentração de quitosana se degradaram mais rapidamente. Uma discussão sobre o efeito da massa molar e grau de desacetilação da quitosana sobre os hidrogéis é feita por Zhou et al. [54].

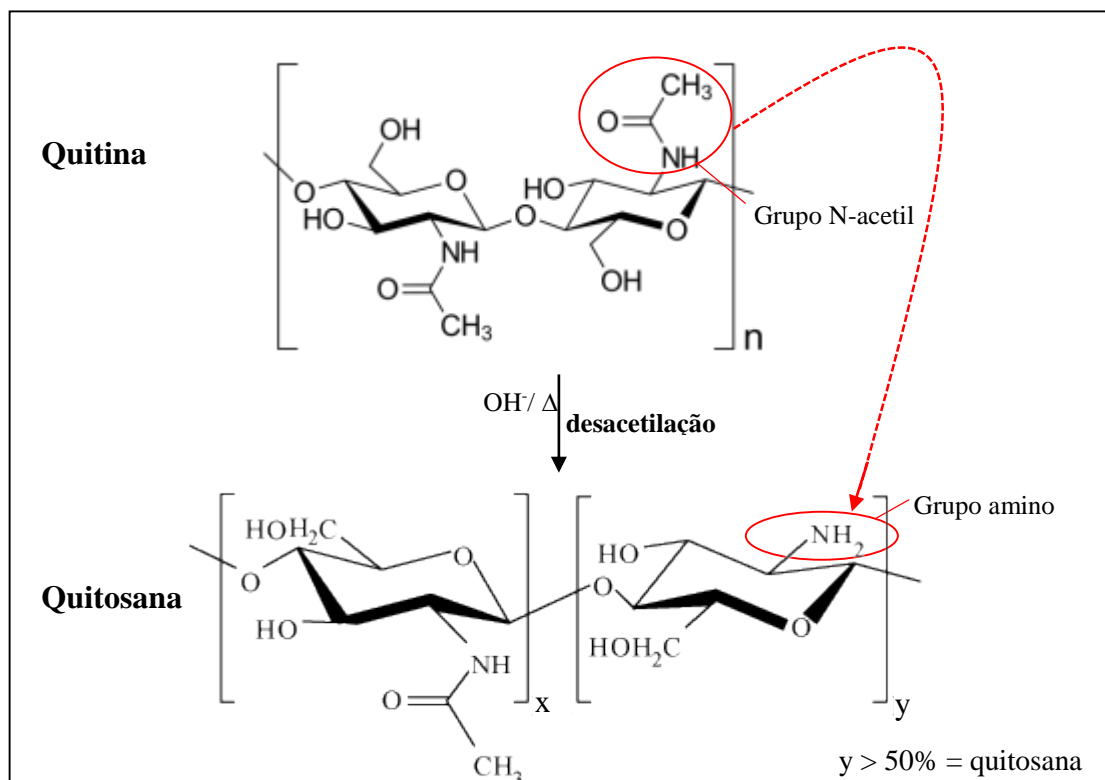
3.4. Quitosana

3.4.1. Estrutura e propriedades

A quitosana é um polissacarídeo de ocorrência natural em alguns fungos, mas geralmente obtido por meio do processo de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás somente da celulose [55]. Estruturalmente, ambos podem ser considerados biopolímeros, sendo formados por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo β 1 \rightarrow 4 em uma cadeia linear. No processo de desacetilação da quitina, os grupos N-acetil (-COCH₃) são convertidos em grupos amino (-NH₂). Quando a proporção de grupos N-acetilglucosamina for menor que 50%, considera-se que a estrutura corresponde a quitosana (Figura 8) [56].

A quitina é o principal constituinte do exoesqueleto de artrópodes e crustáceos, sendo encontrada também em moluscos, insetos e algumas espécies de fungos e algas. Atualmente, sua produção industrial é realizada principalmente pelo aproveitamento de resíduos de camarões e caranguejos da indústria alimentícia. Um dos métodos de extração mais comum é feito pelo tratamento químico com ácidos e bases, que promovem, respectivamente, a desmineralização e desproteinização das carcaças dos crustáceos [57,58]. Para produzir a quitosana, seu principal derivado, a quitina passa pelo processo de desacetilação, onde ocorrerá a hidrólise dos grupos acetil. Este procedimento pode ser realizado de acordo com diferentes metodologias, sendo que o método mais utilizado consiste em processar a quitina em uma solução alcalina e aquecê-la por algumas horas. A origem da quitina, o tipo e concentração da solução alcalina, temperatura e o tempo de

reação são alguns dos fatores que determinarão as características e propriedades da quitosana sintetizada [59]. A extensão da reação de desacetilação determina uma importante propriedade da quitosana, o grau de desacetilação (GD), que pode ser definido como a fração de resíduos acetilados na estrutura do biopolímero [60].

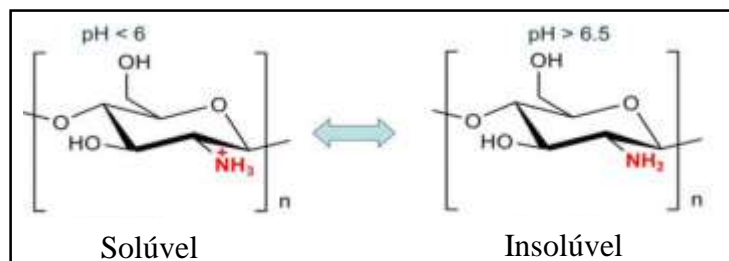


Adaptado de Zhang et al. [61]

Figura 8. Representação estrutural da quitina e quitosana.

A presença dos grupos amina confere algumas propriedades interessantes a quitosana, principalmente em relação a sua solubilidade. Ao contrário da quitina, que é solúvel em grande parte dos solventes orgânicos, a quitosana é solúvel em soluções aquosas ácidas. Em soluções com $\text{pH} \leq 6,0$, os grupos amina se tornam protonados ($-\text{NH}_3^+$) e são facilmente solvatados em meio aquoso. Por essa razão o biopolímero também é classificado como polieletrólito catiônico [62]. Na Figura 9 é ilustrado o comportamento da quitosana em diferentes valores de pH. Devido a essa particularidade, a quitosana pode ser usada em uma série de aplicações. Protonada, pode interagir com substratos aniônicos como proteínas, fatores de crescimento, ácidos nucleicos, citocinas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e polissacarídeos [63]. Em pH mais alto, a quitosana

desprotonada pode interagir com espécies não carregadas, como ácidos graxos e colesterol, por meio de interações hidrofóbicas [64].



Fonte: Kumirska et al. [64]

Figura 9. Ilustração do comportamento da quitosana em diferentes valores de pH.

A protonação da quitosana também é associada a outras propriedades, como mucoadesão e atividade antimicrobiana. A mucoadesividade pode ser explicada pela interação eletrostática entre a quitosana protonada e a glicoproteína negativamente carregada que compõe o muco. Uma das explicações para a atividade antifúngica e antibacteriana aborda a interação da quitosana protonada com as moléculas negativamente carregadas nas membranas das células microbianas interferindo, assim, na troca de nutrientes pela célula. Além disso, ainda pode ocorrer uma competição com os íons cálcio presente nas células, o que compromete a integridade da membrana e provoca a morte celular [5,65].

Dependendo da fonte e do procedimento de fabricação é possível obter quitosanas com massa molar média (MM) entre 50 - 1000kDa e grau de desacetilação (GD) entre 50-90% [66]. Esses são os parâmetros mais importantes na caracterização da quitosana e determinam suas propriedades físico-químicas e biológicas. Solubilidade, viscosidade, biodegradabilidade, cristalinidade, biocompatibilidade e resposta celular são algumas das propriedades diretamente afetadas por esses parâmetros. A taxa de degradação, por exemplo, é uma das propriedades que desempenham um papel crucial no sucesso do dispositivo, pois pode influenciar nos processos celulares. Sabe-se que a quitosana pode ser degradada no ambiente fisiológico por algumas enzimas como a lisozima, por exemplo. Estudos mostram que quitosanas com menores GD e MM apresentam maiores taxas de degradação. Dessa forma, esses parâmetros precisam ser modulados, pois uma

degradação muito rápida pode provocar um acúmulo de aminossacarídeos e produzir uma resposta inflamatória indesejável [62,67].

Os grupos amino (NH_2) e as hidroxilas ($-\text{OH}$) presentes na estrutura da quitosana são reativos e podem ser sítios ativos para uma variedade de reações, originando derivados com diferentes propriedades e aumentando seu leque de aplicações [64].

3.4.2. Aplicações como biomaterial

A quitosana é considerada um dos biomateriais mais importantes para aplicação na engenharia de tecidos, pois reúne diversas propriedades favoráveis como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, alta afinidade com moléculas da matriz extracelular, etc. [68]. Estudos reportam o uso da quitosana e seus derivados na engenharia de tecido ósseo [69], cartilaginoso [70], epitelial [71], nervoso [72] e conjuntivo [73]. Além disso, também é reportado seu uso em sistemas de liberação controlada de fármacos [74,75] e em curativos [76,77].

Estruturalmente similar aos glicosaminoglicanos (GAGs) da matriz extracelular, a quitosana e seus derivados tem sido empregados com sucesso como *scaffolds* na engenharia de tecido. Feng e colaboradores [78] desenvolveram matrizes porosas de quitosana por processo de liofilização e mostrou, por meio de testes *in vitro*, que o biomaterial é capaz de suportar o crescimento e diferenciação de células-tronco da polpa dentária. Seus resultados mostram ainda que as células aderidas à matriz sofreram diferenciação em diversos tipos de células neurais, o que sugere seu potencial para uso na regeneração nervosa.

Uma das técnicas mais utilizadas na produção de matrizes porosas de quitosana que necessitam de propriedades mecânicas superiores ou diferentes taxas de degradação envolvem sua reticulação ou associação a outros materiais. Estudos relativos ao uso da quitosana como *scaffold* para regeneração óssea tem demonstrado o potencial de compósitos baseados em quitosana/hidroxiapatita. Além de melhorar as propriedades físico-químicas e mecânicas dos materiais, a adição da fase inorgânica é associada a maior

e mais rápida consolidação óssea em diferentes modelos de defeitos críticos em ratos [44,79].

Várias associações com quitosana são propostas na literatura: quitosana/gelatina [80,81]; quitosana/vidro bioativo [82,83]; quitosana/colágeno [84,85]; quitosana/ácido hialurônico [86,87], entre outras.

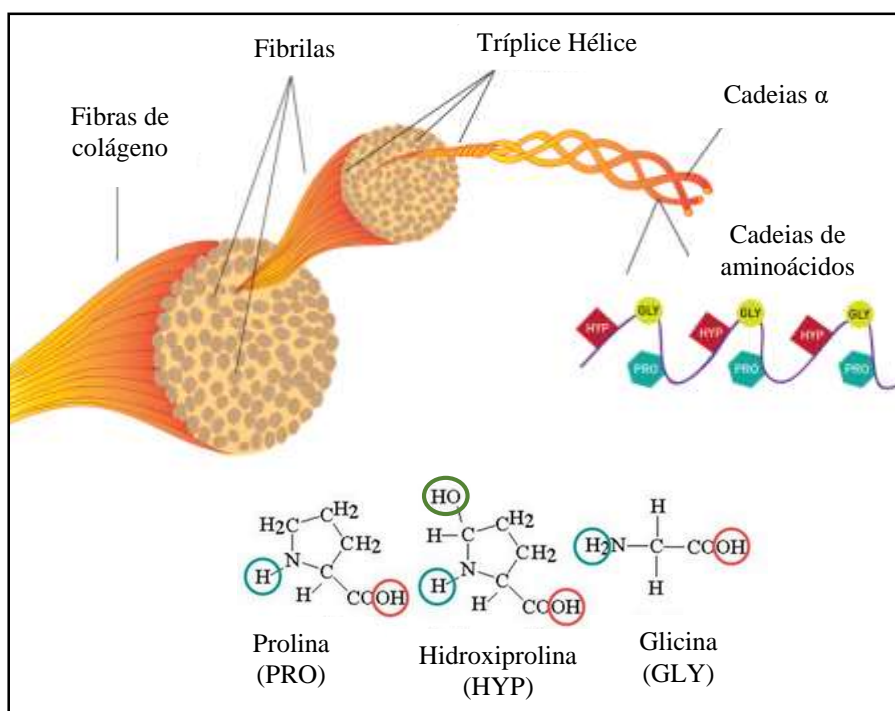
3.5. Colágeno/ Gelatina

3.5.1. Estrutura Molecular e Propriedades

Colágeno e gelatina (colágeno parcialmente hidrolisado) são biomacromoléculas amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e na área biomédica. O colágeno é a proteína estrutural de maior abundância nos animais, compreendendo um terço (1/3) do total das proteínas do corpo humano [88]. Encontrado em diferentes tecidos, sua estrutura básica é constituída por três cadeias peptídicas que se arranjam na forma de uma hélice tripla, denominada tropocolágeno. Cada cadeia peptídica apresenta uma sequência típica de aminoácidos: $(\text{GLY-X-Y})_n$, onde GLY representa a glicina. X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, porém essas posições são frequentemente ocupadas pela prolina e hidroxiprolina, respectivamente [89,90].

Na Figura 10 é ilustrada a estrutura do colágeno. Os aminoácidos presentes nas cadeias apresentam grupos funcionais carboxila (COOH), hidroxila (OH) e amino (NH₂), por onde ocorrem interações do tipo ligação de hidrogênio, responsável pela formação e estabilização da estrutura helicoidal das cadeias [91].

Até o momento já foram identificados cerca de 27 tipos de colágeno, que se diferenciam na organização molecular e nas funções que desempenham em determinado tecido. Os colágenos mais abundantes compreendem os tipos I, II, III, V e XI, que são fibrilares e formam a base estrutural de tecidos como ossos, pele, cartilagem, tendões etc. [91]. Uma discussão mais aprofundada sobre os diversos tipos de colágeno, estrutura e ocorrência pode ser encontrada em excelentes trabalhos de revisão como de Brodsky et al. [91] e Gelse et al. [92].



Fonte: Adaptado de Proto-col World [93].

Figura 10. Representação da estrutura do colágeno e dos principais aminoácidos formadores.

Entre esses, o colágeno Tipo I é o mais abundante, compreendendo cerca de 80% do colágeno total encontrado no corpo. Com sua estrutura e propriedades muito bem estudadas, é o tipo de colágeno mais utilizado como biomaterial [94]. No entanto, uma das dificuldades encontradas ao utilizar o colágeno é o fato de ser insolúvel em solução aquosa. Por isso, uma das alternativas é utilizar um de seus derivados, a gelatina.

O colágeno Tipo I nativo insolúvel pode ser submetido a um processo de hidrólise parcial originando a gelatina, produto solúvel em água quente (aproximadamente 40°C). Se a matéria-prima utilizada para a produção for de origem suína, realiza-se a hidrólise em condições ácidas e o produto é classificado como gelatina Tipo A. Já a gelatina Tipo B é obtida por meio da hidrólise alcalina de tecidos de origem bovina [95].

De acordo com a Associação de Fabricantes de Gelatina da Europa (*Gelatine Manufacturers of Europe, GME*), a matéria prima de origem bovina necessita passar por um processo de alcalinização por semanas, uma vez que o tecido conjuntivo é altamente interconectado. Já no tecido suíno um pré-tratamento com ácido durante um dia e

subsequente neutralização e lavagem é o suficiente para extrair o colágeno. Na Figura 11 são ilustradas as principais etapas para produção da gelatina.

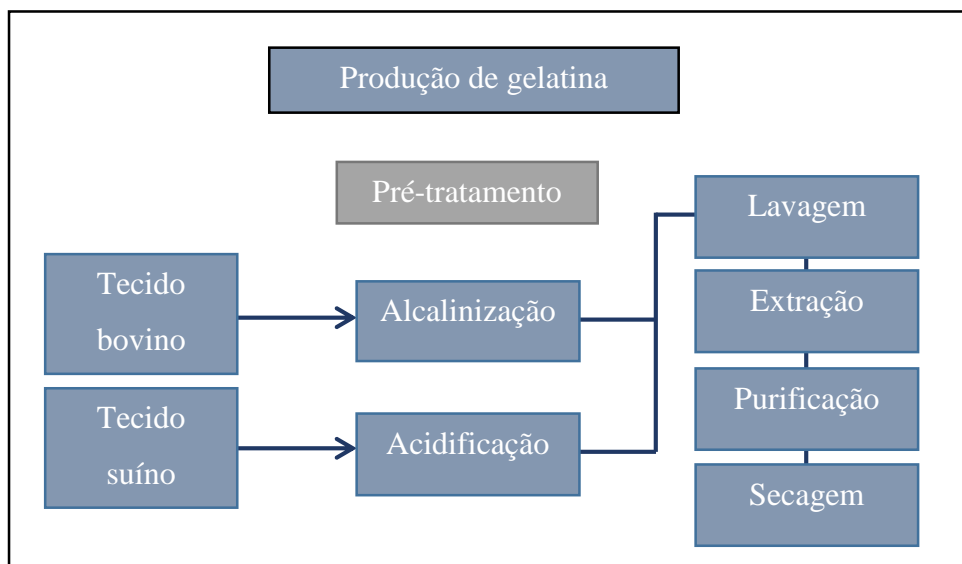
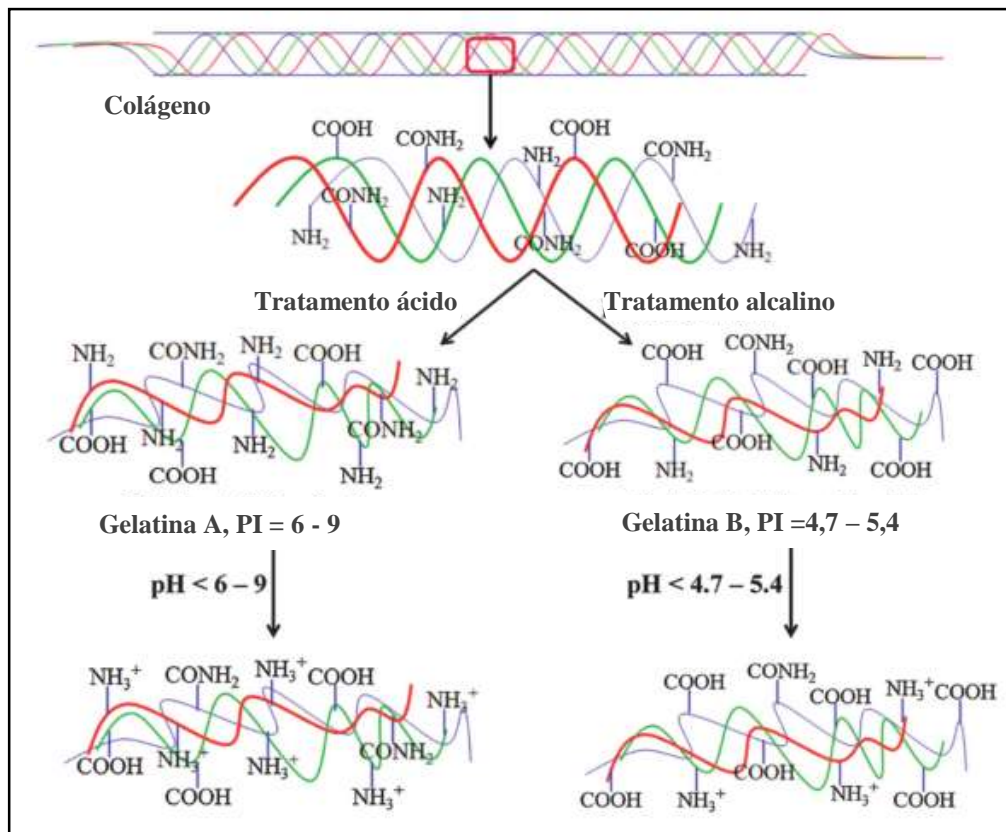


Figura 11. Ilustração das principais etapas envolvidas no processo de produção da gelatina.

No processo de conversão do colágeno em gelatina há uma quebra das ligações cruzadas entre as cadeias que formam a tríplice hélice, originando uma estrutura de espiral aleatória. Na Figura 12 é esquematizado o que ocorre com a estrutura do colágeno para originar os diferentes tipos de gelatina. No tratamento alcalino, para obtenção da gelatina Tipo B, os grupos amida dos aminoácidos formadores do colágeno são hidrolisados em grupos carboxila, provocando um aumento da densidade desses grupos e, conseqüentemente, de carga negativa na molécula. Dessa forma, o produto final apresenta um ponto isoelétrico (PI) na faixa de 4,7-5,4. Em contrapartida, no tratamento ácido os grupos amida não são drasticamente afetados, resultando em um produto com PI maior, na faixa de 6,0-9,0. Comportando-se como um polieletrólito, ao assumir diferentes cargas elétricas de acordo com o pH do meio (carga positiva em pH menor que o PI e carga negativa acima do PI), a gelatina torna-se um material interessante pois pode interagir com diferentes agentes terapêuticos e/ou biomoléculas como ácidos nucléicos e proteínas, por exemplo [96].



Fonte: Samal et al. [96].

Figura 12. Métodos de tratamento do colágeno para obtenção da gelatina Tipo A e Tipo B.

Durante o processo de produção, as cadeias de gelatina são quebradas aleatoriamente, gerando gelatinas com ampla distribuição de massa molar. Devido às diferenças no processo de produção, a gelatina Tipo B geralmente apresenta maior proporção de frações de alta massa molar, enquanto a gelatina Tipo A possui uma distribuição mais homogênea [97].

Uma das propriedades mais importantes da gelatina está relacionada à sua capacidade de formar um gel translúcido em soluções com concentração maior que 2% m/v. A transição sol-gel ocorre em temperaturas abaixo de 30°C, quando as estruturas predominantemente de espirais aleatórios vão se agregando, por meio de ligações de hidrogênio, dando origem a estrutura tridimensional, o gel [98]. A resistência mecânica dos géis é medida industrialmente pelo chamado índice *bloom*, que é dado em gramas e obtido pelo método proposto por Oscar T. Bloom. A resistência do gel é dependente da concentração e da

massa molar da gelatina. O índice Bloom de gelatinas comerciais varia de 50 a 300g. Geralmente, quanto maior for o índice Bloom, maior será a resistência do gel formado [99,100].

3.5.2. Aplicações como biomaterial

A gelatina é classificada como um material seguro (*generally regarded as safe, GRAS*) pelo órgão americano *Food and Drug Administration (FDA)*. Com uma série de relatos de aplicação em cosméticos e produtos alimentícios, é crescente o número de estudos avaliando a aplicação da gelatina como biomaterial [101].

Biocompatibilidade e biodegradabilidade são algumas das propriedades que justificam o crescente número de aplicações clínicas da gelatina. Além de não ser citotóxica ainda apresenta habilidade de interagir com células e biomoléculas por meio dos grupos reativos da molécula e pode ser degradada enzimaticamente por proteases presentes no corpo [102,103]. Quando comparado ao colágeno, a gelatina tem sido a escolha preferencial para uso como biomaterial por apresentar menor custo, menor antigenicidade (provoca uma resposta imunológica consideravelmente mais baixa) e facilidade na obtenção de soluções concentradas [104,105].

Apesar de suas vantagens, o uso da gelatina pode ser limitado devido sua baixa resistência mecânica e estabilidade química em condições fisiológicas. Para contornar esse problema e obter as propriedades adequadas para utilização como biomaterial, é comum se fazer modificações na estrutura da gelatina ou associá-la a outros materiais. Uma das abordagens mais utilizadas na área biomédica é o estabelecimento de ligações cruzadas entre suas moléculas. Entre os reticulantes químicos utilizados para esse fim, o glutaraldeído é o mais empregado devido a sua efetividade no processo de reticulação, curto tempo de reação e baixo custo. Porém, é conhecido que esse agente reticulante apresenta toxicidade e requer o cuidado para remoção de resíduos após a reticulação, os quais poderiam desencadear reações imunológicas indesejadas [106,107]. BIGI et al. (2001) relatam o uso de glutaraldeído como agente reticulante para melhorar as propriedades de filmes a base de gelatina. Seus resultados mostram que, quando utilizado em baixas concentrações (1% m/m), o glutaraldeído promove um aumento significativo

nas propriedades mecânicas e estabilidade térmica dos filmes, sem gerar citotoxicidade no dispositivo.

Diversos compósitos e materiais híbridos utilizando gelatina são descritos na literatura: associado ao colágeno [108]; vidro bioativo [109]; hidroxiapatita [107]; quitosana [110], entre outros.

A combinação da gelatina com quitosana tem ganhado destaque na área biomédica, pois são dois eletrólitos que podem interagir entre si, originando materiais com propriedades físicas e biológicas superiores. Diferentes tipos de estruturas contendo esses dois materiais foram desenvolvidas com sucesso, entre elas: hidrogéis injetáveis [111], filmes [112]; nanofibras [110] e *scaffolds* porosas [113].

3.6. Vidro Bioativo

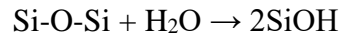
3.6.1. Aspectos Gerais

O vidro bioativo foi descoberto por Larry Hench em 1969 e desde então tem sido muito estudado para diversas aplicações na área biomédica. O conceito de bioatividade surgiu com a observação que esses materiais possuíam a capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, resultando em uma ligação muito forte com o tecido hospedeiro [114].

A primeira e mais conhecida composição de vidro bioativo apresenta a composição molar 46,1 % SiO₂, 24,4 % Na₂O, 26,9% CaO e 2,6% P₂O₅ é conhecido como Bioglass[®] ou 45S5. Atualmente, os vidros bioativos podem ser encontrados em alguns produtos comerciais como, por exemplo, o Perioglas[®], indicado para promover a regeneração periodontal [115]. Desde então, novas composições surgiram, incluindo os sistemas quaternários [79] e ternários [116].

Quando implantados, o vidro bioativo induz uma série de reações na interface biomaterial/tecido, levando à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA). Essas reações podem ser resumidas em cinco estágios representados na Figura 13 [117,118]:

1. Troca iônica de Na^+ e/ou Ca^{2+} pertencentes ao vidro por H^+ e H_3O^+ do fluido corporal.
2. Perda de sílica solúvel do material na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ para a solução e formação da camada de silanol (Si-OH).

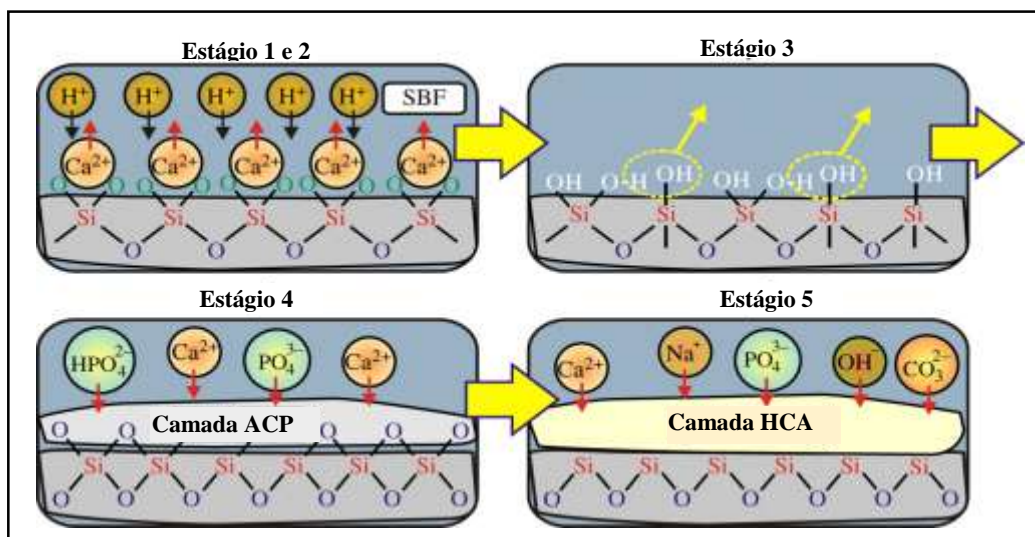


3. Policondensação repolimerização da camada rica em SiO_2 na superfície do material.



4. Migração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em sílica e posterior crescimento da camada rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação do Ca^{2+} e PO_4^{3-} da solução.
5. Cristalização da camada amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (ACP) pela incorporação de OH^- e CO_3^{2-} provenientes da solução, originando a camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA).

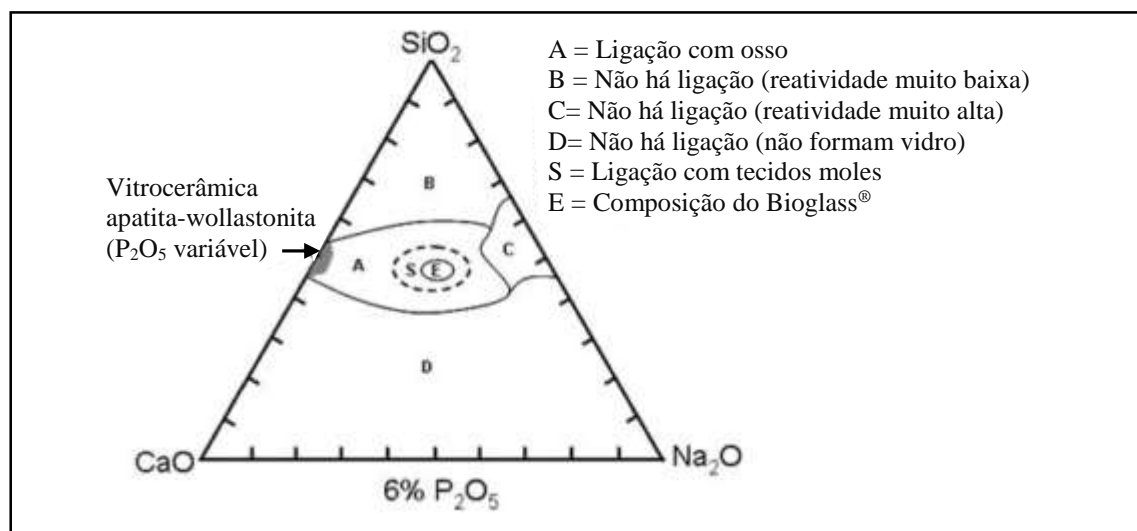
A camada de HCA formada na superfície do vidro bioativo tem composição semelhante ao osso e é a responsável pelas interações com o tecido hospedeiro. Uma série de eventos biológicos ocorre na superfície dessa camada, incluindo adsorção de fatores de crescimento, adesão de células progenitoras, diferenciação celular e excreção de matriz extracelular óssea, seguida de mineralização e formação do novo tecido ósseo [118,119].



Adaptado de Gunawidjaja et al. [120]

Figura 13. Representação dos cinco estágios envolvidos na formação da camada de HCA na superfície do vidro bioativo em contato com fluido corporal.

A velocidade de formação da camada de HCA está diretamente relacionada com a composição do vidro bioativo. Hench [121] relata que vidros produzidos pelo método convencional de fusão só apresentam bioatividade em composições com teor de SiO_2 de até 60% (mol). Acima desse valor, não há formação de ligação na interface do material, que se torna inerte. Na Figura 14 é ilustrado o diagrama de possíveis composições de vidros bioativos, considerando um teor fixo de 6% P_2O_5 . Hench ressalta que os vidros mais bioativos e com capacidade de se ligar mais rapidamente ao osso se encontram no meio do diagrama (região E), área que compreende a formulação do Bioglass[®]. Observando o diagrama é possível notar que além de tecido ósseo, o vidro bioativo também é capaz de se ligar a tecidos moles (região S), o que o torna atrativo para uma ampla gama de aplicações biomédicas.



Fonte: Hench, L. [121]

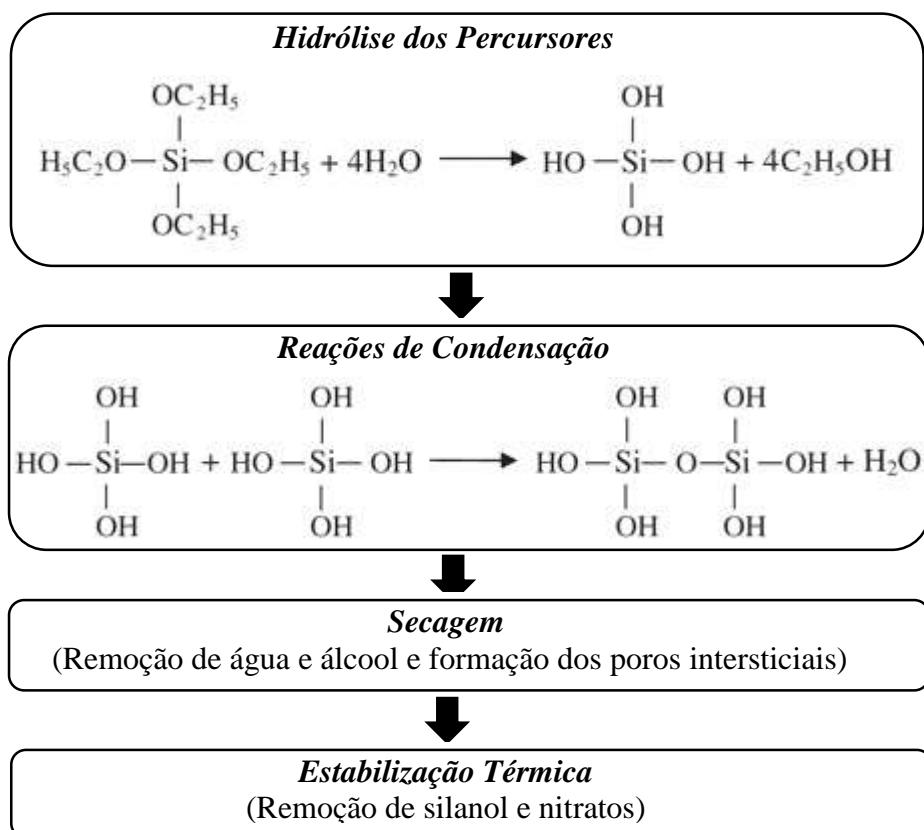
Figura 14. Diagrama composição x capacidade de ligação com tecido para vidros $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Atualmente, as pesquisas estão inclinadas para a síntese do vidro bioativo pela rota sol-gel, que se dá em temperatura ambiente, enquanto no método por fusão são empregadas temperaturas acima de 1300°C [119]. O desenvolvimento da rota sol-gel possibilitou a extensão da bioatividade para formulações com até 90% de SiO_2 , o que permite a obtenção de materiais com maior resistência mecânica. Além disso, a rota permite maior controle dos parâmetros de síntese e obtenção de vidros com maior pureza, poros nanoestruturados distribuídos uniformemente e grande área superficial. Todos esses

fatores contribuem para que os vidros obtidos via rota sol-gel apresentem maior bioatividade que os obtidos via processo de fusão [122,123].

A produção de vidro bioativo via rota sol-gel consiste basicamente na hidrólise (em temperatura ambiente) dos precursores alcóxidos para a formação de uma solução coloidal (sol) a base de sílica. Em seguida, essas nanopartículas se reorganizam, por meio de reações de condensação, para a formação de uma rede tridimensional interconectada (gel). O processo de condensação leva a formação de água e álcool, que permanecem nos poros do gel. Dessa forma, na etapa posterior o material é submetido a um processo de secagem, onde o líquido é removido originando uma estrutura com poros micro ou nanométricos e interconectados. Em seguida é feita a estabilização térmica do material, que é submetido a temperaturas mais altas (600 - 800°C), onde ocorre

a remoção dos grupos silanol (-SiOH) da superfície da rede provocando um aumento na densidade, resistência e dureza do vidro [115]. Os principais passos envolvidos na produção do vidro bioativo pelo processo sol-gel são resumidos na Figura 15.

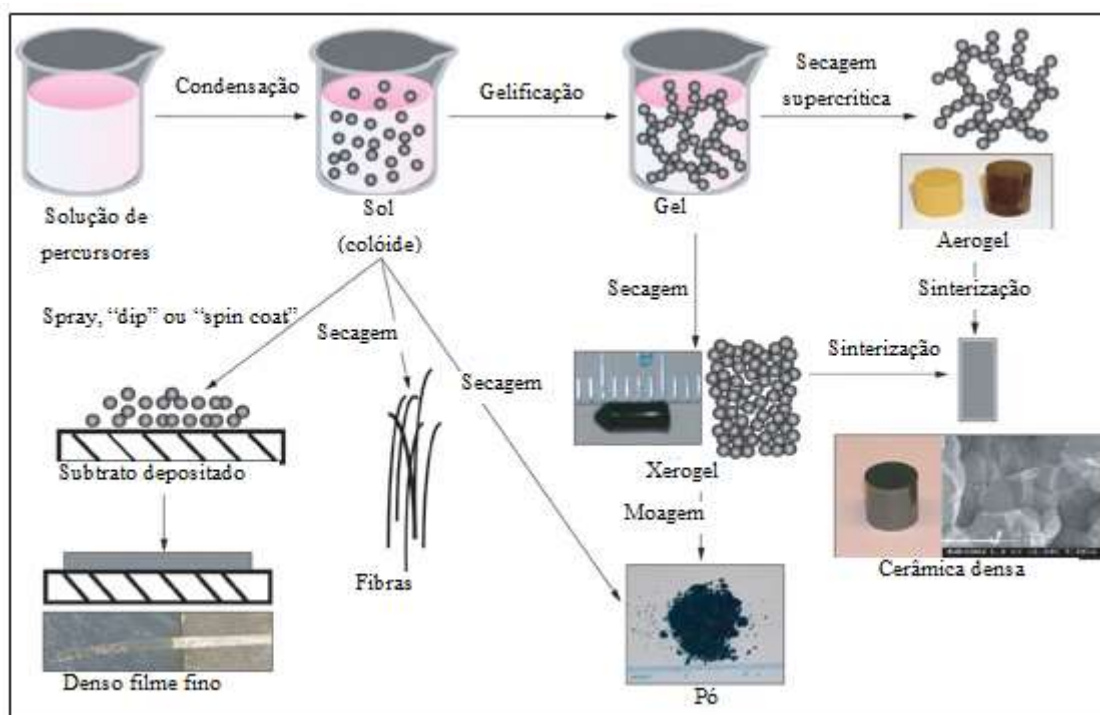


Adaptado de Martin et al. [124]

Figura 15. Representação esquemática do processo sol-gel para obtenção do vidro bioativo.

