Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Síntese e caracterização de membranas biopoliméricas
híbridas contendo apatitas e nanopartículas de prata”**

Lucas Fabrício Bahia Nogueira

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

VERSÃO CORRIGIDA

**“Síntese e caracterização de membranas biopoliméricas
híbridas contendo apatitas e nanopartículas de prata”**

Lucas Fabrício Bahia Nogueira

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Nogueira, Lucas Fabrício Bahia

Síntese e caracterização de membranas biopoliméricas híbridas contendo apatitas e nanopartículas de prata. Ribeirão Preto, 2019.

127 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Materiais híbridos. 2. Membranas biopoliméricas. 3. Colágeno hidrolisado. 4. Polissacarídeos. 5. Hidroxiapatita. 6. Nanopartículas de prata

“While there's life, there is hope.”

(Stephen Hawking)

Aos meus avós, José Raphael e Alaíde (in memoriam), meus maiores exemplos de fé, amor, humildade e doação ao próximo.

Aos meus pais, Mário e Cláudia, pelo apoio incondicional, amor, carinho, dedicação e amparo durante os estudos.

Agradecimentos

A Deus por se fazer presente em todos os dias da minha vida, iluminando, abençoando e guiando os meus caminhos na busca de um futuro melhor.

À minha família, pelas orações e por todo carinho e amor. Agradecimento especial aos meus pais Cláudia e Mário, meu avô José Raphael, meu irmão Paulo, meu tio Rogério, minha tia Telma e meus primos Pedro e Clara, pela educação, pelos ensinamentos por todo apoio e compreensão e, também, pelas palavras de incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida! Obrigado por sempre estarem comigo, seja nos momentos de escolhas, de comemorações, de conquistas, de não era para ser ou até mesmo de receio.

À Brenda Flávio Murari, pelo amor, apoio, carinho, amizade, dedicação, compreensão e paciência. Agradeço pela força e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, de modo especial, os bons, pois eles se tornaram os melhores por estar ao seu lado.

À minha orientadora, professora Ana Paula Ramos, pela oportunidade que me foi concedida, confiança e pelo estímulo em crescer a cada dia, permitindo me tornar uma pessoa e um profissional melhor! Sou grato pelos sete anos que se passaram! Agradeço pela paciência e carinho, e também, pela liberdade em apoiar minhas escolhas e por estar sempre presente quando parece que deu tudo errado.

Aos meus amigos especiais e companheiros de laboratório Camila Bussola Tovani e Marcos Antônio Eufrásio Cruz, pelo carinho, apoio, companheirismo e amizade tão valiosa. Obrigado pela paciência, pelos os ensinamentos e por sempre contribuírem para a minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço também pelas conversas, conselhos, risadas, pelo ombro amigo e, principalmente, por todos os momentos que compartilhamos nesses 7 anos, pois trouxeram um pouco mais de alegria à minha vida. Vou levá-los para sempre no coração, onde quer que eu vá! Foi muito bom estar com vocês nessa caminhada! Aos amigos e companheiros atuais e, também, aos que já se foram do Laboratório de Físico-química de Superfícies e Coloides: Larissa, Lucas Urbano, João Pedro, Guilherme, Débora, Hiskell, Marco Aurélio, Rafael, Tamires, Thaís, Vanessa, Anna Beatriz, Gília, Maike e Cláudio Ferreira. Obrigado a todos pela amizade, companheirismo e união! Agradeço as conversas, risadas, a companhia mais que agradável e por tornarmos muito mais do que um simples grupo de pesquisa. Obrigado pelo carinho, pela alegria e pelo ambiente de trabalho prazeroso que criamos! Guardo vocês no coração!

Às minhas mais que amigas Letícia, Fernanda, Luiza, Luana, Natalí, Wendy, Flávia, Glaucia e Bianca por fazerem parte da história da minha vida.

Aos meus especiais amigos, Camila Marchioni, Thiago Jorge, Caroline Grecco e Mateus Figueiredo, pela inestimável amizade construída ao longo desses últimos dois anos, que trouxe muita alegria, companheirismo, gordices, diversões e aventuras para nossas vidas.

À professora Délia Rita Tapia Blácido e seu aluno de mestrado Guilherme José Aguilar, pela colaboração tanto na realização de testes mecânicos de tração quanto na discussão dos dados obtidos.

Ao Laboratório do Professor Pietro Ciancaglini e ao doutorando Marcos Antônio Eufrásio Cruz pela colaboração em realizar testes de cultura de osteoblastos *in vitro*.

À Professora Marcia Eliana da Silva Ferreira (Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP – USP) pela colaboração e solicitude em me ensinar a realizar os testes de atividade antimicrobiana e discutir os resultados obtidos.

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado (Processos 131166/2017-4 e 2016/25955-1, respectivamente)

Sumário

1.	Introdução	4
1.1	Biomateriais	4
1.2	Tecido ósseo	5
1.2.1	Engenharia de tecido ósseo	6
1.2.2	Resistência mecânica do tecido ósseo	8
1.3	Matrizes biopoliméricas em dispositivos para regeneração óssea	11
1.3.1	Colágeno	12
1.3.2	Quitosana	14
1.3.3	Carragenana	16
1.4	Uso de biominerais na regeneração de tecidos mineralizados	18
1.5	Incorporação de nanopartículas de prata em biomateriais	21
2.	Objetivos.....	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3.	Materiais e Métodos	25
3.1	Materiais	25
3.2	Metodologia	25
3.2.1	Caracterização dos constituintes da matriz orgânica	25
3.2.2	Preparo dos hidrogéis	26
3.2.3	Preparo e incorporação da fase inorgânica	27
3.2.4	Preparo do SBF	29
3.3	Caracterização das membranas biopoliméricas e híbridas	30
3.3.1	Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade	30
3.3.2	Estudo <i>in vitro</i> das propriedades de intumescimento e degradabilidade das membranas híbridas	30
3.3.3	Caracterização da composição química e estrutural	31
3.3.4	Caracterização da morfologia das membranas híbridas	31
3.3.5	Avaliação das propriedades mecânicas	32
3.3.6	Molhabilidade e energia livre de superfície	32
3.3.7	Cultura de osteoblastos <i>in vitro</i>	33
3.3.8	Incorporação das nanopartículas de prata (NpAg) nas membranas híbridas.....	34

4.	Resultados e Discussão	38
4.1	Caracterização dos constituintes da matriz orgânica	38
4.2	Análise da fase inorgânica na ausência da matriz biopolimérica	43
4.3	Caracterização físico-química das membranas híbridas	50
4.4	Avaliação das propriedades mecânicas das membranas híbridas	81
4.5	Avaliação das propriedades de intumescimento e degradabilidade das membranas híbridas	88
4.6	Caracterização das propriedades de superfície das membranas híbridas	94
4.7	Avaliação da toxicidade das membranas híbridas em cultura de osteoblastos	101
4.8	Incorporação das nanopartículas de prata (NpAg) nas membranas híbridas	106
4.8.1	Caracterização das NpAg sintetizadas	106
4.8.2	Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas híbridas contendo NpAg	108
4.8.3	Estudo da liberação das NpAg a 37°C por Espectroscopia UV/VIS	115
5.	Conclusão.....	118
6.	Referências	122

Resumo

Materiais bioativos têm a capacidade de interagir com tecidos naturais, provocando reações que favorecem o desenvolvimento de processos como fixação e biodegradação do material implantado, além de regeneração de tecidos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho está relacionado ao desenvolvimento de novos biomateriais, os quais foram obtidos a partir de combinações de fases orgânicas e inorgânicas em escala nanométrica, resultando em propriedades aprimoradas, como bioatividade, hidrofiliabilidade, resistência mecânica e biodegradabilidade. Foram sintetizadas e caracterizadas membranas autossuportadas constituídas por blendas biopoliméricas reforçadas com fosfato de cálcio. Essas blendas foram preparadas a partir da mistura, nas proporções 2,5:2,5 e 3,5:1,5 % (p/v), entre colágeno hidrolisado e polissacarídeos, como quitosana e κ -carragenana devido as suas notáveis propriedades e a sua semelhança com constituintes da matriz extracelular óssea nativa. A incorporação da fase inorgânica composta por fosfato de cálcio na matriz orgânica se deu por meio de três metodologias diferentes: (1) Precipitação *in locu* nos interstícios da matriz biopolimérica; (2) Adição das nanopartículas previamente sintetizadas; (3) Adição de hidroxiapatita bovina na matriz biopolimérica. A partir dos resultados obtidos por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e difração de raios X (DRX), observou-se que as membranas híbridas formados a partir da metodologia (1), resultaram em deposição homogênea e contínua de HAp por toda a matriz biopolimérica. Como consequência, o módulo de Young desses materiais híbridos foi o maior em relação aos valores obtidos para as suas respectivas matrizes biopoliméricas na ausência do mineral, como indicado pelo aumento do módulo de Young até 130% para membranas compostas por quitosana e até 115% para as membranas contendo κ -carragenana. Verificou-se que a redução da concentração de polissacarídeo na composição das blendas, afeta significativamente o módulo de Young e a taxa de degradação das membranas híbridas em solução salina tamponada de fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) a 37°C. Além disso, foi observado que as membranas compostas por quitosana apresentam menor taxa de degradação quando comparadas as membranas híbridas compostos por κ -carragenana. A incorporação da fase mineral resultou em aumento da hidrofiliabilidade e energia livre de superfície. A exposição das membranas híbridas ao fluido corporal simulado (SBF, do inglês *Simulated body fluid*) resultou na deposição de uma camada de fosfato de cálcio sobre a superfície das amostras. A resposta biológica dessas membranas foi avaliada por cultura de osteoblastos, indicando que os materiais contendo quitosana não são tóxicos. No entanto, o mesmo não foi observado para amostras contendo κ -carragenana, pois essas membranas, devido a elevada taxa de degradação, apresentam baixa estabilidade e integridade no meio de cultura celular. Nanopartículas de prata (NpAg), com tamanho variando de 3-9 nm, foram sintetizadas e incorporadas nas membranas híbridas obtidas pela metodologia 1. Após essa adição, observou-se uma ação antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados indicam que as membranas híbridas obtidas neste trabalho podem, potencialmente, ser usadas como membranas de regeneração tecidual guiada temporária em defeitos ósseos.

Abstract

Bioactive materials present the ability to interact with natural tissues, causing reactions that favor the development of processes such as implant and biodegradation of implanted material, as well as tissue regeneration. Thus, the objective of this study is to develop new biomaterials combining organic and inorganic phases at the nanoscale resulting in improved properties such as bioactivity, hydrophilicity, mechanical strength and biodegradation. Herein, hybrid self-supported membranes formed by polymer blends and reinforced with calcium phosphate were synthesized and characterized. These blends were prepared from the combination, in the proportions 2,5 : 2,5 and 3,5 : 1,5 wt%, between hydrolyzed collagen and polysaccharides, such as chitosan and κ -carrageenan due to its remarkable properties and its similarity to the constituents of the native extracellular matrix. The incorporation of the inorganic phase consisting of calcium phosphate in the organic matrix was performed using three different methodologies: (1) Precipitation *in locus* in the interstices of the polymer matrix; (2) Addition of previously synthesized nanoparticles; (3) Addition of bovine hydroxyapatite in polymeric matrix. From the results obtained by scanning electron microscopy (SEM), infrared vibration spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD), it was observed that the hybrid systems formed from the methodology (1) resulted in a homogeneous and continuous deposition of HAp throughout the biopolymer matrix. As a consequence, the Young's modulus of these hybrid materials was the higher in relation to the values obtained for the biopolymer matrices in the absence of the mineral, as indicated by the increase of the Young's modulus up to 130% for membranes composed by chitosan and up to 115% for the membranes containing κ -carrageenan. It was noted that the reduction of the polysaccharide concentration in the blends composition significantly affects the Young's modulus and the rate of degradation of the hybrid systems in phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C. In addition, it was observed that membranes composed of chitosan have a lower degradation rate compared to hybrid membranes composed of κ -carrageenan. The incorporation of the mineral phase resulted in increased hydrophilicity and surface free energy. Exposure of hybrid membranes to simulated body fluid (SBF) resulted in the deposition of a layer of calcium phosphate under the surface of the samples. The biological response of these membranes was assessed by culturing osteoblasts, indicating that chitosan-containing systems are non-toxic. However, the same was not observed for samples containing carrageenan, because these membranes, due to the high degradation rate, present low stability and integrity in the cell culture medium. Silver nanoparticles (NpAg), ranging in size from 3-9 nm, were synthesized and incorporated into the hybrid membranes obtained by methodology 1. After this addition, an antibacterial action against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* was observed. These results indicate that the hybrid membranes obtained in this study can potentially be used as membranes for temporary guided tissue regeneration in bone defects.

1 Introdução

1.1 Biomateriais

Um biomaterial é, por definição, constituído por uma ou combinação de substâncias, utilizado para produzir dispositivos úteis em aplicações biomédicas, de modo a atuarem sozinhos ou como parte de um sistema no controle de interações com organismos vivos, para fins terapêuticos ou diagnóstico.¹ Pode ser de natureza sintética ou natural e em contato com o sistema biológico pode ser usado permanente ou temporariamente.¹ No entanto, nenhum biomaterial abrangerá todas as aplicações e novas delas surgem com os avanços da medicina e, por essa razão, o campo continua a crescer na área da pesquisa e desenvolvimento.²

O desenvolvimento de biomateriais tem se dado no decorrer de três gerações,³ sendo que a primeira foi constituída por materiais bioinertes que exibiram uma mínima resposta tóxica do tecido hospedeiro; enquanto que a segunda foi marcada pelo desenvolvimento de materiais que interagiam com o sistema biológico promovendo uma ligação tecido/material. Já na terceira, desenvolveu-se materiais que estimulavam uma resposta celular específica em nível molecular, ou seja, materiais que possuíam a capacidade de iniciar uma resposta biológica após a implantação, tais como a adesão, proliferação e diferenciação celular, possibilitando a regeneração de um tecido danificado ou órgão inteiro.³

Nesse sentido, destaca-se que um biomaterial ideal deve apresentar características como: biocompatibilidade, não ser citotóxico, não ser carcinogênico, não provocar reações alérgicas, ter estabilidade mecânica, peso e densidade adequados, ser reprodutível e de fácil fabricação e desempenhar sua função no organismo, ou seja, serem bifuncionais. No entanto, durante o estudo dos biomateriais, algumas características são essenciais para seu sucesso do ponto de vista biológico, como a biocompatibilidade⁴ e sua bioatividade.⁵ Nessa perspectiva, vale ressaltar que o contato entre um material estranho e o tecido ou o fluido biológico desencadeia respostas imunológicas as quais se manifestam primeiramente como processos inflamatórios para a eliminação de implante. Além disso, a interação biológica induzida pelo biomaterial na interface entre o material e o tecido hospedeiro é um fator importante para o sucesso da ancoragem do implante.⁶ Sendo assim, o desempenho adequado de um biomaterial pós-implante está intimamente associado a um equilíbrio entre a biocompatibilidade, bioatividade e biofuncionalidade.⁷ Desta forma, para o

desenvolvimento dos biomateriais é necessário caracterizar detalhadamente as suas propriedades físico-químicas, estruturais e das interações da interface do biomaterial com o tecido.⁸

O desenvolvimento de biomateriais se dá em diversas áreas, dentre elas, na produção de implantes para substituições e/ou regeneração óssea.⁹ No caso de biomateriais utilizados nessa aplicação, independentemente de serem permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, necessitam ser, além de biocompatíveis e bioativos, idealmente osteoindutivos e osteocondutivos, ou seja, devem apresentar a capacidade de induzir e guiar, respectivamente, a formação do novo tecido ósseo ao longo da superfície ou dos poros do material, influenciando na diferenciação e maturação celular.⁶ Nessa perspectiva, destaca-se que os primeiros fenômenos bioquímicos necessários para o sucesso de um biomaterial ocorrem na interface material / tecido hospedeiro, colaborando com a completa aposição entre o implante e o osso (osteointegração).⁶ Dessa forma, a superfície do material é a primeira região que entra em contato com o ambiente biológico, em que o complexo conjunto de respostas e mecanismos resultará na integração entre um implante e o corpo hospedeiro. Portanto, uma resposta biológica inicial depende de suas características superficiais, sendo então fundamental otimizá-las. Nesse sentido, destaca-se que a modificação da composição química superficial por meio da incorporação de fosfato de cálcio tem sido empregada para aumentar a afinidade por substâncias polares e também para criar superfícies bioativas que simulem a composição e estrutura do tecido ósseo, uma vez que ela visa aprimorar as propriedades físico-químicas superficiais, acelerando e melhorando o processo de osseointegração.⁵

Nesse contexto, devido à complexidade das células e dos tecidos, surge uma nova abordagem denominada biomimética, a qual envolve aspectos que imitam os materiais naturais e tecidos, permitindo, assim, variações de propriedades desejáveis para um biomaterial dependendo de sua aplicação biomédica.¹⁰

1.2 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo que continuamente sofre remodelação através do acoplamento preciso e localizado da reabsorção (remoção do material envelhecido), promovida pelas células denominadas osteoclastos, com a substituição pelo novo tecido ósseo formado, decorrente da ação de células intituladas osteoblastos.^{11,12} Materialmente, é constituído, em peso, 90% pela matriz extracelular e 10% água.^{12,13} Essa matriz,

conhecida como matriz óssea, é um material híbrido orgânico-inorgânico tridimensional, que consiste em cerca de 60% de componente inorgânico e 30 % de fase orgânica.^{12,13} É reportado que a fase mineral, que está sob a forma de hidroxiapatita carbonatada, é nucleada seletivamente e depositada na superfícies e nos interstícios de uma rede altamente ordenada formada pela a auto-organização supramolecular das cadeias de macromoléculas.¹⁴ No caso, essa fase orgânica é composta por lipídeos, uma série de proteínas não-colagênicas, como glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados, e, majoritariamente, colágeno tipo-I, organizadas tridimensionalmente em estruturas fibrosas.^{15,16}

Esse arranjo entre fases orgânica e inorgânica resulta em uma matriz óssea com uma estrutura hierárquica porosa, que suporta adesão, diferenciação e crescimento celular, e elevada resistência mecânica.¹⁴ Nessa perspectiva, vale ressaltar que o osso não é isolado no corpo e sua manutenção e função requerem uma interação próxima com os componentes celulares do corpo, incluindo osteoblastos e osteoclastos.¹² Dessa forma, o equilíbrio entre reabsorção e regeneração, denominado homeostase óssea, nesse tecido calcificado promovido pela ação dessas células ósseas, que é dependente de sua fixação na matriz óssea, acarreta na capacidade de auto reparação e adaptação.^{11,12,15,16} Além disso, é apontado por Elango et al.¹¹ que a falha deste sistema pode ajudar a explicar as fraturas osteoporóticas que ocorrem, por exemplo, em mulheres pós-menopausa e idosos.