O tamanho dos poros do material obtido é uma das propriedades que influenciam na bioatividade e, geralmente, varia entre 1 e 30 nm na rota sol-gel. Esse parâmetro pode ser controlado por meio da escolha do precursor, da composição do vidro e do pH em que se processam as reações de condensação [119].

Dependendo do método de secagem e tratamento térmico utilizado, pode-se obter vidro bioativo de diferentes formas e propriedades (Figura 16).



Fonte: Rath et al. [125]

Figura 16. Ilustração das diferentes formas de vidro bioativo obtidos pela rota sol-gel.

Uma das formas utilizadas na área biomédica são as partículas esféricas, que podem ser usadas como reforço em estruturas poliméricas e na entrega de agentes terapêuticos. O método de Stöber [126] foi o pioneiro e tem sido amplamente utilizado para a produção de partículas esféricas e monodispersas. A síntese é realizada em meio alcalino (acima do ponto isoelétrico da sílica), utilizando hidróxido de amônia como catalisador, o que provoca a repulsão entre as partículas durante a policondensação. Em seu trabalho Stöber correlaciona uma série de parâmetros de síntese que influenciam no tamanho final das

partículas. Por esse método é possível obter partículas no intervalo de 50nm-2µm de diâmetro.

Oliveira et al. [123] propôs uma modificação no método de Stöber para a obtenção de nanopartículas com a formulação ternária: 60% SiO₂, 36% CaO and 4% P₂O₅ (%.mol). Utilizando uma mistura de diferentes alcóxidos e metanol como surfactante, foram obtidas partículas com diâmetro médio de 19 ± 9nm antes do tratamento térmico e de 87 ± 4nm após tratamento térmico. Os resultados mostram que os vidros obtidos por esse novo método apresentam grande potencial para utilização na área biomédica, pois apresentam grande área superficial, alta biotividade e aumento na viabilidade celular de osteoblastos *in vitro*. Frente a esses resultados e a intensiva caracterização dos vidros bioativos obtidos por esta rota, esse foi o método empregado para a produção das nanopartículas utilizadas no presente trabalho.

3.6.2. Aplicações Biomédicas

Os vidros ativos têm sido extensivamente investigados para reparo e regeneração óssea. Atualmente, sabe-se que outras cerâmicas bioativas também levam a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada, porém com velocidade menor que o vidro bioativo. Valério et al. [127] realizaram um estudo comparando o comportamento de osteoblastos em contato com produto iônico do vidro bioativo com 60% de SiO₂ (BG60S) e cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (BCP: 67%Ca; 33%PO₄³⁻). Os testes biológicos realizados *in vitro* mostraram que os osteoblastos em contato com o produto iônico do vidro bioativo apresentaram maior proliferação e secreção de colágeno em comparação com o grupo controle e o produto iônico de BCP. Os autores presumem que o aumento da atividade celular na presença do BG60S se deve à sílica existente no produto iônico, que é capaz de interagir com biomoléculas presentes no meio promovendo a estabilização do colágeno.

Quando o vidro bioativo é utilizado na forma de partícula, um dos parâmetros mais importantes para utilização na medicina regenerativa é o seu tamanho. Ajita e colaboradores [127] investigaram o efeito do tamanho de partículas vidros produzidos na proliferação de células-tronco mesenquimais de ratos. Alguns parâmetros de síntese, como a concentração de surfactante e polietilenoglicol (PEG), foram controlados para

sintetizar partículas com diferentes tamanhos. Seus resultados mostram que maiores concentrações de PEG produziram partículas menores, as quais apresentaram os melhores resultados em termos de aumento de viabilidade celular. Esses resultados são consistentes com outros estudos, que demonstram que partículas menores apresentam maior área superficial e levam a formação da camada de HCA em menor tempo [123,128].

Para engenharia de tecido, o vidro bioativo pode ser processado na forma de espuma para obtenção de *scaffolds* macroporosas. Jones e colaboradores [129] ajustaram os parâmetros de síntese de vidros com formulação 70% SiO₂, 30% CaO para obtenção de espumas com propriedades mecânicas adequadas para uso na engenharia de tecido ósseo. Seus resultados mostraram que vidros tratados a 800°C por 2h produziram *scaffolds* com resistência à compressão próxima ao do osso trabecular e porosidade adequada para crescimento celular.

Apesar das excelentes propriedades biológicas, uma das limitações da utilização do vidro bioativo na engenharia de tecido é sua baixa resistência mecânica. Por isso é muito comum associá-lo a outros materiais. Gerhardt et al. [130] investigaram as propriedades angiogênicas de micro e nanopartículas de vidro bioativo em *scaffolds* porosos contendo poli(D,L-lactídeo) (PDLLA). Os autores relataram que as propriedades mecânicas dos *scaffolds* produzidos foram comparáveis ao do osso trabecular, admitindo ainda a necessidade alguma melhoria posterior. Os estudos *in vitro* mostraram que os fibroblastos em contato com filmes contendo vidro produziram uma quantidade de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) cinco vezes maior que nos filmes de PDLLA sem adição de vidro bioativo. Além disso, os resultados *in vivo* (realizado em ratos) demonstraram que após 8 semanas de implantação os *scaffolds* contendo vidro estavam bem infiltradas no tecido recém formado e demonstraram maior vascularização e porcentagem de vasos sanguíneos quando comparado ao *scaffold* de PDLLA puro.

Além da utilização como substitutos ósseos e em *scaffolds* para engenharia de tecido, alguns autores tem investigado o uso do vidro bioativo como veículo para o encapsulamento e liberação controlada de drogas e moléculas bioativas. El-Kady e Farag investigaram o uso de nanopartículas de vidro bioativo como um dispositivo para liberação controlada de 5-fluouracil (5-FU), medicamento utilizado no tratamento de câncer. O medicamento foi incorporado por imersão das nanopartículas em um solução

contendo 5-fluouracil. O perfil de liberação *in vitro* encontrado para esses sistemas sugerem que as nanopartículas podem ser utilizadas como sistemas para liberação do medicamento a longo prazo, o que poderia minimizar o problema de recorrência de câncer após processo de ressecção. A biocompatibilidade, bioatividade e simplicidade do método de incorporação do medicamento nesses sistemas foram algumas das vantagens pontuadas pelos autores. Outros sistemas contendo vidro bioativo para liberação controlada foram propostos por Arcos et al. [131], Xia et al. [132] e Soundrapandian et al. [133].

4. METODOLOGIA

4.1. Etapas de desenvolvimento do trabalho

O fluxograma apresentado na Figura 17 descreve as principais etapas que foram desenvolvidas neste trabalho:

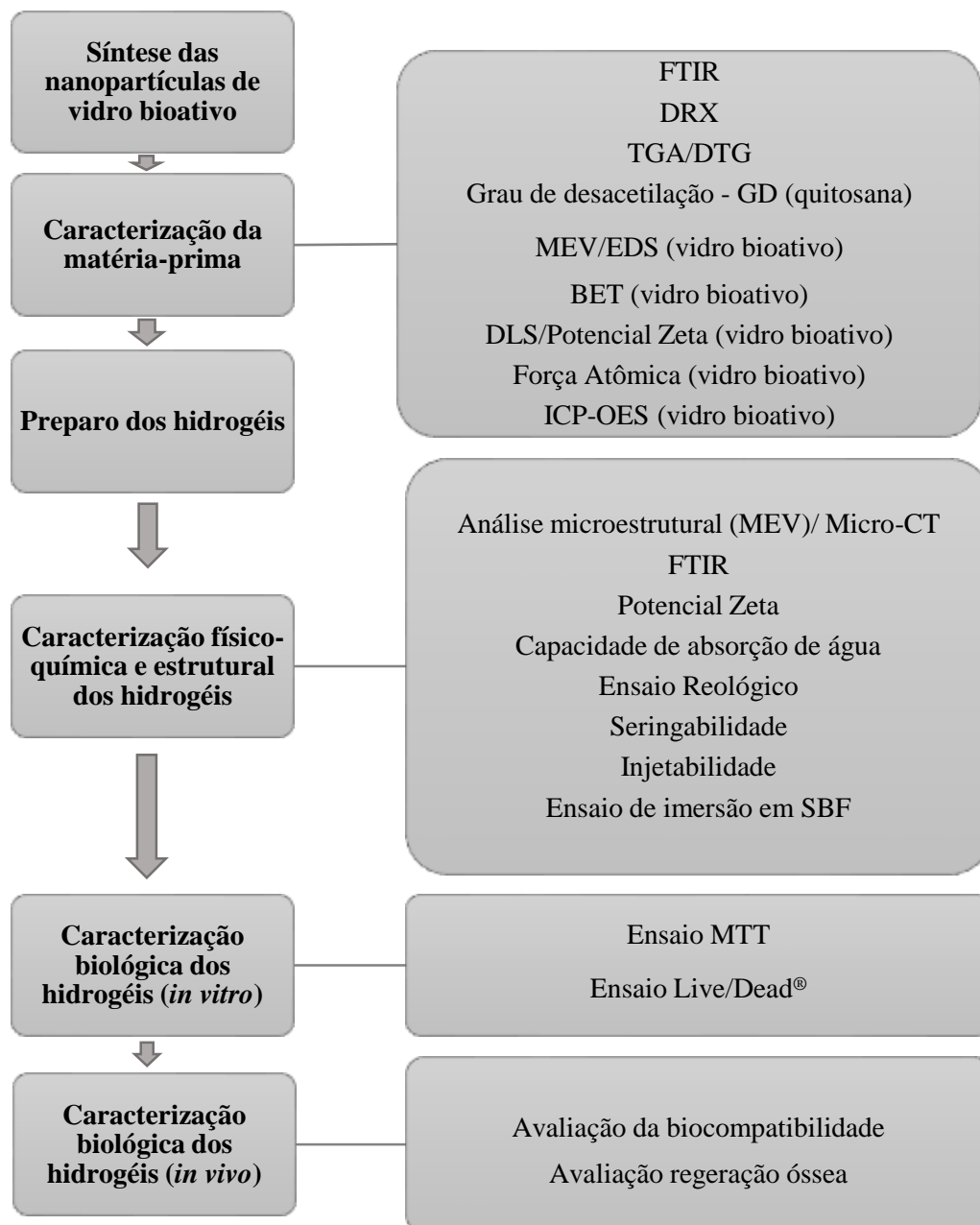


Figura 17. Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho.

4.2. Matéria-Prima

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico (P.A.) e incluem: Tetraetil ortosilicato 98% (TEOS); Trietil fosfato 99% (TEP); Ácido acético glacial; Quitosana em pó de alta massa molar e grau de desacetilação maior que 75% (ref.: 419-419, lote: MKBF9232V); Sal β -glicerofosfato dissódico hidratado (ref.:G-9422) e Gelatina Tipo A (ref.: G-1890) da Sigma-Aldrich, USA. Nitrato de cálcio tetra hidratado e Metanol da Synth, Brasil. Ácido nítrico e solução 33% de hidróxido de amônio da Merck, Brasil.

4.3. Síntese das nanopartículas de vidro bioativo

A síntese das nanopartículas de vidro bioativo com composição nominal (em mol) de 60% de SiO_2 , 36% CaO e 4% P_2O_5 foi realizada de acordo com protocolo desenvolvido anteriormente por Oliveira e colaboradores [123]. O procedimento para a síntese é esquematizado na Figura 18 e foi realizado da seguinte forma: (1) 200 mL de metanol foram misturados a 0,46 mL de hidróxido de amônio 33% e 5,4 mL de água deionizada e submetidos a agitação por 5 minutos. (2) Em seguida, 5,57 mL de TEOS e 0,56 mL de TEP foram adicionados gota a gota por 10 minutos. O sol foi, então, agitado mecanicamente por 48 horas. (3) O sol formado foi colocado em uma estufa a 50°C até a completa evaporação da amônia. (4) Após esse processo, o sol foi filtrado em filtro de $0,22\ \mu\text{m}$. (5) Em seguida, foram adicionados 3,46g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ no sol e o sistema submetido a agitação por 24 horas. (6) As nanopartículas formadas foram separadas por filtração sucessiva em filtros de $0,22$ e $0,11\ \mu\text{m}$. (7) O sol filtrado em filtro de $0,11\ \mu\text{m}$ foi submetido ao processo de liofilização para prevenir a agregação secundária das partículas do gel via ligação entre as moléculas de água durante o processo de secagem. (8) O pó obtido foi tratado termicamente à 450°C por 40 minutos, a uma taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. (9) No fim do processo, foram obtidas nanopartículas de vidro bioativo na forma de pó.

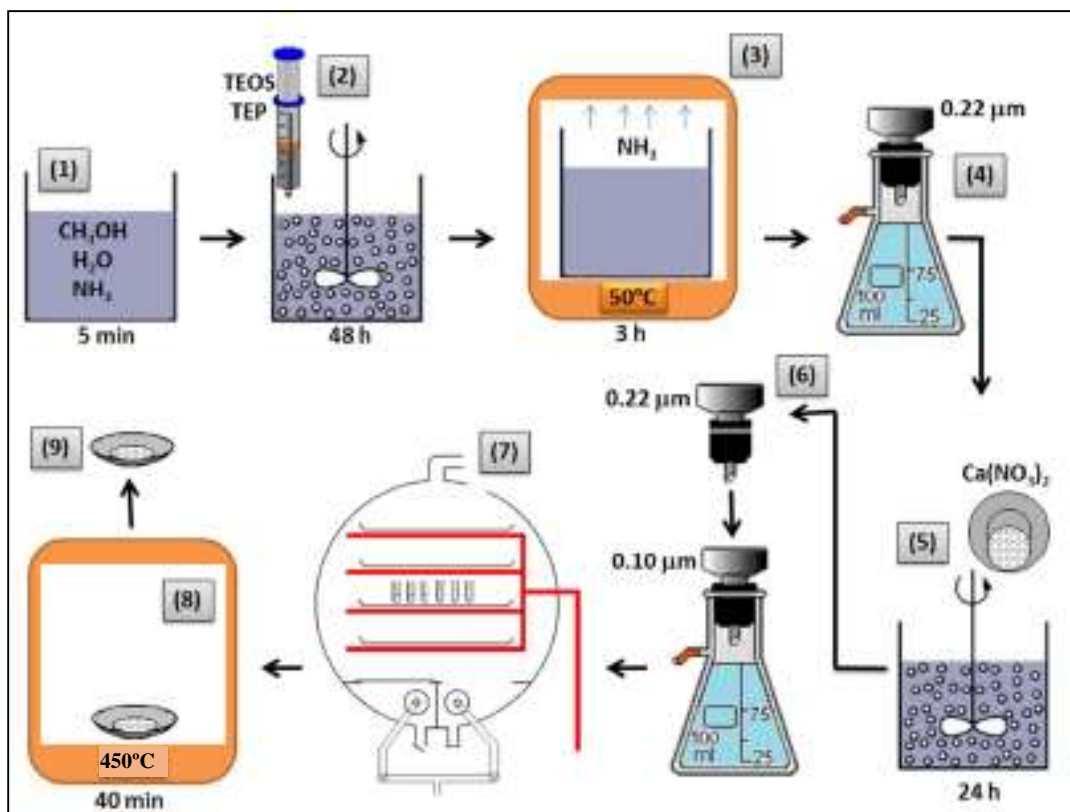


Figura 18. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo. [134]

4.4. Caracterização da matéria-prima

Os materiais utilizados na síntese dos hidrogéis foram caracterizados por meio das técnicas de análise por Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), Difração de Raios-X (XRD- *X Ray Diffraction*) e Análise Termogravimétrica (TGA). Análise específica para determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada por meio de Titulação potenciométrica. Além disso, as nanopartículas de vidro bioativo também foram caracterizadas com o auxílio de Microscopia de Força Atômica (MFA), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); Potencial Zeta (ζ); Adsorção de Nitrogênio, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

A avaliação dos grupos químicos da quitosana, gelatina e vidro bioativo foi realizada por meio de FTIR. Para isso, os materiais poliméricos, na forma de pó, foram submetidos à análise pela técnica de Reflectância Total Atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR),

utilizando o acessório “*Smart Omni Sampler*” sem necessidade de preparo prévio das amostras. As amostras de vidro bioativo foram analisadas pela técnica de Reflectância Difusa (*Diffuse Reflectance*, DRIFT), usando o acessório “*Smart Diffuse Reflectance*”. Para isso, as nanopartículas foram misturadas com KBr, na concentração de 1% (m/m) e trituradas em um gral para análise. O experimento foi conduzido no equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific, sendo feitas 64 varreduras entre 600 e 4000 cm^{-1} para a técnica de ATR e entre 400 e 4000 cm^{-1} para a técnica de Reflectância Difusa. A resolução das medidas foi de 4 cm^{-1} e intervalos de 2 cm^{-1} . Os dados obtidos pela técnica foram tratados com o auxílio do software Origin9® e os espectros analisados quanto as bandas associadas aos principais grupos químicos esperados para cada amostra.

A cristalinidade dos materiais utilizados foi avaliada por Difração de Raios X (DRX), conduzida no equipamento PW9710mpd, da Philips, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$) à 40kV e 30mA. A análise foi conduzida nos materiais na forma de pó, com 2θ variando de 3,00° a 90,00° com passo de 0,06° e tempo de coleta de 1s.

O estudo do comportamento térmico dos materiais foi realizado por meio de análise termogravimétrica (TGA). Este método de análise térmica é muito utilizado para monitorar as variações de massa dos materiais frente a mudanças de temperatura [135]. As análises foram feitas no equipamento SDT Q600 (TA instruments). Para realização dos testes, uma massa de aproximadamente 5mg de amostra foi depositada em um suporte de platina e submetida a um aquecimento controlado em atmosfera de nitrogênio. Diferentes faixas de aquecimento foram utilizadas para cada material: (a) 25 - 900°C para a quitosana; (b) 25 – 500°C para a gelatina e (c) 25 - 1100°C para o vidro bioativo. Foi utilizada uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e fluxo do gás de arraste de 50mL.min⁻¹.

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizado por meio de titulação potenciométrica. Para isso, 0,2000g de quitosana foram dissolvidos em 20mL de solução padronizada de HCl 0,1mol.L⁻¹, seguido de diluição em 10 mL de água deionizada. Em seguida, foi realizada a titulação potenciométrica, sob agitação magnética constante, com solução padronizada de NaOH 0,1mol.L⁻¹. Os valores de pH e volume de NaOH adicionados foram registrados, obtendo-se uma curva típica de titulação potenciométrica. Os cálculos para determinação do grau de desacetilação foram baseados nas equações

propostas por Martins [123]. Os valores obtidos foram aplicados nas Equações 1 e 2 e o resultado comparado ao valor fornecido pelo fabricante:

$$MA = n_1 * 161 + n_2 * 204 \quad \text{Equação 1}$$

$$GD (\%) = \frac{n_1}{(n_1 + n_2)} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

MA = massa da amostra;

n_1 = número de mols do monômero desacetilado (titulado), cujo mero tem massa molar igual a 161g.mol⁻¹;

n_2 = número de mols do mero acetilado, que tem massa molar igual a 204g.mol⁻¹.

GD = grau de desacetilação.

Análises adicionais foram realizadas para caracterização das nanopartículas de vidro bioativo. A composição das nanopartículas foi analisada por meio de ICP-OES no equipamento Optima 7300 DV (PerkinElmer, EUA). Para essa análise, 0,1 g das amostras foram transferidas para um cadinho de grafite, contendo 0,7g de metaborato de lítio. Outra porção de 0,7g de metaborato de lítio foi adicionada e a mistura levada à mufla (950 ± 25°C) por 10 minutos. O cadinho foi retirado da mufla, a mistura homogeneizada e, em seguida, colocada de volta no equipamento por 10 min. adicionais (950 ± 25°C). Depois disso, a mistura foi transferida para um béquer contendo 100mL de solução de ácido nítrico 10% (v/v) e submetida a agitação até completa dissolução. A solução resultante foi transferida para tubos falcon para armazenamento e posterior análise. As concentrações de Si, Ca e P foram então analisadas pelo equipamento e as proporções de SiO₂, CaO e P₂O₅ foram calculadas.

A microestrutura e a composição atômica foram observadas usando um microscópio FEI-INSPECT S50 operado a 20kV e equipado com uma unidade de espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS) (EDAX Genesis). As amostras foram revestidas com uma película de grafite ultrafina por pulverização catódica e analisadas.

A topografia, morfologia e distribuição do tamanho das partículas foram analisadas por AFM no equipamento XE-70 (Park Systems, Coreia do Sul), utilizando ponta de Si tipo

PPP-NCHR, no modo de não contato, com força constante de 42N/m e frequência 330kHz. O preparo das nanopartículas para análise foi realizado pela adição do material, na forma de pó, em álcool etílico na concentração 0,5mg.mL⁻¹. Após 5h de agitação magnética, algumas gotas da dispersão foram dispensadas sob a lamínula para análise.

A distribuição do tamanho de partícula foi analisada por DLS usando o instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, EUA) com um comprimento de onda de luz laser de 660nm (laser de diodo vermelho de 35mW) usando um mínimo de dez repetições. Para isso, as partículas de VB foram dispersas em metanol (0,125mg.mL⁻¹) e mantidas sob agitação por 5h. A solução coloidal foi filtrada em um filtro de seringa de 0,45µm (Millex LCR 25 mm, Millipore) e submetida a análise.

As propriedades texturais das nanopartículas foram analisadas por meio das isotermas de adsorção-dessorção de N₂. As medidas foram realizadas no equipamento Quantachrome 9 (2200 v.6.11). A área superficial específica foi determinada usando o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) usando pontos de dados de adsorção com uma pressão relativa (P/P₀) na faixa de 0,01-0,30. A distribuição do diâmetro dos poros calculada pelo método BJH foi aplicada nas curvas de dessorção.

4.5. Síntese dos hidrogéis termossensíveis

Os hidrogéis foram preparados utilizando diferentes proporções de quitosana (Q), gelatina (GE) e de vidro bioativo (VB) para estudar a influência da composição sobre as propriedades do hidrogel. Conforme apresentado na Tabela 1, a proporção de gelatina nos hidrogéis variou de 10% a 30% (m/m). Essas formulações foram escolhidas neste estudo porque, acima desta porcentagem, os hidrogéis se gelificaram à temperatura ambiente, tornando-os inadequados para uso como hidrogéis injetáveis, capazes de sofrerem gelificação *in situ*.

A síntese dos hidrogéis, usando o sal β glicerofosfato (β-GP) como iniciador do processo de gelificação foram baseadas em protocolos propostos anteriormente [52,54]. Todas as soluções para preparo dos hidrogéis, exceto a solução de gelatina foram mantidos sob refrigeração à 4°C, aproximadamente. As soluções utilizadas compreendem: solução de

quitosana (2,5%*m/v*) preparada em solução aquosa de ácido acético (0,1M); solução aquosa de gelatina (2%*m/v*) e solução aquosa de β -GP (56%*m/v*).

Tabela 1. Notação e composição química das amostras propostas.

Notação	Quitosana:gelatina (proporção em massa)	Vidro bioativo (%)
100Q	100Q:0GE	-
100Q/VB	100Q:0GE	10
90Q	90Q:10GE	-
90Q/VB	90Q:10GE	10
70Q	70Q:30GE	-
70Q/VB	70Q:30GE	10

Soluções de quitosana e gelatina foram misturadas na proporção mássica de 90/10 e 70/30 (quitosana/gelatina). Durante a execução do trabalho foi realizado um estudo de otimização das formulações e verificou-se que essas proporções resultaram em hidrogéis com propriedades termossensíveis. À essa mistura foi adicionada, gota a gota, a solução de β -GP, até que fosse atingida a concentração, em massa, de 16% ($m_{\beta\text{-GP}}/m_{\text{Q+GE}}$). Essa porcentagem foi fixada após estudos que garantiram que todas as formulações apresentariam pH no intervalo de 7,2-7,4. Nanopartículas de vidro bioativo (VB) na forma de pó foram, então, adicionadas às formulações de modo a obter as seguintes concentrações finais: 0% (controle) e 10% ($m_{\text{VB}}/m_{\text{Q+GE}}$). As soluções foram estocadas à 4°C, para evitar gelificação, até a realização dos testes.

4.6. Caracterização dos hidrogéis

4.6.1. Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Para análise de MEV, os hidrogéis foram imersos em banho-maria à 37°C até gelificação. Em seguida, foram estocados no congelador por 3 dias e submetidos à liofilização a -80°C, durante 48h, no equipamento da Liotop, modelo K105. As amostras liofilizadas foram recobertas por carbono e analisadas no microscópio FEI-INSPECT S50, operando a 20kV equipado com um espectrômetro por dispersão de energia de raios X (EDS) da EDAX Genesis.

A microestrutura e a distribuição do tamanho dos poros dos hidrogéis foram investigadas por microtomografia de raios X (Micro-CT) usando um scanner de micro-CT de desktop compacto (SkyScan 1174, Bruker micro-CT, Bélgica) com uma fonte de tensão de 40 kV, corrente 800 μ A e tamanho de pixel de 10 μ m, sem uso de filtro. As amostras foram fixadas em um suporte, com giro de 180° e aquisição de imagens a cada 0.7°. As imagens foram reconstruídas em fatias 2D usando a interface do software NRecon (Bruker micro-CT, Bélgica) e o software CT Analyzer (Bruker micro-CT, Bélgica) foi utilizado para análises em 3D e reconstrução de superfície em 3D.

4.6.2. Análise de Potencial Zeta

As possíveis interações eletrostáticas entre os componentes dos hidrogéis foram avaliadas por análise de potencial zeta (ζ). Para esse fim, as amostras preparadas (100Q, 100Q/VB, 90Q, 90Q/VB, 70Q e 70Q/VB) e as soluções precursoras (Q, GE, β -GP) foram diluídas trinta vezes usando água deionizada. A razão de diluição das soluções se baseou em estudos anteriores, garantindo medições mais precisas e que o pH das soluções após diluição permanecesse próximo aos valores das soluções de partida [136].

Já as nanopartículas de VB foram dispersas em água deionizada (0,125mg.mL⁻¹) e mantidas sob agitação por 5 h. O potencial zeta das dispersões à 25°C e 37°C foi medido usando um instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, EUA), com um comprimento de onda de luz laser de 660 nm (laser de diodo vermelho de 35 mW) e usando um mínimo de dez repetições.

4.6.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A análise dos grupos químicos dos hidrogéis foi realizada por meio de FTIR. As amostras foram liofilizadas (conforme preparo para MEV) e submetidas à análise no equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific, por meio da técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance*), utilizando o acessório OMNI-Smart. Foram feitas 64 varreduras entre 600 e 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e intervalos de 2 cm⁻¹.

4.6.4. Avaliação da termossensibilidade por Ensaio Reológico

Um estudo reológico das amostras foi realizado a fim de avaliar a formação do gel em função da temperatura. Os ensaios foram conduzidos em um reômetro de tensão controlada, modelo AR-G2 (TA Instruments, New Castle, USA), com geometria placa-cone 20mm, 2°.

Para determinar a temperatura de gelificação das amostras, foram realizados ensaios oscilatórios em uma rampa de aquecimento de 4 a 45°C, seguida de resfriamento (45 a 4 °C) a uma taxa de 1°C/min e gap de 49 µm. Foram fixados os valores de frequência (1Hz) e uma pequena deformação (*strain*) em 0,01, de modo a não perturbar a formação do gel durante os testes e simular as condições corporais [137]. A evolução dos módulos de perda (G'') e armazenamento (G') foi avaliada durante a rampa de aquecimento e resfriamento.

Para determinar o tempo de gelificação, as amostras foram submetidas aos testes de *Strain Sweep* e *Time Sweep*. Para o teste de *Strain Sweep*, as amostras foram submetidas a um ensaio oscilatório a 37 °C, variando a deformação (*strain*) de 0,01 a 100%. Nesse ensaio é possível determinar a deformação na faixa de viscosidade linear na temperatura de ensaio. Em seguida, realizou-se o ensaio de *Time Sweep*, utilizando a deformação determinada no ensaio anterior. Os resultados obtidos foram analisados pelo software Rheology Advantage®.

4.6.5. Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis

A seringabilidade das amostras foi quantificada em termos da massa residual de hidrogel retida na seringas após aplicação de uma força constante de 50N durante 5s. O teste de seringabilidade foi realizado usando um aparato desenvolvido (Fig. 19) conforme proposto por Alves e colaboradores [138]. Seringas descartáveis poliméricas de 1mL (Descarpack®) foram equipadas com agulha 21G1^{1/4} (30 x 0,8mm). A seringa foi suavemente preenchida com os hidrogéis para evitar a retenção de ar. A seringabilidade foi calculada de acordo com a seguinte equação (Equação 3).

$$\text{Seringabilidade (\%)} = \frac{\text{Massa expelida da seringa}}{\text{massa de amostra antes da injeção}} \times 100$$

Equação 3

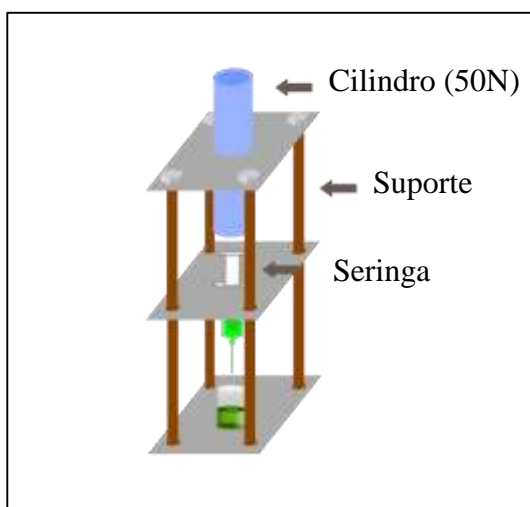


Figura 19. Representação esquemática do aparato para análise de seringabilidade.

4.6.6. Avaliação da injetabilidade

A injetabilidade das amostras foi quantificada em termos da força necessária para a injeção do material. Os testes de injetabilidade foram realizados à temperatura ambiente por um aparato (Fig. 20) acoplado à máquina de teste universal (EMIC DL 3000) no modo de compressão. Para este fim, os hidrogéis foram extrudados a partir de seringas descartáveis poliméricas de 1 mL, equipadas com agulha 21G1^{1/4}. O teste foi realizado em quintuplicata a uma velocidade de compressão de 1,0 mm.s⁻¹.

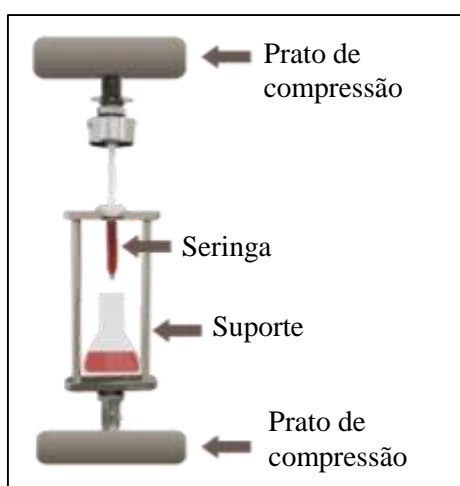


Figura 20. Representação esquemática do aparato para teste de injetabilidade.

4.6.7. Avaliação da capacidade de absorção de água

A determinação da quantidade de água incorporada nos hidrogéis foi medida de acordo com protocolo proposto anteriormente [139]. Para essa avaliação, os hidrogéis foram colocados em moldes circulares (diâmetro de 5mm) e incubados a 37°C por 10h. Em seguida, as amostras foram submetidas à liofilização a -80°C, durante 48h (Liotop, K105). As amostras liofilizadas tiveram sua massa medida (M_0). Em seguida, foram imersas em solução tampão PBS (pH=7,4) e mantidas a 37°C, em banho-maria. Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras foram retiradas da solução e gentilmente secas com um papel de filtro para remover a solução da superfície do material. Foi realizada uma nova medida de massa (M_f), e as amostras retornaram para solução tampão até que o equilíbrio fosse atingido. O grau de expansão foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$GE = \frac{M_f - M_0}{M_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: M_0 = massa inicial do hidrogel e M_f = massa do hidrogel no estado expandido de equilíbrio.

4.6.8. Ensaio de imersão em solução SBF

Os hidrogéis foram submetidos ao teste de imersão em fluido corporal simulado (SBF - *Simulated Body Fluid*) para verificar seu comportamento de perda de massa e bioatividade *in vitro*. A solução SBF simula a concentração de diferentes espécies iônicas encontradas no plasma do sangue humano e foi preparada conforme protocolo descrito por Kokubo e colaboradores [140]. Os reagentes, de grau analítico, utilizados no preparo da solução SBF foram NaCl (8,0350g), NaHCO₃ (0,3550g), KCl (0,2250g), K₂HPO₄.3H₂O (0,2310g), MgCl₂.6H₂O (0,3110g), CaCl₂ (0,2920g) e Na₂SO₄ (0,0720g), (Synth-Brasil), que foram dissolvidos em 1L de água destilada. A solução resultante foi tamponada com tampão TRIS (Trishidroximetilaminometano) e HCl 1M (Merck) para obtenção de pH 7,40 ± 0,05 à 37 ± 0,5°C.

As amostras liofilizadas (0,0200g), preparadas conforme descrito na seção anterior, foram submersas em 20 mL de solução SBF e mantidas em banho-maria à 37°C. Após intervalos

de tempo predeterminados (0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias), as amostras foram removidas da solução, secas (temperatura ambiente) e coletadas para análises posteriores.

Análise de perda de massa

O ensaio de degradação *in vitro* foi realizado para estudar a capacidade dos hidrogéis perderem massa quando expostos ao fluido corporal simulado (SBF). Para isso, a massa inicial das amostras secas, antes da imersão em SBF, foi medida e nomeada como M_0 . Ao final dos intervalos de tempo estabelecidos, a massa das amostras secas (M_f) foi medida e a taxa de degradação foi monitorada pela diferença entre a massa inicial (M_0) e a massa final (M_f) de cada amostra. A percentagem de massa restante (Mr) foi calculada pela equação 5:

$$\% \mathbf{Mr} = \frac{M_0 - M_f}{M_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Caracterização dos hidrogéis após imersão em SBF

As modificações estruturais na superfície dos hidrogéis após imersão em SBF foi monitorada por meio de MEV. Para isso, as amostras secas foram recobertas com filme de carbono e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 FEI (ThermoFisher Scientific, EUA), operando a 15 kV. A composição química foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), utilizando o equipamento Nicolet 6700 instrument (Thermo Scientific) no modo ATR (*attenuated total reflectance*). Além disso, foram verificados os padrões de cristalinidade das amostras por meio de ensaio de Difração de raios X (DRX). A análise foi conduzida no equipamento PW9710mpd (Philips) usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$) à 40kV e 30mA. A análise foi conduzida com 2θ variando de $3,00^\circ$ a $90,00^\circ$ com passo de $0,06^\circ$ e tempo de coleta de 1s.

Liberação de íons Si, Ca e P na solução de SBF

Após o término dos períodos de imersão (1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias), a solução de SBF foi analisada por Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O equipamento PerkinElmer Optima 7300 DV ICP-OES foi utilizado para determinação da concentração de íons silício, cálcio e fósforo. Cada teste foi repetido 3 vezes e os resultados expressos em termos do valor médio \pm desvio padrão.

4.6.9. Caracterização biológica *in vitro* dos hidrogéis

Preparo e esterilização das amostras

Para realização dos testes de citotoxicidade *in vitro*, os hidrogéis foram preparados sob condições estéreis, em fluxo laminar. Para isso, todas as matérias-primas foram previamente expostas à radiação de luz ultra violeta (UV) (254 nm Light Electronics) por 1h, a uma distância de 10 cm da fonte de radiação. As soluções precursoras foram preparadas utilizando água MiliQ estéril e misturadas, conforme descrito nas seções anteriores, para obtenção das formulações propostas. Os hidrogéis estéreis foram submetidos aos testes *in vitro*, conforme preparados.

Cultura de células

Cultura de células de osteosarcoma humano (SAOS, ATCC® HTB-85) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BC RJ, Brasil). Células embrionárias de rim humano (HEK293 T) foram gentilmente cedidas pela Profa. Maria de Fátima Leite do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium*) contendo solução 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina (10 mg.mL^{-1}), penicilina G de sódio ($10 \text{ unidades.mL}^{-1}$), e anfotericina-b (0.025 mg.mL^{-1}), todos fornecidos pela Gibco BRL (NY, USA), em estufa com 5% de CO_2 e 37°C . As células SAOS e HEK293 T foram utilizadas para os experimentos na passagem 48 e 55, respectivamente.