1.2.1 Engenharia de tecido ósseo

Falhas no processo de remodelação também podem ocorrer quando ocorrem lesões no tecido ósseo que envolvem perda tecidual excessiva, visto que essas lesões apresentam características morfológicas de extensão e largura que impedem a regeneração óssea espontânea, limitando, consequentemente, a capacidade de autorregeneração da matriz óssea.^{6,17}

Nessa perspectiva, surge a engenharia de tecido ósseo com o propósito de desenvolver de materiais biomédicos que sejam implantados, a fim de facilitar o crescimento e a diferenciação celular no local do tecido lesionado; devido à um trauma, tumor ou infecção; permitindo, consequentemente, o reparo desse defeito ósseo.^{18,19}

A literatura²⁰⁻²³ destaca o uso de membranas poliméricas para o favorecimento do processo de osseointegração, tendo em vista que essas ao revestirem implantes metálicos

ou, ainda, outros enxertos ósseos comerciais, como partículas de Bio-Oss, podem favorecer a integração desses materiais nos locais defeituosos ao assegurar a migração seletiva de osteoblastos e células osteogênicas que promovem, conseqüentemente, o crescimento do novo tecido na interface desses implantes. Esse procedimento auxilia na redução dos riscos de rejeição associados a implantação desses materiais sintéticos na matriz óssea.²¹

Nessa perspectiva foi desenvolvido o conceito de regeneração tecidual guiada (GTR, do inglês *guided tissue regeneration*) que envolve a colocação de uma membrana polimérica como uma barreira sobre os defeitos ósseos, para impedir que o crescimento de outros tecidos conjuntivos ou infiltrações de células indesejáveis, como as epiteliais, na área do tecido ósseo lesionado, afetando negativamente o processo de regeneração óssea.^{20,22-24} De acordo com Mota et al.,²⁰ as células epiteliais são as primeiras células a migrar para o local da lesão, tornando-se um problema, uma vez que impedem a formação óssea. Dessa forma, o uso de membranas poliméricas como barreira deve favorecer a regeneração do tecido perdido e lesado, pois promove seletivamente o repovoamento de células específicas no espaço isolado, assegurando o tempo necessário para a ocorrência da proliferação osteoblástica e, conseqüentemente, da regeneração óssea no local do defeito ósseo.^{20,22,23}

Além de fornecer função de barreira, têm-se desenvolvido membranas que desempenham uma função dupla ao promoverem a regeneração óssea guiada a partir da interface do defeito ósseo, acelerando, portanto, a ocorrência desse processo para o crescimento do novo tecido.^{20,22,23} Para isso, o material as membranas devem deve fornecer suporte mecânico, isolar e manter o espaço do defeito, possuir capacidade de excluir tecidos ou células indesejáveis, ser biocompatível, osteocondutiva, osteoindutiva, osteointegrativa e de fácil manuseio clínico.^{18-20,23}

Nesse contexto, um aspecto que deve ser destacado é que a resposta do organismo a materiais implantados envolve uma série de eventos celulares que, idealmente, culminam na completa aposição entre o implante e o osso (osteointegração).⁶ No caso de materiais utilizados nessa aplicação, além de biocompatíveis, devem ser idealmente osteoindutivos e osteocondutivos, ou seja, devem apresentar a capacidade de induzir e guiar, respectivamente, a formação do novo tecido ósseo ao longo da superfície do material, influenciando na diferenciação e maturação celular.⁶

Diante dessa perspectiva, membranas para regeneração óssea guiada tem sido desenvolvidas em diferentes estudos^{20,22} principalmente para aplicação na região óssea maxilofacial, em áreas de defeito ósseo após cisto e excisão do tumor, extração dentária e

osso alveolar deficiente para a instalação de implante. No entanto, de acordo com Kwon e Seok,²² as membranas disponíveis comercialmente para esse tipo de aplicação apresentam limitações em relação ao seu tipo de material, propriedades e preços altos. Dessa forma, tem-se estimulado a produção e estudo dessas membranas, a fim de serem obtidas com propriedades biológicas e mecânicas aprimoradas, a preços razoáveis e clinicamente controlável.²²

De acordo com Pande et al.,²¹ a formação óssea envolve osteoblastos ativos e diferenciados que induzem a síntese de matriz extracelular que suportará o processo de mineralização. Dessa forma, esses autores²¹ destacam que essa função natural dos osteoblastos pode ser influenciada pela presença de uma membrana biodegradável, pois a liberação de componentes presentes na composição das membranas poliméricas podem estimular a ação dos osteoblastos. Nessa perspectiva, os materiais poliméricos se destacam pelo fato de apresentarem a possibilidade de ser otimizada as suas características físico-químicas, de modo a controlar tanto a sua taxa de degradação quanto a sua capacidade de promover a adesão, proliferação e diferenciação das células progenitoras em osteoblastos.^{6,17} Além disso, têm-se buscado desenvolver materiais que apresentem uma taxa controlada de biodegradação, que não deve desencadear processos inflamatórios, os quais podem interferir na produção da matriz extracelular por células, para que seja eliminada a necessidade de uma cirurgia secundária para remove-lo do corpo no final do período de tratamento.^{6,17,18,22} Dessa forma, espera-se que a sua biodegradação ocorra praticamente na mesma velocidade em que o novo tecido cresce no local do defeito ósseo.^{6,17}

1.2.2 Resistência mecânica do tecido ósseo

Um dos aspectos interessantes em relação aos materiais híbridos é a possibilidade de combinarem as propriedades peculiares dos biopolímeros como a auto-organização supramolecular das cadeias, que leva à formação de uma rede altamente ordenada possibilitando a nucleação seletiva²⁵ de compostos inorgânicos sobre a superfícies e no interior da matriz orgânica resultando em um material com elevada resistência mecânica.¹⁴ Vale ressaltar que os componentes da matriz óssea têm propriedades mecânicas extremamente diferentes, enquanto a HAp é rígida e quebradiça, a fase proteica é menos rígida, mas é mais resistente do que o mineral.¹⁵ Assim, as propriedades ideais de ambos

os componentes, a rigidez e a dureza, são combinadas na formação óssea, proporcionando a esse material híbrido rigidez e resistência à fratura.¹⁵ No entanto, a peculiaridade das propriedades mecânicas desse material, não é resultante apenas da soma das contribuições individuais de cada um dos constituintes escolhidos para compor o híbrido pretendido, mas sim do sinergismo entre a fase orgânica e inorgânica.²⁶

O osso, dependendo da idade, hábitos alimentares e sexo dos indivíduos, tem módulo de elasticidade -variando entre 15 e 25 GPa, e força (estresse aplicado no início da deformação plástica) – em torno de algumas centenas de MPa e resistência à fratura entre 3-10 MPa/m.¹⁶ Embora outros materiais possam ser mecanicamente superiores, os ossos são únicos por sua capacidade de auto-reparação e adaptação, e devido a esses processos, é um material mecanicamente anisotrópico tanto no nível macroscópico (órgão) quanto no microscópico (material).¹⁵ Por estas razões, nos últimos anos, um progresso considerável tem sido feito para entender melhor as propriedades mecânicas do tecido ósseo.¹⁵

Embora alguns estudos tenham apontado que a presença de HAp no osso é fundamental para a sua rigidez, uma vez que se observou um aumento contínuo no módulo de Young à medida que as fibrilas de colágeno mineralizam, a HAp é considerado um material rígido que não é capaz de dissipar energia e, conseqüentemente, pensa-se que a matriz orgânica desempenha um papel importante neste aspecto.¹⁶

As fibrilas de colágeno de tipo I, o componente majoritário na matriz orgânica do tecido ósseo, são reticuladas a nível a partir da condensação entre os grupos prostéticos de resíduos de peptídeos específicos justapostos, e também por ligações de hidrogênio.^{15,16} Assim, essas interações por estabilizarem as moléculas de tropocolágeno, que estão formando essas fibrilas, proporcionam propriedades mecânicas ao tecido ósseo, como resistência à tração e viscoelasticidade e capacidade de dissipação de energia sob deformação mecânica.^{15,16} Além disso, tanto essas ligações cruzadas quanto as ligações de hidrogênio também estão envolvidas na capacidade dos ossos de auto-reparação e adaptação.^{15,16} Dessa forma, baseando-se nestas constatações, na literatura, essas ligações foram denominadas como ligações de sacrifício, uma vez que elas devem ser parcialmente responsáveis pela dureza do osso.¹⁶

Apesar da matriz intermolecular reticulada ser um mecanismo importante de dissipação de energia, o movimento relativo das fibrilas de colágeno mineralizadas é responsável por uma deformação temporária ou permanente no osso, uma vez que é resistido pela matriz interfibrilar de proteínas não-colagênicas em um meio aquoso presente na matriz extracelular.¹⁶ Assim, cada matriz de fibrilas, conectada por uma fase proteica

que fornece propriedades dissipativas adicionais por atuar como uma “cola”, pode torcer em uma fibra individual no momento de uma deformação.¹⁶ Dessa forma, quanto mais mecanismos de dissipação de energia existem, mais difícil é quebrar um material.^{15,16}

Neste contexto, vale destacar que proteínas não-colagênicas fosforiladas foram considerados como “colas” excelentes, visto que, em meio aquoso, os grupos fosfato carregados negativamente podem formar ligações relativamente estáveis com outros grupos fosfato e com cargas negativas em superfícies. Por exemplo, a ligação com as plaquetas de HAp presentes nos interstícios da matriz fibrilar - na presença de íons divalentes positivos como Ca^{2+} .¹⁶

Nessa perspectiva, atenção tem sido dada para o estudo de matrizes tridimensionais de polímeros para regeneração óssea, uma vez que tem sido considerada matriz ideal para mimetizar o ambiente extracelular natural do tecido a ser regenerado.¹⁷ Uma vantagem de materiais poliméricos é a possibilidade de controlar as suas características físico-químicas, de modo a controlar tanto a sua taxa de degradação quanto a sua capacidade de promover a adesão, proliferação e diferenciação das células progenitoras em osteoblastos, de modo que a biodegradação ocorra praticamente na mesmas velocidade em que o tecido cresce sob o defeito.^{6,17} Consequentemente, a vantagem de utilizar um material biodegradável é que não há necessidade de remove-lo do corpo no final do período de tratamento.⁶ No entanto, mesmo existindo grande variedade de polímeros utilizados na área de biomateriais, poucos são usados na engenharia de tecido ósseo por não satisfazerem essas características. Polímeros naturais ou biopolímeros têm sido amplamente empregados, visto que, além de sua grande variedade, apresentam em sua estrutura grupos funcionais, como hidroxilas, amins e ácidos carboxílicos, possibilitando que as cadeias poliméricas sejam modificadas, alterando suas características físico-químicas, e consequentemente, melhorando sua aplicabilidade específica. Além disso, algumas cadeias biopoliméricas possuem naturalmente grupos carregados em sua estrutura, e, dessa forma, podem ser empregadas no desenvolvimento desses biomateriais uma vez que podem mimetizar as proteínas não-colagênicas presentes na matriz orgânica do tecido ósseo.²

1.3 Matrizes biopoliméricas em dispositivos para regeneração óssea

A biocompatibilidade e a biodegradabilidade geralmente são problemas na utilização de polímeros sintéticos como biomateriais, em especial os dedicados à regeneração óssea.²⁷ No entanto, o mesmo não ocorre no uso de biopolímeros, uma vez que apresentam menor incidência de toxicidade e inflamação, principalmente, durante a sua degradação, tendo em vista à sua semelhança com os constituintes da matriz extracelular.^{18,19,28} Na verdade, a principal vantagem de usá-los, além de apresentarem grande ocorrência na natureza e serem obtidos de fonte renováveis, é o fato de serem facilmente reconhecidos e metabolizados pelo corpo humano, podendo ser degradados enzimaticamente por qualquer parte do corpo.^{17,29}

Apesar desses benefícios, sua fragilidade mecânica, quando comparada a do material polimérico sintético, e a baixa adesão celular ainda são consideradas como atributos indesejáveis.^{6,28,29} Nesse sentido, pesquisadores tem procurado trabalhar na melhoria das propriedades mecânicas e biológicas de biomateriais biopoliméricas, por meio de diferentes combinações e proporções entre biopolímeros. Nestas combinações, denominadas blendas, ocorre apenas interações físicas intermoleculares, que podem resultar em propriedades aprimoradas quando comparada aos componentes separados.²⁹

Além disso, biopolímeros que apresentam a habilidade de formar estruturas tridimensionais interconectadas por interações intermoleculares ou ligações covalentes, capazes, devido ao seu caráter hidrofílico, de absorver grandes quantidades de água ou fluídos biológicos, tem chamado atenção, uma vez que suas estruturas moleculares porosas e hidratadas se assemelham ao microambiente do tecido natural mais do que qualquer outra classe de biomateriais.^{6,29,30} Essas estruturas são denominadas hidrogéis, e podem ser moldados em formas ou tamanhos desejados para a obtenção tanto de materiais bidimensionais (2D) quanto tridimensionais (3D).²⁹ Nessa perspectiva, destaca-se que essa classe de biopolímeros têm sido empregadas, combinados em blendas ou não, no desenvolvimento de novos materiais, buscando-se aprimorar as propriedades mecânicas e biológicas de sistemas poliméricos de origem natural para aplicações biomédicas.^{10,29} Dessa forma, devido a estas propriedades promissoras, os hidrogéis tem sido aplicados enormemente em uma ampla gama de aplicações biomédicas, incluindo encapsulamento celular, biossensores biomédicos diagnósticos, administração de medicamentos e medicina regenerativa.³⁰ Para essa última aplicação, destaca-se dentre os mais estudados, o

colágeno,³¹ e os polissacarídeos como a quitosana³² e, mais recentemente as carragenanas,¹⁸ os quais tem sido utilizados para formar hidrogéis que resultem em uma boa viabilidade celular, uma vez que mimetizam os componentes da matriz extracelular nativa, que contém grupos funcionais altamente carregados negativamente, tais como -COOH e -SO₃H.³³

1.3.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo dos mamíferos, correspondendo cerca de 30% da proteína total, com a função de prover estabilidade, elasticidade e resistência mecânica para tecidos conectivos moles, tecido ósseo e matriz extracelular.³⁴ Esse biopolímero é encontrado sob 29 tipos conhecidos na natureza, sendo os mais comuns I, II, III e IV.³⁵ Essa variação ocorre em relação ao tipo de tecido em que é encontrado, a sequência peptídica e a funcionalidade.³⁵ Colágeno tipo I é o mais comumente encontrado, sendo constituído pelo tropocolágeno, que é uma molécula linear com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro.³⁶ Este é formado por uma tripla hélice de duas cadeias $\alpha 1$, com cerca de 1055 resíduos de aminoácidos, e uma cadeia $\alpha 2$, com cerca de 1029 resíduos. Cada molécula de polipeptídeo (chamada de procolágeno) é uma α -hélice formada pela sequência tripeptídica Gly-X-Y (onde geralmente X é prolina e Y é 4-hidroxiprolina) que adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.³⁷ Em tecidos biológicos, o colágeno organiza-se em estruturas fibrilares, sendo que a sua formação inicia-se por meio de interações entre cinco moléculas de tropocolágeno, originando as microfibrilas. Estas, por sua vez, agregam-se, por um processo de fibrilogênese, formando, assim, as fibras insolúveis, as quais são mantidas por ligações cruzadas intramoleculares, entre a mesma unidade de tropocolágeno, e intermoleculares, entre as unidades de tropocolágeno.^{16,36} No caso do colágeno tipo I, a formação das fibras, em meio fisiológico, ocorre em pH 7, o que infere que a resultante das cargas na molécula seja zero, correspondente ao colágeno íntegro.^{38,39}

O desenvolvimento de matrizes a base de colágeno vem se mostrando interessante na área do biomateriais, em especial para a regeneração do tecido ósseo, devido à alta biocompatibilidade, além de ser biodegradável e biorreabsorbível.⁴⁰ Nessa perspectiva, destaca-se que o colágeno tem sido amplamente utilizado como biomaterial, para

aplicações como agente hemostático e materiais para a regeneração de tecidos, nas formas de hidrogéis, membranas ou esponja.⁴¹

No entanto, como o colágeno apresenta a característica de biodegradabilidade, esta, apesar de ser positiva, pode ocasionar problemas para aplicações em que se deseja um tempo maior de permanência no organismo. Por essa razão, torna-se necessário a utilização de agentes de reticulação, os quais são usados para diminuir a taxa de degradação *in vivo* destas matrizes.⁴² Alguns compostos com biocompatibilidade, não citotoxicidade e capacidade de aumentar a resistência à degradação enzimática após a implantação, têm sido explorados como agentes de reticulação de proteínas.⁴² Nesse contexto, destaca-se que outras estratégias também tem sido adotadas, como, por exemplo, modificações químicas que promovem a desnaturação das matrizes colagênicas, podendo ocasionar alterações nas propriedades nativas do colágeno, sejam elas mecânicas ou físico-químicas, de modo a atender necessidades específicas na área de biomaterias.⁴³ Essas modificações podem gerar uma matriz carregada positiva ou negativamente, sendo a primeira obtida por meio de reações de esterificação. e a segunda por meio da hidrólise alcalina dos resíduos de aminoácidos Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno.⁴³ Essa última, é denominada colágeno aniônico, e têm sido considerada apropriada em substituição ao colágeno nativo em aplicações biomédicas, como no crescimento de tecidos⁴³ e na regeneração de tecidos mineralizados, como tecido ósseo, pois mimetizam o efeito de polipeptídios aniônicos no processo de calcificação de matrizes ósseas.⁴⁴ Além disso, também pode ser empregado em sistemas biodegradáveis desenvolvidos para a liberação controlada de drogas catiônicas, justamente, devido a sua forma aniônica em pH fisiológico.⁴⁵ De modo geral, tem sido reportado em estudos *in vitro* e *in vivo* que materiais preparado a partir de colágeno aniônico apresentam ausência de citotoxicidade e alto grau de biocompatibilidade.⁴⁶