Teste de citotoxicidade *in vitro* por ensaio MTT

Os hidrogéis foram submetidos a um primeiro estágio de avaliação de citotoxicidade *in vitro* de acordo com a norma ISO 10993-5:1999 (*Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for in vitro cytotoxicity*). O procedimento geral para o teste é esquematizado na Figura 21. Para esses testes, os hidrogéis esterilizados foram colocados em placas de 24 poços, onde foram plaqueados com células SAOS e HEK293T (3×10^5 células/poço). Como grupos controle foram usadas as células em meio DMEM com 10% de SFB, controle positivo Triton X-100 (1%v/v em tampão fosfato salino) e como controle negativo lascas de eppendorf de polipropileno estéreis (0,1mg/mL). Após 72 h,

o meio foi aspirado e substituído por 210µl de meio de cultura com soro, em cada poço e as células foram fotografadas utilizando microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED, Alemanha). Foram adicionados a cada poço 170µL de reagente MTT (5 mg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubou-se durante 4h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, 170µl de solução de Isopropanol/4% de HCl foram colocadas em cada poço. Em seguida, 100µl foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância (Abs) em espectrofotômetro (I-Mark, Bio-Rad) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis de acordo com a equação 6.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância das células em contato com as amostras} \times 100}{\text{Absorbância (controle)}} \quad \text{Equação 6}$$

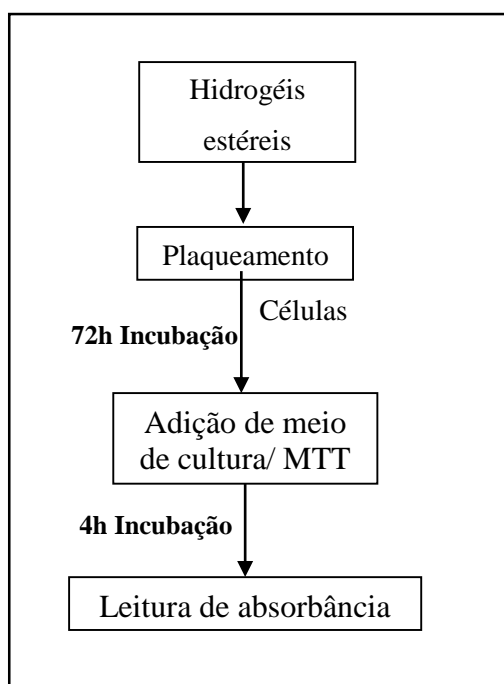


Figura 21. Diagrama esquemático do ensaio MTT.

Teste de viabilidade celular por imunofluorescência (Ensaio LIVE/DEAD®)

Células SAOS e HEK293 T foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 h e, após esse período, foram semeadas (3 x 10⁵ células/poço) sobre as amostras desenvolvidas em placas de 24 poços. Após 72h, o meio foi aspirado, as células lavadas 3 vezes com PBS (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e tratadas por 30 minutos com o kit LIVE/DEAD®

viability/cytotoxicity (Life Technologies do Brasil Ltda; São Paulo) de acordo com as especificações do fabricante. Imagens foram obtidas com microscópio invertido (Leica, modelo DMIL-LED, Germany) e fluorescência captada separadamente para calceína (530 ± 12.5 nm) e homodímero de etídio (645 ± 20 nm).

O programa *Prism software* (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística dos dados. A análise estatística foi realizada considerando como significância o $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como valores médios \pm os desvios padrão. Os experimentos foram realizados com $n=5$, utilizando o método ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni.

4.6.10. Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia *in vivo*

Teste de citotoxicidade in vivo

Os testes de citotoxicidade *in vivo* foram realizados no Laboratório de Sinalização de Cálcio do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Visto que os hidrogéis de quitosana já foram extensivamente avaliados em estudos anteriores [84,141], somente as formulações com adição de gelatina foram avaliadas neste estudo (90Q; 90Q/VB; 70Q e 70Q/VB). As amostras estéreis foram preparadas conforme descrito para os testes *in vitro*.

Injeção subcutânea

Camundongos Swiss machos (30-40g) foram utilizados nos experimentos. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais seguiram as orientações estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG; protocolo 169/2014). Os animais foram anestesiados utilizando uma mistura de ketamina/xilasina (10/5%) 30 minutos antes da injeção das amostras. Após remoção completa dos pelos do dorso dos animais, 200 μ l de cada gel foi inoculado subcutaneamente no dorso dos camundongos utilizando uma seringa de 1mL, acoplada com agulha de 22G. A massa dos animais foi registrada diariamente e a área ocupada pelo implante medida no primeiro e último dia do experimento. Após 7 dias, os animais foram

submetidos a eutanásia por overdose anestésica e tiveram o sangue e tecidos coletados para análise posterior.

Análise histológica

Para avaliar a reação inflamatória no local de injeção, os fragmentos de fígado e do tecido subcutâneo foram fixados com 10% de solução de formalina e incorporados em parafina. Os tecidos fixados foram seccionados (5µm) ao longo do eixo longitudinal do implante e depois corados com hematoxilina e eosina (Leica Biosystems). As imagens foram obtidas por microscopia de luz (Leica DM2500) acoplado com câmera CCD (Leica DFC345FX) e analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.5[®].

Avaliação do funcionamento hepático

Para avaliar a integridade das funções hepáticas frente aos hidrogéis injetados, foram realizados testes bioquímicos para quantificar as transaminases hepáticas (AST-aspartato aminotransferase e ALT-alanina aminotransferase). Para isso, o sangue coletado após 7 dias passou por um processo de centrifugação para separação do plasma. A atividade enzimática foi determinada usando teste comercial Kinect (Bioclin).

Análise da regeneração óssea in vivo

Animais e Procedimento Cirúrgico

A análise de regeneração óssea *in vivo* foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, os hidrogéis 90Q, 90Q/BG; 70Q e 70Q/BG foram testados em defeito ósseo por 7 dias. As amostras foram preparadas em fluxo estéril, conforme preparo para os testes *in vitro*. O procedimento cirúrgico foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, seguindo as diretrizes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG; protocolo 165/2014). Para a realização da cirurgia de perfuração da tíbia, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1mL/100g) e cloridrato de quetamina 10% (0,1mL/100g), sendo feita uma incisão na região anterior da pata esquerda, afastamento da musculatura, seguido pela

perfuração da tíbia com uma broca piloto de 1,6 mm, com irrigação constante (NaCl 0,9%). O defeito ósseo foi realizado no terço médio das tibias, ao longo do eixo látero-lateral, sendo perfuradas ambas as corticais. Nos grupos tratados com os biomateriais, o hidrogel foi injetado em quantidade suficiente para preencher o defeito, empregando-se seringa de 1mL acoplada a uma agulha de 21G^{1/4}. Em seguida, foi realizada a sutura da musculatura e da pele e, ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84mg/100g de peso corporal) e uma dose de flunixinina meglumina (0,22mg/100g de peso corporal), ambas via intramuscular. Após 7 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação e as tibias imersas em formalina neutra tamponada para análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT).

Na segunda etapa, o hidrogel 70Q/VB foi selecionado para ser submetido aos testes para avaliar a regeneração *in vivo* durante 30 dias. Para essa etapa, os hidrogéis foram preparados sob condições estéreis, em fluxo laminar, após esterilização das matérias-primas por exposição à oxido de etileno. O procedimento cirúrgico foi realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, seguindo as diretrizes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG; protocolo 165/2017). Para isso, foi realizada a tricotomia nos membros pélvicos direito e esquerdo, estendendo-se da região dorsal do sacro às articulações metatarso-falangeanas. Esse procedimento foi feito 24 horas antes da realização da cirurgia e com os animais anestesiados. Para a cirurgia foi realizada medicação pré-anestésica com injeção subcutânea de morfina (5mg/Kg). Foi feita antibióticoterapia profilática 30 minutos antes da cirurgia, com cefalotina (60mg/Kg) e 1mg/Kg de meloxicam, via intramuscular. Foi realizada a indução anestésica com inalação passiva de 4,0% de isoflurano e a manutenção por meio do fornecimento de 2,0% de isoflurano, em máscara facial (sistema semi-aberto). A antissepsia com clorexidina degermante 2% e clorexidina alcoólica 0,5% foi realizada nos membros pélvicos direito e esquerdo, estendendo-se da região dorsal do sacro às articulações metatarso-falangeanas. Após posicionamento dos panos de campo, foi realizada incisão cutânea de cerca de 1,5cm na face medial do terço proximal da tíbia. Após divulsão do tecido subcutâneo e fáscia muscular, os mesmos foram afastados para realização da falha óssea. Com auxílio de um perfurador pneumático, uma broca de 3mm e uma goiva foi realizada a falha na metáfise proximal da tíbia de 3 mm de largura por 6mm de comprimento. As tibias direita (tratado)

e esquerda (controle) do mesmo animal foram submetidas à cirurgia para produção de falha óssea metafisária. No grupo tratado, o hidrogel foi injetado em quantidade suficiente para preencher o defeito (0,08mL), empregando-se seringa de 1mL acoplada a uma agulha de 21 G^{1/4}. Nesses animais, o hidrogel foi injetado após a sutura da fáscia muscular com poliglecaprone 5-0, padrão simples contínuo. O tecido subcutâneo foi suturado da mesma forma que a fáscia muscular e a pele com náilon 6-0 padrão simples separado. Durante a recuperação anestésica, os animais foram mantidos em câmara oxigenada com aquecimento por bolsas de água quente e foi feito curativo sobre a ferida cirúrgica. Foi administrado morfina (5mg/kg) via subcutânea quatro horas após a primeira aplicação da mesma. A analgesia pós-operatória foi realizada durante três dias consecutivos com tramadol (5mg/kg, via subcutânea), a cada 12 horas. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e as tíbias com defeito foram preservadas em formaldeído e submetidas à análise por Micro-CT. Um resumo das etapas de realização do testes de regeneração *in vivo* pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos experimentais para ensaio de regeneração óssea *in vivo*.

Etapa dos testes		Grupos amostrais				
Etapa 1 (7 dias)	controle	100Q	90Q	90Q/VB	70Q	70Q/VB
Etapa 2 (30 dias)	controle			70Q/VB		

Avaliação por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Após a eutanásia, as tíbias com defeito foram submetidas à análise por Micro-CT a fim de avaliar o reparo ósseo na falha criada. Micro-CT de alta resolução (SkyScan 1174v2; Bruker micro-CT, Kontich, Bélgica) foi utilizado para a quantificação de parâmetros morfológicos específicos e aquisição de imagens tridimensionais do osso tratado. O escaneamento foi realizado com o auxílio de um filtro de alumínio de 1,0mm, utilizando-se a tensão de 50kV, corrente de 800µA e tamanho de pixel de 10 µm. As amostras foram colocadas em tubo de plástico de 5cm de diâmetro e rotacionadas 180° para aquisição de imagens a cada 0,7°. Os softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vox,

fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo, foram utilizados para as análises morfométricas. Os seguintes parâmetros morfológicos foram avaliados [142]:

- Porcentagem de tecido ósseo (BV/TV; %): razão do volume de tecido mineralizado pelo total de volume analisado;
- Espessura trabecular (Tb.Th; mm): espessura média das trabéculas;
- Número de trabéculas (Tb.N; 1/mm); número de placas por unidade de comprimento;
- Separação Trabecular (Tb.Sp; mm): espessura média das cavidades com medula óssea.
- Densidade mineral óssea (BMD; g/cm³): densidade volumétrica de cálcio hidroxapatita (Ca-HA) no tecido biológico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das matérias-primas

A etapa de caracterização dos materiais de partida usados na produção dos hidrogéis é de extrema importância, já que as macromoléculas (quitosana e gelatina) são derivadas de fontes naturais e podem apresentar diferentes propriedades de acordo com fonte e lote do produto. Também foi realizada a caracterização das partículas de vidro bioativo sintetizadas pelo método sol-gel.

5.1.1. Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

Na Figura 22 são apresentados os espectros FTIR das matérias-primas e as principais bandas vibracionais encontram-se listadas na Tabela 3. Nos espectros de absorção da quitosana e da gelatina (Fig. 22a) é possível notar a presença de algumas bandas características comuns às duas biomoléculas, como no caso das grupos amida. A banda de amida I (que compreende o intervalo de 1700 a 1620 cm^{-1}) é associada à vibração de estiramento do grupo carbonila ($\text{C} = \text{O}$). A banda de amida II está relacionada à deformação da ligação N-H e à vibração de estiramento no grupo C-N (1580 cm^{-1} -1510 cm^{-1}) [143,144]. A banda relacionada à amida III é, predominantemente, relacionada ao estiramento C-N e é encontrada na região de 1380-1350 cm^{-1} do espectro de quitosana [145] e na região de 1260-1220 cm^{-1} do espectro de gelatina [143]. Os espectros FTIR dos biopolímeros ainda exibem bandas características adicionais, tais como uma banda larga que varia de 3600 a 3200 cm^{-1} , que está associada com grupos hidroxila (OH) das ligações C-OH e às moléculas de água fisicamente adsorvidas. Sobrepondo à essa banda, encontram-se a banda de estiramento N-H (3360-3320 cm^{-1}) e as vibrações de estiramento C-H provenientes das ligações CH, CH₂ e CH₃ (2990-2930 cm^{-1}) [144,146].

O espectro da quitosana exhibe ainda bandas com máximo em 1070 e 1030 cm^{-1} , que são relacionadas ao estiramento C-O do anel na estrutura polissacarídica [147]. Os picos com máximo em 1151 e 896 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-O-C (estrutura sacarídea - β -1-4).

No espectro de gelatina, a banda relacionada à flexão das ligações C-H está presente no intervalo de 1450 a 1400 cm^{-1} [148]. As bandas na região de 1500-1200 cm^{-1} são atribuídas à deformação do grupo CH_2 [143].

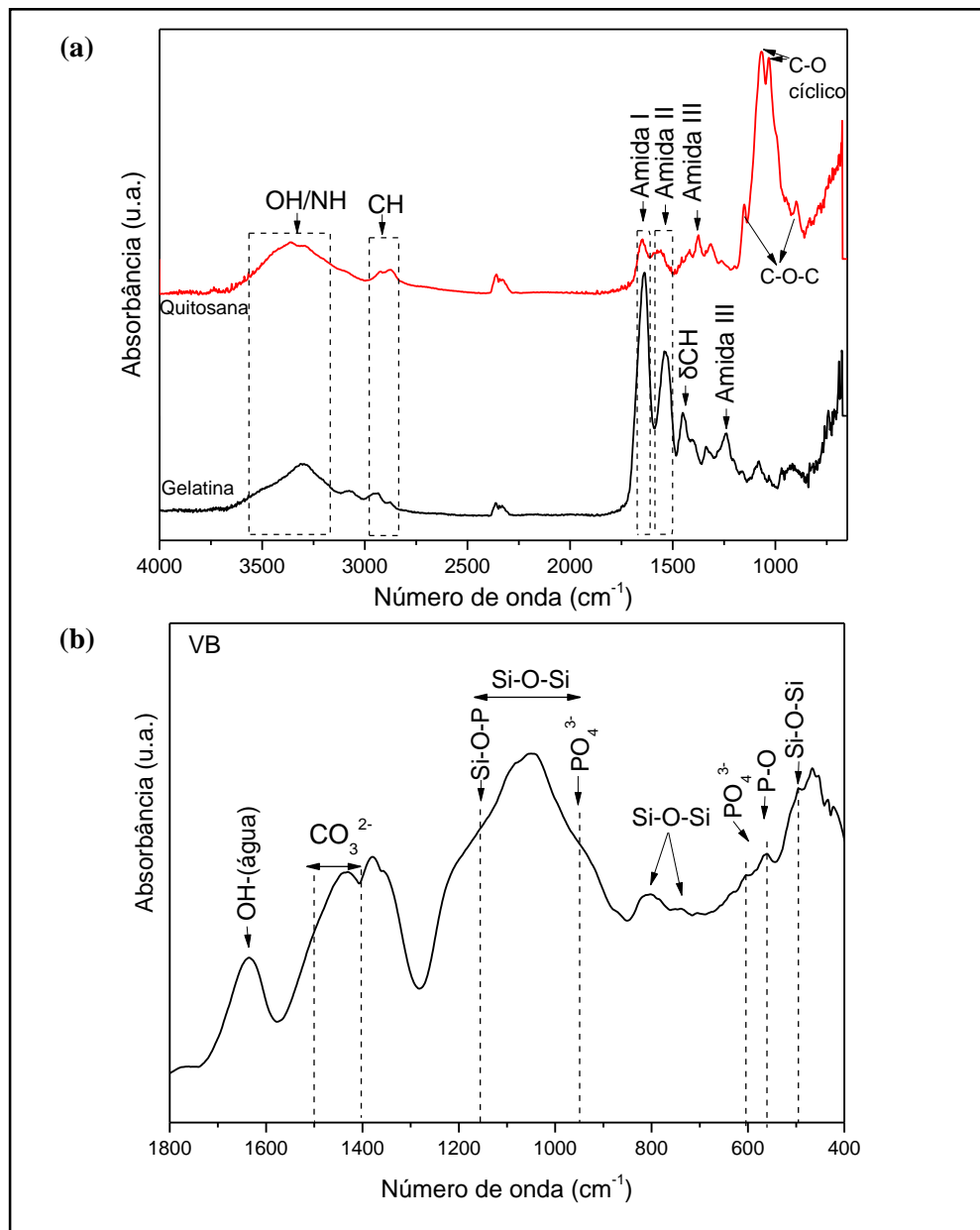


Figura 22. Espectro FTIR: (a) quitosana/gelatina e (b) vidro bioativo, utilizados na produção dos hidrogéis.

O espectro FTIR das nanopartículas (Fig. 22b) apresenta duas bandas amplas com máximo em 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , que são comumente associadas a adsorção de água e carbonato, respectivamente, na superfície do material [149,150]. Na faixa entre 1200 e 1000 cm^{-1} é encontrada a banda relacionada ao estiramento assimétrico de grupos Si-O-

Si [123]. Sobrepondo a essa banda, encontram-se as bandas relacionadas às vibrações de estiramento Si-O-P ($1175-1170\text{ cm}^{-1}$) e a banda associada ao estiramento simétrico P-O do grupo PO_4^{3-} em $1100-950\text{ cm}^{-1}$ [150]. Os estiramentos simétrico e assimétrico no grupo Si-O-Si podem ser vistos nas bandas ($820-800\text{ cm}^{-1}$) e ($760-730\text{ cm}^{-1}$), respectivamente [149,150]. As vibrações associadas ao dobramento da ligação P-O podem ser vistas na faixa de $610-600\text{ cm}^{-1}$ nos grupos PO_4^{3-} cristalino e em $500-480\text{ cm}^{-1}$ na estrutura amorfa [151]. Por fim, observa-se o aparecimento da banda localizada entre 500 e 480 cm^{-1} , que remete ao dobramento no grupo Si-O-Si [129].

Tabela 3. Principais bandas vibracionais associadas à quitosana, gelatina e vidro bioativo.

Material	Número de onda (cm^{-1})	Grupo químico associado	Referência
Q, GE	3570–3200	Estiramento -OH/N-H ₂ N-H	[144,152]
Q, GE	2955–2845	Estiramento -CH ₂ /-CH ₃	[144,152,153]
Q, GE	1700-1620	Amida I: estiramento C=O	[143,152]
Q, GE	1580-1510	Amida II: deformação N-H/ estiramento C-N	[143,144]
Q	1380-1350	Amida III (estiramento C-N)	[145,147]
GE	1450-1400	Deformação C-H	[148]
GE	1260-1220	Amida III (estiramento C-N)	[143,154]
Q	1100-1020	Estiramento C-O (cíclico)	[147]
Q	1151, 896	Estiramento COC (estrutura sacarídea β -1-4)	[152]
VB	1650-1610	Deformação OH (água adsorvida)	[48,51]
VB	1500-1400	Estiramento CO_3^{2-}	[150]
VB	1200-1000	Estiramento assimétrico Si-O-Si	[123]
VB	1100-950	Estiramento assimétrico P-O (PO_4^{3-})	[34,48]
VB	820-800	Estiramento simétrico Si-O-Si	[149,155]
VB	760-730	Estiramento assimétrico Si-O-Si	[48,53]
VB	610-600	Deformação P-O (PO_4^{3-})	[149,150]
VB	550-560	Deformação P-O (amorfo)	[151]
VB	480-500	Deformação Si-O-Si	[129,151]

5.1.2. Análise por Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 23 são mostrados os difratogramas obtidos a partir dos pós da quitosana, gelatina e das nanopartículas de vidro bioativo. Nota-se que o perfil dos difratogramas é típico de materiais predominantemente amorfos, sem o aparecimento de picos de difração bem definidos. O difratograma da quitosana comercial apresenta dois halos característicos, com 2θ máximo em $19,9^\circ$ e 10° . Esse resultado está em concordância com o padrão de difração descrito na literatura [156,157]. O primeiro halo pode ser associado com aos grupos N-acetil-D-glicosamina e o segundo halo aos grupos N-glicosamina das cadeias poliméricas e são indexados como planos [020] e [110], respectivamente [158].

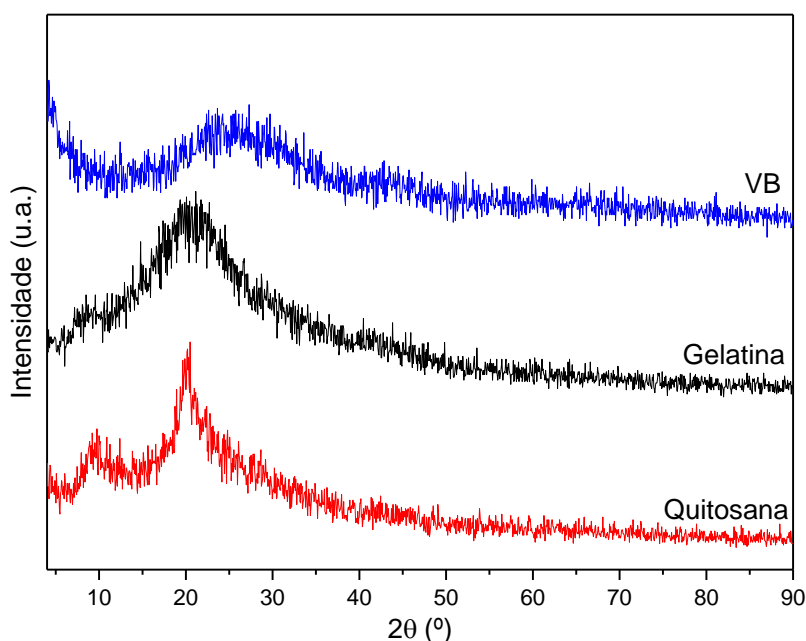


Figura 23. Padrões de DRX das matérias-primas.

O padrão de difração da gelatina mostra um halo entre 14 e 27° , característico da estrutura cristalina da tríplice hélice remanescente da estrutura do colágeno [159]. O difratograma das nanopartículas de vidro bioativo também são caracterizados por um halo, com 2θ na faixa $16-35^\circ$, que corresponde à sílica amorfa [160]. A ausência de picos de difração indicam que a temperatura de tratamento térmico empregada (450°C) na síntese não provocou cristalização do material. O tratamento térmico realizado em temperaturas entre $300-700^\circ\text{C}$ tem sido empregado na síntese de nanopartículas de vidro bioativo, a fim de

evitar sinterização do material. Dessa forma, são produzidos materiais predominantemente amorfos, que são preferidos para utilização biomédica por apresentarem maior bioatividade quando comparado com materiais cristalinos [123,161].

5.1.3. Avaliação do comportamento térmico:

Os métodos de análise térmica, tais como a Termogravimetria (TG) são técnicas muito utilizadas na caracterização de materiais, pois produzem curvas únicas para uma composição específica da substância [135]. A Fig. 24 (a) mostra a curva TG, juntamente com a curva diferencial (DTG- *differential thermogravimetric analysis*) da quitosana comercial utilizada no presente trabalho. Observam-se dois eventos térmicos, com perda de massa, que correspondem à desidratação e decomposição do material, respectivamente. O primeiro evento pode ser observado na faixa de 25-110°C (com máximo em 54°C), onde ocorre a evaporação de água fisicamente adsorvida pelo biopolímero. Nesta etapa, ocorre uma perda de 10% da massa inicial da quitosana. O segundo evento aparece na faixa entre 270-350°C (com máximo em 325°C), durante o qual é observado uma perda de aproximadamente 67% de massa, gerando um resíduo carbonizado no final da análise. Esses eventos também foram observados por Neto e colaboradores [135], que estudaram os eventos térmicos de compostos a base de quitosana. Eles atribuem o segundo evento à decomposição térmica e oxidativa da quitosana e à eliminação de produtos voláteis. Nessa faixa de temperatura também pode ocorrer a despolimerização das cadeias da quitosana, decomposição dos anéis pirrólicos por meio da desidratação, desaminação e, finalmente, a reação de abertura do anel [162]. Na Tabela 4 é apresentado um resumo dos resultados obtidos nas análises de TG das matérias-primas.

As curvas TG/DTG da gelatina Tipo A (Fig. 24b) apresentam dois eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorre no intervalo entre 30 e 80°C (com máximo em 54°C), onde há uma perda de aproximadamente 7,3% de massa, correspondente à perda de água do biopolímero. O segundo evento, que ocorre na faixa de 260-340°C é associado à degradação térmica da proteína, com a desintegração das cadeias laterais, onde cerca de 52,5% de sua massa é degradada [163].

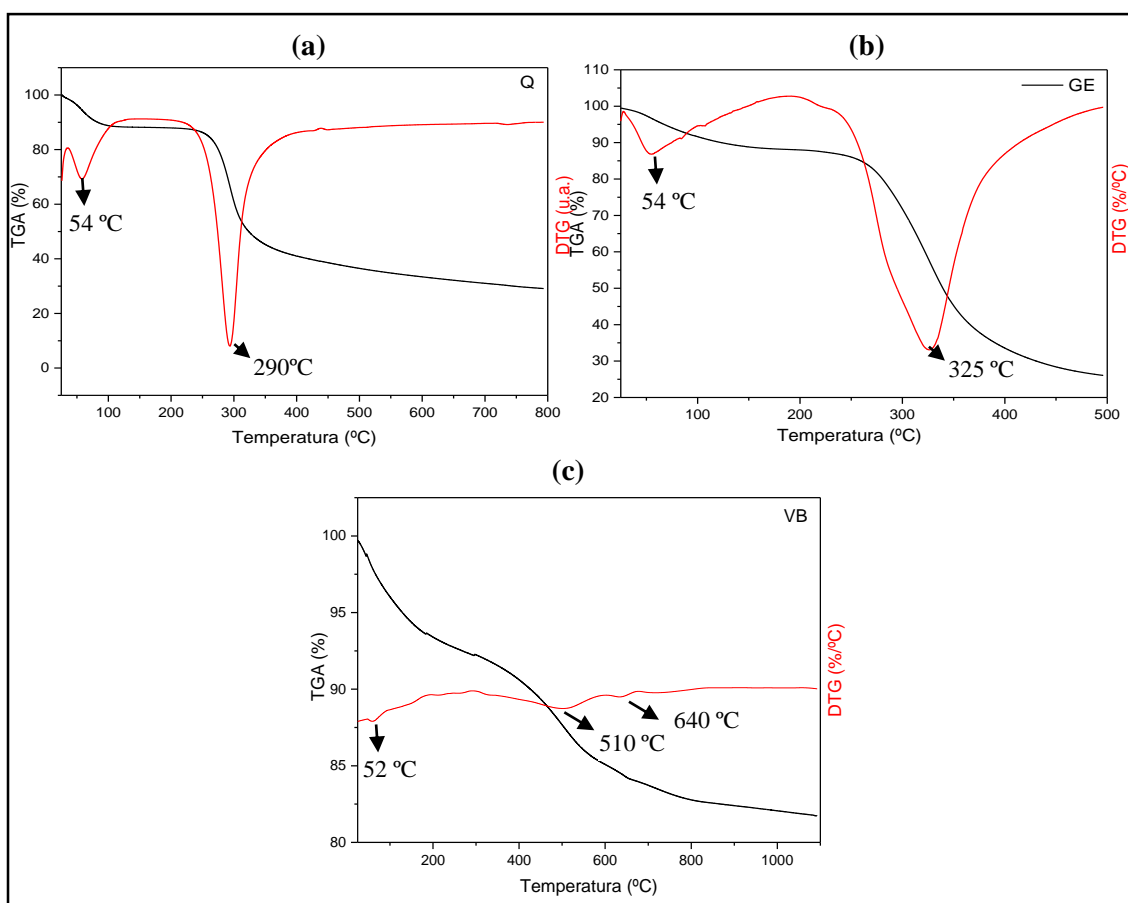


Figura 24. Curvas TGA/DTG das matérias-primas: (a) quitosana; (b) gelatina; (c) vidro bioativo.

Na Figura 24 (c) são apresentadas as curvas TG/DTG do vidro bioativo. Apesar de não estarem bem definidos, foi possível a identificação de alguns picos característicos do material cerâmico. O pico centrado em aproximadamente 52°C corresponde à perda de água adsorvida nos poros das nanopartículas, onde há perda de aproximadamente 7% da massa da amostra. O segundo evento térmico ocorre entre 310 e 550°C (com máximo em 510°C) e pode ser associado à perda de água quimicamente adsorvida ou à remoção de grupos orgânicos remanescentes dos precursores da síntese [164]. O aparecimento de um pico com máximo em 640°C pode ser relacionada à eliminação de nitrato residual ou ao processo de cristalização do vidro bioativo. Alguns autores atribuem o processo de cristalização aos picos com início em aproximadamente 650 e máximo entre 850-890°C [129]. Essas informações são relevantes para avaliar, por exemplo, a temperatura de tratamento térmico das nanopartículas produzidas. Essa temperatura deve ser suficiente

para permitir a eliminação de nitrato remanescente da síntese, mas idealmente não pode ultrapassar valores que provoquem a cristalização da estrutura. A formação de fase cristalina é tida como um dos fatores que podem diminuir a bioatividade do vidro bioativo, uma vez que as reações que ocorrem naturalmente no meio fisiológico, com troca de íons seriam dificultadas [165].

Tabela 4. Resultados de TGA para a decomposição térmica das matérias-primas.

Material	TGA/DTG		
	Evento térmico	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Quitosana	$QUI.nH_2O \rightarrow QUI + nH_2O$	25-110	10
	$QUI \rightarrow RC^*$	270-318	67
Gelatina	$GE \rightarrow GE + nH_2O$	30-80	7,3
	$GEL \rightarrow RC^*$	260-340	52,5
Vidro bioativo	$nBG \rightarrow nBG + nH_2O_{(adsorvida)}$	45-150	7,2
	$nBG \rightarrow nBG + nH_2O$ ou	310-550	12,3
	$nBG \rightarrow nBG + RP^{**}$		
	$nBG \rightarrow nBG + NO_3^-$	620-700	16,3

* RC= Resíduo carbonizado; ** RP: resíduo de precursores da síntese

5.1.4. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação é um dos parâmetros mais importantes na caracterização da quitosana porque interfere diretamente em suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Na literatura são descritos vários métodos para a determinação desse parâmetro. Entre eles são citados: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho, análise elementar, espectroscopia UV-VIS e titulação potenciométrica. Estudos [166] mostram que o mais preciso e robusto deles é o RMN. Porém, devido à falta de disponibilidade do equipamento em muitos laboratórios se torna necessário recorrer a métodos mais simples, mas com precisão semelhante a essa técnica. Os autores

acrescentam que a titulação potenciométrica tem sido muito utilizada devido a sua confiabilidade, rapidez e baixo custo de análise. Desde que sejam empregados os protocolos corretos e soluções padrão na análise, os resultados ficam próximos aos obtidos pelo método de referência ^1H RMN, com pequeno desvio padrão. Diante disso, o método de análise escolhido para determinação do grau de desacetilação da quitosana foi a titulação potenciométrica.

Na Figura 25 é apresentada a curva de titulação potenciométrica obtida a partir da solução de quitosana (2% m/v). A curva apresenta dois pontos de inflexão, os quais são melhor visualizados na curva da derivada primeira. O primeiro máximo (12,97mL) corresponde à neutralização do excesso de HCl e o segundo (21,42mL) à quantidade de NaOH necessária para reagir com os íons H^+ dos grupos amino.

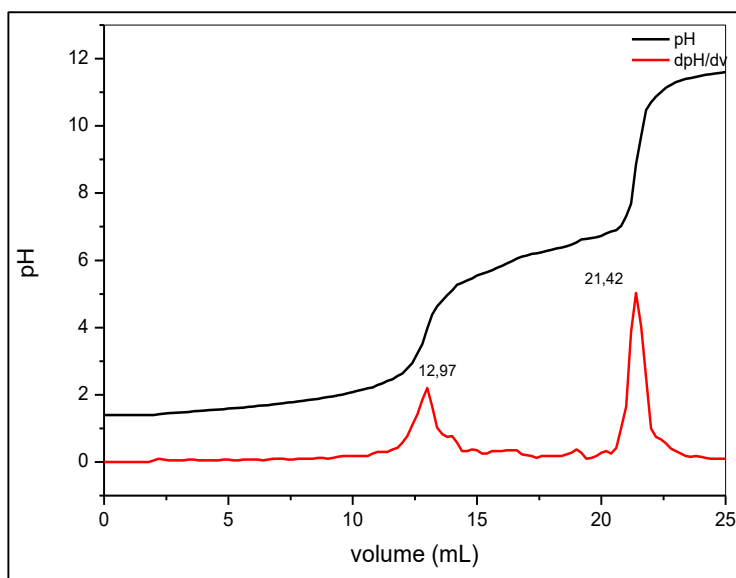


Figura 25. Curva de titulação potenciométrica da quitosana.

Por meio do valor de NaOH gasto no segundo ponto de inflexão é possível inferir o número de mols do mero acetilado (n_2 na Equação 7). Dessa forma, obteve-se um valor $75,2 \pm 0,6 \%$ para o grau de desacetilação da quitosana, condizente com as especificações do fabricante ($>75\%$).

5.1.5. Análise estrutural das nanopartículas de vidro bioativo

Nanopartículas de VB com uma composição nominal 60% de SiO₂, 36% de CaO e 4% de P₂O₅ (%.molar) foram produzidas pela rota sol-gel. Também conhecido como 58S, VB com esta composição é relatado em vários estudos como um excelente candidato a ser aplicado na engenharia de tecidos, principalmente devido ao seu alto índice de bioatividade [123,167]. Além da composição, o tamanho das partículas também é retratado na literatura como um aspecto relevante para sua bioatividade. As partículas de VB em nanoescala apresentam melhor bioatividade em termos de formação de camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) e crescimento celular [168]. Portanto, como as propriedades mecânicas e biológicas do VB são intrinsecamente dependentes da composição e estrutura, é crucial caracterizar as partículas produzidas. As principais características das nanopartículas sintetizadas estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo.

Parâmetro	Método de Caracterização	Resultado
Composição (% molar)	ICP-OES	SiO ₂ : 59.2
		CaO: 36.7
		P ₂ O ₅ : 4.0
Diâmetro de partícula (valor médio)	MFA	52 nm
	DLS	64 nm
Diâmetro de poros	BET	19.5 nm
Área superficial	BET	107 m ² .g ⁻¹

A morfologia das nanopartículas de VB foi investigada por MEV acoplado à análise EDS. Uma imagem representativa de MEV é mostrada na Fig. 26a, onde podem ser observados alguns aglomerados de partículas de forma esférica. A presença de Si, Ca e P na estrutura foi observada por análise EDS (Fig. 26b).

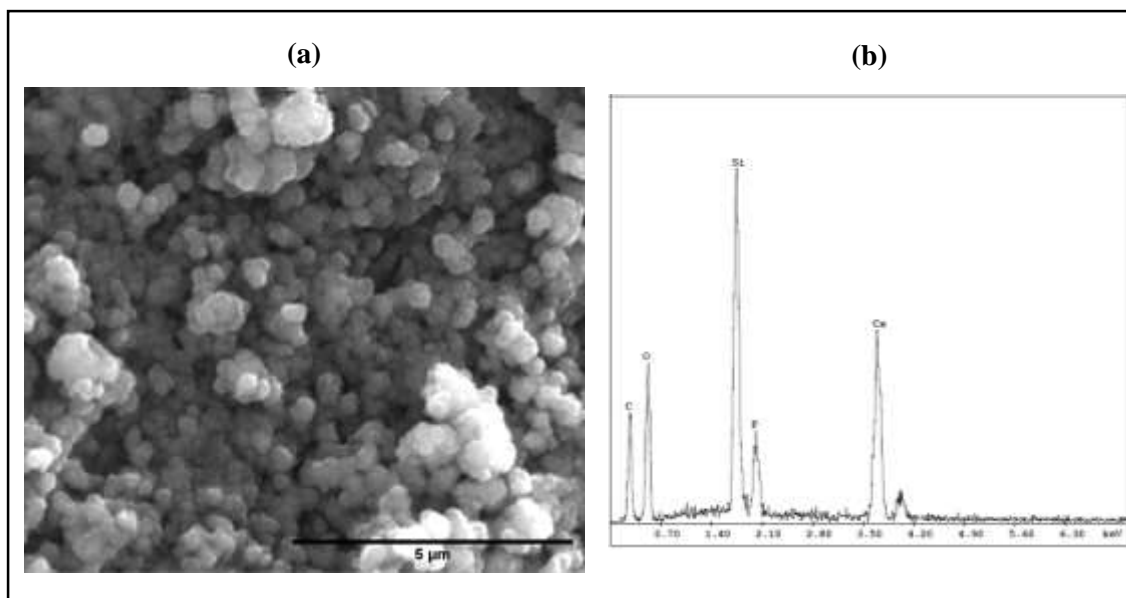


Figura 26. Caracterização estrutural das nanopartículas de BG: (a) imagens MEV (30.000x); (b) análise EDS.

A topografia e a morfologia das nanopartículas também foram analisadas por meio de Microscopia de Força Atômica (MFA). A forma esférica e a nanoescala das partículas foram confirmadas pelas imagens de MFA (Fig. 27). O diâmetro das partículas medido pela técnica se encontra na faixa de 15-75 nm, com um valor médio de 52 nm.