O colágeno pode ser desnaturado por tratamento térmico, pois a variação da temperatura até um dado limite, acarreta o rompimento de ligações de hidrogênio, que auxiliam a estabilização da hélice tripla, produzindo uma estrutura desorganizada conhecida como gelatina.⁴⁷ Essa é caracterizada como uma mistura heterogênea de proteínas de massas molares médias que variam entre 20000 a 250000Da, dependendo do grau de desnaturação.⁴⁸ Em comparação ao seu precursor, a gelatina tem antigenicidade relativamente mais baixa, e, além disso, retém algumas características do colágeno nativo, como por exemplo, a capacidade de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular.^{49,50} Além disso, verificou-se que a gelatina é um material hidrossolúvel em pH

próximo a 7 e temperatura ambiente, capaz de formar géis para a obtenção de filmes com considerável resistência mecânica, biodegradáveis e de baixo custo.⁴⁷ Hidrogéis constituídos por gelatina podem ser promissores para o tratamento de feridas e para gerar matrizes de aplicações na engenharia de tecido, visto que suportam a fixação e crescimento de uma grande variedade de células, incluindo endoteliais, epiteliais, fibroblastos e osteoblastos.⁵¹

No entanto, o colágeno pode ser desnaturado tanto parcial, correspondente a gelatina,²⁸ quanto totalmente, a qual é obtida pela hidrólise em meio ácido a 125°C, acarretando na solubilização do colágeno até a sua estrutura primária, ou seja, a sua sequência de aminoácidos.⁵² Essa última estrutura desnaturada denominamos como colágeno hidrolisado. A literatura tem reportado a importância do emprego do colágeno hidrolisado no desenvolvimento de biomateriais, visto que ele pode auxiliar na manutenção do tecido ósseo, em relação ao processo degenerativo dessa matriz e de articulações, pois é considerado uma fonte biodisponível de peptídeos e aminoácidos, sendo, assim, um agente terapêutico na síntese da cartilagem e da matriz óssea.⁵² Por exemplo, no trabalho de Ramadass et al.,⁵³ o colágeno hidrolisado foi utilizado na produção de *scaffolds* voltados para a cicatrização de feridas na derme, pois, de acordo com o autor, além de estimular a biossíntese do colágeno, apresenta propriedades hemostática, antimicrobianas e quimiotáticas sobre fibroblastos influenciando o seu crescimento. Já no estudo de Pei et al.,⁵⁴ celulose foi combinada ao colágeno hidrolisado para superar as desvantagens de como alta solubilidade e fragilidade mecânica.

1.3.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da quitina, que é um dos componentes estruturais das paredes celulares de fungos e leveduras e, também, do exoesqueleto dos artrópodes; como os insetos e crustáceos; e alguns moluscos, como a lula.⁵⁵ Por essa razão, esse tem sido considerado o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose.³³ A quitina é constituída por unidades repetitivas de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4). Dessa forma, a quitosana é um derivado da N-desacetilação da quitina, resultando em um heteropolissacarídeo composto por unidade de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e de

2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose.⁵⁶ As estruturas químicas da quitina e da quitosana são apresentadas na figura 1.

Figura 1 – Estrutura química da (A) quitina e (B) quitosana.

No entanto, esse processo raramente é completo, e por essa razão, esse biopolímero sempre apresentará um grau ou porcentagem de acetilação. Alguns autores tem definido a quitosana como o polímero tendo um grau de acetilação em torno de 60% a 50%, mas essa porcentagem não é bem estabelecida visto a sua variação dependendo do autor.⁵⁵ Como resultado desse processo, a quitosana, passa a ser insolúvel em soluções neutras e alcalinas e solúvel em ácidos diluídos.⁵⁵ Quanto à sua massa molar, pode ser classificada como de baixa massa molar (< 50 kDa), de média massa molar (entre 50 e 150 kDa) ou de alta massa molar (> 150 kDa).⁵⁷ O método e a fonte de obtenção da quitina influenciam tanto o grau de acetilação quanto a massa molar da quitosana, os quais são parâmetros fundamentais para determinação de suas propriedades.⁵⁷

Assim, devido à sua natureza catiônica e a capacidade de formar ligações de hidrogênio entre suas cadeias, a quitosana apresenta propriedades gelificantes e mucoadesivas, as quais tem sido amplamente utilizadas na preparação de dispositivos de liberação de fármacos.⁵⁵ Tendo em vista a sua semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos, componente principal da matriz extracelular, outros aspectos importantes na aplicação desse biopolímero, estão relacionados ao fato de ser biodegradável, biocompatível e por promover a adesão e proliferação celular.^{32,55,56} Por essa razão, esse biopolímero tem sido incorporado na formulação de transportadores de fármacos e cicatrizadores de feridas.^{32,55,56} Nesse tipo de aplicação, é comum a produção de filmes de quitosana pelo método de casting, no qual o biopolímero é solubilizado em solução diluída de ácido e seco em algum molde. Estes filmes necessitam de posterior

processo de neutralização para remoção dos resíduos de ácidos, uma vez que estes podem contribuir com alguma citotoxicidade.^{32,58}

Membranas e scaffolds de quitosana apresentaram taxa de degradação moderada, baixas taxa de proliferação celular e propriedades mecânicas limitadas em comparação à outros materiais.²⁸ Uma alternativa para diminuir a rigidez destes materiais é a mistura com gelatina.³³ A formação dessa blenda ocorre por meio de interações eletrostáticas, uma vez que nas moléculas de gelatina estão presentes grupos carboxílicos que interagem com os grupos amino protonados da quitosana. Outra vantagem importante observada para essa blenda, é a melhora na atividade biológica do material, uma vez que a presença das sequências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato na gelatina são reconhecidas por promover a adesão e proliferação celular.⁵⁰ Na área de biomateriais, esta blenda biopolimérica tem sido testada no desenvolvimento tanto de filmes na substituição da epiderme humana,⁵⁹ quanto de *scaffolds*, para uso em engenharia de tecidos,⁶⁰ inclusive em formas complexas como protótipos de fígado⁶¹ e de vasos sanguíneos.⁶²

1.3.3 Carragenana

Na matriz extracelular nativa, espera-se que polissacarídeos sulfatados liguem e retenham fatores de crescimento, que são essenciais para a diferenciação celular, sendo assim, fundamentais no processo de formação óssea.^{19,33} Nessa perspectiva, destaca-se a carragenana, que é um heteropolissacarídeo linear aniônico de alto peso molecular obtido a partir de algas marinhas, *Rhodophyceae*, que consiste de cadeias lineares longas de β -(1, 3)-sulfatada-D-galactose ligada por meio de ligações glicosídicas a α -(1, 4)-3,6-anidro-D-galactose.^{19,33,63} Biopolímeros como a carragenana, têm recebido ampla atenção uma vez que oferecem um novo mercado para produtos de baixo custo.⁶⁴

Existem três tipos principais de carragenana com base no número e na posição dos grupos sulfato na cadeia galactose/anidrogalactose: κ -, ι - e λ - carragenana, que contêm um, dois e três grupos sulfato por unidade de repetida de dissacarídeos, respectivamente, conforme pode ser observado na figura 2.^{19,63} Este fato tem sido considerado relevante em aplicações biomédicas, uma vez que a presença da carragenana pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, dependendo da dose e do seu grau de sulfatação. Além disso, tem sido reportado que os grupos sulfonil associados à carragenana fornecem sua propriedade anticoagulante.⁶⁵ A κ -carragenana foi considerada como candidata

potencial para aplicações na engenharia de tecidos, devido, além do seu menor grau de sulfatação, às suas propriedades de gelificação, resistência mecânica e sua semelhança com glicosaminoglicanos naturais, como o sulfato de condroitina, presentes no matriz extracelular nativa.¹⁸

Figura 2 – Estrutura química da (A) κ -carragenana, (B) ι -carragenana e (C) λ -carragenana. Elas diferem em relação a presença da ponte 3,6-anidro-Dgalactopiranosil (destacada em vermelho) e o grau de sulfatação (destacado em azul). Adaptada de Liu et al.⁶⁶

No caso da κ -carragenana, ocorre a formação de um gel estável, o mais resistente da família das carragenanas, mediante a redução de temperatura;⁶³ em condições salinas adequadas por meio de interações iônicas e ligações de hidrogênio.³⁰ Quando o gel é resfriado abaixo de 10 ° C, o comportamento de gelificação é semelhante ao de agarose e ágar, tornando-se uma escolha adequada para fabricação de matrizes de sistemas de *drug-delivery*.⁶³

Além disso, seu comportamento tixotrópico inerente permitiu sua utilização como uma matriz injetável para o carreamento e distribuição de macromoléculas e células para tratamentos minimamente invasivos.¹⁸ Além disso, os hidrogéis de carragenana formados através de reticulação iônica e têm sido amplamente utilizados na engenharia de tecidos, devido ao fato de exibirem excelente biocompatibilidade.³³ Têm sido reportado que hidrogéis de κ -carragenana preparado com uma proporção molar de grupos Ca^{2+} /sulfônicos = 1,5 induziu a formação de apatita após exposição ao fluido corporal simulado (SBF, do inglês *Simulated Body Fluid*) durante 12 horas.⁶⁷ Porém, apesar de ter sido reportado bons resultados relacionados à sua aplicação biomédica, alguns problemas, como o controle inadequado sobre as propriedades de intumescimento, características de degradação e propriedades mecânicas dos hidrogéis formados a partir do contato com o meio fisiológico tem sido relatados.¹⁸ Como um meio para superar as limitações dos hidrogéis κ -carragenana, outros polímeros, naturais ou sintéticos, têm sido incorporados a essa rede tridimensional,¹⁸ uma vez que as carragenanas podem formar complexos

polieletrólitos com polímeros com cargas opostas.³³ Além disso, a introdução de agentes reticuladores ou a adição de nanopartículas são outras estratégias utilizadas para fortalecer a matriz polimérica.⁶⁴

Devido à similaridade composicional com o osso, materiais compósitos Colágeno-Hidroxiapatita (HAp) têm sido extensivamente estudados.⁶³ Nesse contexto, destaca-se que a adição de componentes suplementares a formulação desse compósito tem sido uma estratégia viável para aprimorar algumas ou, ainda, induzir novas propriedades nesse material.⁶³ Dentre esses componentes, encontra-se a κ -carragenana, que ao ser adicionada ao híbrido colágeno-HAp, constituindo a formação de uma blenda, promove um aprimoramento significativo das propriedades mecânicas desse material.⁶³

1.4 Uso de biominerais na regeneração de tecidos mineralizados

Carbonato de cálcio (CaCO_3) e fosfato de cálcio, são os dois minerais mais abundantes, que ocorrem na natureza associados a matrizes orgânicas. CaCO_3 pode ocorrer em três polimorfos anidros cristalinos: calcita, aragonita e vaterita. A calcita e a aragonita são as formas mais recorrentes na natureza. Destaca-se ainda a importância do uso de CaCO_3 em sistemas biomiméticos dada à sua capacidade de estimular o crescimento de HAp, quando esses sistemas são expostos a soluções que simulam as concentrações de íons e pH encontrados no fluido corpóreo.⁶⁸

Com a busca de materiais bioativos que simulem a composição do tecido ósseo, tem sido explorado o uso de HAp em biomateriais. Esta biocerâmica é utilizada frequentemente no desenvolvimento de scaffolds e associada a materiais luminescentes designados para muitas aplicações biomédicas, como a administração de medicamentos e a reconstituição de tecido ósseo, devido ao fato de, além da sua similaridade química e estrutural com o componente mineral dos ossos e dentes humanos, ser biocompatível, bioativo, não inflamatório, não tóxico e não imunogênico.^{33,69–71} Estas excelentes propriedades de HAp são determinadas pela sua morfologia, tamanho, composição e estrutura.⁷² No caso da apatita natural do tecido ósseo, destaca-se que o tamanho de partícula é de ordem nanométrica conferindo uma área superficial muito grande para interação com o tecido hospedeiro.⁶⁹ Ainda, destaca-se que HAp pode ser derivada de fontes naturais ou sintetizada por vários métodos, tais como precipitação, sol-gel, hidrotérmico, emulsão múltipla, deposição biomimética, eletrodeposição.⁶⁹

A razão para o interesse em materiais constituídos por HAp obtidos a partir de osso animal está relacionada ao fato de a origem natural poder contribuir para a osteocondutividade e osteoindutividade, uma vez que o material natural pode reter várias propriedades do osso inicial, incluindo sua composição química e vários aspectos da sua micro ou macroestrutura, dependendo de como é processado.⁷⁰ Por exemplo, a HAp ao ser produzida, a partir de um pedaço de osso, removendo-se a matriz orgânica e mantendo a fase mineral substancialmente intacta, pode resultar em um material sólido poroso, com tamanho de partícula próximo ao encontrado na matriz óssea e com traços de elementos em sua composição, como alumínio, ferro, magnésio, potássio, sílica, sódio, vanádio e zinco.⁷⁰

No caso da HAp de origem sintética, independentemente da metodologia adotada, pode-se destacar alguns aspectos relevantes das estruturas e das morfologias que podem ser obtidas. A ocorrência de microestruturas de HAp em biocerâmicas, que pode ser constituída por uma mistura de partículas de escala nano-a-submicrométrica, tem resultado em um aprimoramento eficiente do contato e da estabilidade na interface entre material artificial e osso natural tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*.⁶⁹ Além disso, verificou-se que microestruturas porosas de HAp podem influenciar o comportamento das células através de interação promovida entre as superfícies do material e as proteínas adsorvidas, oferecendo, assim, mais aplicações potenciais, especialmente em aplicações biomédicas.⁷² Essas estruturas hierárquicas porosas de HAp podem ocorrer com uma morfologia agulhas, hastes, flor ou esferas, dependendo das condições da síntese.⁷² Verificou-se que nanopartículas de HAp esféricas apresentaram biocompatibilidade mais favorável do que as nanopartículas HAp tipo haste para osteoblastos.⁷³ Vale ressaltar que a maioria dos biomateriais naturais possui microestruturas hierárquicas complexas, e por essa razão, a pesquisa de sínteses controláveis para a obtenção de HAp hierarquicamente nanoestruturada tem sido considerada importante para a compreensão do mecanismo de biomineralização.⁷¹

Outro fator importante que deve ser destacado é que a HAp, independente da sua origem, tem atraído muita atenção devido à sua boa biocompatibilidade, alta atividade e estabilidade mecânica, o que a torna um excelente biomaterial de implante para se ligar ao tecido ósseo e promover o reparo. No entanto, a fraca resistência à tração e a fratura da biocerâmica de HAp pura, em comparação a outras cerâmicas, limitam sua aplicação prática em regiões que não sejam suporte de carga, sendo, então, utilizada com o intuito de estimular a formação do tecido ósseo que, posteriormente, conferirá as propriedades

mecânicas necessárias na área implantada.^{33,70} Nessa perspectiva, vale ressaltar que *in vivo*, os materiais a base de HAp também podem ser degradados, ser absorvidos e ser substituídos pelo osso.⁷⁰ No entanto, as taxas desses processos dependem de numerosos fatores químicos, como estequiometria, e fatores físicos, como a razão entre superfície volume.⁷⁰ Além disso, também estão relacionadas com a medida em que uma determinada forma da biocerâmica é osteocondutora e osteoindutiva.⁷⁰

Dessa forma, para produção de estruturas hierárquicas nanoestruturadas, combinações entre fases orgânicas biocompatíveis e biodegradáveis com inorgânicas têm sido investigadas, pois o sinergismo entre as fases proporciona uma resistência mecânica maior quando comparada à natureza mecânica desses componentes separados.⁷⁴ Além disso, a matriz orgânica em materiais híbridos deve atuar como molde para a nucleação e crescimento dos cristais, controlando, assim, a fase, a morfologia e o tamanho de partícula de HAp no híbrido.⁷⁴ De fato, esse processo mimetiza o que acontece na natureza, uma vez que o crescimento de cristais mediados por um hidrogel frequentemente ocorre, em condições padrão de temperatura e pressão, durante a formação de materiais híbridos em organismos vivos, como ossos, dentes e conchas.^{72,74} Por isso, é vantajoso utilizar o hidrogel como meio para a precipitação de fosfatos de cálcio, desenvolvendo-se, assim, um novo biomaterial híbrido sintético e biomimético, que permite uma compreensão da mineralização do colágeno durante a formação do tecido ósseo.⁷² Portanto, os materiais híbridos HAp-polímeros desempenham um papel vital nas aplicações biomédicas.⁷⁴ Segundo Fikai et al.⁷⁵ a fase mineral é depositada na fase orgânica através de interações eletrostáticas entre grupos carboxílicos de colágeno e Ca^{2+} de HAp. Muitos pesquisadores afirmaram que a HAp é depositada na matriz formada pelas fibrilas de colágeno somente através de proteínas não-colagênicas e citrato ligado a ela, enquanto outros dizem que a mineralização ocorre também no colágeno puro. Por essa razão, Fikai et al.⁷⁵ afirma que para se obter bons substitutos ósseos, devemos entender a biossíntese do osso natural e controlar alguns parâmetros, tais como composição, forma e tamanho de cristais de HAp, fibrilas de colágeno e orientação do cristal de HAp.

1.5 Incorporação de nanopartículas de prata em biomateriais

A rejeição de implantes é uma complicação comum em pós-operatório e continua a ser um problema grave na cirurgia ortopédica.^{76,77} As infecções bacterianas associadas a esses materiais ocasionam uma inflamação local ao seu redor e, eventualmente, levam à perda desse implante.^{76,77}

Uma das formas de se melhorar o sucesso de materiais voltados para implantes é o uso de constituintes biocompatíveis, de modo que o contato desse material com tecidos vivos e fluidos corporais resulte em ínfimas reações inflamatórias.^{76,77} Proteínas e outras substâncias orgânicas são facilmente adsorvidas em superfícies constituídas por HAp, que por sua vez pode promover a adsorção e replicação das bactérias, resultando na formação de biofilmes, formação de agregados de microrganismos aderidos a superfície do material rodeados por matriz exopolissacarídica.⁷⁶⁻⁷⁸ Dessa forma, esse processo acarreta, nos pacientes, o desenvolvimento de quadros infecciosos relacionados com o implante.^{76,77}

Em termos de compostos orgânicos, destaca-se que a presença de alguns polissacarídeos na composição superficial dos materiais pode resultar em uma ação antibiofilme, devido propriedade anti-adesiva promovida pela sua habilidade em pode inibir e / ou desestabilizar o biofilme bacteriano.^{76,78} Dentre os polissacarídeos naturais, destaca-se a quitosana, pois, além de sua propriedade antibiofilme, ela pode ocasionar a morte de células bacterianas por contato.⁷⁸⁻⁸⁰ Dessa forma, destaca-se que as suas propriedades antimicrobianas são atribuídas, em geral, à sua natureza policatiónica devido a protonação dos grupos NH_2 (NH_3^+), pois esse grupo carregado positivamente deve interagir com constituintes da membrana celular microbiana carregados negativamente, causando alteração da permeabilidade dessa membrana.⁷⁸ Apesar desses aspectos, existem limitações da aplicação da quitosana, pois têm-se adotado alterações em sua estrutura para que seja obtido derivados que apresentem uma maior solubilidade no meio aquoso, consequentemente, uma maior atividade antibacteriana.⁷⁸