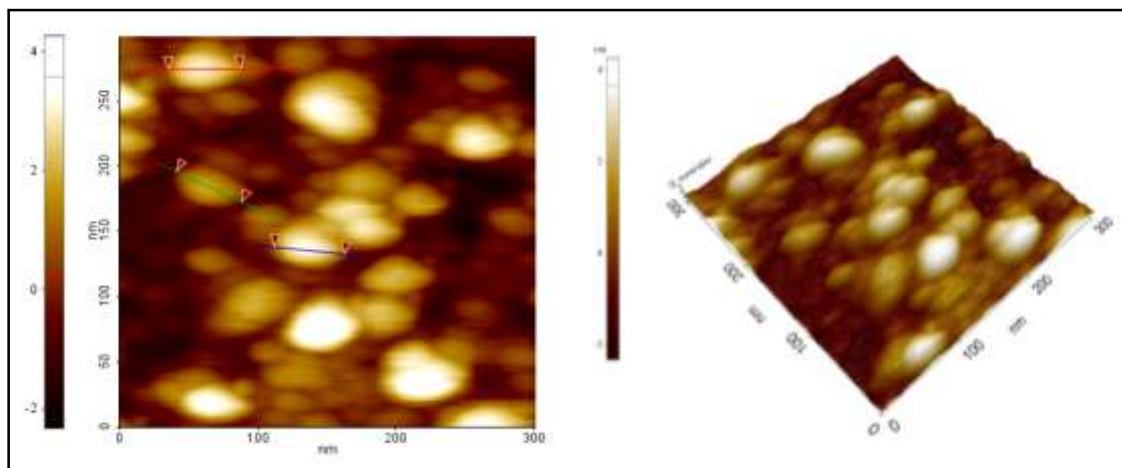


Figura 27. Caracterização estrutural das nanopartículas de BG: topografia por MFA.

A composição das nanopartículas foi confirmada por método de fusão com metaborato de lítio seguida de análise por ICP-OES. Observou-se que a composição determinada pelo IPC-OES (Tabela 5) foi próxima da composição teórica.

As características dos poros das nanopartículas foram investigadas a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio pelo ensaio Brunauer-Emmett-Teller (BET). Na Fig. 28 são mostradas as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ e a distribuição de tamanho de poro correspondente (gráfico inserido) das nanopartículas produzidas. A isoterma pode ser identificada como tipo IV, que é característica de materiais mesoporosos (2-50 nm) [123,161]. A área superficial específica e o diâmetro de poros obtidos pelo método BJH foram 107 m².g⁻¹ e 19,5 nm, respectivamente.

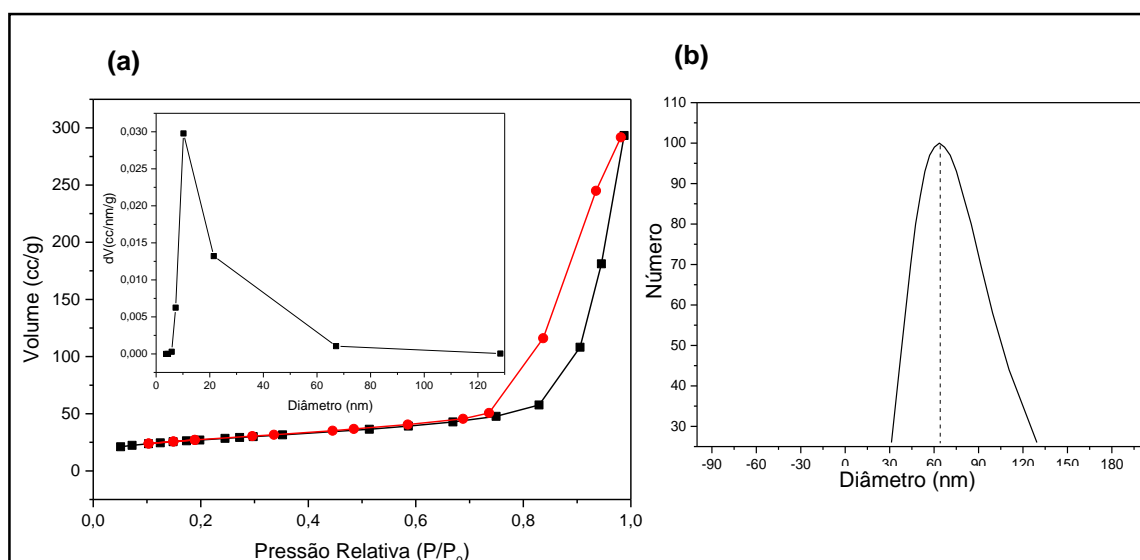


Figura 28. Isotermas de sorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poro de nanopartículas por BET (a) e distribuição de diâmetro por análise DLS (b).

A distribuição do tamanho de partícula de VB presente em uma suspensão foi obtida por análise DLS (Fig. 28b). A análise cumulativa mostra um diâmetro médio de partículas de $63,6 \pm 26,3$ nm e um índice de polidispersidade (PDI) de 0,23, o que indica uma distribuição homogênea dos tamanhos de partícula. Esses resultados confirmam que a síntese via sol-gel produziu partículas com composição similar à teórica, além de resultar em partículas esféricas e com escala nanométrica. O tamanho reduzido e formato esférico das partículas de VB preparadas são pontos importantes no desenvolvimento dos hidrogéis, pois permite uma injeção mais suave através de uma agulha e seringa.

5.2. Caracterização dos hidrogéis termossensíveis

5.2.1. Análise qualitativa do comportamento termorresponsivo dos hidrogéis

As formulações propostas foram preparadas em meio aquoso e sem a utilização de agentes de reticulação. Na Fig. 29 pode ser visto o comportamento dos hidrogéis sob diferentes temperaturas. As fotografias mostram o comportamento termorresponsivo das amostras, que permaneceram fluidas à temperatura ambiente e gelificaram à temperatura fisiológica ($36,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

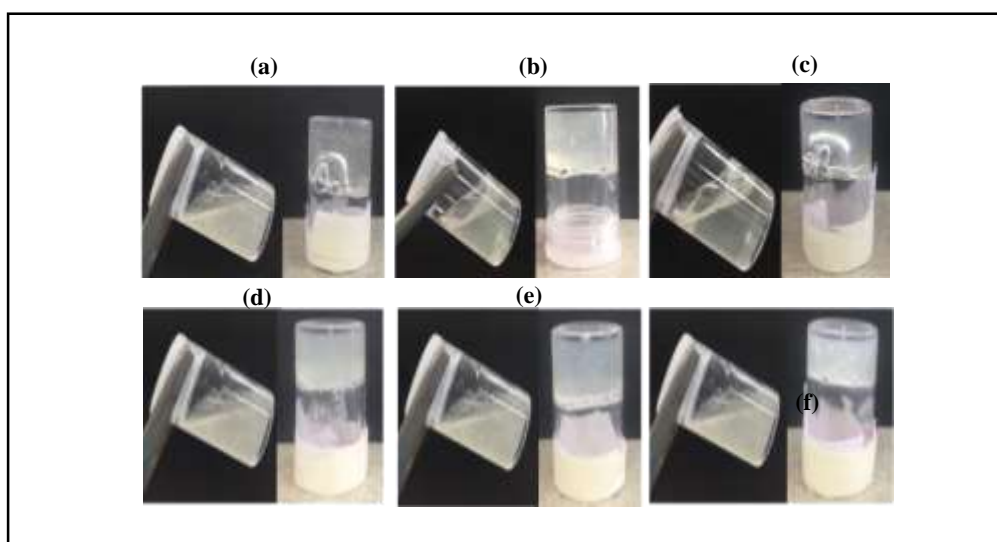


Figura 29. Fotografias dos hidrogéis produzidos à temperatura ambiente e à $37 \text{ }^\circ\text{C}$: (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.

O mecanismo de gelificação na temperatura corpórea é atribuído principalmente à adição do sal β -glicerofosfato (β -GP) e envolve várias interações entre os materiais de partida e a água. Embora o mecanismo preciso de gelificação ainda não tenha sido completamente elucidado, alguns autores propuseram interações entre Quitosana e β -GP em hidrogéis termosensíveis de quitosana [52,53,137]. Um ponto que é bem estabelecido e aceito na literatura é o efeito do sal β -GP nas soluções de quitosana à temperatura ambiente. É de conhecimento que, em uma solução ácida diluída ($\text{pH} < 6,0$), os grupos amino (NH_3) da quitosana se encontram protonados (NH_3^+). Isso explica a solubilidade do polissacarídeo em soluções ácidas, uma vez que suas cadeias sofrem forças de repulsão devido as cargas

geradas na protonação e permanecem em solução. Uma forma de aumentar o pH da solução até o valor de pH nas condições fisiológicas (pH=7,4) sem provocar a precipitação do polímero é por meio da adição do β -GP, um sal de caracter alcalino (pKa 6.7 a 25°C) [137]. Os grupos fosfato do β -GP podem interagir com os grupos amino protonados de quitosana (Fig. 30) permitindo que o sistema permaneça no estado sol à temperatura ambiente.

No presente estudo, moléculas de gelatina e nanopartículas de vidro bioativo foram adicionadas aos hidrogéis com o intuito de aumentar as interações intermoleculares e melhorar as características mecânicas e reológicas do hidrogel. A cadeia carbônica da gelatina possui grupos carboxila e amino livres, o que permite interações eletrostáticas com as cadeias de quitosana, além da formação de ligações de hidrogênio [144]. Para investigar as possíveis interações envolvidas no mecanismo de gelificação desses sistemas, os hidrogéis foram analisados por meio de medidas de potencial zeta e espectroscopia FTIR.

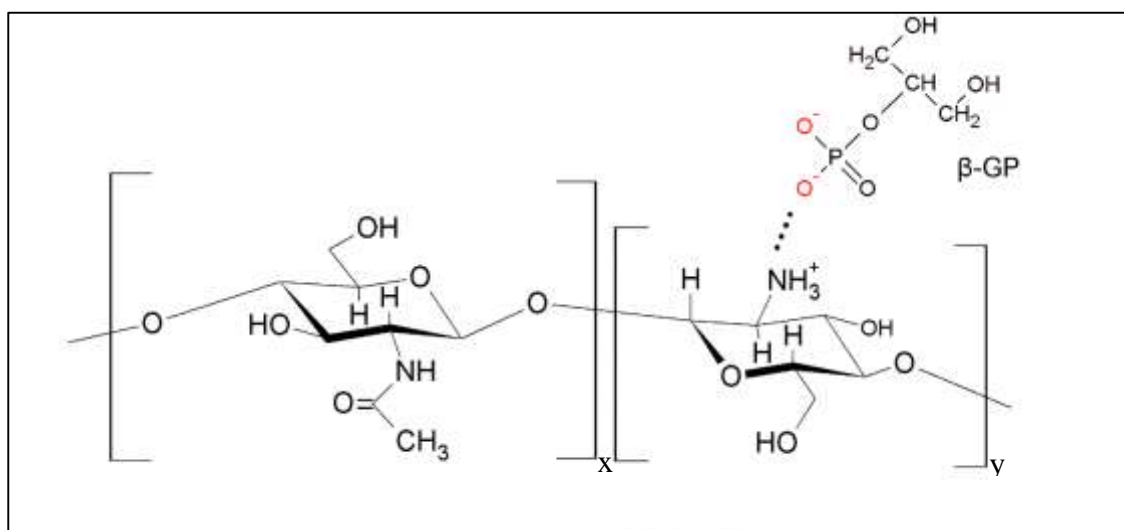


Figura 30. Representação esquemática das possíveis interações entre Q/ β -GP à temperatura ambiente.

5.2.2. Análise de Potencial Zeta

O potencial zeta (ζ) das matérias-primas e dos hidrogéis foram medidos para investigar as possíveis interações eletrostáticas entre os componentes dos hidrogéis compósitos. As soluções de partida utilizadas no preparo dos hidrogéis foram diluídas 30x e submetidas

a medição de pH e potencial zeta a 25 e 37°C. Na Tabela 6 são mostrados os valores obtidos para as matérias-primas e hidrogéis em ambas as temperaturas. As medições de potencial zeta são baseadas na mobilidade eletroforética das espécies em solução e fornecem uma medida indireta da densidade de carga superficial tornando-se, portanto, uma ferramenta muito útil para prever a estabilidade de uma suspensão e a interação entre partículas [169].

Tabela 6. Valores de Potencial Zeta das matérias-primas e dos hidrogéis produzidos.

Solução/Dispersão	pH	Potencial Zeta (ζ , mV)	
		25 °C	37 °C
Quitosana	6,1 \pm 0,1	+49,4 \pm 1,8	+52,4 \pm 2,2
Gelatina	5,6 \pm 0,1	+7,2 \pm 1,0	+6,7 \pm 4,4
β -GP	8,4 \pm 0,1	-24,0 \pm 3,0	-35,8 \pm 9,5
VB	8,1 \pm 0,1	-5,8 \pm 3,1	-12,6 \pm 2,6
100Q	7,2 \pm 0,1	+7,5 \pm 4,1	+3,8 \pm 2,5
100Q/BG	7,2 \pm 0,1	+9,1 \pm 3,2	+6,2 \pm 2,8
90Q	7,2 \pm 0,1	+9,6 \pm 5,1	+6,9 \pm 3,2
90Q/VB	7,2 \pm 0,1	+10,3 \pm 5,3	+6,2 \pm 3,1
70Q	7,2 \pm 0,1	+10,4 \pm 3,6	+4,6 \pm 1,8
70Q/VB	7,2 \pm 0,1	+7,7 \pm 3,8	+3,1 \pm 1,4

Analisando os valores de ζ obtidos para as soluções de partida (25 e 37 °C), observa-se que a quitosana e gelatina apresentam valores positivos, enquanto o sal β -GP e as partículas de vidro bioativo apresentam valores negativos. Os valores medidos para a solução de quitosana variaram entre +49,4 \pm 1,8 mV (25 °C) a +52,4 \pm 2,2 mV (37 °C). Esses valores são comumente atribuídos a presença dos grupos amino que, em solução ácida, se encontram protonados, na forma de NH_3^+ . A solução de gelatina utilizada na produção dos hidrogéis apresentou ζ na faixa de +6,7 \pm 4,4 mV a +7,2 \pm 1,0 mV, valores medidos em solução com pH = 5,6. Dados da literatura apontam que a gelatina tipo A apresenta ponto isoelétrico (PI) na faixa de pH entre 8,0 e 9,0 [170]. Abaixo do PI, as cadeias laterais de aminoácidos da gelatina encontram-se protonadas, resultando em uma medição de potencial elétrico positivo [171]. A solução de β -GP apresentou ζ entre -24,0 \pm 3,0 mV e -35,8 \pm 9,5 mV, valor que pode ser atribuído aos grupos fosfato (PO_4^{3-}) do sal. Por sua vez, a suspensão com as nanopartículas de vidro bioativo apresentaram ζ na faixa de -5,8 \pm 3,1 mV a -12,6 \pm 2,6 mV. Esses resultados mostram que as nanopartículas

encontram-se predominantemente carregadas com carga negativa, uma vez que os grupos silanol encontram-se desprotonados (Si-O^-) nas condições de pH e temperatura medidos. Na Figura 31 são ilustrados os principais grupos nas estruturas das matérias-primas responsáveis pelos valores de potencial zeta obtidos.

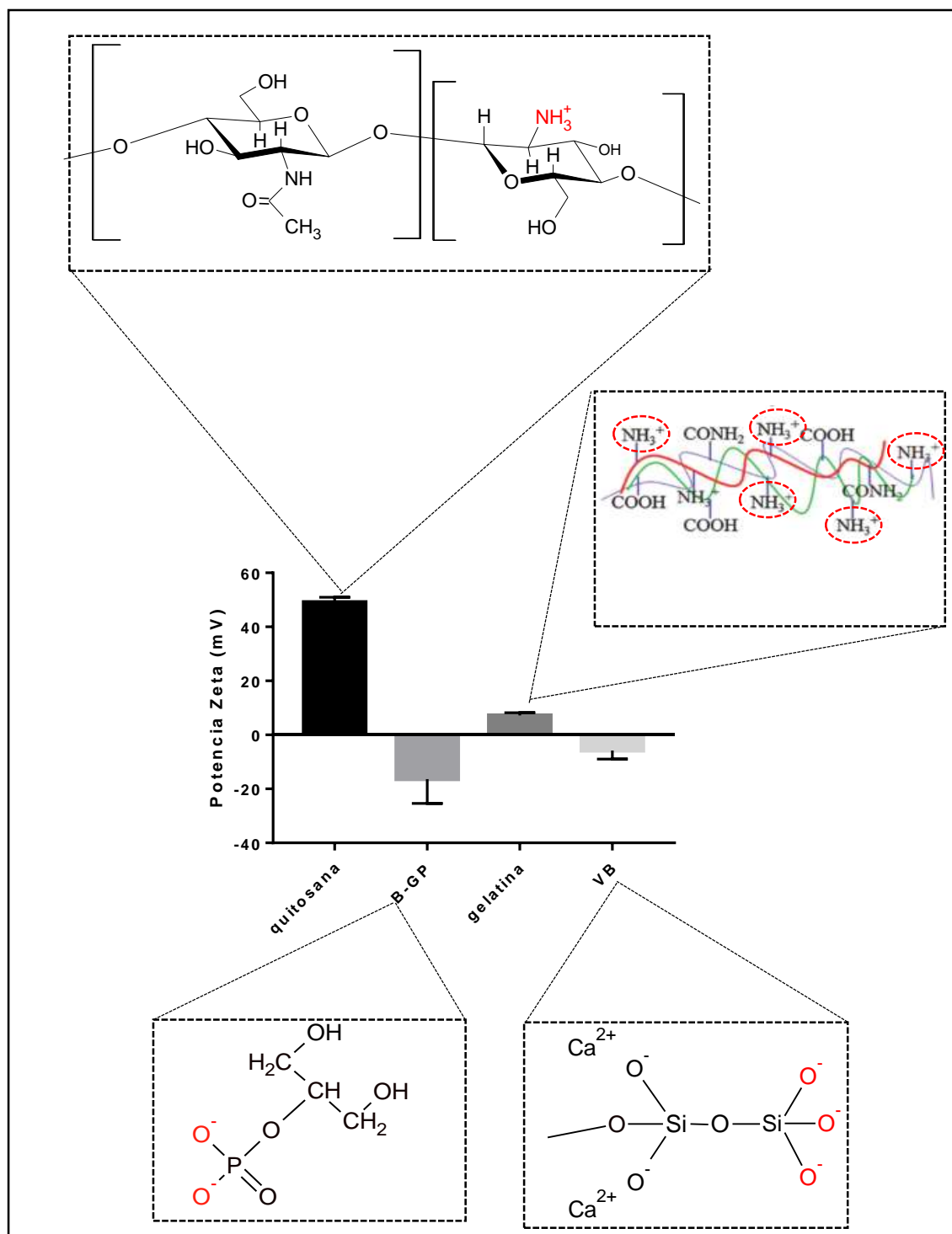


Figura 31. Representação esquemática dos grupos responsáveis pela medição de potencial zeta.

Examinando o potencial zeta para os hidrogéis a 37 °C (Tabela 6), nota-se que os valores se encontram na faixa de $+3,1 \pm 1,4$ mV a $+6,9 \pm 3,2$ mV, mostrando uma diminuição significativa em relação à solução de quitosana pura. Também foram realizadas medidas ζ nos hidrogéis a 25 °C a fim de verificar as mudanças de carga superficial envolvidas no processo de gelificação. Os valores de ζ a 25 °C foram superiores aos obtidos a 37 °C, variando de $+7,5 \pm 4,1$ mV a $+10,4 \pm 3,6$ mV. Esse comportamento é consistente com os resultados encontrados por Lavertu et al. [172] que mostraram uma diminuição na ionização da quitosana após o aquecimento em sistemas quitosana/ β -GP. Desta forma, a densidade de carga superficial da quitosana diminui quando os hidrogéis são aquecidos, resultando em uma redução das forças de repulsão entre as cadeias que se aglomeram para formar a estrutura tridimensional dos hidrogéis. Além disso, os autores ainda mostraram que o aquecimento provoca uma redução na densidade de carga negativa do β -GP, resultado da transferência de prótons da quitosana para o sal durante o aquecimento. Esses resultados confirmam a hipótese de que a quitosana interage eletrostaticamente com o agente de gelificação (β -GP) para formar a estrutura tridimensional do hidrogel. Acredita-se que ocorram interações similares entre as estruturas carregadas de forma oposta, como gelatina/ β -GP, quitosana/VB e gelatina/VB, já que nota-se a mesma redução de carga superficial nos hidrogéis durante o aquecimento.

Além de ser uma ferramenta útil para elucidar o mecanismo de gelificação dos hidrogéis, o conhecimento da carga superficial permite prever a interação dos materiais com o tecido hospedeiro. A natureza positiva dos hidrogéis pode proporcionar interações favoráveis com a membrana celular, que é predominantemente carregada com carga negativa [173]. Desta forma, em termos de propriedades superficiais, os hidrogéis preparados são capazes de fornecer um microambiente adequado para a fixação e proliferação de células.

5.2.3. Caracterização química por FTIR

A estrutura química dos hidrogéis foi investigada por meio dos espectros FTIR. Para isso as amostras foram previamente liofilizadas e analisadas sem a necessidade de preparo prévio, pela técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Os espectros FTIR dos hidrogéis preparados podem ser vistos na Fig. 32, onde também aparecem os espectros FTIR da quitosana e gelatina. A identificação das bandas relacionadas à quitosana,

gelatina e vidro bioativo foram detalhadas anteriormente e podem ser vistas na Tabela 3 (pag.54).

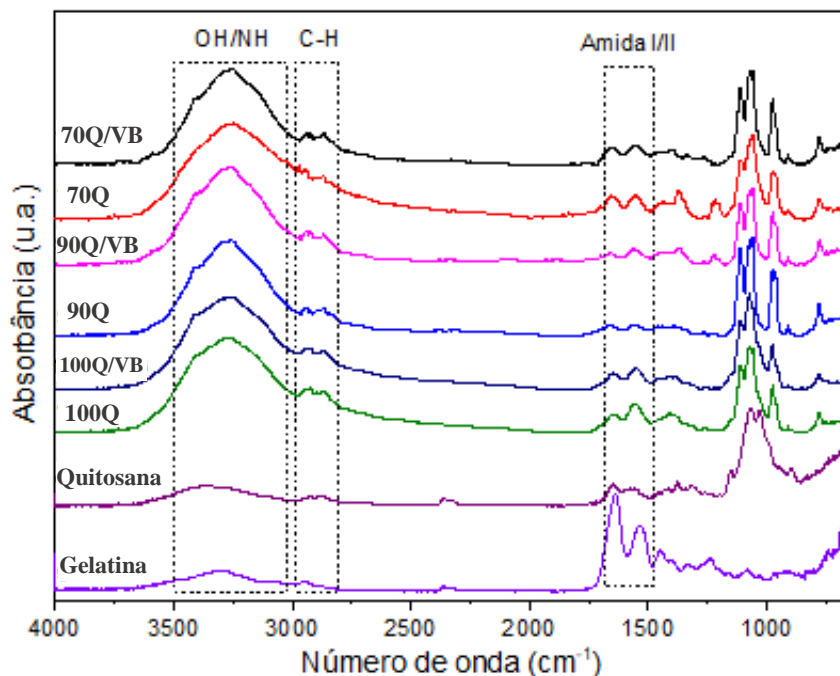
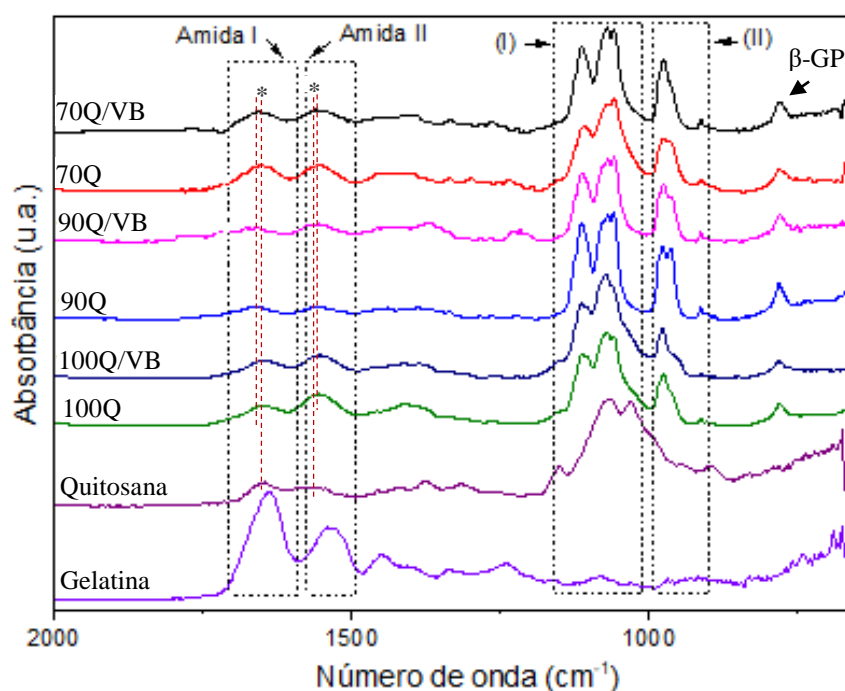


Figura 32. Espectro FTIR dos hidrogéis produzidos (4000-650 cm^{-1}).

De modo geral, observa-se que os espectros de FTIR dos hidrogéis são bastante semelhantes entre si. As principais colaborações da quitosana e gelatina estão relacionadas aos grupos amida I ($1680\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1565\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) e as vibrações relacionadas às ligações OH/NH ($3570\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$). Os espectros dos hidrogéis apresentaram alguns deslocamentos de banda em relação às matérias-primas (sinalizados na Fig. 33). O grupo amida I na molécula de quitosana apresenta vibração com máximo em 1650 cm^{-1} e nos hidrogéis com maior proporção de gelatina esse pico se desloca para 1663 cm^{-1} . Já o grupo amida II se desloca de 1567 cm^{-1} na quitosana para 1555 cm^{-1} nos hidrogéis com gelatina. Esses deslocamentos também foram detectados por Elashi e colaboradores [174] e podem ser um indicativo do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana e gelatina. Além disso, o aumento significativo na intensidade da banda da vibração NH nos hidrogéis também reforça a possibilidade do estabelecimento de interações intermoleculares entre os materiais. Kim e colaboradores [175] relataram mudanças semelhantes nos espectros de FTIR de filmes

compósitos a base de quitosana/ gelatina, o que foi atribuído às interações entre o grupo C = O de gelatina e o grupo N-H da quitosana. As alterações nos espectros FTIR de hidrogéis sem gelatina podem estar relacionadas a interações entre aos grupos O-H/N-H de cadeias de quitosana e ao grupo OH da cadeia carbônica do sal β -GP.



* deslocamentos de banda em relação à quitosana.

Figura 33. Ampliação do espectro FTIR dos hidrogéis produzidos (2000-650 cm^{-1}).

Na Fig. 33, as bandas com diferenças mais significativas são destacadas como áreas (I) e (II). A Área I inclui as principais contribuições das moléculas de quitosana para a energia de absorção dos hidrogéis. Essa área é caracterizada, principalmente, pelas vibrações de estiramento C-O (1070 cm^{-1}) da estrutura cíclica. Uma nova banda com um máximo centrado em 1115 cm^{-1} aparece no espectro de hidrogéis e é atribuída a vibração de estiramento do grupo fosfato, que são comuns às moléculas do sal β -GP e às partículas de vidro bioativo. A área II é marcada pelo aparecimento da banda variando de 995 cm^{-1} a 947 cm^{-1} . Esse intervalo também está relacionado às vibrações de alongamento dos grupos PO_4^{3-} , com bandas com máximo em 972 , 910 e 780 cm^{-1} [123,150].

Não foram observadas diferenças significativas nos espectros de hidrogéis com e sem VB, principalmente, devido à sobreposição das bandas relacionadas ao sal β -GP e às nanopartículas VB. Além disso, a baixa concentração de vidro bioativo nos hidrogéis também pode dificultar a detecção das bandas referentes ao material inorgânico. A ausência de novas bandas de absorção nos espectros dos hidrogéis indica que não ocorreu uma reticulação química covalente relevante durante a formação da rede tridimensional e corrobora com os resultados de potencial zeta, confirmando que a formação dos hidrogéis ocorre por meio de interações eletrostáticas.

5.2.4. Análise microestrutural dos hidrogéis

Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microtomografia de Raios X (Micro-CT) foram obtidas para caracterizar a microestrutura dos hidrogéis. Para ambas as análises, as amostras liofilizadas foram fraturadas e submetidas aos testes.

Alta porosidade e uma estrutura de poros interligados são alguns dos requisitos básicos para a fixação e crescimento de um novo tecido em um biomaterial [176]. Dessa forma, as imagens de MEV e Micro-CT podem ser ferramentas úteis para prever a possível migração de células para os biomateriais.

As imagens de MEV (Fig. 34) permitem avaliar a estrutura e porosidade dos hidrogéis. Nota-se que todas as formulações apresentam uma estrutura porosa, o que pode fornecer uma área superficial adicional para o crescimento de células. Todos os hidrogéis apresentaram poros predominantemente arredondados e abertos. Não foi possível a visualização das nanopartículas nas imagens de MEV. Provavelmente a quantidade de VB presente nas amostras não pode ser detectada devido ao limite de detecção da técnica. No entanto, testes posteriores, como imersão em solução de SBF irão confirmar a presença das nanopartículas nos hidrogéis.

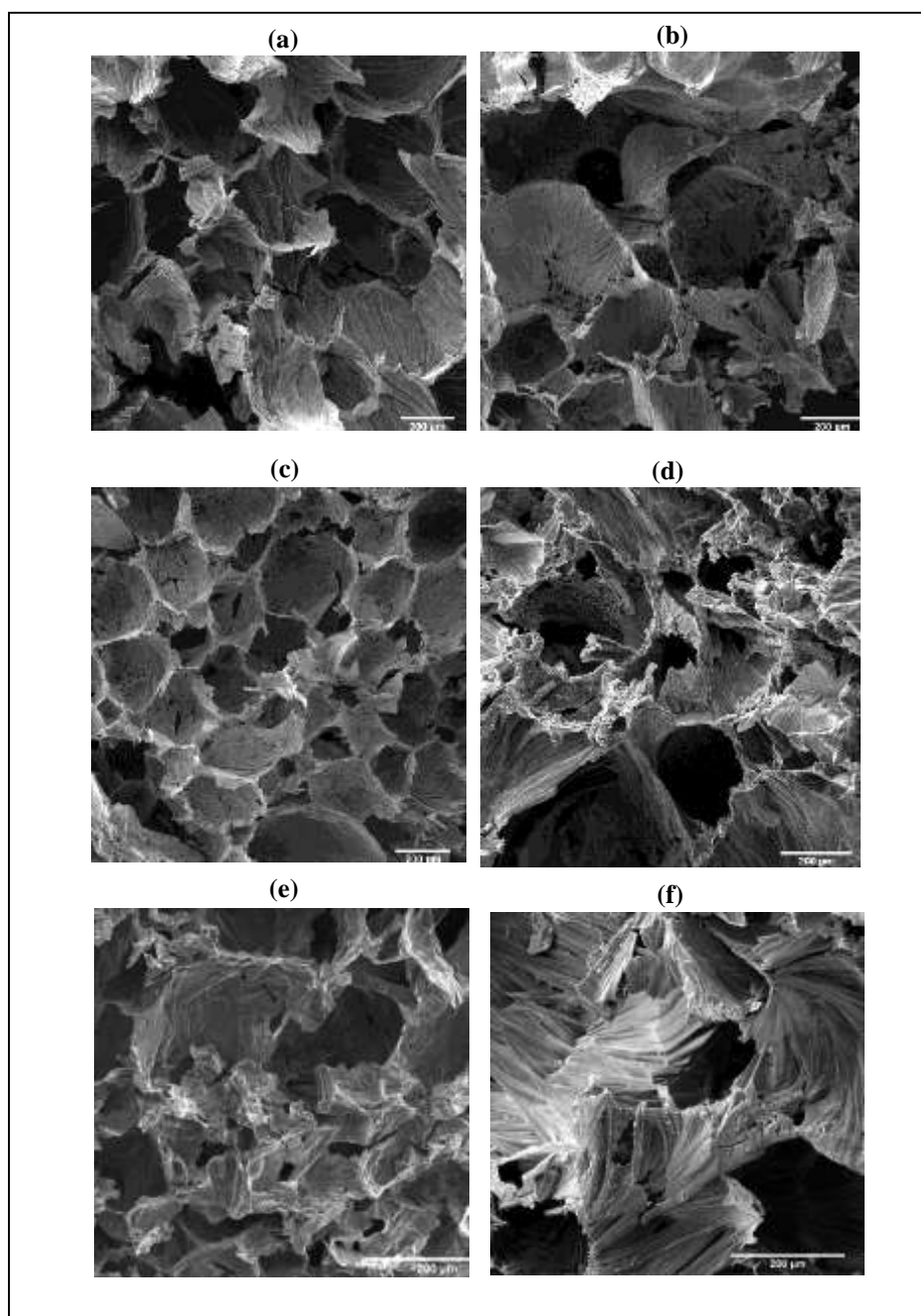


Figura 34. Imagens MEV (500X): (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB. Barra de escala: 200 µm.

A análise da estrutura 3D dos hidrogéis foi realizada por meio de Micro-CT. A Figura 35 apresenta o histograma de distribuição de tamanho de poros, a porosidade total dos materiais produzidos e as respectivas imagens 3D.

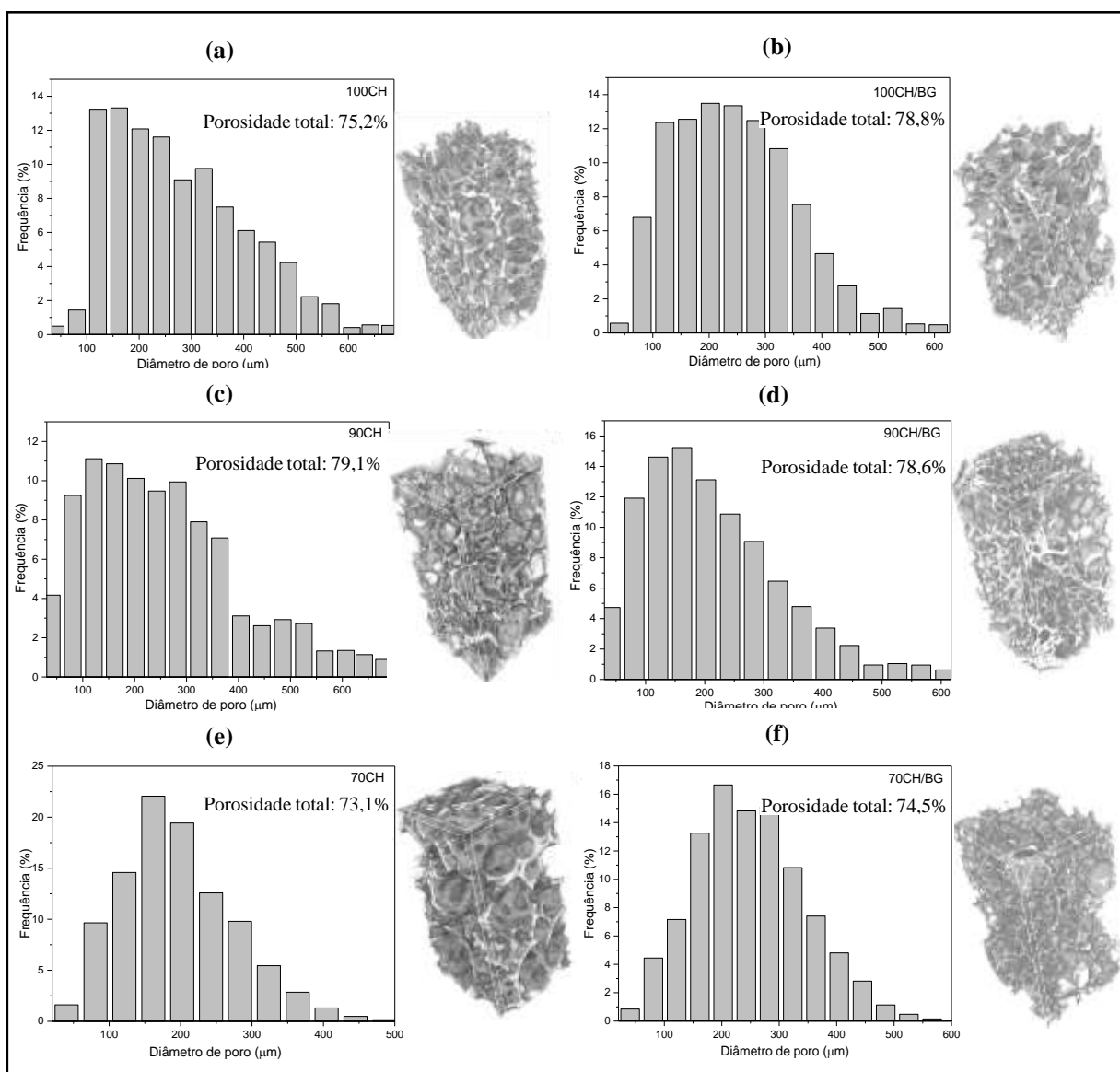


Figura 35. Histogramas de distribuição do tamanho de poros e imagens obtidos por micro-CT dos hidrogéis: (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.

Por meio das imagens 3D confirma-se a porosidade de todas as amostras, bem como a estrutura de poros interligados. A porosidade total das amostras encontra-se na faixa de 73,1% a 79,1%, não apresentando diferença significativa entre as diferentes composições. O histograma de distribuição de tamanho de poros mostra que os hidrogéis de quitosana (Fig. 35.a,b) apresentaram uma estrutura com uma maior distribuição de poros em comparação com os hidrogéis com maiores quantidades de gelatina (Fig. 35.c-e). Em especial, os hidrogéis com 30% de gelatina (70Q e 70Q/BG) apresentaram uma

distribuição de tamanho de poros mais estreita, originando estruturas mais homogêneas, com maior proporção de poros na faixa de 150-300 μm . Estes resultados podem ser indicativos das interações moleculares entre as cadeias de quitosana e gelatina, resultando em uma distribuição de poros mais homogênea.