Assim, a fim de melhorar a resposta biológica de materiais com potencial em aplicações biomédicas, têm-se adotado a inclusão de outros agentes antimicrobianos e de sua liberação direta no tecido lesionado, tal como na interface implante/tecido.^{76,77} Nesse contexto, destaca-se como um agente inorgânico antibacteriano e anti-inflamatório a prata (Ag), com respostas eficazes em concentrações muito baixas, boa compatibilidade e estabilidade inerente.^{76,77}

Diante disso, a incorporação de espécies de Ag na forma iônica^{76,77} (Ag^+) ou nanopartícula metálica nas superfícies de materiais com potencial para implantes médicos é considerada uma estratégia válida pelo fato de impedir a incidência de infecção. No entanto, o uso de Ag^+ pode resultar na interação desses íons com os grupos tiol de proteínas vitais, como enzimas, resultando na sua inativação e, também, na interrupção da respiração celular.^{76,77} O uso de nanopartículas de Ag é mais indicado devido à sua alta razão área superficial/ volume, maior eficácia contra as bactérias e, o mais importante, menor toxicidade aos seres humanos.⁸¹ Um estudo comparativo entre nanopartículas de Ag, AgNO_3 e AgCl revelou que as nanopartículas têm um poder antibacteriano e anti-inflamatório maior do que Ag^+ livres.⁸¹ Embora o efeito altamente antibacteriano associado as nanopartículas de prata seja reconhecido, destaca-se que o mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado.⁷⁹ Nessa perspectiva, assume-se que as nanopartículas devem interagir com as membranas celulares danificando-as e, conseqüentemente, ocasionam alterações estruturais que tornam as bactérias mais permeáveis.⁷⁹ Além disso, é destacado que elas podem produzir espécies reativas de oxigênio, formando radicais livres com poderosa ação bactericida.⁷⁹ No entanto, essa consideração pode fundamentar e explicar tanto a atividade biológica quanto o seu potencial de toxicidade para seres humanos.⁸¹

Por essa razão, considera-se que nanopartículas de Ag sejam o melhor sistema de incorporação para a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, visto que, em nanoescala, Ag exibe propriedades físicas, químicas e biológicas extremamente incomuns, e devido a essas propriedades, tem apresentado uma variedade de aplicações biomédicas para o desenvolvimento de biomateriais.⁸¹⁻⁸³ Destaca-se que os efeitos anti-inflamatórios das nanopartículas de Ag são úteis dada a sua capacidade de acelerar a cicatrização de feridas, e, nessa perspectiva, podem ser exploradas no desenvolvimento de melhores curativos para feridas e queimaduras.^{81,82} Além disso, o uso dessas nanopartículas tem-se mostrado como uma solução para o combate de bactérias resistentes aos antibióticos.^{81,82}

Na área de substituição do tecido ósseo, têm-se estudados o uso dessas nanopartículas na composição de fixadores de próteses articuladas projetadas para cirurgias de substituição de articulações em joelhos e quadris, uma vez que as taxas de infecção nesses procedimentos cirúrgicos são elevadas, em tornos de 1,0-4,0%.⁸¹ Esses estudos, além de evidenciarem o elevado potencial antibacteriano em comparação a antibióticos, também mostraram que essas nanopartículas não apresentam toxicidade a fibroblastos de rato ou a osteoblastos de humanos.⁸¹

Além da atividade antibacteriana, têm-se, também, investigado o notável potencial anti-inflamatório que as nanopartículas de Ag apresentam.^{81,82} Essas nanopartículas foram incorporadas na composição de curativos aplicados em dermatites tanto em animais quanto em humanos.⁸¹ O exame histopatológico revelou que a epiderme estava praticamente recuperada em 72 horas após o tratamento com esse curativo.⁸¹ Ressalta-se que, com o uso das nanopartículas de Ag, existe uma preocupação sobre a toxicidade e esse aspecto ainda precisa ser abordado em futuras pesquisas *in vivo*.⁸¹

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Obter membranas híbridas constituídas por blendas formadas entre colágeno hidrolisado e polissacarídeo, quitosana ou κ -carragenana, e por biominais conhecidos biocompatíveis, como as apatitas, dopados com nanopartículas de prata.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudar os fatores que influenciam a precipitação de apatitas tais como: concentração dos íons e tempo de exposição à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$;
2. Obter membranas biopoliméricas híbridas a partir da incorporação de fosfato de cálcio nos interstícios da blenda composta por colágeno hidrolisado e quitosana ou κ -carragenana;
3. Avaliar o efeito da incorporação de fosfato de cálcio pelas três metodologias adotadas em termos das propriedades como morfologia, cristalinidade e mecânica;
4. Testar a bioatividade das membranas por meio de sua exposição em soluções SBF a 37 °C;
5. Analisar as propriedades de intumescimento e degradabilidade das membranas híbridas produzidas *in vitro*;
6. Estudar as propriedades físico-químicas relacionadas às superfícies das membranas, como molhabilidade e energia de superfície total;
7. Avaliar a toxicidade dos materiais selecionados a partir das melhores respostas frente as propriedades bioativa, morfológica e mecânicas em culturas de osteoblastos *in vitro*;
8. Observar atividade antibacteriana *in vitro* mediante a incorporação de nanopartículas de prata nas membranas híbridas;
9. Quantificar a porcentagem de liberação das nanopartículas de prata das membranas híbridas produzidas para o meio fisiológico;

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada por um sistema Milli-Q® (Tensão superficial (γ) = 72,8 mN m⁻¹ e resistividade de 18,2 M Ω cm). Nitrato de prata (AgNO₃, Aldrich, 99%); boro hidreto de sódio (NaBH₄, Aldrich, 99%); ácido fosfórico (H₃PO₄, Synth, 85%); cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.2H₂O, Synth, 99,5%); colágeno hidrolisado (Bioflora); κ -carragenana (Gelymar); quitosana (baixo peso molecular, Aldrich); glicerol (Mallinckrodt Chemicals, 99,8%); (NH₄)₂CO₃(Neon, PA).

Para o preparo do SBF foram utilizados os seguintes reagentes: Cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.2H₂O, Synth, 99,5%); Cloreto de sódio (NaCl, Synth, 99,5%); Bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Vetec, 99,5%); Cloreto de potássio (KCl, Vetec, 99,0%); Fosfato de sódio dibásico heptaidratado (Na₂HPO₄.7H₂O, Mallinckrodt Chemicals, 99,5%); ácido clorídrico (HCl, Synth, 36-38,5%); Cloreto de magnésio hexaidratado (MgCl₂.6H₂O, Synth, 99,0%); Sulfato de sódio (Na₂SO₄, Synth); trishidroximetilaminometano (C₄H₁₁NO₃, Aldrich, 99,9%).

3.2 Metodologia

3.2.1 Caracterização dos constituintes da matriz orgânica

Inicialmente, fez-se necessário caracterizar o ponto isoelétrico de cada biopolímero individualmente. Para isso, foram realizadas medidas de potencial zeta dos polieletrólitos solubilizados em água, em diferentes valores de pH fazendo uso de um titulador automático MPT-2 o qual é acoplado ao Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments (Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, DQ/FFCLRP).

Também foi caracterizada a conformação do colágeno hidrolisado no meio reacional de trabalho, visto que é um parâmetro importante para as propriedades do material híbrido que foi produzido. Dessa forma, a conformação dessa proteína desnaturada foi estudada por meio da Espectroscopia de Dicroísmo Circular, usando o Espectropolarímetro JASCO J-810 (DQ/FFCLRP). As amostras foram preparadas a partir

da dissolução de 3 mg de colágeno hidrolisado em 10 mL da mistura de trabalho diluída 10 vezes ($5\text{mmol.L}^{-1} \text{CaCl}_2 + 1,65\text{ mmol.L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$), visto que as concentrações elevadas dos íons Cl^- e PO_4^{3-} nessa mistura, maiores que $0,15\text{ mol.L}^{-1}$ e 100mmol.L^{-1} , respectivamente, podem ocasionar o *cut-off*^{84,85} do sinal, relacionado ao comprimento de onda abaixo do qual o solvente absorve mais que uma unidade de absorbância em uma cela de 1cm de caminho óptico.

As amostras preparadas foram analisadas a 20°C e os espectros registrados na faixa de 195 nm a 250 nm, a uma velocidade de 1nm/s. Os resultados foram obtidos como elipticidade molar $[\theta]$, visto a relação $[\theta] = 10^{-3} \theta\text{M/LC}$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), onde θ é a elipticidade medida em graus, L é o comprimento da cubeta utilizada na análise em milímetro (mm), C é a concentração em mg/mL e M é a massa molar média dos resíduos de colágeno.