A alta porosidade e ampla distribuição de tamanho de poros nos hidrogéis produzidos pode ser um ponto interessante para sua aplicação como material injetável. Geralmente, materiais muito porosos apresentam propriedades mecânicas reduzidas, o que pode comprometer sua utilização. No entanto, como o objetivo deste trabalho é a produção de hidrogéis que possam servir como matrizes temporárias que auxiliarão no processo de regeneração tecidual, a propriedade mecânica não precisa ser equivalente à do osso. Neste caso, os hidrogéis não desempenharão o papel de substituto ósseo, mas criarão um microambiente favorável para diferenciação e crescimento do neotecido. Dessa forma, a ampla distribuição de poros pode ser favorável, pois a presença de poros menores garantirão a passagem de nutrientes enquanto os poros maiores servirão como suporte para o crescimento de células.

5.2.5. Avaliação da capacidade de absorção de água

A determinação da quantidade de água incorporada em um hidrogel é um dos testes de caracterização mais importantes para aplicações biomédicas. A quantidade de água absorvida pelo material influencia em propriedades como difusão de nutrientes, mandatória para adesão e crescimento celular. Geralmente, quanto maior a capacidade de absorção de água, maior será a velocidade de difusão de soluto, embora outros fatores como microestrutura da cadeia polimérica também desempenhem papel importante nesse aspecto [35].

Na Figura 36 (a) é mostrado o comportamento de absorção de água dos hidrogéis imersos em solução tampão PBS (pH 7,4). Todos os hidrogéis apresentaram um perfil de absorção de água semelhante. Nos primeiros 30 min., há uma rápida absorção de água variando de 198% para 70Q/VB a 436% para 100Q. Em seguida, há uma pequena queda na absorção até que os sistemas entram em equilíbrio e tendem a um patamar (após 210 min).

O grau de absorção de água das amostras após equilíbrio é mostrado na Fig. 36b. Observa-se que a capacidade de absorção de água é reduzida a medida que a quantidade de gelatina e vidro bioativo nas formulações aumenta. Esses resultados são consistentes com as observações feitas anteriormente na análise por microscopia (MEV) e Micro-CT. Como a adição de gelatina e vidro bioativo nos hidrogéis de quitosana provocou uma redução no tamanho dos poros, esses materiais apresentam uma estrutura menos susceptível à expansão. Esse comportamento reforça a hipótese de que a adição de gelatina e VB promove um fortalecimento nas interações intermoleculares nos hidrogéis. Estudos anteriores também relatam a redução no grau de absorção de água de *scaffolds* quitosana/gelatina quando partículas de vidro bioativo são adicionadas ao compósito [177]. Os autores sugerem que os grupos hidrofílicos das cadeias poliméricas interagem com as partículas de vidro bioativo reduzindo, portanto, o número de grupos capazes de interagir com as moléculas de água.

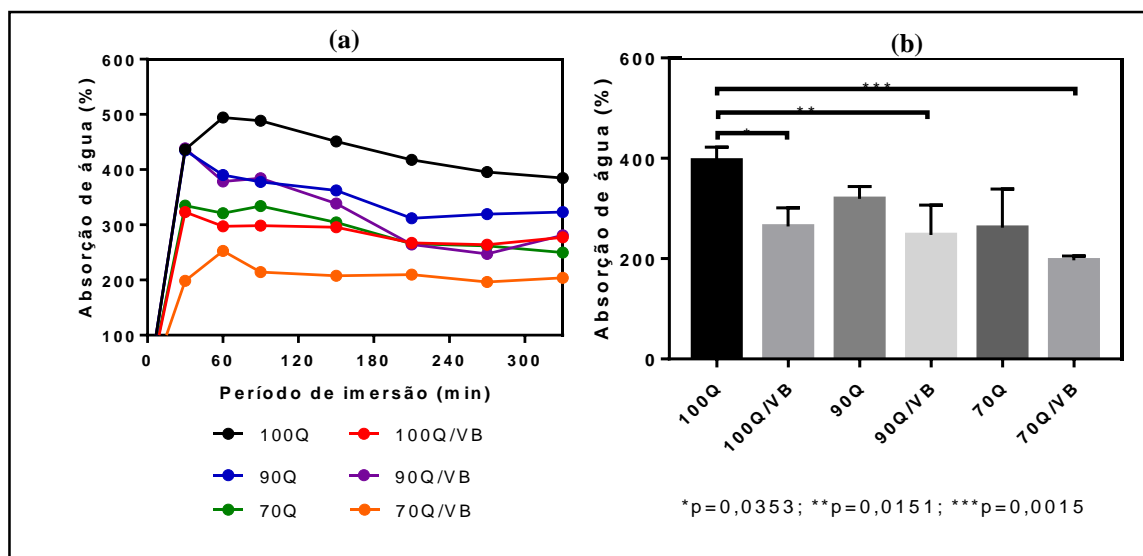


Figura 36. Avaliação do grau de absorção de água dos hidrogéis imersos em solução PBS: (a) absorção de água ao longo do tempo; (b) absorção de água no equilíbrio.

Apesar da redução observada, todos os hidrogéis apresentaram alta capacidade de absorção de água, com valores na faixa de $196 \pm 8\%$ (70Q/VB) a $396 \pm 6\%$ (100Q).

5.2.6. Avaliação da termossensibilidade por ensaio reológico

Uma das características mais importantes dos hidrogéis termossensíveis está relacionada à sua capacidade de ser injetada na forma líquida e se tornar um gel no corpo. Dessa forma, podem ser utilizados em procedimentos minimamente invasivos, sendo capazes de preencher defeitos ou cavidades de tamanho reduzido e com formas complexas. Assim, a medição das propriedades reológicas é essencial para verificar a viabilidade desses sistemas.

O comportamento viscoelástico das amostras foi avaliado medindo o módulo de elasticidade (G') e o módulo viscoso (G'') frente a uma faixa de aquecimento e resfriamento. Na Fig. 37 é mostrado o perfil das curvas representativas dos hidrogéis sintetizados.

Todas as curvas mostram um comportamento reológico típico de materiais termossensíveis [52,137]. Durante o processo de aquecimento, observam-se três regiões distintas: a primeira região refere-se ao início do aquecimento onde as amostras ainda são fluidas e o componente viscoso (G'') prevalece, apresentando valores maiores que o componente elástico (G'). Observa-se também que tanto G' quanto G'' diminuem com o aumento da temperatura, o que é compatível com o comportamento térmico de materiais predominantemente fluidos [178].

A segunda região está relacionada à faixa de temperatura em que G' e G'' apresentam um aumento, o que é comumente explicado pela agregação das cadeias poliméricas, induzida pelo calor. Esse aumento é seguido por um valor crítico de temperatura onde G' e G'' se interceptam. Esse valor é definido como a temperatura de gelificação, onde os materiais fluidos sofem transição sol-gel, se tornando um gel [137]. A terceira região está associada à faixa de temperatura acima do ponto de gelificação em que G' apresenta valores muito maiores do que G'' . A partir desse ponto, o comportamento elástico das amostras predomina devido à formação da rede tridimensional do hidrogel.

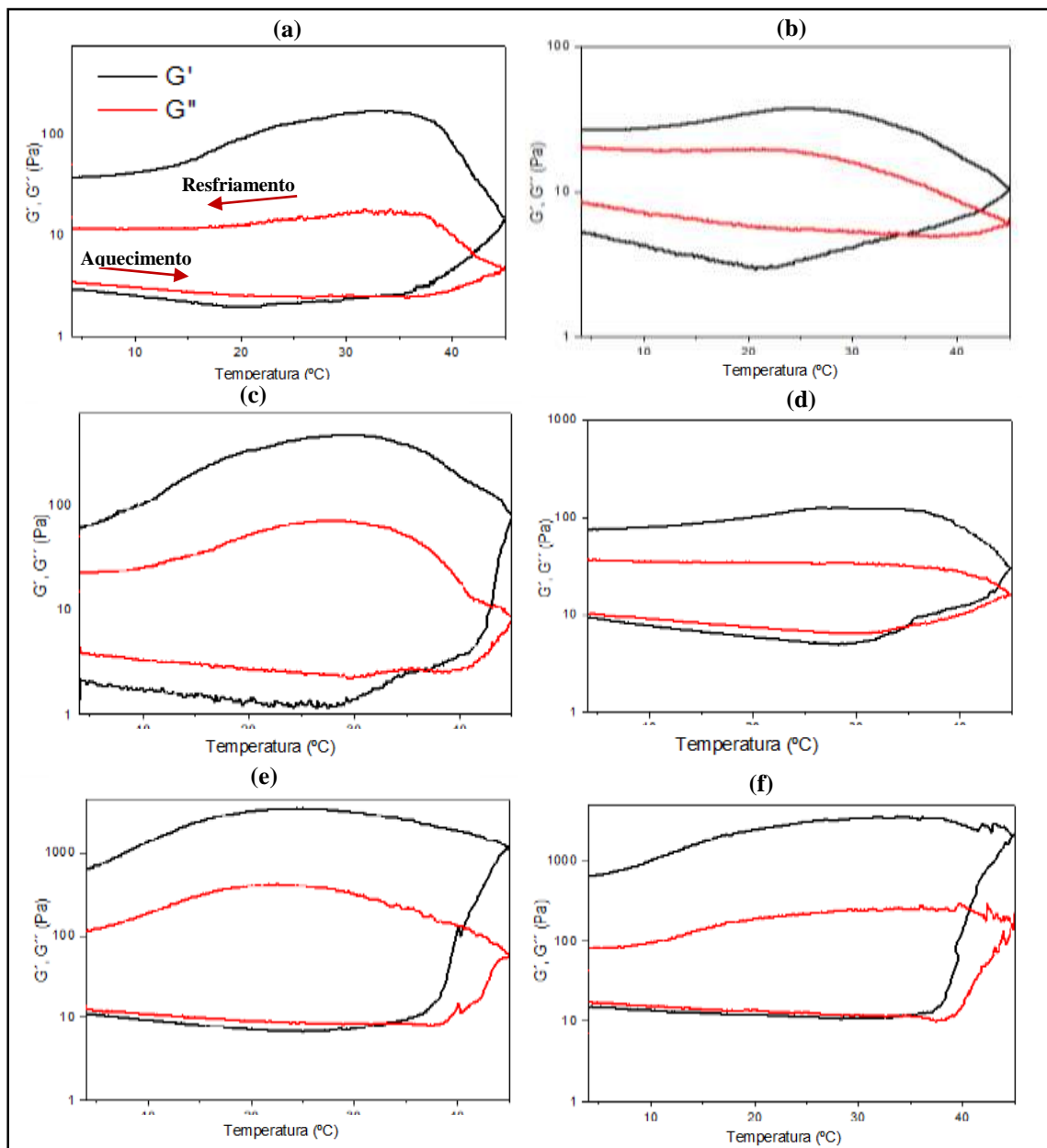


Figura 37. Curvas reológicas representativas dos hidrogéis: (a) 100Q; (b) 100Q/VB, (c) 90Q, (d) 90Q/VB, (e) 70Q, (f) 70Q/VB.

Conforme apresentado na Fig. 37, o processo de resfriamento permitiu uma investigação da termorreversibilidade das amostras. Apesar da tendência de aumento no início do resfriamento, tanto G' quanto G'' apresentaram uma redução de valor até atingirem um patamar. Na faixa de temperatura testada não foi detectado o ponto de interseção entre G' e G'' durante o processo de resfriamento das amostras. Além disso, em todas as curvas, G' permaneceu maior que G'' após o resfriamento. Essas observações implicam que os

hidrogéis produzidos não são reversíveis ao estado fluido original. Chenite e colaboradores[52] avaliaram a termorresibilidade dos hidrogéis de quitosana/ β -GP e relataram que essa propriedade está diretamente relacionada ao pH dos materiais antes do aquecimento. Além disso, eles relatam que o resfriamento das amostras após a gelificação induzida pelo calor pode afetar as interações entre as cadeias. Dessa forma, os hidrogéis tendem a não retornarem ao seu estado original porque as forças hidrofóbicas tornam-se mais fracas, enquanto as ligações de hidrogênio se fortalecem.

A temperatura e o tempo de gelificação das amostras são mostrados na Tabela 7. Ambos os parâmetros apresentam papel importante na avaliação preliminar do desempenho *in vivo* dos hidrogéis. Uma temperatura de gelificação próxima à temperatura corporal permite uma injeção suave por meio de uma agulha, reduzindo o desconforto para o paciente. A temperatura de gelificação das amostras variou de $34,6 \pm 0,4^\circ\text{C}$ a $36,7 \pm 0,8^\circ\text{C}$, valores compatíveis com aplicações clínicas. Não houve diferença significativa na temperatura de gelificação entre as amostras com diferentes composições.

Tabela 7. Temperatura de gelificação, tempo de gelificação e valores de G' e G'' dos hidrogéis produzidos.

Amostra	Temperatura de gelificação ($^\circ\text{C}$)	Tempo de gelificação (s)	G' (Pa) G'' (Pa)		G' (Pa) G'' (Pa)	
			25 $^\circ\text{C}$		37 $^\circ\text{C}$	
100Q	34.6 ± 0.4	218 ± 35	3.3	5.4	5.4	4.9
100Q/VB	36.7 ± 0.8	193 ± 28	4.3	6.3	7.6	6.8
90Q	34.5 ± 0.7	185 ± 27	4.4	5.8	8.2	5.5
90Q/VB	35.3 ± 0.3	178 ± 32	6.6	6.9	11.1	6.3
70Q	34.8 ± 0.5	174 ± 26	9.2	10.4	13.2	10.4
70Q/VB	33.7 ± 0.5	172 ± 34	9.8	12.5	12.4	12.2

O tempo de gelificação dos hidrogéis a 37 $^\circ\text{C}$ foi razoavelmente baixo, variando de $172 \pm 34\text{s}$ a $218 \pm 35\text{s}$. A fim de avaliar o comportamento dos hidrogéis à temperatura ambiente e fisiológica, os valores dos módulos G' e G'' a 25 $^\circ\text{C}$ e 37 $^\circ\text{C}$ são listados na Tabela 7. Observa-se que o módulo de elasticidade (G') tende a aumentar com a adição de nanopartículas de VB e gelatina. O aumento do comportamento elástico e a diminuição do tempo de gelificação com adição de gelatina e VB reforçam a hipótese de que podem ocorrer interações moleculares adicionais entre os materiais durante o processo de gelificação. Cheng et al. [179] também observaram uma diminuição no tempo de gelificação e aumento da resistência mecânica quando diferentes quantidades de gelatina

foram adicionadas aos hidrogéis de quitosana. Do ponto de vista clínico, esses resultados sugerem que todas as formulações podem ser aplicadas como sistemas injetáveis, o que pode ser confirmado por meio dos testes de seringabilidade e injetabilidade.

5.2.7. Avaliação da seringabilidade

O termo seringabilidade é relacionado à facilidade de liberação do material por meio de uma agulha. A seringabilidade das amostras foi avaliada em termos da porcentagem de material efetivamente expulso da seringa. Até o momento, não é de nosso conhecimento a existência de métodos quantitativos padrão para avaliar a seringabilidade e injetabilidade de hidrogéis. Portanto, o teste de seringabilidade foi realizado utilizando um dispositivo simples, similar ao descrito por Alves e colaboradores [138]. Embora apenas poucos trabalhos relatem a avaliação da seringabilidade e injetabilidade de sistemas injetáveis, avaliar esses parâmetros é crucial para estimar o desempenho de injeção do material.

Uma agulha 21G^{1/4} foi selecionada para esse estudo, pois este é um dos tamanhos mais comuns utilizados para a injeção *in vivo* de materiais similares. A Tabela 8 mostra que a seringabilidade de todas as formulações aproximou-se de 100% para o tamanho da agulha testado. A seringabilidade variou de $93,9 \pm 1,4\%$ a $94,8 \pm 1,3\%$ para uma agulha 21G^{1/4}. Estes resultados sugerem que todas as formulações possuem a capacidade de passar facilmente por uma agulha hipodérmica e apresentam uma precisão considerável na entrega do material.

Tabela 8. Seringabilidade dos hidrogéis por uma agulha 21G^{1/4}.

Amostra	Seringabilidade (%)
	Agulha 21G ^{1/4} (25x 0,8mm)
100Q	94.3 ± 1.3
100Q/VB	93.9 ± 1.4
90Q	94.2 ± 1.3
90Q/VB	94.7 ± 1.3
70Q	93.9 ± 1.4
70Q/VB	94.8 ± 1.3

5.2.8. Avaliação da injetabilidade

Injetabilidade é outro parâmetro importante para avaliar a performance da seringa em uma injeção subcutânea. Para medir a facilidade de injeção dos hidrogéis propostos, a força necessária para realizar a administração por meio de uma seringa foi avaliada com o auxílio de um teste de compressão em uma máquina universal de ensaios. Os testes foram realizados a uma velocidade de compressão de 1,0 mm/s, comparável às taxas normais de injeção manual [180].

A força aplicada em um êmbolo de seringa durante a injeção de uma formulação através de uma agulha pode ser dissipada de três maneiras: (a) superando a força de resistência do êmbolo da seringa; (b) transmitindo energia cinética ao líquido; e (c) forçando o líquido através da agulha. O predomínio de um ou mais eventos determinará o perfil da curva força x deslocamento do êmbolo [181].

O perfil do gráfico de força versus deslocamento é bastante semelhante para todas as amostras (Fig. 38). Existe um pico de força inicial à medida que o conteúdo da seringa começa a fluir. Esse valor é chamado de "força de deslocamento inicial" (força necessária para iniciar o movimento do êmbolo) [181]. Em seguida, os gráficos são marcados por uma queda na força, que tende a atingir um platô. Outro valor de força importante observado nos gráficos está relacionado à "força máxima" (força máxima detectada durante o experimento).

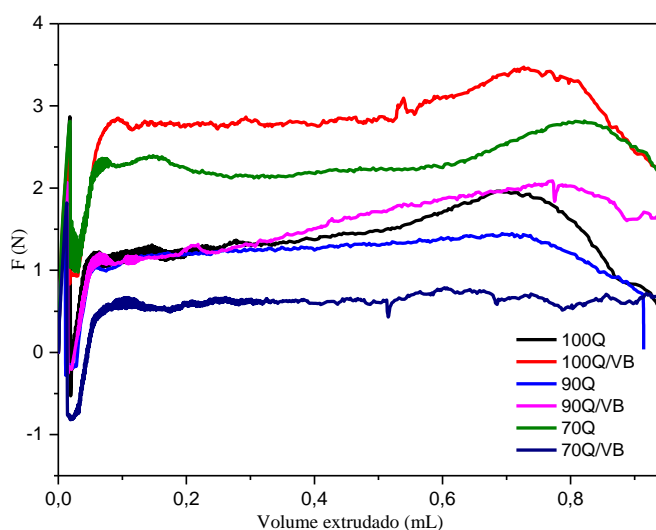


Figura 38. Curva representativa força x deslocamento dos hidrogéis testados em uma agulha 22G1^{1/4}.

A força de deslocamento inicial e a força máxima necessária para que os hidrogéis sejam expelidos da seringa são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Injetabilidade dos hidrogéis utilizando máquina de ensaios.

Amostra	Agulha	Força Inicial (N)	Força Máxima (N)
100Q		2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.4
100Q/VB		2.5 ± 0.4	4.0 ± 0.5
90Q	22G11/4	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1
90Q/VB	(20x0.8 mm)	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.3
70Q		1.7 ± 0.3	2.1 ± 0.2
70Q/VB		2.1 ± 0.7	2.9 ± 0.2

Os resultados mostram que a adição de nanopartículas de VB provocou um aumento na força máxima de injeção. Esses dados são consistentes com os ensaios reológicos, que verificaram que a adição de VB provoca um aumento no caráter elástico dos hidrogéis, portanto, esperam-se valores de força mais elevados para expulsar o conteúdo da seringa. No entanto, os diâmetros da ordem de nanômetro das partículas de BG permitiram uma injeção eficiente através de uma agulha de pequeno calibre, como a testada. Todos os hidrogéis preparados apresentaram uma força máxima abaixo de 30 N, que é considerado o limite superior da força de injeção aceitável [182].

5.2.9. Ensaio de imersão em solução SBF

Análise da perda de massa

A degradação *in vitro* de biomateriais é um estudo importante para avaliar sua estabilidade em longo prazo. A taxa de degradação dos hidrogéis foi medida em termos de alteração da massa seca das amostras ao longo de 28 dias imersas em solução de SBF (pH 7,4 a $37,0 \pm 0,5$ °C). Conforme mostrado na Fig. 39, o perfil de perda de massa foi bem semelhante para todos os hidrogéis, não havendo diferença significativa no comportamento de degradação das mesmas.

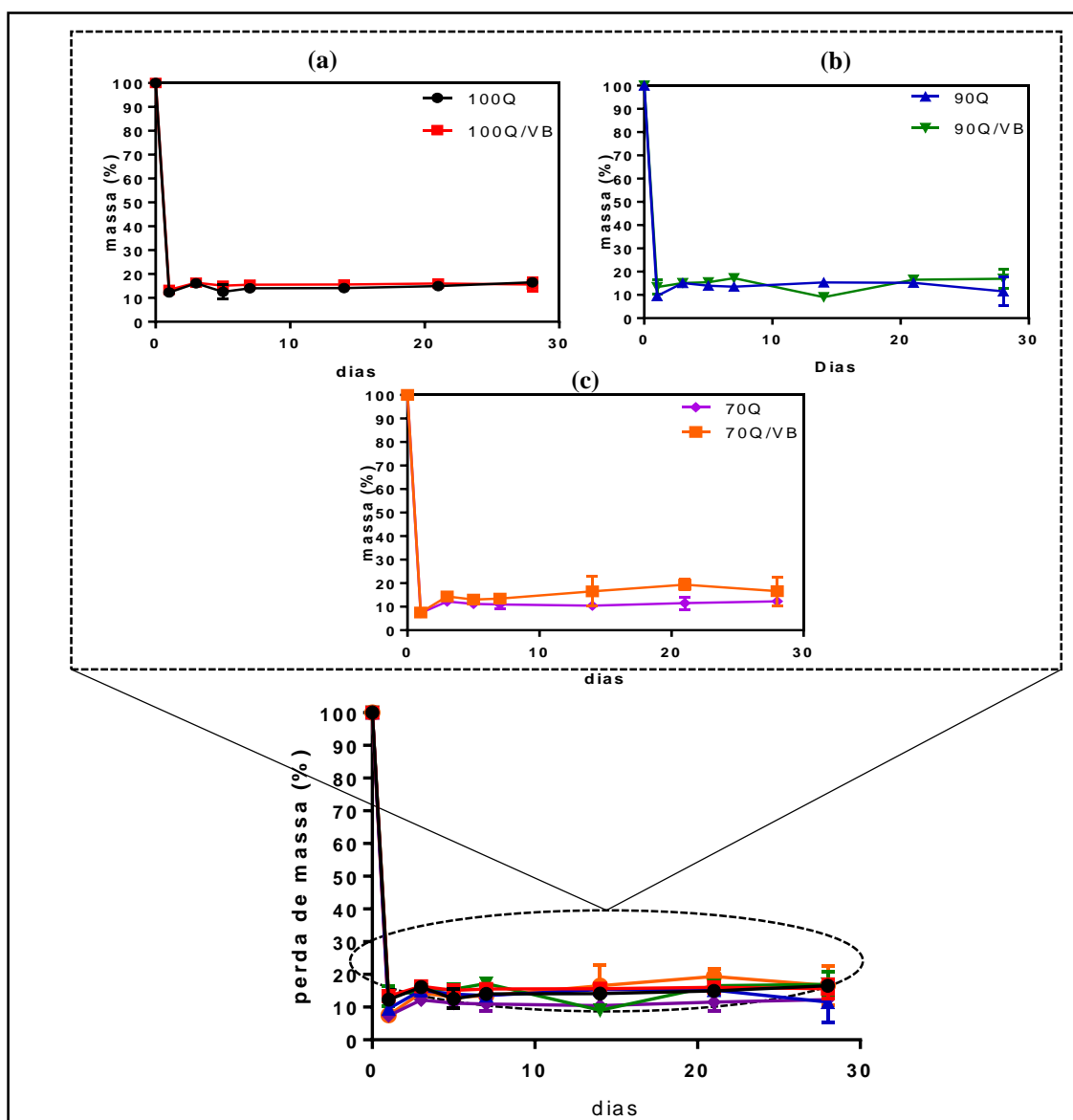


Figura 39. Perfil de perda de massa dos hidrogéis imersos em SBF: (a) 100Q, 100Q/VB; (b) 90Q, 90Q/VB; (c) 70Q, 70Q/VB.

As amostras foram submetidas a um processo que pode ser considerado de degradação acelerada, onde a razão massa amostra/volume de solução SBF foi de 0,001g/mL. Para os testes de degradação em tempo real, existem algumas diretrizes que estabelecem o volume da solução de imersão. De acordo com a ASTM F1635 (*Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*) a razão recomendada para testes de degradação de materiais hidroliticamente degradáveis é de 0,2g/mL, enquanto a ISO 10993-13:1998

(*Biological evaluation of medical devices*) recomenda a razão mínima de 0,1g/mL. A razão de diluição utilizada no presente trabalho foi cerca de 100 vezes maior que a razão recomendada para testes em tempo real. Essa razão foi empregada para permitir a medição da liberação de íons na solução de SBF (próxima seção). Razões de diluição maiores, como a utilizada, aceleram o processo natural de difusão que ocorre entre as moléculas do material e a solução. Dessa forma, a tendência inicial nesses sistemas será a saída extensiva de espécies do material para a solução até que se estabeleça um equilíbrio de concentração entre material/solução. Isso justifica a perda de massa significativa observada nas primeiras 24h de imersão dos hidrogéis em solução SBF.

Além do fator de diluição, uma das contribuições para a perda de massa significativa no início do período de imersão pode ser atribuída à liberação de β -GP dos hidrogéis. Pakzad e colaboradores [141] realizaram um estudo de imersão de hidrogéis em solução tampão salivar simulada durante 10 dias. Os autores acompanharam o processo de perda de massa das amostras e observaram uma perda mais significativa nas primeiras 8h de imersão. Essa redução expressiva de massa foi atribuída à dissolução e lixiviação do sal β -GP livre presente nas camadas superficiais dos hidrogéis. No presente trabalho, cerca de 16% da massa seca dos hidrogéis é proveniente das moléculas do sal β -GP e pode ter contribuído para a perda inicial de massa observada.

Após 3 dias, observa-se que há uma tendência de estabilidade na massa dos hidrogéis. Após o período de 28 dias, a perda de massa sólida de hidrogéis variou de $83,0 \pm 2,4\%$ a $88,5 \pm 2,4\%$. Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras, foi possível observar uma tendência, após 7 dias, de aumento de massa nas amostras contendo vidro bioativo. Esse aumento pode ser atribuído à formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) após imersão em solução de SBF. Trabalhos anteriores também relataram um aumento de massa em espumas contendo partículas de BG [164]. A presença de camada HA foi confirmada pela análise de MEV, FTIR e da solução de SBF, como será mostrado posteriormente.

A taxa de perda de massa encontrada para as amostras é típica de hidrogéis físicos, que são mais suscetíveis à degradação hidrolítica. Além disso, ambos biopolímeros apresentam grupos hidrofílicos, como amino e carboxila, que podem contribuir para acelerar o processo de degradação do material. Estudos de degradação em tempo real em

hidrogéis à base de quitosana mostraram que a taxa de perda de massa pode ser diretamente relacionada com a concentração da solução e o grau de desacetilação da quitosana (GD). Gangi e colaboradores [53] observaram que os hidrogéis preparados com quitosana a 2% (m/v) atingiram diferentes perdas de massa após 60 dias de imersão em solução tampão (PBS, pH=7.4). Uma maior taxa de degradação (cerca de 75%) foi encontrada para amostras com GD menores, devido à menor cristalinidade do biopolímero. No presente trabalho, uma quitosana de baixo GD (aproximadamente 75%) foi empregada no preparo dos hidrogéis e pode ser um dos fatores que colaboraram para a alta taxa de perda de massa observada.

É importante ressaltar que os resultados encontrados neste trabalho auxiliam no entendimento do comportamento dos materiais quando imersos em solução SBF, porém resultados mais precisos podem ser obtidos por meio de testes de degradação *in vivo*.

Análise da liberação de íons Si, Ca e P

A solução de SBF em que as amostras ficaram imersas por 28 dias foram analisadas por ICP-OES afim de investigar as mudanças na composição química da superfície dos hidrogéis relacionada ao processo de mineralização. Além de acompanhar o processo de formação da camada de HA na superfície dos hidrogéis, o estudo de liberação de íons serve como um parâmetro para prever a resposta biológica desses materiais. Estudos *in vitro* demonstram que o produto iônico de vidros bioativos podem estimular a expressão gênica e proliferação de osteoblastos [127,183].

As concentrações de Si, Ca e P medidas em intervalos de tempo predeterminados (0, 1, 3, 5, 7, 14, 28 d) podem ser vistas na Figura 40. A Fig.40a mostra a variação da concentração de Si ao longo de 28 dias de testes. O gráfico de concentração de Si permite identificar a presença do vidro bioativo nos hidrogéis 100Q/VB; 90Q/VB e 70Q/VB. Como o Si é o único dos elementos medidos que não está presente na solução original de SBF, nos hidrogéis sem VB sua concentração é inexistente, conforme mostra a Fig.40a. Aos 14 dias a concentração de Si atinge os valores mais altos, na faixa de $6,5 \pm 0,6$ ppm a $11,3 \pm 2,3$ ppm. Esses valores podem ser considerados favoráveis para o comportamento biológico dos hidrogéis, uma vez que estudos realizados anteriormente demonstram que

a liberação de Si na faixa de 0,1-100ppm promovem efeito estimulante nos osteoblastos [183,184].

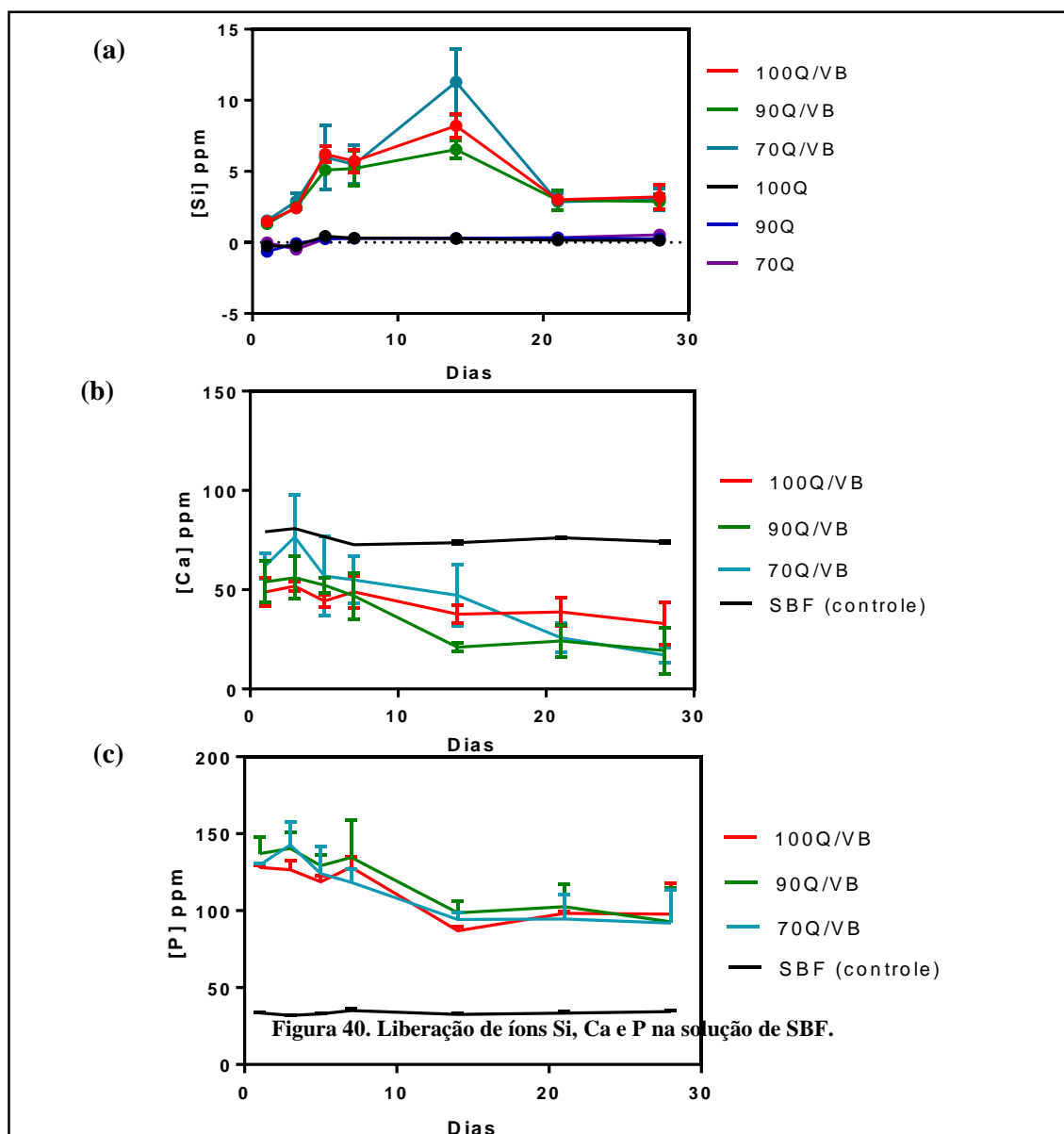


Figura 41. Liberação de íons Si, Ca e P na solução de SBF.

Para melhor visualização dos dados, a variação de Ca e P foi registrada somente para as amostras contendo vidro bioativo (Fig.40b,c). A variação da concentração dos íons nas amostras contendo vidro bioativo pode ser explicada pela formação de HA ao longo do tempo de imersão. Um mecanismo para a formação dessa camada é proposto na literatura [5,21,22] e compreende algumas etapas envolvendo troca de íons. O primeiro evento que

ocorre é a troca de íons Ca^{2+} da superfície de materiais bioativos com $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ da solução. O fósforo presente na estrutura também é liberado nessa fase. Essas mudanças podem ser vistas nas Fig.40 (b,c), que mostram um aumento inicial (até o terceiro dia) na concentração de Ca e P. Em um segundo momento, ocorre a formação de $\text{Si}(\text{OH})_4$ solúvel e a formação de silanol (Si-OH). Essa reação fica evidente com o aumento da concentração de Si na solução, até o 14d de imersão (Fig. 39a). Em seguida, ocorre a condensação de grupos Si-OH e a polimerização da camada rica em sílica. Finalmente, os íons Ca e P migram para a superfície formando um filme amorfo $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, que incorpora OH e CO_3^{2-} da solução para formar a camada cristalina de HA. Neste momento, as concentrações de Si, Ca e P são reduzidas.

A deposição de Ca na superfície dos hidrogéis poder ser comprovada pela redução de sua concentração ao longo do tempo de imersão, quando comparado à solução de SBF (grupo controle) (Fig.40b). Já a concentração de P (Fig. 40c) mostra valores superiores ao grupo controle ao longo dos 28 dias de imersão. Essa observação pode ser explicada pela presença de fósforo no sal β -glicerofosfato de sódio. Esses resultados reforçam a hipótese de que uma das etapas de perda de massa que ocorrem nos hidrogéis imersos em SBF ocorre devido a lixiviação do sal β -GP, explicado pelo aumento da concentração de P na solução de SBF.

Análise microestrutural por MEV

Nas Figuras 41 (amostras sem BG) e 42 (amostras com BG) são mostradas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos hidrogéis após 1 e 28 dias de imersão em solução SBF.

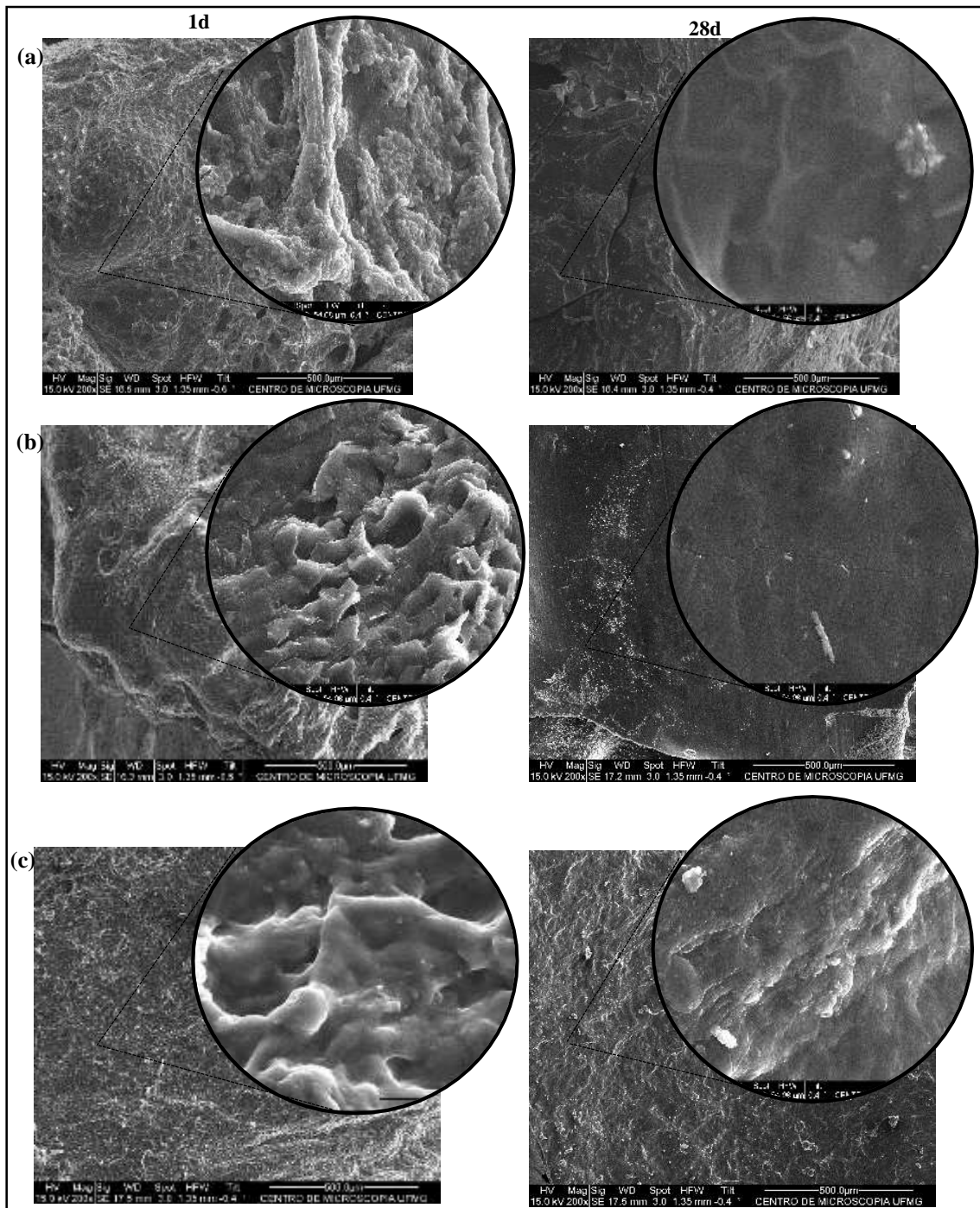


Figura 42. MEV da superfície dos hidrogéis sem vidro bioativo após imersão em SBF por 1dia e 28 dias: (a) 100Q; (b) 90Q; (c) 70Q.

Observa-se que a superfície dos hidrogéis 100Q; 90Q e 70Q após imersão em SBF (Fig.41) apresentam estrutura predominantemente lisa e sem a formação de aglomerados.

Por outro lado, nota-se o aparecimento de aglomerados na superfície dos hidrogéis 100Q/VB, 90Q/VB e 70Q/VB (Fig.42) imersos em solução SBF. Esses aglomerados apresentam morfologia que pode ser associada a formação da camada de hidroxiapatita na superfície dos hidrogéis com vidro biotivo [83,185].

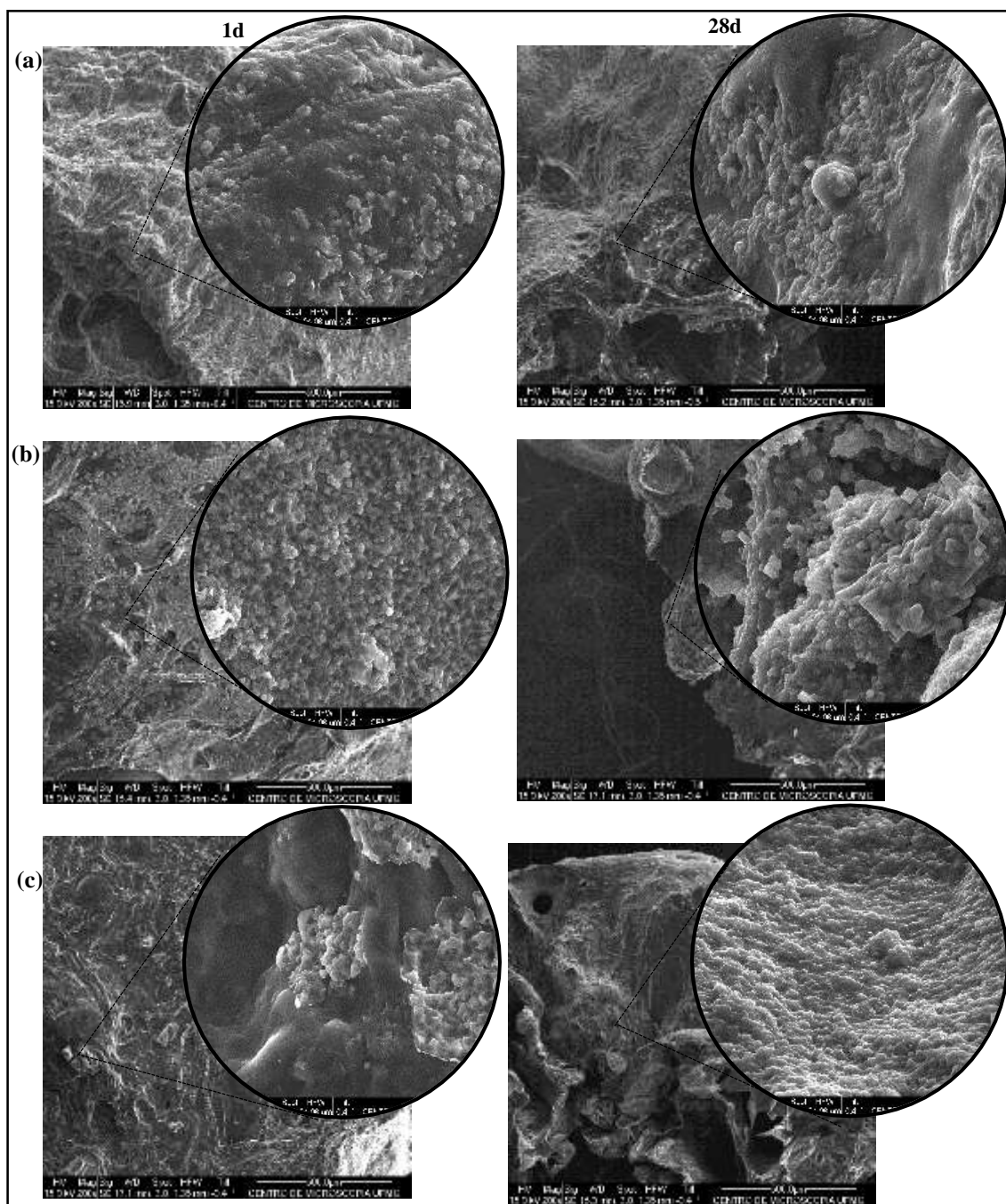


Figura 43. MEV da superfície dos hidrogéis com vidro bioativo após imersão em SBF por 1 dia e 28 dias: (a) 100Q/VB; (b) 90Q/VB; (c) 70Q/VB.

Análise química por FTIR

Os hidrogéis foram imersos em SBF durante 28 dias e submetidos a análise de FTIR semanalmente. A evolução nos espectros FTIR das amostras imersas em SBF ao longo deste tempo pode ser observada na Figura 43, onde são mostrados os dias em que ocorreram alterações mais significativas.

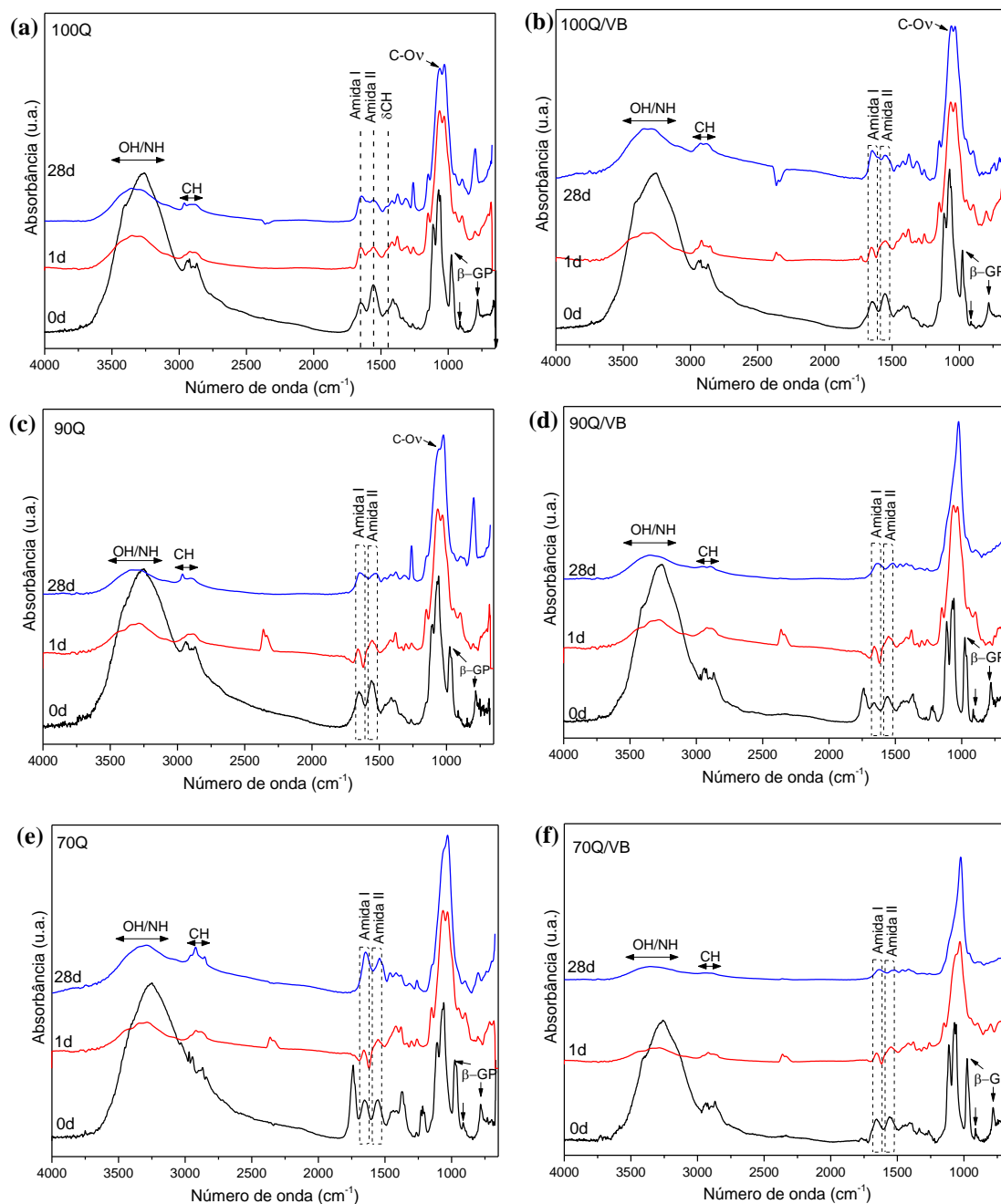


Figura 44. Espectros FTIR dos hidrogéis após imersão em solução SBF. (a) 100Q; (b) 100Q/VB; (c) 90Q; (d) 90Q/VB; (e) 70Q; (f) 70Q/VB.

A principal alteração observada nos espectros dos hidrogéis pós-imersão em SBF foi a redução na intensidade das bandas associadas à amida I e II (Fig. 43a-f). Essas mudanças foram previamente observadas no estudo de degradação de espumas de quitosana /BG e foram atribuídas à degradação hidrolítica normal das cadeias do polímero [186]. Além disso, é possível notar uma redução da banda característica da ligação C-O da estrutura da quitosana (1070 cm^{-1}) no decorrer dos dias de imersão, que é mais perceptível nas formulações com menor concentração do polissacarídeo. Também foi observado o desaparecimento das principais bandas relacionadas ao sal de β -GP ao longo do tempo de imersão na solução de SBF. Essa observação corrobora com os resultados encontrados na liberação de íons na solução de SBF, que demonstraram a liberação de íons P proveniente do sal.

Nos espectros dos hidrogéis 100Q (Fig. 43a) e 90Q (Fig. 43b) observa-se o surgimento de duas novas bandas centradas em 1260 e 798 cm^{-1} após 28d de imersão. Como os outros hidrogéis não apresentaram essas mudanças, acredita-se que o surgimento dessas bandas pode estar relacionada a presença de sais na superfície dos hidrogéis, que não foram lixiviados após lavagem do material.

Nos hidrogéis com vidro bioativo é possível observar a mudança de algumas bandas entre 1200cm^{-1} a 650cm^{-1} (Fig. 43b, d, f). Para verificar com mais detalhes essas mudanças, os espectros foram ampliados (Fig. 44). Desde o primeiro dia de imersão em SBF observou-se um alargamento na banda de 1000cm^{-1} a 1040cm^{-1} , formando um ombro, com máximo em 1030cm^{-1} , que pode ser atribuído ao grupo fosfato [187]. O intervalo de 1200cm^{-1} a 650cm^{-1} foi marcado pela subtração das bandas relacionadas ao β -GP. Além disso, também foi observado um alargamento significativo da banda variando de 1175 a 975 cm^{-1} . Esta alteração pode ser atribuída ao aparecimento de vibrações de estiramento P-O ($1220\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) provenientes de grupos fosfato [161,188]. Aos 28 dias de testes, surge uma banda suave em 960 cm^{-1} , que também pode ser associada às vibrações simétricas dos grupos PO_4^{3-} . A presença das bandas de fosfato em 1030 e 960 cm^{-1} sugere a formação da camada de hidroxiapatita (HA) na superfície dos hidrogéis imersos em SBF. O aparecimento dessas bandas, associadas ao grupo carbonato (890 e 800cm^{-1}) tem sido associado a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) no material imerso em solução SBF [123].

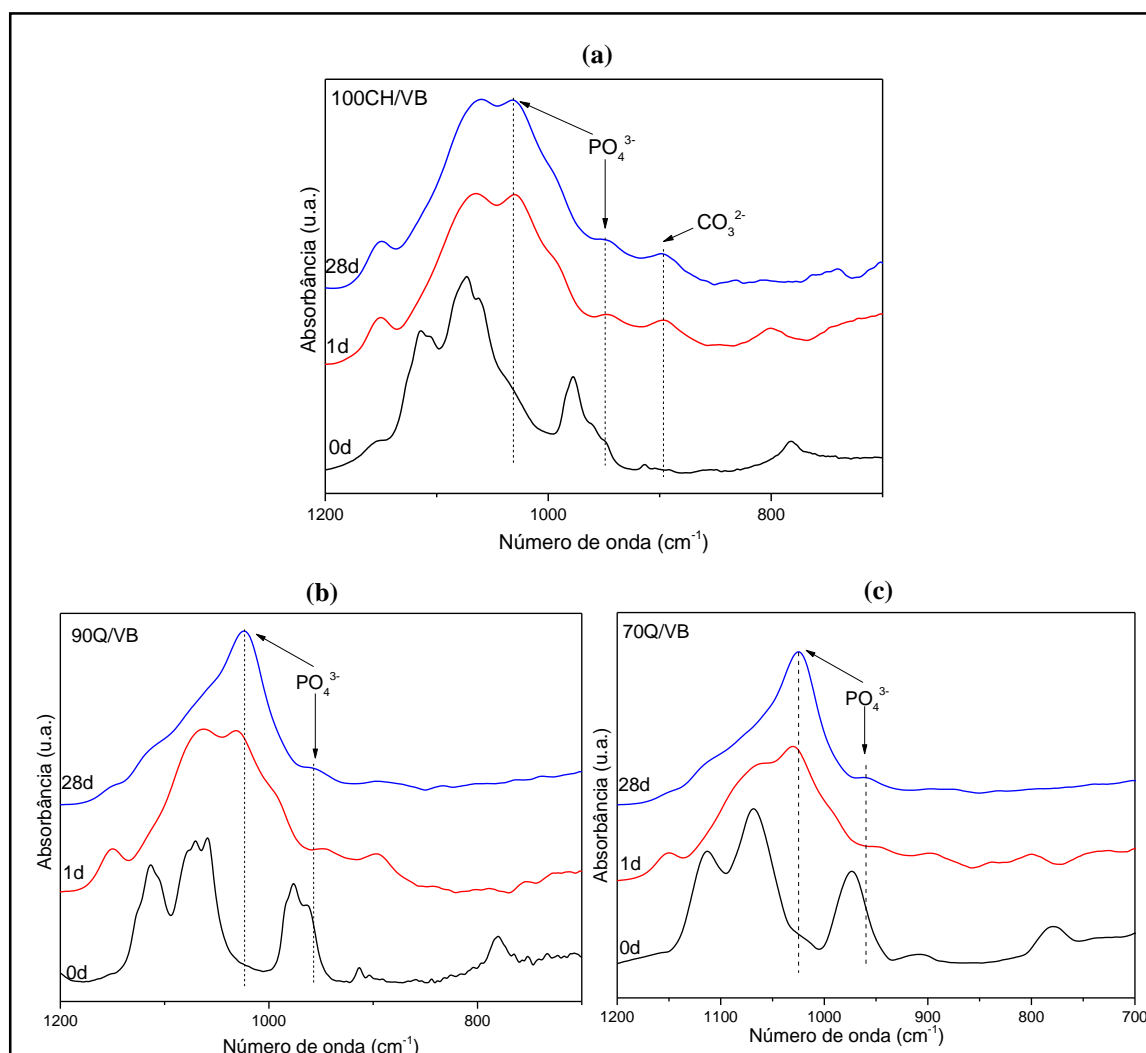


Figura 45. Espectros FTIR dos hidrogéis após imersão em solução SBF (1200-700 cm⁻¹): (a) 100Q/VB; (b) 90Q/VB; (c) 70Q/VB.

A formação *in vitro* da camada de HA na superfície de um material está associada à sua bioatividade e é desejável para aplicações biomédicas, principalmente para engenharia de tecido ósseo.

Análise por Difração de Raios-X (DRX)

Na Figura 45 são mostrados os padrões DRX das amostras antes e depois de 1 e 28 dias de imersão na solução de SBF. O padrão DRX dos hidrogéis antes da imersão mostra uma

ampla faixa de difração, típica de materiais amorfos. O difratograma dos hidrogéis sem vidro não mostram nenhuma fase nova ao longo de 28 dias de testes. No entanto, o difratograma

DRX das amostras com vidro (Fig45b,d,f) apresentaram novos picos em 32° , 45° e 56° em 28 dias. O surgimento desses picos está associado à formação da HA e confirmam a bioatividade dos hidrogéis 100Q/VB, 90Q/VB e 70Q/VB [187].

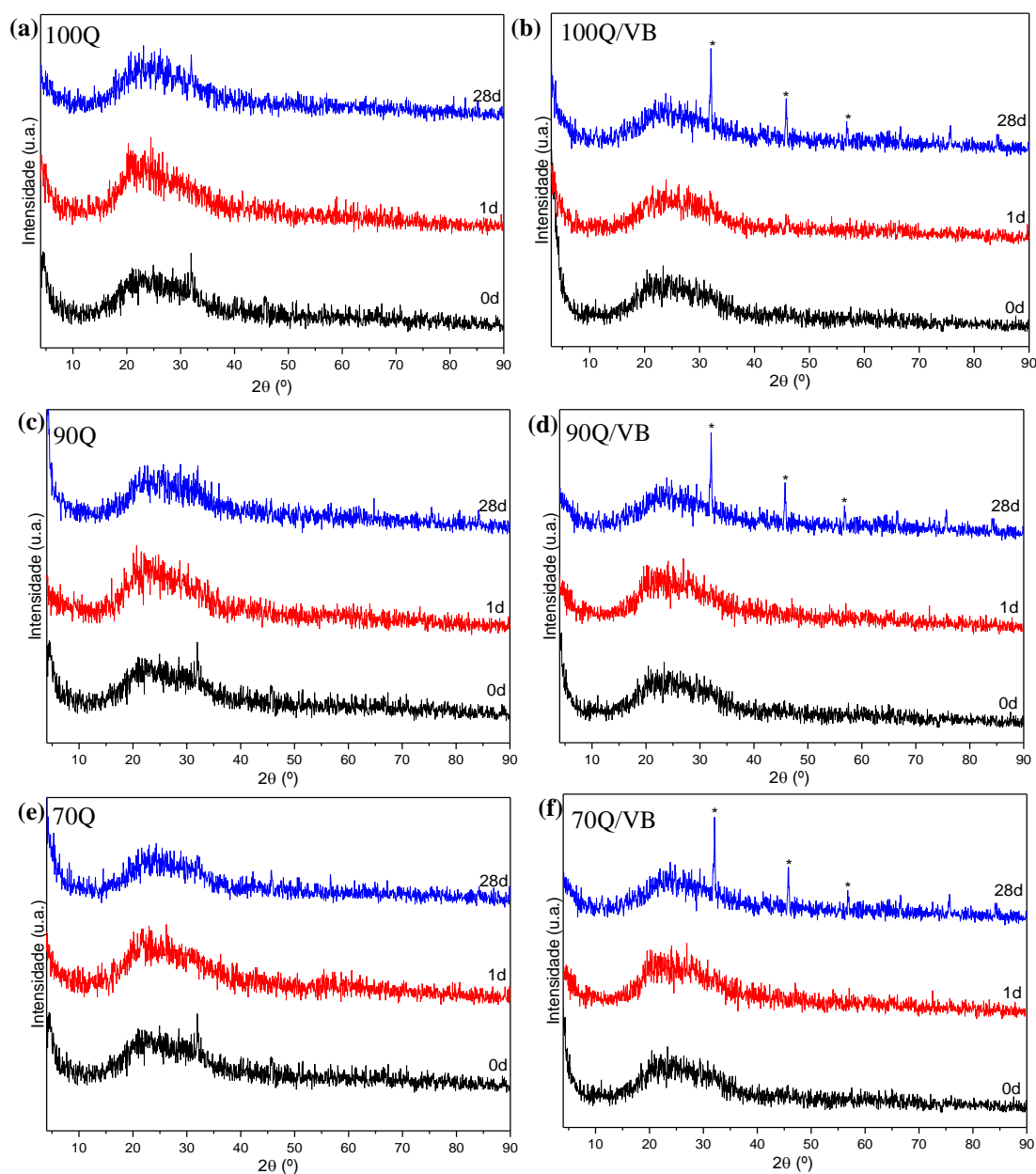


Figura 46. Padrão DRX dos hidrogéis antes e depois da imersão em SBF.

5.2.10. Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia *in vitro*

Ensaio de MTT e LIVE/DEAD

A análise de citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em termos da viabilidade celular das células HEK293 T e SAOS. Neste trabalho foram realizados ensaios de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e LIVE/DEAD®. As amostras 90Q; 90Q/VB; 70Q e 70Q/VB foram submetidas aos ensaios *in vitro*.

O ensaio de MTT é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis [35]. Conforme mostrado na Fig. 46, o ensaio MTT demonstra a natureza não tóxica dos hidrogéis produzidos frente aos tipos celulares testados. Os valores de viabilidade mantiveram-se acima de 50%, valor acima do qual os materiais são considerados não citotóxicos.

Em contato com as células HEK293 T (Fig. 46a), as amostras apresentaram viabilidade celular variando de $95 \pm 3\%$ (90Q) a $100 \pm 2\%$ (70Q/VB). Não houve diferença significativa na viabilidade celular quando comparadas ao o grupo controle. Também não foi observada diferença significativa de viabilidade entre as diferentes formulações.

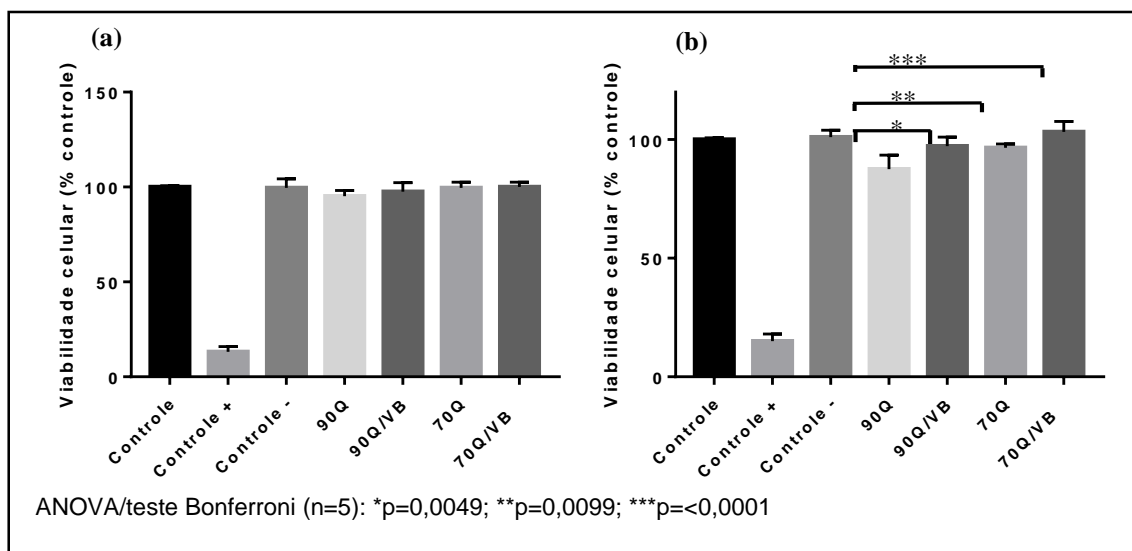


Figura 47. Viabilidade celular por MTT após 72h (a) células embrionárias de rim humano (HEK293 T) e (b) células de osteosarcoma humano (SAOS).

As amostras em contato com células SAOS (Fig. 46b) apresentaram viabilidade celular variando de $88 \pm 6\%$ (90Q) a $103 \pm 4\%$ (70Q/VB). Nenhum grupo experimental apresentou efeito tóxico para as células SAOS após 72 h de exposição. Não houve diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram comparados com o grupo controle. No entanto, em comparação com a amostra 90Q, as amostras 90Q/VB, 70Q e 70Q/VB apresentaram aumento significativo na viabilidade celular de 9,6%; 9,0% e 15,6%, respectivamente. Esses resultados iniciais *in vitro* sugerem que a adição de VB e GE pode ter promovido um microambiente relativamente superior, mais favorável para a adesão e desenvolvimento das culturas de células testadas.

Para confirmar os resultados obtidos pelo ensaio MTT, a viabilidade celular também foi avaliada por meio do ensaio LIVE/DEAD[®]. O Kit de ensaio LIVE/DEAD[®] permite avaliar a função citoplasmática e a integridade da membrana celular. O kit utiliza uma mistura com dois marcadores: a Calceína AM e o homodímero de etídio. Quando a calceína AM atravessa a membrana de células viáveis, é hidrolisada e mostra fluorescência em comprimento de onda de 515nm. Já o homodímero de etídio fluoresce em comprimento de onda de 617nm, somente após se ligar ao DNA das células. Dessa forma, as células com membrana intacta (viáveis) são marcadas em verde fluorescente pela calceína AM, enquanto as células que apresentam danos na membrana celular (não viáveis) são marcadas em vermelho fluorescente [189].

Conforme indicado nas Fig. 47 e 48, a citotoxicidade avaliada pelo ensaio LIVE / DEAD[®] descreve o alto nível de viabilidade celular para todos os grupos experimentais. As amostras semeadas com células HEK293T (Fig.47) e SAOS (Fig.48) apresentaram fluorescência semelhante ao grupo controle, com alta fluorescência verde (células viáveis) e pouca fluorescência vermelha (células mortas).

As imagens de microscopia das células HEK 293 T (Fig.47) sem contato com os hidrogéis (grupo controle) apresentam confluência de 100%, típicas de células HEK293 T, com células arredondadas e aderidas. As células tratadas com os hidrogéis apresentaram confluência semelhante ao grupo controle. As imagens ainda mostram as regiões onde se

encontram os hidrogéis (indicadas com uma seta vermelha), evidenciando que as células HEK 293 T se aderem normalmente nas regiões próximas ao material.

As imagens de microscopia das células SAOS após contato de 72h com as amostras desenvolvidas são mostradas na Fig.48. Observa-se que, no grupo controle, as células apresentaram confluência de 100% e morfologia típicas de células SAOS. Nos grupos tratados com os hidrogéis, foi possível observar que as células também se aderem normalmente nas regiões próximas às amostras e apresentam confluência semelhante ao grupo controle.

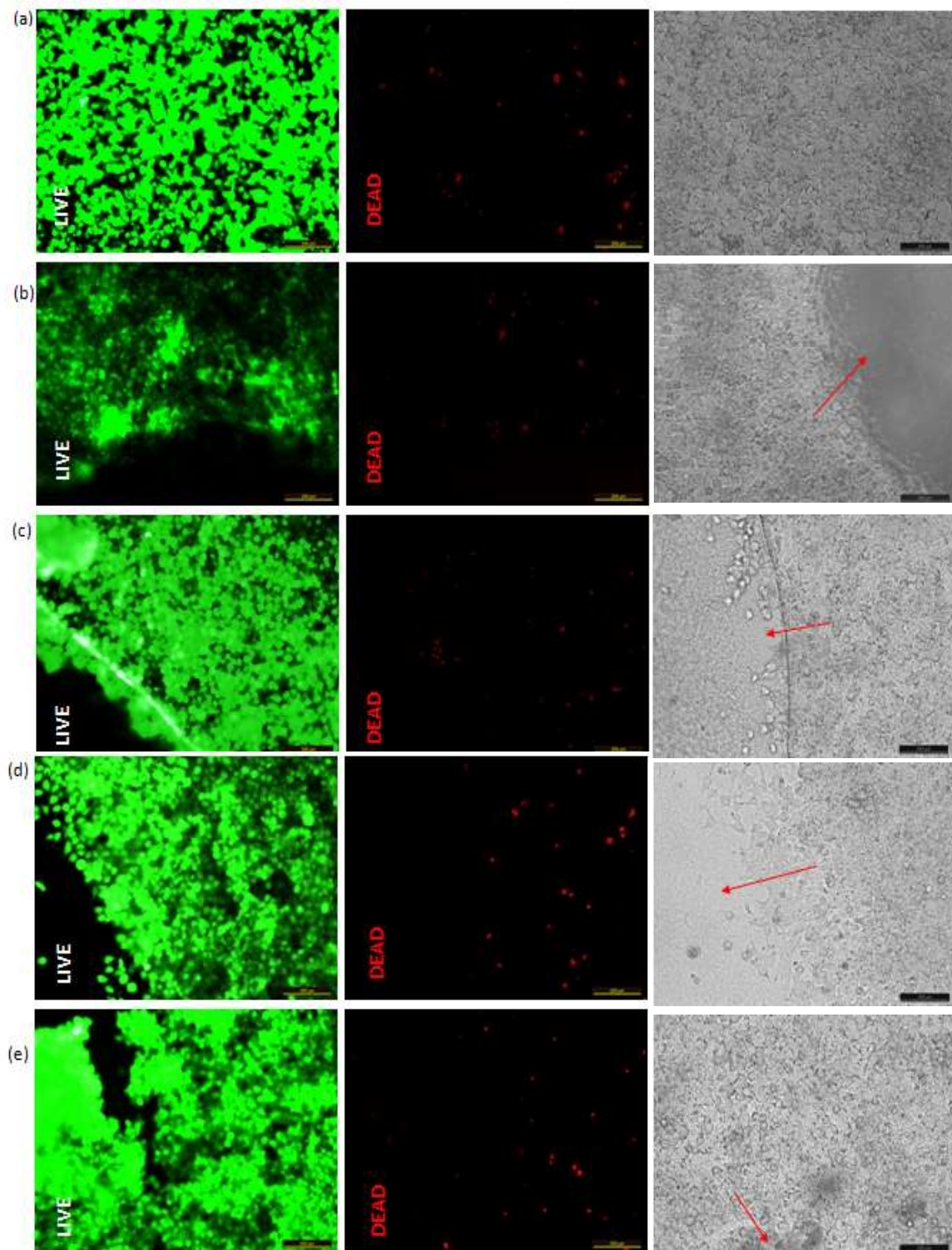


Figura 48. Imagens de microscopia de células HEK293 T pelo ensaio LIVE/DEAD. Células viáveis (fluorescência verde) e células mortas (fluorescência vermelha) após 72 h: (a) grupo controle, (b) 90Q, (c) 90Q/VB, (d) 70Q e (e) 70Q/VB. Barra de escala: 200 μm. Setas vermelhas = hidrogel, aumento 200x)

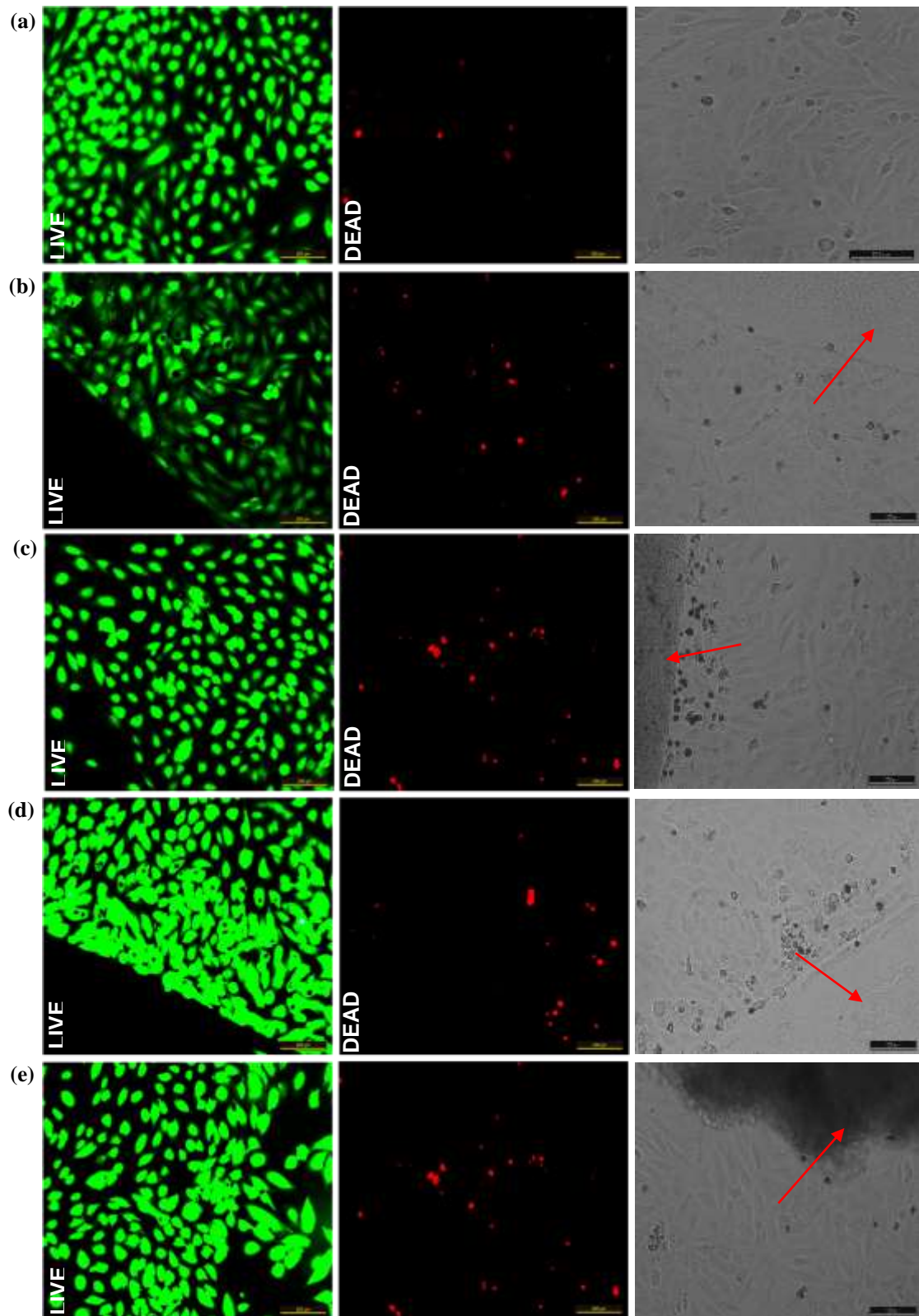


Figura 49. Imagens de microscopia de células SAOS pelo ensaio *LIVE/DEAD*. Células viáveis (fluorescência verde) e células mortas (fluorescência vermelha) após 72 h: (a) grupo controle, (b) 90Q, (c) 90Q/VB, (d) 70Q e (e) 70Q/VB. Barra de escala: 200 µm. Setas vermelhas = hidrogel, aumento 200x)

5.2.11. Caracterização biológica dos hidrogéis por metodologia *in vivo*

Avaliação da citotoxicidade *in vivo*

Para avaliar a resposta *in vivo*, os hidrogéis foram administrados por meio de injeção subcutânea no dorso de camundongos Swiss machos com o uso de uma seringa de 1 mL acoplada com uma agulha 22G. Todas as amostras puderam ser injetadas suavemente nos dorsos dos camundongos, originando uma protuberância de forma arredondada no local da injeção. Após a injeção, os camundongos retornaram às suas atividades normais e não foram observadas complicações ou sinais de reação adversa. Após 7 dias, os animais foram eutanasiados e não foram observadas alterações macroscópicas atribuídas aos hidrogéis.

A avaliação de citotoxicidade *in vivo* foi conduzida por meio da análise da área ocupada pelos hidrogéis, alterações de massa corporal e atividade das enzimas ALT/ AST. A área da protrusão formada pela injeção de hidrogel foi medida imediatamente após a injeção e ao final dos 7 dias de teste. Na Fig. 49 (a) é mostrado que a área do implante apresentou uma discreta diminuição ao longo do experimento. Essas observações podem ser indicativas de que os hidrogéis apresentaram um comportamento termorresponsivo adequado, sofrendo a transição sol-gel em condições fisiológicas e permanecendo no estado gel ao longo dos 7 dias testados. A redução da área do implante pode ser associada à degradação normal dos materiais e não mostrou diferença significativa entre as amostras. A massa corporal dos camundongos foi monitorada diariamente ao longo do período de 7 dias. Conforme mostrado na Fig. 49(b) não foram observadas alterações significativas na massa corporal após a administração subcutânea dos hidrogéis em comparação com o grupo controle, o que indica o funcionamento normal do metabolismo dos animais.

O fígado desempenha um papel fundamental no metabolismo de substâncias tóxicas e alguns parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar sua função [190]. No presente trabalho, foram feitas medições de concentração das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) no plasma (Fig.49c, d). Um aumento nos níveis séricos dessas enzimas é comumente associado a algum dano nos hepatócitos e, conseqüente, dano as funções hepáticas [191]. Os resultados não mostraram mudanças

estatisticamente significativas nos valores de concentração enzimática entre o grupo controle e os grupos experimentais. Esses resultados indicam que os hidrogéis não causaram danos às funções hepáticas dos animais testados.

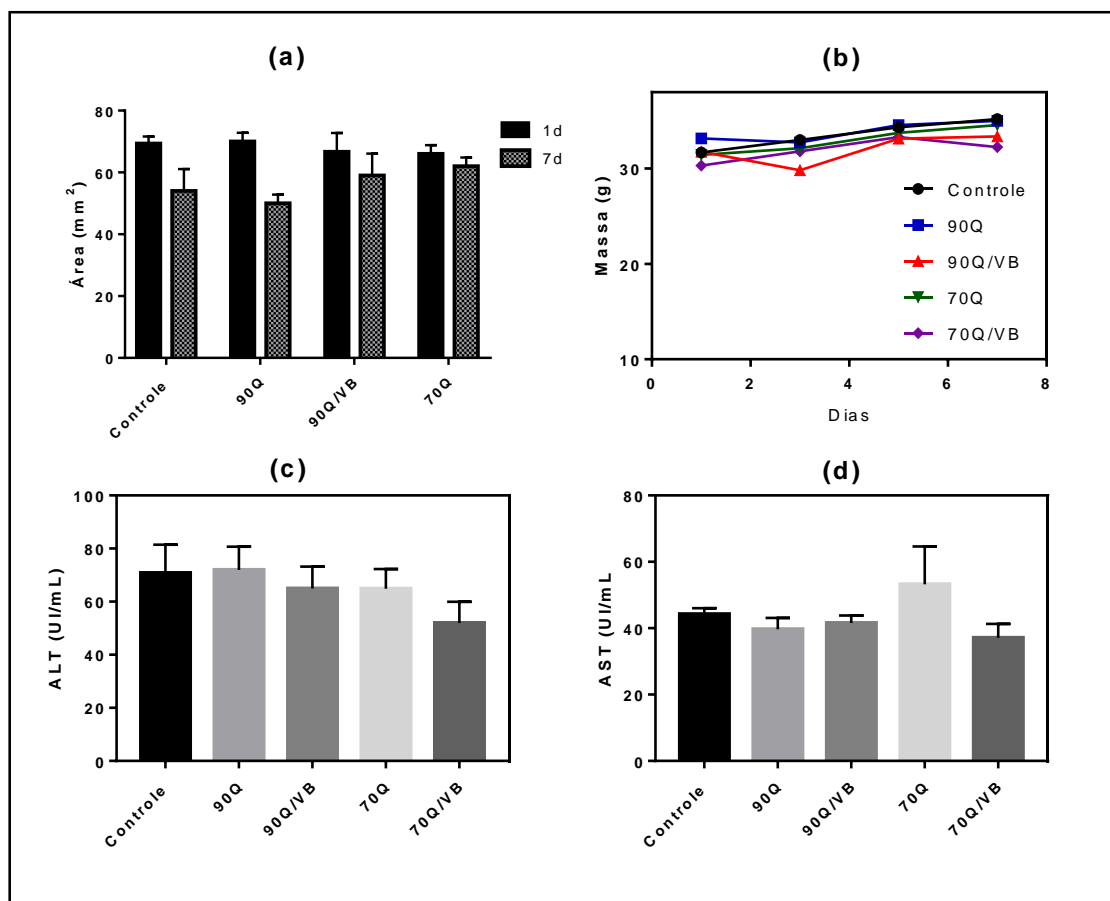


Figura 50. Efeito da injeção subcutânea dos hidrogéis em: (a) área do implante; (b) massa corporal; (c) enzima aspartate aminotransferase (AST); (d) enzima alanine aminotransferase (ALT).

A observação histológica do fígado e do tecido subcutâneo próximo ao local da injeção é mostrada nas Fig. 50 e 51. Não foram observadas mudanças notáveis na morfologia do tecido subcutâneo (Fig.50) e do fígado (Fig. 51) entre os grupos controle e experimentais. Além disso, a imagem não é característica de infiltrado inflamatório, o que confirma a biocompatibilidade *in vivo* dos hidrogéis.

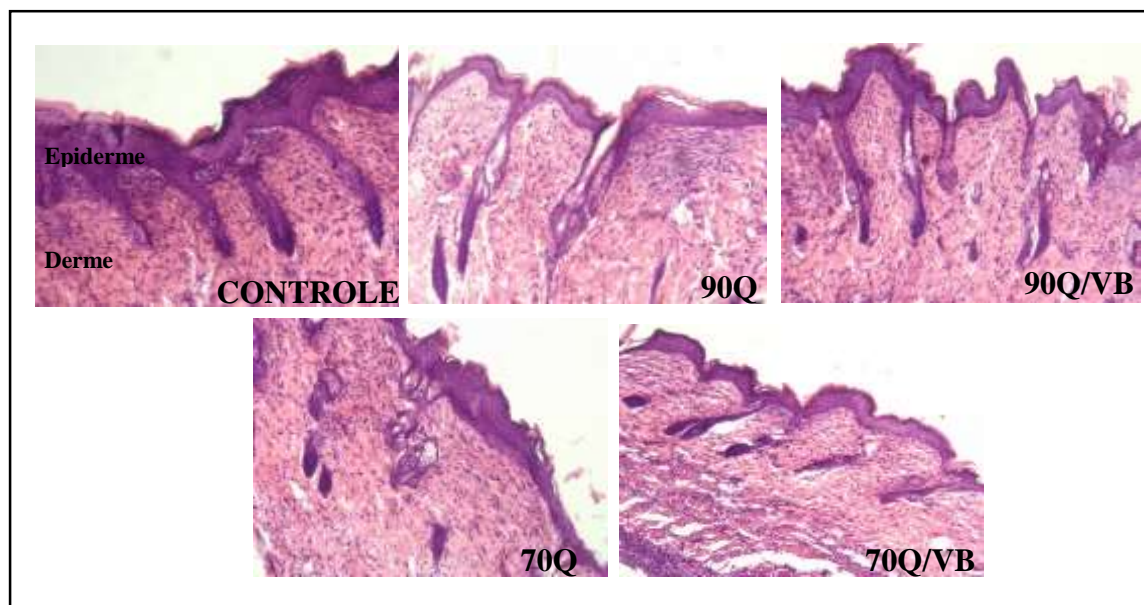


Figura 51. Corte histológico do tecido subcutâneo após 7 dias de contato com os hidrogéis.

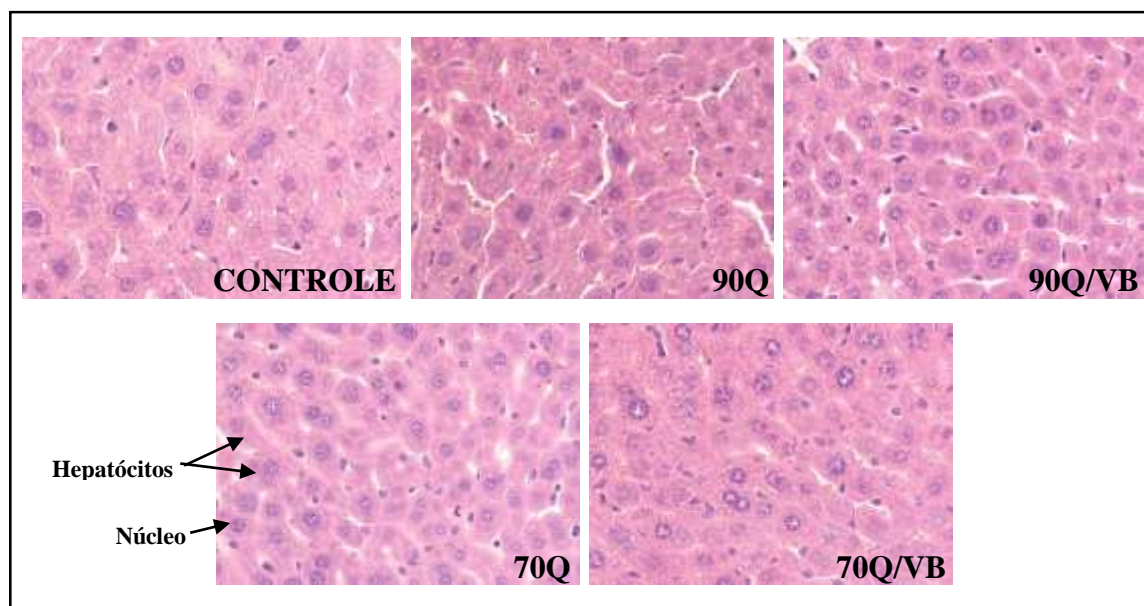


Figura 52. Corte histológico do fígado de camundongos após 7 dias de contato com os hidrogéis.

Avaliação da regeneração óssea *in vivo*

A avaliação do potencial de regeneração óssea frente aos hidrogéis foi realizada em duas etapas. Os primeiros testes *in vivo* foram realizados em parceria com o laboratório, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG. Nesta etapa, os hidrogéis 90Q, 90Q/VB, 70Q e 70Q/VB foram injetados em um defeito criado na tíbia de ratos adultos durante 7 dias. Já a segunda etapa foi realizada em parceria com o laboratório na Escola de Veterinária da UFMG. Nesta etapa, somente o hidrogel 70Q/VB foi testado em um estudo de 30 dias.

Na primeira etapa dos testes *in vivo*, os defeitos criados apresentavam 1,6mm de diâmetro e atravessavam os dois lados do osso. Ao final de 7 dias, as tíbias foram adequadamente preservadas e encaminhadas para análise de Micro-CT. Uma avaliação inicial do potencial de regeneração óssea dos hidrogéis foi realizada por meio de análise por Micro-CT. Esta técnica tornou-se uma ferramenta importante para investigar a microarquitetura do osso, pois fornece uma imagem tridimensional da microestrutura e medições precisas dos parâmetros microestruturais [7]. Na Figura 52 são mostradas, em diferentes planos de visualização, as reconstruções microtomográficas das tíbias com o modelo de defeito em estudo.

A microtomografia computadorizada de raios X (micro-CT) possibilita diferentes formas de visualização do reparo ósseo em um defeito experimental. Quando a formação de tecido é significativa, é possível verificar visualmente, por meio das imagens 2D ou 3D, o aparecimento do novo tecido. No caso dos testes realizados durante 7 dias, não foi possível essa verificação visual. Nestes casos, a técnica fornece a análise morfométrica 3D de diferentes parâmetros do tecido estudado.

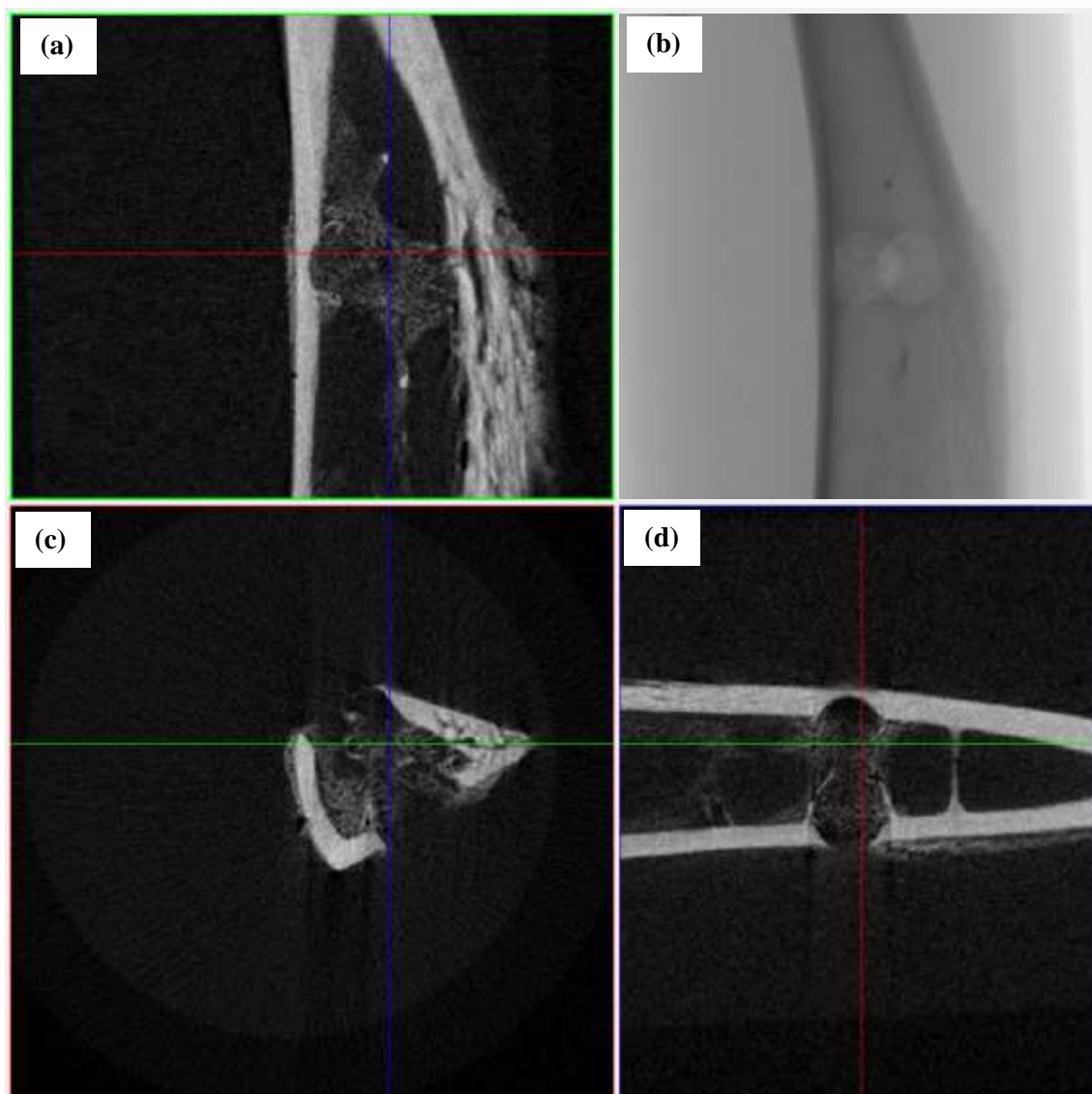


Figura 53. Visualização coronal (a), radiográfica (b), transversal (c) e sagital (d) das reconstruções microtomográficas da tíbia de rato com defeito produzido em laboratório.

Na Fig. 53 mostra os parâmetros morfológicos encontrados para os ossos tratados com os hidrogéis durante 7 dias. A porcentagem de tecido ósseo (BV/TV) corresponde a razão do volume de tecido ósseo pelo volume total analisado. Um aumento nesse valor indica a formação de um neotecido, assim como o aumento na espessura trabecular (Tb.Th); número de trabéculas (Tb.N) e densidade mineral óssea (BMD). A análise microestrutural 3D (Fig. 53) das tíbias tratadas com os hidrogéis não apresentou diferença significativa nos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle, sem injeção do material.

Portanto, a análise morfométrica dos defeitos após 7 dias de implantação não forneceu dados indicativos da formação de novo tecido mineralizado.

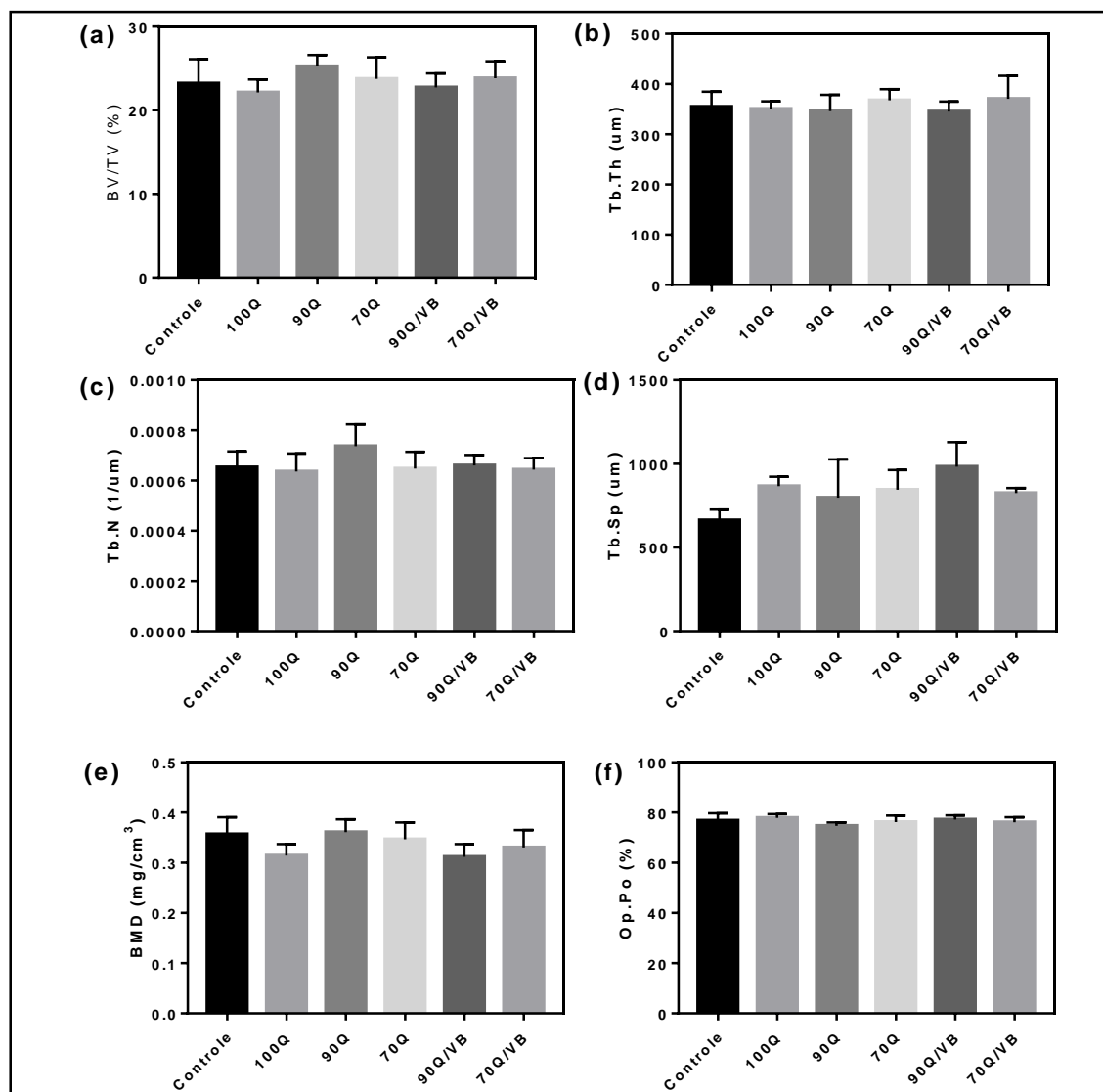


Figura 54. Parâmetros morfométricos dos ossos tratados com os hidrogéis durante 7 dias. (a) BV/TV (% tecido ósseo); (b) Tb.Th (espessura trabecular); (c) Tb.N (número de trabéculas); (d) Tb.Sp (separação trabecular); (e) BMD (densidade mineral óssea); (f) Op.Po (porosidade aberta).

Talvez o tempo de estudo não foi suficiente para verificar modificações significantes na estrutura óssea. Alguns estudos de regeneração óssea mostram um aumento significativo nos parâmetros morfométricos em tempos de implantação maiores. Midha e colaboradores [192], por exemplo, implantaram espumas de vidro bioativo (70S30C) em

defeitos na tíbia de ratos e fizeram análise após 11 semanas de estudo. Após esse período, foi possível verificar um aumento nos parâmetros medidos por Micro-CT em relação ao grupo controle. Dessa forma, os autores confirmaram o potencial de regeneração óssea da amostra, que apresentou resultados próximos ao de produtos comerciais, como Novabone[®] e Actifuse[®].

Um estudo mais prolongado (30 dias) foi realizado na segunda etapa dos ensaios *in vivo*. Nesta fase, o hidrogel 70Q/VB foi injetado em defeitos criados na tíbia de ratos (tamanho de 3mm de largura x 6mm de comprimento). Imagens do procedimento cirúrgico para criação do defeito e as imagens reconstruídas das tíbias podem ser vistas nas Fig. 54 e 55.



Figura 55. Fotografia do procedimento cirúrgico para criação de defeito ósseo para avaliação de regeneração *in vivo*.

A porcentagem de tecido ósseo (BV/TV) corresponde a uma relação volumétrica do tecido ósseo pelo volume total analisado. Ao considerar o volume total analisado, as informações fornecidas por esse valor permitem verificar a formação do novo tecido ósseo. Em conjunto com esse valor, um aumento do número de trabéculas (Tb.N) e na densidade mineral óssea (BMD) indicam a formação de tecido ósseo na área analisada.

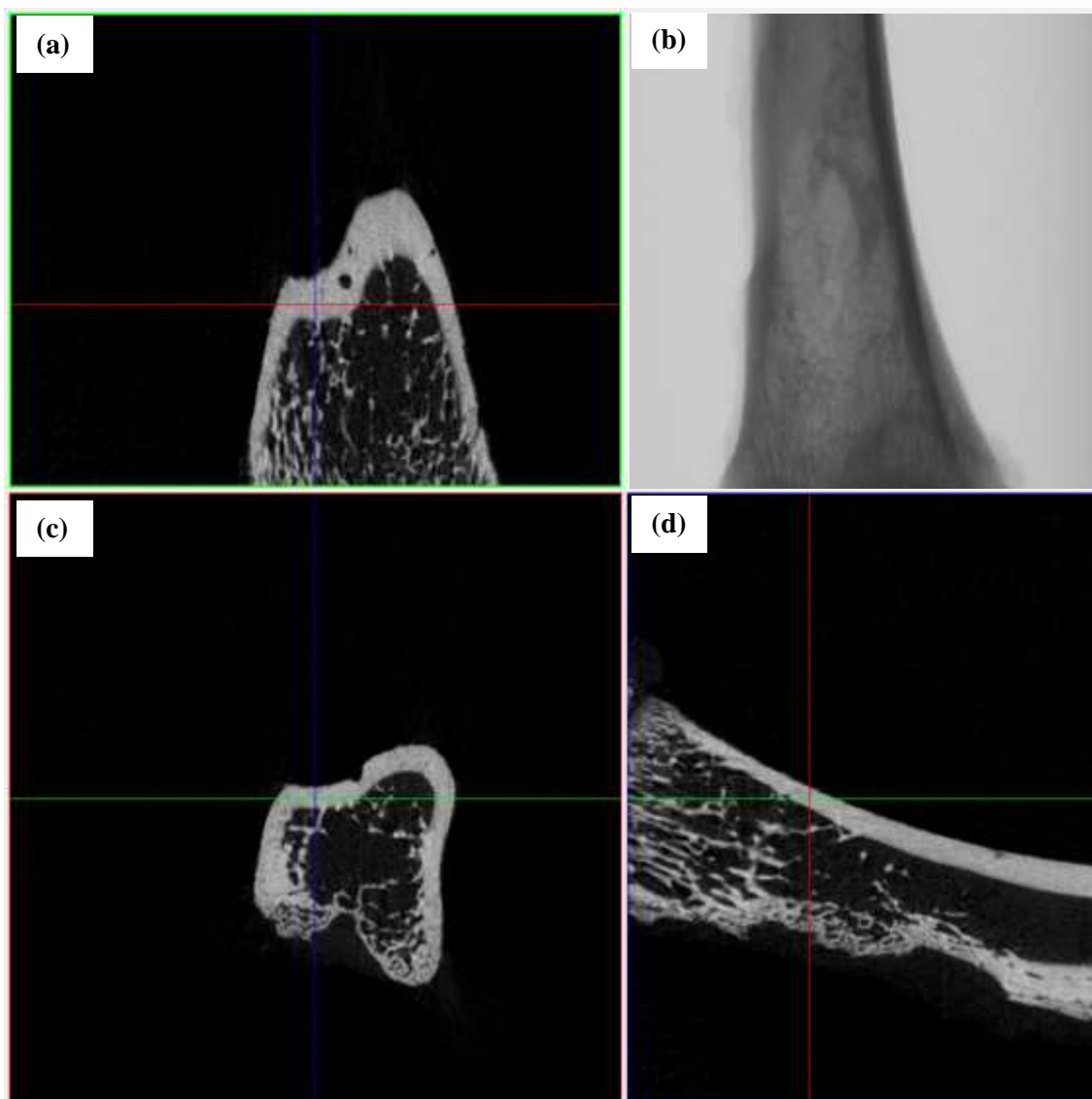


Figura 56. Visualização coronal (a), radiográfica (b), transversal (c) e sagital (d) das reconstruções microtomográficas da tíbia de rato com defeito produzido em laboratório.

Os resultados de Micro-CT para ossos tratados por 30 dias com hidrogéis 70Q/VB são mostrados na Fig. 56 e mostram um aumento nesses parâmetros quando comparados ao grupo controle. A densidade mineral óssea variou de $0,29 \pm 0,03 \text{g/cm}^3$ a $0,31 \pm 0,02 \text{g/cm}^3$ no grupo tratado com o hidrogel. Dados da literatura mostram uma grande variação nos valores de BMD, que dependerá da área analisada e das condições de saúde do órgão. Valores obtidos para área proximal e terço médio da tíbia em ratos saudáveis se encontram na faixa de $0,34 \text{g/cm}^3$ a $0,51 \text{g/cm}^3$, respectivamente [193,194]. Devido a essas

variações, a análise dos valores de BMD é geralmente feita entre o grupo controle e os experimentais, usando as mesmas condições de escaneamento e área de interesse.

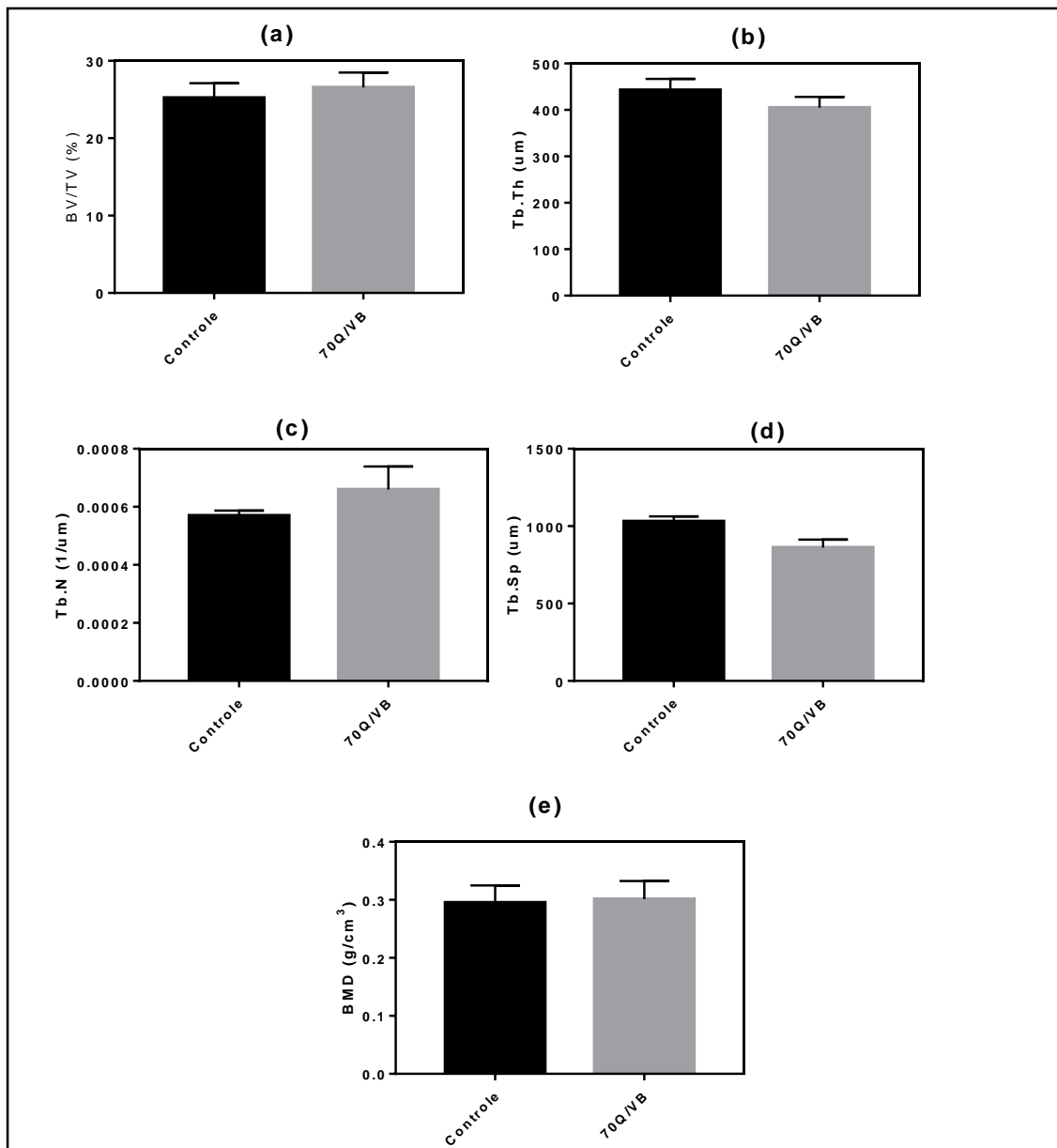


Figura 57. Parâmetros morfométricos dos ossos tratados com os hidrogéis após 30 dias: (a) BV/TV (% tecido ósseo); (b) Tb.Th (espessura trabecular); (c) Tb.N (número de trabéculas); (d) Tb.Sp (separação trabecular); (e) BMD (densidade mineral óssea).

O surgimento do novo tecido ósseo diminui o espaço entre as trabéculas, isso explica a redução observada nos valores de separação trabecular (Tb.Sp). Embora as diferenças não

tenham sido estatisticamente significantes, a visão tridimensional dos ossos reconstruídos permite observar a diferença entre os defeitos no grupo controle e no grupo experimental

Na Figura 57 são mostrados os resultados macroscópicos, em uma visão 3D dos ossos tratados. Uma imagem representativa do defeito após 2 dias (Fig. 57a) é mostrada para se verificar a evolução do defeito ósseo ao longo do experimento. Após 30 dias, é possível verificar que o defeito tratado com hidrogel (Fig.57c) encontra-se, praticamente, todo preenchido pelo novo tecido, enquanto no grupo controle (Fig. 57b) ainda é possível verificar alguns espaços vazios. Essas observações estão de acordo com a tendência observada nos resultados morfométricos, os quais sugerem que no osso tratado com hidrogel houve maior formação óssea, quando comparado com grupo controle. O potencial de regeneração óssea sugerido pela análise de Micro-CT pode ser atribuído à composição dos hidrogéis, que mimetizam o ambiente da matriz extracelular nativa (ECM). Além disso, a presença das nanopartículas de vidro bioativo promove uma sequência de reações bioquímicas na interface hidrogel/osso, podendo gerar uma regeneração mais rápida que a observada nos ossos não tratados.

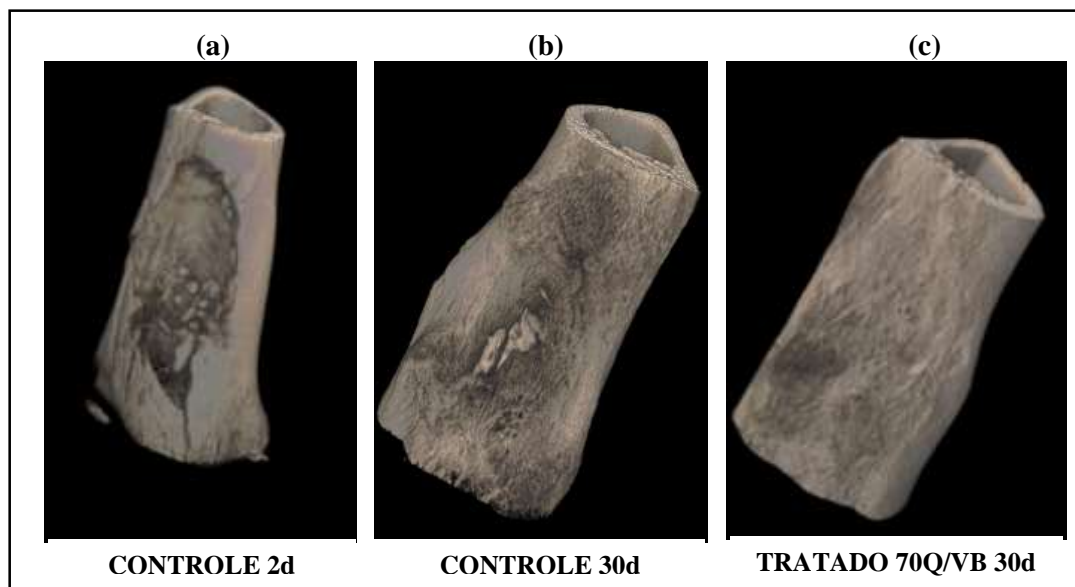


Figura 58. Imagens 3D Micro-CT dos defeitos ósseos: (a) grupo controle após 2d; (b) grupo controle após 30d; (c) grupo tratado com 70Q/VB após 30 dias.

Esses resultados preliminares indicam que os hidrogéis baseados em quitosana/gelatina/nVB apresentam potencial para serem utilizados como matrizes injetáveis temporárias para promover regeneração óssea. No entanto, estudos futuros devem ser conduzidos para caracterizar o novo tecido formado no interior dos defeitos e confirmar a formação do novo tecido ósseo.

6. CONCLUSÕES

Hidrogéis termossensíveis baseados em quitosana/gelatina/vidro bioativo foram obtidos com sucesso e caracterizados extensivamente.

A caracterização dos hidrogéis demonstrou que a adição de gelatina e vidro bioativo nas formulações modificou as interações na rede tridimensional dos materiais, que apresentaram um aumento nas propriedades elásticas.

Análise por MEV e Micro-CT revelaram a estrutura altamente porosa dos materiais, que também apresentaram uma ampla distribuição de tamanho de poros, o que pode ser um fator relevante para a migração de nutrientes e crescimento celular.

Análise de FTIR e Potencial Zeta revelaram o potencial mecanismo de gelificação das formulações propostas. As técnicas mostraram que a formação dos hidrogéis é governada pela modificação de interações eletrostáticas entre os componentes quando submetidos a um aumento de temperatura. Medidas de potencial zeta também revelaram que a carga superficial dos hidrogéis é de natureza positiva, o que pode ser um ponto positivo para a biocompatibilidade desses materiais. Como a superfície da membrana celular e alguns componentes da matriz celular é carregada negativamente, a ocorrência de interação hidrogel/hospedeiro é facilitada.

Testes de performance do processo de injeção foram realizados e avaliados em termos de seringabilidade e injetabilidade. Os resultados mostraram que os hidrogéis podem ser facilmente injetados com o auxílio de uma seringa e uma agulha de pequeno calibre, utilizando uma força considerada normal para injeção manual.

Testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* forneceram evidências que os hidrogéis não são citotóxicos. Testes *in vitro* demonstraram alta viabilidade das células testadas e testes *in vivo* mostraram que a injeção subcutânea dos materiais não provocam danos às funções normais do organismo dos animais testados.

Os ensaios de imersão em solução de SBF permitiu a avaliação do processo de degradação *in vitro*, bem como verificar a bioatividade dos hidrogéis contendo partículas de vidro bioativo. Análises dos hidrogéis após imersão e da solução de SBF revelaram a formação

de uma camada de hidroxiapatita na superfície dos materiais, comprovando sua bioatividade.

Evidências do potencial regeneração óssea dos hidrogéis foram obtidas por meio de testes *in vivo*, que mostraram um aumento da massa óssea nos defeitos onde foram aplicados os hidrogéis, quando comparado ao grupo controle.

Os hidrogéis compósitos se mostraram excelentes candidatos para utilização como matriz temporária para regeneração óssea, pois reuniram uma série de requisitos como porosidade, termossensibilidade, facilidade de injeção e bioatividade, necessários à aplicação.

7. CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

Este trabalho propôs a síntese de novos sistemas tricomponentes baseados em quitosana/gelatina/vidro bioativo para serem utilizados no tratamento de pequenos defeitos ósseos.

Os hidrogéis foram sintetizados por meio de uma rota de processamento simples, em meio aquoso e sem a utilização de reticulantes tóxicos.

Os hidrogéis apresentaram propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis para utilização como sistemas temporários para regeneração óssea.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a capacidade de incorporação e liberação de fármacos que possam estimular osteogênese.

Realizar ensaio de degradação *in vivo*.

Realizar teste de injeção *in vivo* em tempos maiores que 30 dias, para verificar a regeneração óssea a longo prazo.

Realizar análise histológica e testes de biologia molecular, como imunohistoquímica para confirmar a formação de tecido ósseo nos testes de regeneração *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS

- [1] R.L. Oréfice, M.M. Pereira, H.S. Mansur, *Conceitos Básicos de Ciência dos Materiais*, in: *Biomateriais Fundam. E Apl.*, 1st ed., Guanabara, Rio de Janeiro, 2012: p. 552.
- [2] Biomaterials Market (Cardiovascular Biomaterials, Orthopedic Biomaterials, Wound Care Biomaterials, Urological Biomaterials Plastic Surgery Biomaterials and Gastrointestinal Biomaterials) Forecast, 2016 – 2022, 2018. <http://atozresearch.com/healthcare-it/biomaterials-market-brazil-industry-perspective-by-2022/> (accessed January 22, 2018).
- [3] J.D. Kretlow, L. Klouda, A.G. Mikos, Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 263–73. doi:10.1016/j.addr.2007.03.013.
- [4] Y. Li, J. Rodrigues, H. Tomás, Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2193–2221. doi:10.1039/c1cs15203c.
- [5] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792. doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [6] J.B. Rose, S. Pacelli, A.J. El Haj, H.S. Dua, A. Hopkinson, L.J. White, F.R. a J. Rose, Gelatin-based materials in ocular tissue engineering, *Materials (Basel)*. 7 (2014) 3106–3135. doi:10.3390/ma7043106.
- [7] G.M. Campbell, A. Sophocleous, Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies, *Bonekey Rep.* 3 (2014) 1–12. doi:10.1038/bonekey.2014.59.
- [8] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [9] M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y.Y. Kim, M.J. Kaufman, E.P. Douglas, L.B. Gower, Bone structure and formation: A new perspective, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 58 (2007) 77–116. doi:10.1016/j.mser.2007.05.001.
- [10] J.G. Betts, K.A. Young, D.H. Kruse, P. DeSaix, B. Poe, O. Korol, J.A. Wise, Bone

- Tissue and the skeletal system, in: *Anat. Physiol.*, OpenStax, Houston, 2013: p. 225pp.
- [11] P. Proff, P. Römer, The molecular mechanism behind bone remodelling: A review, *Clin. Oral Investig.* 13 (2009) 355–362. doi:10.1007/s00784-009-0268-2.
- [12] N. Rucci, Molecular biology of bone remodelling, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 5 (2008) 49–56. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2781193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [13] G. Daculsi, B.H. Fellah, T. Miramond, M. Durand, Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes, *Irbm.* 34 (2013) 346–348. doi:10.1016/j.irbm.2013.07.001.
- [14] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *Eur. Spine J.* 10 (2001) S96–S101. doi:10.1007/s005860100282.
- [15] L.C.V. Reyes, *Aplicação de um vidro bioativo em túbias de coelhos*, Universidade de São Paulo, 2000.
- [16] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Crit Rev Biomed Eng.* 40 (2012) 363–408. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10.
- [17] W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact. Mater.* 2 (2017) 224–247. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- [18] T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld, Fracture healing: Mechanisms and interventions, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
- [19] A.S. Daar, The future of replacement and restorative therapies: From organ transplantation to regenerative medicine, *Transplant. Proc.* 45 (2013) 3450–3452. doi:10.1016/j.transproceed.2013.09.011.
- [20] C. Dieckmann, R. Renner, L. Milkova, J.C. Simon, Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond, *Exp. Dermatol.* 19 (2010) 697–706. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01087.x.

- [21] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today*. 14 (2011) 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [22] A. Atala, Regenerative medicine strategies, *J. Pediatr. Surg.* 47 (2012) 17–28. doi:10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013.
- [23] B. Ulery, L. Nair, C. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 49 (2011) 832–864. doi:10.1002/polb.22259.Biomedical.
- [24] D.W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12 (2001) 107–124. doi:10.1163/156856201744489.
- [25] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Scaffold design for tissue engineering, *Macromol. Biosci.* 2 (2002) 67–77. doi:10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
- [26] J. Park, R.S. Lakes, Tissue Engineering Materials and Regeneration, in: J. Park, R.S. Lakes (Eds.), *Biomater. - An Introd.*, 3 rd, Springer, New York, 2007: pp. 485–515.
- [27] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *Int. J. Polym. Sci.* (2011) 1–19. doi:10.1155/2011/290602.
- [28] Y.J. Seol, D.Y. Park, J.Y. Park, S.W. Kim, S.J. Park, D.W. Cho, A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 1444–1455. doi:10.1002/bit.24794.
- [29] M. Peroglio, L. Gremillard, J. Chevalier, L. Chazeau, C. Gauthier, T. Hamaide, Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating, *J. Eur. Ceram. Soc.* 27 (2007) 2679–2685. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2006.10.016.
- [30] K.M. Park, K.D. Park, Injectable Hydrogels: Properties and Applications, *Encycl. Polym. Sci. Technol.* (2017) 1–16. doi:10.1002/0471440264.pst663.
- [31] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [32] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Hydrogels and their medical applications, *Nucl.*

- Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms. 151 (1999) 56–64. doi:10.1016/S0168-583X(99)00118-4.
- [33] H. Omidian, K. Park, Hydrogels, in: J. Siepmann, R. Siegel, M. Rathbone (Eds.), *Fundam. Appl. Control. Release Drug Deliv.*, Springer, New York, 2012: pp. 75–106. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9_5.
- [34] S.K. Gulrez, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, in: A. Carpi (Ed.), *Prog. Mol. Environ. Bioeng. – From Anal. Model. to Technol. Appl.*, In Tech, 2011: pp. 117–150. <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications>.
- [35] K. Pal, A.K. Banthia, D.K. MAJUMDAR, Polymeric Hydrogels : Characterization and Biomedical Applications – A mini review, *Des. Monomers Polym.* 12 (2009) 197–220.
- [36] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 18–23. doi:10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [37] R.S. Hiratsuka, C.V. Santilli, S.H. Pulcinelli, O processo sol-gel: uma visão físico-química, *Quim. Nova.* 18 (1995) 171–180.
- [38] M.C. Koetting, J.T. Peters, S.D. Steichen, N. a. Peppas, Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications, *Mater. Sci. Eng. R.* 93 (2015) 1–49. doi:10.1016/j.mser.2015.04.001.
- [39] M. a. Ward, T.K. Georgiou, Thermoresponsive polymers for biomedical applications, *Polymers (Basel).* 3 (2011) 1215–1242. doi:10.3390/polym3031215.
- [40] M.I. Gibson, R.K. O'Reilly, To aggregate, or not to aggregate? considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7204–13. doi:10.1039/c3cs60035a.
- [41] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Mater. Sci. Eng. C.* 57 (2015) 414–433. doi:10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [42] D.J. Phillips, M.I. Gibson, Towards being genuinely smart: “isothermally-responsive” polymers as versatile, programmable scaffolds for biologically-

- adaptable materials, *Polym. Chem.* 6 (2015) 1033–1043. doi:10.1039/C4PY01539H.
- [43] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 49–60. doi:10.1016/j.addr.2012.09.024.
- [44] S. Dhivya, S. Saravanan, T.P. Sastry, N. Selvamurugan, Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo, *J. Nanobiotechnology.* 13 (2015) 40. doi:10.1186/s12951-015-0099-z.
- [45] E. Ruel-Gariépy, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta, J.-C. Leroux, Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules., *J. Control. Release.* 82 (2002) 373–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175750>.
- [46] H.Y. Zhou, Y.P. Zhang, W.F. Zhang, X.G. Chen, Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1643–1651. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.022.
- [47] E. Ruel-Gariépy, J.C. Leroux, In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 409–426. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.019.
- [48] R.F.S. Freitas, E.L. Cussler, Temperature Sensitive Gels as Size Selective Absorbants, *Sep. Sci. Technol.* 22 (1987) 911–919. doi:10.1080/01496398708068989.
- [49] K. Na, J.H. Park, S.W. Kim, B.K. Sun, D.G. Woo, H.-M. Chung, K.-H. Park, Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF β -3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes, *Biomaterials.* 27 (2006) 5951–5957. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.012.
- [50] S. Chen, H. Zhong, B. Gu, Y. Wang, X. Li, Z. Cheng, L. Zhang, C. Yao, Thermosensitive phase behavior and drug release of in situ N-isopropylacrylamide copolymer, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 2199–2204. doi:10.1016/j.msec.2012.05.052.
- [51] L. Klouda, A.G. Mikos, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications,

- Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 34–45. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.025.
- [52] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*. 21 (2000) 2155–61. doi:10.1016/S0142-9612(00)00116-2.
- [53] F. Ganji, M.J. Abdekhodaie, a. Ramazani S.A., Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 42 (2007) 47–53. doi:10.1007/s10971-006-9007-1.
- [54] H.Y. Zhou, X.G. Chen, M. Kong, C.S. Liu, D.S. Cha, J.F. Kennedy, Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 265–273. doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.026.
- [55] R.C. Goy, O.B.G. Assis, S.P.C. Campana-Filho, Produção de esferas de quitosana, *Rev. Biotecnol. Ciência E Desenvolv.* (2004) 30–34.
- [56] E. Khor, L.Y. Lim, Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*. 24 (2003) 2339–2349. doi:10.1016/S0142-9612(03)00026-7.
- [57] K.N. Aye, W.F. Stevens, Improved chitin production by pretreatment of shrimp shells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79 (2004) 421–425. doi:10.1002/jctb.990.
- [58] R. SPIN-NETO, C. PAVONE, R.M. de FREITAS, R.A.C. MARCANTONIO, E. MARCANTONIO-JÚNIOR, Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica : revisão de literatura, *Odontol. Da.* 37 (2008) 155–161. <http://www.hostcentral.com.br/rou/PDF/v37n2a09.pdf>.
- [59] M.B. Cardoso, Contribuição ao estudo da reação de desacetilação da quitina: estudos da desacetilação assistida por ultrassom de alta potência, Universidade de São Paulo, 2008.
- [60] E.D.S. Costa Junior, H.S. Mansur, Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido., *Quim. Nova*. 31 (2008) 1460–1466.
- [61] H. Zhang, Y. Li, X. Zhang, B. Liu, H. Zhao, D. Chen, Directly determining the molecular weight of chitosan with atomic force microscopy, *Front. Nanosci.*

- Nanotechnol. 2 (2016) 123–127. doi:10.15761/FNN.1000121.
- [62] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.
- [63] T.-L. Yang, Chitin-based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ., *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 1936–63. doi:10.3390/ijms12031936.
- [64] J. Kumirska, M.X. Weinhold, J. Thöming, P. Stepnowski, Biomedical activity of chitin/chitosan based materials- influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-Acetylation, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 1875–1901. doi:10.3390/polym3041875.
- [65] A.P. M. Camacho, M.O.C. Rocha, J. . . E. Brauer, A. Z.G. Verdugo, Chitosan composite films: Thermal , structural , mechanical and antifungal properties, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 305–315. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.069.
- [66] J.K. Suh, H.W. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review., *Biomaterials*. 21 (2000) 2589–2598. doi:10.1016/S0142-9612(00)00126-5.
- [67] I.-Y. Kim, S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim, C.-S. Cho, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications., *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 1–21. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.009.
- [68] H. Honarkar, M. Barikani, Applications of biopolymers I: Chitosan, *Monatshefte Fur Chemie*. 140 (2009) 1403–1420. doi:10.1007/s00706-009-0197-4.
- [69] M. Kucharska, B. Butruk, K. Walenko, T. Brynk, T. Ciach, Fabrication of in-situ foamed chitosan/ β -TCP scaffolds for bone tissue engineering application, *Mater. Lett.* 85 (2012) 124–127. doi:10.1016/j.matlet.2012.07.002.
- [70] S.C. Neves, L.S. Moreira Teixeira, L. Moroni, R.L. Reis, C. a Van Blitterswijk, N.M. Alves, M. Karperien, J.F. Mano, Chitosan/poly(E-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair., *Biomaterials*. 32 (2011) 1068–79. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.073.
- [71] V.T. Tchemtchoua, G. Atanasova, A. Aqil, P. Filée, N. Garbacki, O.

- Vanhootehem, C. Deroanne, A. Noël, C. Jérôme, B. Nusgens, Y. Poumay, A. Colige, Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 3194–3204. doi:10.1021/bm200680q.
- [72] W. Xiao, X.Y. Hu, W. Zeng, J.H. Huang, Y.G. Zhang, Z.J. Luo, Rapid sciatic nerve regeneration of rats by a surface modified collagen-chitosan scaffold, *Injury*. 44 (2013) 941–946. doi:10.1016/j.injury.2013.03.029.
- [73] F. Chen, M. Tian, D. Zhang, J. Wang, Q. Wang, X. Yu, X. Zhang, C. Wan, Preparation and characterization of oxidized alginate covalently cross-linked galactosylated chitosan scaffold for liver tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 32 (2012) 310–320. doi:10.1016/j.msec.2011.10.034.
- [74] L. Upadhyaya, J. Singh, V. Agarwal, a. C. Pandey, S.P. Verma, P. Das, R.P. Tewari, Efficient water soluble nanostructured ZnO grafted O-carboxymethyl chitosan/curcumin-nanocomposite for cancer therapy, *Process Biochem*. 50 (2015) 678–688. doi:10.1016/j.procbio.2014.12.029.
- [75] A. Khandtragool, S. Ausayakhun, P. Leesawat, C. Laokul, R. Molloy, Chitosan as an ocular drug delivery vehicle for vancomycin, *J. Appl. Polym. Sci.* 122 (2011) 3160–3167. doi:10.1002/app.
- [76] R. Chen, G. Wang, C. Chen, H. Ho, Development of N , O- (Carboxymethyl) chitosan / Collagen Matrixes as a Wound Dressing, (2006) 1058–1064.
- [77] S.Y. Ong, J. Wu, S.M. Moochhala, M.H. Tan, J. Lu, Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials*. 29 (2008) 4323–4332. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.034.
- [78] X. Feng, X. Lu, D. Huang, J. Xing, G. Feng, G. Jin, X. Yi, L. Li, Y. Lu, D. Nie, X. Chen, L. Zhang, Z. Gu, X. Zhang, 3D porous chitosan scaffolds suit survival and neural differentiation of dental pulp stem cells, *Cell. Mol. Neurobiol*. 34 (2014) 859–870. doi:10.1007/s10571-014-0063-8.
- [79] J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, Y. Jiao, J.Z. Shi, Effect of magnesia on the degradability and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ system glasses, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 81 (2010) 87–95.

- [80] I.C. Carvalho, H.S. Mansur, Engineered 3D-scaffolds of photocrosslinked chitosan-gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressings and regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 78 (2017) 690–705. doi:10.1016/j.msec.2017.04.126.
- [81] F. Han, X. Yang, J. Zhao, Y. Zhao, X. Yuan, Photocrosslinked layered gelatin-chitosan hydrogel with graded compositions for osteochondral defect repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015). doi:10.1007/s10856-015-5489-0.
- [82] J. Mota, N. Yu, S.G. Caridade, G.M. Luz, M.E. Gomes, R.L. Reis, J. a Jansen, X.F. Walboomers, J.F. Mano, Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration, *Acta Biomater.* 8 (2012) 4173–4180. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.040.
- [83] C.O. Correia, Á.J. Leite, J.F. Mano, Chitosan/bioactive glass nanoparticles scaffolds with shape memory properties, *Carbohydr. Polym.* 123 (2015) 39–45. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.076.
- [84] C.D.F. Moreira, S.M. Carvalho, H.S. Mansur, M.M. Pereira, Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 58 (2016) 1207–1216. doi:10.1016/j.msec.2015.09.075.
- [85] Y. Liu, L. Ma, C. Gao, Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 32 (2012) 2361–2366. doi:10.1016/j.msec.2012.07.008.
- [86] S.J. Florczyk, K. Wang, S. Jana, D.L. Wood, S.K. Sytsma, J.G. Sham, F.M. Kievit, M. Zhang, Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM, *Biomaterials*. 34 (2013) 10143–10150. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.034.
- [87] H. Park, B. Choi, J. Hu, M. Lee, Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4779–4786. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.033.
- [88] M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen structure and stability, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 929–958. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- [89] I. Brand, F. Habecker, M. Ahlers, T. Klüner, Structure of collagen adsorbed on a

- model implant surface resolved by polarization modulation infrared reflection–absorption spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 138 (2015) 216–224. doi:10.1016/j.saa.2014.11.031.
- [90] Christine Z. Alvarado, Casey M. Owens, Poultry: Chemistry and Biochemistry, in: Y.H. Hui, F. Sherkat (Eds.), *Handb. Food Sci. Technol. Eng.*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 2005: p. 31.5-31.6. doi:0849398479.
- [91] B. Brodsky, A. V Persikov, Molecular structure of the collagen triple helix, *Adv. Protein Chemistry.* 70 (2005) 301–339. doi:10.1016/S0065-3233(04)70009-1.
- [92] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, Collagens--structure, function, and biosynthesis., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1531–1546.
- [93] Proto-col world, What Is Collagen? (2014). <http://www.protocol.com/blog/2014/07/collagen/> (accessed February 20, 2015).
- [94] M.G. Patino, M.E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, R.E. Cohen, Collagen : An Overview, *Implant Dent.* 11 (2002) 280–285. doi:10.1097/01.ID.0000019547.50849.3B.
- [95] R.C. Prestes, S.M. Golunski, G. Toniazzo, A.P. Kempka, M. Di Luccio, Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado, *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais.* 15 (2013) 375–382.
- [96] S.K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D.L. Kaplan, E. Chiellini, C. van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7147. doi:10.1039/c2cs35094g.
- [97] R. Schrieber, H. Gareis, From collagen to gelatin, in: *Gelatine Handb. Theory Ind. Pract.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007: pp. 1–334. doi:978-3-527-61097-6.
- [98] S. Gorgieva, V. Kokol, Collagen-vs. Gelatin-Based Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives, in: *Biomater. Appl. Nanomedicine*, 2011: pp. 17–51. doi:10.5772/24118.
- [99] A.P. Kempka, S.M.A.G.U. De Souza, A.A.U. De Souza, R.C. Prestes, D. Ogliari, Influence of bloom number and plastifiers on gelatin matrices produced for enzyme immobilization, *Brazilian J. Chem. Eng.* 31 (2014) 95–108.

- [100] H.T. Peng, L. Martineau, P.N. Shek, Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 997–1007. doi:10.1007/s10856-007-0167-5.
- [101] R. Lopez-cebral, M. Martín-pastor, J. Evelin, G. Konat, B. Seijo, Chemically Modified Gelatin as Biomaterial in the Design of New Nanomedicines, *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 7 (2011) 145–154.
- [102] D. Nadeem, M. Kiamehr, X. Yang, B. Su, Fabrication and in vitro evaluation of a sponge-like bioactive-glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33 (2013) 2669–78. doi:10.1016/j.msec.2013.02.021.
- [103] S. Van Vlierberghe, E. Vanderleyden, V. Boterberg, P. Dubruel, Gelatin functionalization of biomaterial surfaces: Strategies for immobilization and visualization, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 114–130. doi:10.3390/polym3010114.
- [104] A. Ito, A. Mase, Y. Takizawa, M. Shinkai, H. Honda, K.-I. Hata, M. Ueda, T. Kobayashi, Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering., *J. Biosci. Bioeng.* 95 (2003) 196–199. doi:10.1263/jbb.95.196.
- [105] a. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, N. Roveri, Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking, *Biomaterials*. 22 (2001) 763–768. doi:10.1016/S0142-9612(00)00236-2.
- [106] A.O. Elzoghby, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research, *J. Control. Release*. 172 (2013) 1075–1091. doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.019.
- [107] M.C. Chang, W.H. Douglas, Cross-linkage of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite using imide-based zero-length cross-linker, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 2045–2051. doi:10.1007/s10856-007-3152-0.
- [108] A.A. Haroun, H.H. Beherei, M.A.A. El-Ghaffar, Preparation, Characterization, and In Vitro Application of Composite Films Based on Gelatin and Collagen from Natural Resources, *J. Appl. Polym. Sci.* 116 (2010) 2083–2094.

doi:10.1002/app.31714.

- [109] T. Qu, X. Liu, Nano-Structured Gelatin/Bioactive Glass Hybrid Scaffolds for the Enhancement of Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells., *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* 1 (2013) 4764–4772. doi:10.1039/C3TB21002B.
- [110] S. Wang, G. Zhao, Quantitative characterization of the electrospun gelatin-chitosan nanofibers by coupling scanning electron microscopy and atomic force microscopy, *Mater. Lett.* 79 (2012) 14–17. doi:10.1016/j.matlet.2012.03.044.
- [111] Y.H. Cheng, S.H. Yang, F.H. Lin, Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of ferulic acid for nucleus pulposus regeneration, *Biomaterials.* 32 (2011) 6953–6961. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.065.
- [112] Y. Wang, X. Guo, R. Pan, D. Han, T. Chen, Z. Geng, Y. Xiong, Y. Chen, Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: A new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity, *Mater. Sci. Eng. C.* 53 (2015) 222–228. doi:10.1016/j.msec.2015.04.031.
- [113] F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. Song, S. Li, Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material, *Int. J. Pharm.* 476 (2014) 124–133. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.036.
- [114] a Sola, D. Bellucci, V. Cannillo, a Cattini, Bioactive glass coatings: a review, *Surf. Eng.* 27 (2011) 560–572. doi:10.1179/1743294410Y.0000000008.
- [115] J.R. Jones, New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1275–1281. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.003.
- [116] N. Letaïef, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, P. Boullay, Investigation of the surfactant type effect on characteristics and bioactivity of new mesoporous bioactive glass in the ternary system SiO₂–CaO–P₂O₅: Structural, textural and reactivity studies, *Microporous Mesoporous Mater.* 195 (2014) 102–111. doi:10.1016/j.micromeso.2014.03.035.
- [117] P. Saravanapavan, J.R. Jones, R.S. Pryce, L.L. Hench, Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂)

- and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O), *J. Biomed. Mater. Res. A.* 66 (2003) 110–119. doi:10.1002/jbm.a.10532.
- [118] M.M. Pereira, L.L. Hench, Bioactive Glass, in: G.E. Wnek, G.L. Bowlin (Eds.), *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2004: pp. 53–62. doi:10.1081/E-EBBE.
- [119] J.R. Jones, Review of bioactive glass : From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457–4486.
- [120] P.N. Gunawidjaja, R. Mathew, a. Y.H. Lo, I. Izquierdo-Barba, a. Garcia, D. Arcos, M. Vallet-Regi, M. Eden, Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1376–1399. doi:10.1098/rsta.2011.0257.
- [121] L.L. Hench, The story of Bioglass, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967–78. doi:10.1007/s10856-006-0432-z.
- [122] J. Román, S. Padilla, M. Vallet-Regí, Sol - Gel Glasses as Precursors of Bioactive Glass Ceramics, *Chem. Mater.* 15 (2003) 798–806. doi:10.1021/cm021325c.
- [123] A.A.R. Oliveira, D.A. de Souza, L.L.S. Dias, S.M. de Carvalho, H.S. Mansur, M. de M. Pereira, Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications., *Biomed. Mater.* 8 (2013) 25011. doi:10.1088/1748-6041/8/2/025011.
- [124] R.A. Martin, S. Yue, J. V. Hanna, P.D. Lee, R.J. Newport, M.E. Smith, J.R. Jones, Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1422–1443. doi:10.1098/rsta.2011.0308.
- [125] K. Rath, Novel Materials from Solgel Chemistry, *Sci. Technol. Rev.* May (2005) 24–26. <https://str.llnl.gov/index.html>.
- [126] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69. doi:10.1016/0021-9797(68)90272-5.
- [127] P. Valerio, M.M. Pereira, A.M. Goes, M.F. Leite, The effect of ionic products from

- bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production, *Biomaterials*. 25 (2004) 2941–2948. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.086.
- [128] S.K. Misra, D. Mohn, T.J. Brunner, W.J. Stark, S.E. Philip, I. Roy, V. Salih, J.C. Knowles, A.R. Boccaccini, Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass® composites, *Biomaterials*. 29 (2008) 1750–1761. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.040.
- [129] J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 964–973. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.017.
- [130] L.-C. Gerhardt, K.L. Widdows, M.M. Erol, C.W. Burch, J. a Sanz-Herrera, I. Ochoa, R. Stämpfli, I.S. Roqan, S. Gabe, T. Ansari, A.R. Boccaccini, The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds., *Biomaterials*. 32 (2011) 4096–108. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.032.
- [131] D. Arcos, C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system, *Biomaterials*. 22 (2001) 701–708. doi:10.1016/S0142-9612(00)00233-7.
- [132] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system, *J. Control. Release*. 110 (2006) 522–530. doi:10.1016/j.jconrel.2005.11.002.
- [133] C. Soundrapandian, A. Mahato, B. Kundu, S. Datta, B. Sa, D. Basu, Development and effect of different bioactive silicate glass scaffolds: In vitro evaluation for use as a bone drug delivery system, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater*. 40 (2014) 1–12. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.08.007.
- [134] A.A.R. de Oliveira, Nova Metodologia de obtenção de nanopartículas de vidro bioativo, poliuretanas biodegradáveis e seus compósitos para aplicações biomédicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. doi:10.1590/S0103-56652008000200018.
- [135] C.G.T. Neto, J. a. Giacometti, a. E. Job, F.C. Ferreira, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira, Thermal Analysis of Chitosan Based Networks, *Carbohydr. Polym*. 62 (2005) 97–103. doi:10.1016/j.carbpol.2005.02.022.

- [136] G.O. Kim, N. Kim, D.Y. Kim, J.S. Kwon, B.H. Min, An electrostatically crosslinked chitosan hydrogel as a drug carrier, *Molecules*. 17 (2012) 13704–13711.
- [137] J. Cho, M.-C. Heuzey, A. Bégin, P.J. Carreau, Physical gelation of chitosan in the presence of beta-glycerophosphate: the effect of temperature., *Biomacromolecules*. 6 (2005) 3267–75. doi:10.1021/bm050313s.
- [138] H.L.R. Alves, L. a Dos Santos, C.P. Bergmann, Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 2241–2246. doi:10.1007/s10856-007-3329-6.
- [139] J. Wu, Z.G. Su, G.H. Ma, A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate, *Int. J. Pharm.* 315 (2006) 1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.045.
- [140] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*. 27 (2006) 2907–2915.
- [141] Y. Pakzad, F. Ganji, Thermosensitive hydrogel for periodontal application: in vitro drug release, antibacterial activity and toxicity evaluation., *J. Biomater. Appl.* 30 (2016) 919–929. doi:10.1177/0885328215614191.
- [142] G.F. da Silva, *Qualidade óssea trabecular: caracterização por microtomografia 3D por raio-x*, Universidade de São Paulo, 2008.
- [143] D.M. Hashim, Y.B.C. Man, R. Norakasha, M. Shuhaimi, Y. Salmah, Z.A. Syahariza, Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins, *Food Chem.* 118 (2010) 856–860. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.049.
- [144] W.W. Thein-Han, J. Saikhun, C. Pholpramoo, R.D.K. Misra, Y. Kitiyanant, Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3453–3466. doi:10.1016/j.actbio.2009.05.012.
- [145] S.N. Alhosseini, F. Moztarzadeh, M. Mozafari, S. Asgari, M. Dodel, A. Samadikuchaksaraei, S. Kargozar, N. Jalali, Synthesis and characterization of

- electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 25–34. doi:10.2147/IJN.S25376.
- [146] A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, C.J. Kennedy, T.J. Wess, Molecular interactions in collagen and chitosan blends, *Biomaterials*. 25 (2004) 795–801. doi:10.1016/S0142-9612(03)00595-7.
- [147] H.S. Mansur, E.S. Costa-Júnior, A.A.P. Mansur, E.F. Barbosa-Stancioli, Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 1574–1583. doi:10.1016/j.msec.2008.12.012.
- [148] S. Hermanto, L.O. Sumarlin, W. Fatimah, Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis, *J. Food Pharm. Sci.* 1 (2013) 68–73.
- [149] L. Li, L. Chen, H. Shi, X. Chen, W. Lin, Evaluation of mesoporous bioactive glass (MBG) as adsorbent for removal of methylene blue (MB) from aqueous solution, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 1451–1459. doi:10.1016/j.jece.2016.01.039.
- [150] A. Lucas-Girot, F.Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, M. Le Floch, Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅: Comparison with melting method, *J. Non. Cryst. Solids*. 357 (2011) 3322–3327. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2011.06.002.
- [151] O. Peitl Filho, G.P. Latorre, L.L. Hench, Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5, *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 509–514. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199604)30:4<509::AID-JBM9>3.0.CO;2-T.
- [152] H.S. Mansur, H.S. Costa, Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications, *Chem. Eng. J.* 137 (2008) 72–83. doi:10.1016/j.cej.2007.09.036.
- [153] S.M.L. Silva, C.R.C. Braga, M.V.L. Fook, C.M.O. Raposo, L.H. Carvalho, E.L. Canedo, Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites, in: T. Theophile (Ed.), *Infrared Spectrosc. - Mater. Sci. Eng. Technol.*, In Tech, Rijeka, 2012: pp. 43–62. doi:10.5772/35522.

- [154] W.-M. Li, D.-M. Liu, S.-Y. Chen, Amphiphilically-modified gelatin nanoparticles: Self-assembly behavior, controlled biodegradability, and rapid cellular uptake for intracellular drug delivery, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 12381. doi:10.1039/c1jm10188a.
- [155] A.A.R. Oliveira, V.S. Gomide, M. de F. Leite, H.S. Mansur, M. de M. Pereira, Effect of Polyvinyl Alcohol Content and After Synthesis Neutralization on Structure, Mechanical Properties and Cytotoxicity of Sol-Gel Derived Hybrid Foams, *Mater. Res.* 12 (2009) 239–244. doi:10.1590/S1516-14392009000200021.
- [156] M. Liu, Y. Zhou, Y. Zhang, C. Yu, S. Cao, Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 186–191. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.03.003.
- [157] X. Wang, X. Li, X. Wang, J. Lu, H. Zhao, X. Zhang, Z. Gu, Investigation of a Collagen-Chitosan-Hydroxyapatite System for Novel Bone Substitutes, in: X. Zhang, X. Li, H. Fan, X. Liu (Eds.), *Bioceram.* 19, TTP USA, Chengdu, 2007: pp. 415–418.
- [158] H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar, Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis, *Polym. Degrad. Stab.* 130 (2016) 1–9. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.016.
- [159] D. Naskar, S.C. Kundu, N. Rachel James, Fabrication of cationized gelatin nanofibers by electrospinning for tissue regeneration, (n.d.). doi:10.1039/c5ra10384c.
- [160] A.A.R. De Oliveira, B.B. De Carvalho, M. Sander Mansur, Herman Magalhães Pereira, Synthesis and characterization of bioactive glass particles using an ultrasound-assisted sol-gel process: Engineering the morphology and size of sonogels via a poly(ethylene glycol) dispersing agent, *Mater. Lett.* 133 (2014) 44–48. doi:10.1016/j.matlet.2014.06.092.
- [161] B.R. Barrioni, A.C. Oliveira, M. de F. Leite, M. de M. Pereira, Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8904–8927. doi:10.1007/s10853-017-0944-6.

- [162] J. Zawadzki, H. Kaczmarek, Thermal treatment of chitosan in various conditions, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 394–400. doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.037.
- [163] M. Nieto-Suárez, M.A. López-Quintela, M. Lazzari, Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly, *Carbohydr. Polym.* 141 (2016) 175–183. doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.064.
- [164] A.M. El-Kady, M.M. Farag, Bioactive Glass Nanoparticles as a New Delivery System for Sustained 5-Fluorouracil Release: Characterization and Evaluation of Drug Release Mechanism, *J. Nanomater.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/839207.
- [165] R.G. Hill, J.T. Pembroke, P. V. Hatton, Influence of sodium oxide content on bioactive glass composite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 697–701. doi:10.1023/A.
- [166] R. Czechowska-biskup, D. Jarosińska, B. Rokita, P. Ulański, J.M. Rosiak, Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparizon of methods, *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.* XVII (2012) 5–20.
- [167] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel-derived 58S Bioactive Glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 734–40. doi:10.1002/jbm.0000.
- [168] J. Ajita, S. Saravanan, N. Selvamurugan, Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 53 (2015) 142–149. doi:10.1016/j.msec.2015.04.041.
- [169] G.M. Luz, J.F. Mano, Chitosan/bioactive glass nanoparticles composites for biomedical applications, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 1–9. doi:10.1088/1748-6041/7/5/054104.
- [170] J.B. Rose, S. Pacelli, A.J. El Haj, H.S. Dua, A. Hopkinson, L.J. White, F.R.A.J. Rose, Gelatin-based materials in ocular tissue engineering, *Materials (Basel)*. 7 (2014) 3106–3135. doi:10.3390/ma7043106.
- [171] S.M. Ahsan, C.M. Rao, The role of surface charge in the desolvation process of gelatin: Implications in nanoparticle synthesis and modulation of drug release, *Int.*

- J. Nanomedicine. 12 (2017) 795–808. doi:10.2147/IJN.S124938.
- [172] M. Lavertu, D. Filion, M.D. Buschmann, Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation, *Biomacromolecules*. 9 (2008) 640–650. doi:10.1021/bm700745d.
- [173] L. Hu, Z. Mao, C. Gao, Colloidal particles for cellular uptake and delivery, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 3108. doi:10.1039/b815958k.
- [174] N. Eslahi, F. Dadashian, N. Hemmati Nejad, M. Rabiee, Evaluation of wool nanoparticles incorporation in chitosan/gelatin composite films, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014) 1–10. doi:10.1002/app.40294.
- [175] S. Kim, M.E. Nimni, Z. Yang, B. Han, Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 75 (2005) 442–450. doi:10.1002/jbm.b.30324.
- [176] C.M. Murphy, M.G. Haugh, F.J. O'Brien, The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering., *Biomaterials*. 31 (2010) 461–6. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- [177] M. Peter, N.S. Binulal, S.V. Nair, N. Selvamurugan, H. Tamura, R. Jayakumar, Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering, *Chem. Eng. J.* 158 (2010) 353–361. doi:10.1016/j.cej.2010.02.003.
- [178] L. Li, P.M. Thangamathesvaran, C.Y. Yue, K.C. Tam, X. Hu, Y.C. Lam, Gel network structure of methylcellulose in water, *Langmuir*. 17 (2001) 8062–8068. doi:10.1021/la010917r.
- [179] Y.H. Cheng, S.-H. Yang, W.-Y. Su, Y.-C. Chen, K.-C. Yang, W.T.-K. Cheng, S.-C. Wu, F.-H. Lin, Thermosensitive Chitosan – Gelatin – Glycerol Phosphate Hydrogels as a Cell Carrier for Nucleus Pulposus Regeneration: An In Vitro Study, *Tissue Eng. Part A*. 16 (2010) 695–703.
- [180] C. Xin, W. Lihong, L. Qiuyuan, L. Hongzhuo, Injectable long-term control-released in situ gels of hydrochloric thiothixene for the treatment of schizophrenia: Preparation, in vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* 469 (2014) 23–30.

doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.044.

- [181] F. Cilurzo, F. Selmin, P. Minghetti, M. Adami, E. Bertoni, S. Lauria, L. Montanari, Injectability evaluation: an open issue., *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 604–9. doi:10.1208/s12249-011-9625-y.
- [182] V. Burckbuchler, G. Mekhloufi, A.P. Giteau, J.L. Grossiord, S. Huille, F. Agnely, Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76 (2010) 351–356. doi:10.1016/j.ejpb.2010.08.002.
- [183] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151–157. doi:10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::AID-JBM1001>3.0.CO;2-D.
- [184] I. Christodoulou, L.D.K. Buttery, P. Saravanapavan, G. Tai, L.L. Hench, J.M. Polak, Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 74 (2005) 529–537. doi:10.1002/jbm.b.30249.
- [185] D.S. Couto, Z. Hong, J.F. Mano, Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles., *Acta Biomater.* 5 (2009) 115–23. doi:10.1016/j.actbio.2008.08.006.
- [186] T. Martins, C.D.F. Moreira, E.S. Costa-Júnior, M.M. Pereira, In vitro degradation of chitosan composite foams for biomedical applications and effect of bioactive glass as a crosslinker, *Biomed. Glas.* 4 (2018) 45–56.
- [187] F. Pishbin, V. Mouriño, S. Flor, S. Kreppel, V. Salih, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini, Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Bioactive Glass/Chitosan Composite Coatings for Orthopaedic Implants, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 8796–8806. doi:10.1021/am5014166.
- [188] A.P. Hurt, A.K. Kotha, V. Trivedi, N.J. Coleman, Bioactivity, biocompatibility and antimicrobial properties of a chitosan-mineral composite for periodontal tissue regeneration, *Polímeros.* 25 (2015) 311–316. doi:10.1590/0104-1428.1835.
- [189] M.A. Martín-Piedra, I. Garzón, A.C. Oliveira, C.A. Alfonso-Rodríguez, V.S.

- Carriel Araya, G. Scionti, M. Alaminos, Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures, *Cytherapy*. 16 (2014) 266–277. <http://hdl.handle.net/1854/LU-4251631%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.016>.
- [190] L.N. Andrade, R.G. Amaral, G. Anne, A. Dória, C.S. Fonseca, T. Kayane, R. Luiz, C. Albuquerque, S.M. Thomazzi, In Vivo Anti-Tumor Activity and Toxicological Evaluations of Perillaldehyde 8 , 9-Epoxyde , a Derivative of Perillyl Alcohol, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–11. doi:10.3390/ijms17010032.
- [191] X. Yang, L.K. Schnackenberg, Q. Shi, W.F. Salminen, Hepatic toxicity biomarkers, in: R.C. Gupta (Ed.), *Biomarkers Toxicol.*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2014: pp. 241–259. doi:10.1016/B978-0-12-404630-6.00013-0.
- [192] A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves, Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan, *Tissue Eng. Part B Rev.* 17 (2011) 331–347. doi:10.1089/ten.teb.2010.0704.
- [193] V.B. Andrade, Avaliação de biocompósitos baseados no hialuronato de sódio e nos nanotubos de carbono em um modelo experimental de osteoporose, Universidade Federalde Minas Gerais, 2016.
- [194] M.J. Falcai, A. Zamarioli, G.B. Leoni, M.D. De Sousa Neto, J.B. Volpon, Swimming activity prevents the unloading induced loss of bone mass, architecture, and strength in rats, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 8p. doi:10.1155/2015/507848.