3.2.2 Preparo dos hidrogéis

Nesse trabalho foram estudados dois hidrogéis formadas a partir de uma blenda composta por colágeno hidrolisado e um polissacarídeo, sendo neste caso a quitosana e a κ -carragenana. Essas matrizes foram preparadas a 5% (p/v), de modo que 2,5% correspondesse ao colágeno hidrolisado e 2,5% ao polissacarídeo, a partir da dissolução a quente ($\sim 65^\circ\text{C}$) de uma massa total de 0,5 g dos dois biopolímeros de interesse em 10 mL de uma solução aquosa com uma concentração de, no caso do hidrogel constituído por quitosana, $0,0165\text{ mol.L}^{-1}$ de H_3PO_4 ou, no caso da κ -carragenana, 5 mmol.L^{-1} de KCl. O fato de se utilizar um sal de potássio nessa última matriz está relacionado com a especificidade da fração κ por íons K^+ para a formação de hidrogéis.⁸⁶ Após a adição das quantidades estabelecidas dos dois biopolímeros escolhidos, o sistema permaneceu sob aquecimento e agitação por 2 horas e posteriormente apenas agitação por mais 12 horas a temperatura ambiente, para que assim fosse assegurado a completa solubilização dos biopolímeros empregados. Ao final, foi adicionado o plastificante glicerol em uma concentração correspondente a 25% da massa total de biopolímero adotada, pois, quando as matrizes biopoliméricas são desidratados, durante o processo de secagem, obtém-se uma estrutura com forte coesão entre as cadeias dos seus constituintes e, por esse motivo, a presença do plastificante é necessária para reduzir as forças intermoleculares coesivas,

permitindo maior mobilidade entre as cadeias e, conseqüentemente, resultando em uma membranas mais flexível.⁸⁷

Por fim, o sistema foi mantido sob agitação por mais 1 hora a fim de assegurar a interação do plastificante com a rede tridimensional do hidrogel formada previamente, assim como também, a homogeneização do hidrogel. Esses hidrogéis foram empregados para obtenção de membranas biopoliméricas com ausência de fosfato de cálcio, indicadas como grupo controle nas caracterizações das membranas estudadas, e, também, na formação das membranas híbridas a partir da adição de partículas tanto de HAp sintética quanto HAp bovina.

No caso das membranas híbridas obtidas a partir da precipitação *in locu* nos interstícios da matriz orgânica, a distinção na preparação reside no fato dos biopolímeros empregados terem sido dissolvidos em 10 mL de uma mistura aquosa contendo 0,05 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 0,0165 mol.L⁻¹ de H₃PO₄. As concentrações nessa mistura apresentam excesso de Ca²⁺ com relação à razão molar Ca²⁺/P encontrada na HAp. No caso do hidrogel a base de κ-carragenana, optou-se por não adicionar íons K⁺ visto que durante o processo de formação da membrana híbrida ocorria a precipitação de KCl. Por essa razão, considerou-se um excesso de íons Ca²⁺ para que favorecesse, além da precipitação da fase mineral nos interstícios da matriz, o processo de gelificação.

3.2.3 Preparo e incorporação da fase inorgânica

A incorporação da fase inorgânica de fosfato de cálcio nas matrizes orgânicas se deu por meio de três metodologias: (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz polimérica; (2) Adição das nanopartículas sintetizadas previamente; (3) Adição de HAp bovina (Bioinnovation produtos biomédicos LDTA) na matriz polimérica.

No método (1), os hidrogéis formados a partir da dissolução dos biopolímeros em solução aquosa contendo os íons precursores de interesse foram transferidos para uma placa de teflon com moldes retangulares, com dimensões de 2,7 x 8,0 x 0,5 cm. Posteriormente, para a precipitação e incorporação da fase mineral nos interstícios dessa rede tridimensional e, conseqüentemente, formação das membranas híbridas, os hidrogéis foram expostos, em dessecador fechado, a atmosfera gerada a partir da decomposição do (NH₄)₂CO₃ por 45 minutos. Os íons e as espécies químicas que devem estar presentes no meio aquoso aprisionado nos interstícios da rede tridimensional do hidrogel são Ca²⁺,

H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , $\text{NH}_3(\text{g})$ e $\text{CO}_2(\text{g})$, e, através da reação entre estas, considerou-se a possibilidade de controlar a precipitação de fases minerais compostas por fosfatos de cálcio. Por fim, o molde de teflon foi levado a estufa em temperatura próxima a 50 °C para secagem controlada.

Na metodologia (2), a fase mineral foi sintetizada previamente a partir da exposição de uma mistura aquosa contendo 0,05 mol.L⁻¹ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,0165 mol.L⁻¹ de H_3PO_4 a atmosfera gerada a partir da decomposição do $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ em dessecador fechado por 45 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada e o precipitado resultante foi levado a estufa para sua secagem. Posteriormente, as partículas sintetizadas foram adicionadas ao hidrogel sob agitação por 1 hora em três quantidades diferentes pré-estipuladas: 0,1, 0,01 e 0,001g, indicados por, respectivamente, (HApS 0,1g), (HApS 0,01g) e (HApS 0,001g). Por fim, os hidrogéis contendo as partículas foram transferidos para a placa de teflon, a qual foi levada a estufa em temperatura próxima a 50 °C para secagem controlada.

Na metodologia (3), HAp bovina foi adicionado ao hidrogel nas mesmas quantidades pré-estabelecidas na metodologia (2), resultando em amostras nomeadas como (HApB 0,1g), (HApB 0,01g) e (HApB 0,001g). Assim, após a homogeneização desse sistema por uma hora, os hidrogéis contendo as partículas também foram transferidos para a placa de teflon e levados a estufa em temperatura próxima a 50°C para secagem controlada.

É importante ressaltar que para remover o resíduo de H_3PO_4 de todas as amostras produzidas, estas foram imersas em 10 mL de uma solução de NaOH a 0,2 mol.L⁻¹ durante 60 minutos e, posteriormente, lavadas várias vezes em água deionizada e novamente levadas a estufa em temperatura próxima a 50°C para secagem controlada. A figura 3 apresenta a fotografia de amostras representativas obtidas antes e após a incorporação da fase mineral pelas três metodologias adotadas nesse trabalho.

Figura 3 – Fotografia das membranas recortadas em discos com diâmetro de 1 cm obtidas sem (0) e com a incorporação da fase mineral por meio das três metodologias adotadas nesse trabalho: (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz polimérica; (2) Adição das nanopartículas sintetizadas previamente (HApS); (3) Adição de HAp bovina (HApB).

3.2.4 Preparo do SBF

A solução SBF foi preparada conforme a metodologia descrita no trabalho de Tas.⁸⁸ Brevemente, para o preparo de 500 mL de solução SBF foram adicionados a 400 mL de água Milli-Q os reagentes descritos na tabela 1 na respectiva ordem, tendo em vista a relevância da força iônica e da formação de diferentes equilíbrios envolvidos nesse fluido. Após a adição do nono reagente, o pH foi ajustado até pH 7,4 a 37°C com uma solução de HCl 1,0 mol.L⁻¹ e o seu volume completado para 500 mL.

Tabela 1 – Reagentes usados para o preparo de 500 mL de SBF.

Ordem	Reagente	Massa utilizada (g)
1º	NaCl	3,274
2º	NaHCO ₃	1,134
3º	KCl	0,186
4º	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,134
5º	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,152
6º	HCl 1 mol L ⁻¹	18 mL
7º	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,184
8º	Na ₂ SO ₄	0,0355
9º	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	3,028

3.3 Caracterização das membranas biopoliméricas e híbridas

3.3.1 Avaliação *in vitro* da bioatividade

A exposição de materiais a soluções que simulem a composição iônica e pH do fluido corpóreo (SBF) é um método bastante utilizado em estudos de bioatividade *in vitro*,^{89,90} visto que essa solução simula o contato inicial de um material implantável com o fluido corpóreo. Nesse sentido, amostras que estimulem a formação de HAp após imersão nesta solução são reconhecidamente bioativas. Dessa forma, a fim de avaliar a bioatividade, das membranas biopoliméricas híbridas obtidas, essas foram expostas a solução SBF a 37°C por 30 minutos. Verificou-se que tempos longos de exposição culminava na completa solubilização das membranas híbridas. Por essa razão, este estudo limitou-se a tempos de exposição mais curtos. Após a exposição, as amostras foram lavadas três vezes com água deionizada e, posteriormente, levadas à estufa em temperatura próxima a 50 °C para secagem controlada.

3.3.2 Estudo *in vitro* das propriedades de intumescimento e degradabilidade das membranas híbridas

Nos estudos de degradação e absorção de água, as membranas híbridas foram cortadas em quadrados com 6,25 cm², os quais, posteriormente, foram imersos, a 37°C, em um béquer contendo 10 mL de PBS (tampão fosfato), pH= 7,4, por 60 minutos. Após esse intervalo, as amostras intumescidas foram limpas suavemente com papel absorvente e pesadas, e, em seguida, levadas para a estufa para completa secagem sob temperatura controlada. O peso inicial (Pi) de todas as amostras foram medidos e as mudanças de peso, como peso molhado (Pm) e peso seco (Ps) também foram determinados após o intervalo definido. Respectivamente, capacidade de absorção de água (Aa%) (Eq. 1) e a perda de massa (Pp%) (Eq. 2) foram calculadas, de acordo com o reportado na literatura⁹¹, como:

$$Aa\% = \left(\frac{Pm - Ps}{Ps} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Pp\% = \left(\frac{Pi - Ps}{Pi} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

3.3.3 Caracterização da composição química e estrutural

A análise dos grupos químicos presentes nas membranas biopoliméricas antes e após a incorporação da fase mineral foi realizada por meio da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando-se o acessório de reflexão total atenuada na superfície (ATR). Os espectros foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro de infravermelho IR Prestige-21 Shimadzu (Laboratório de Terras-Raras/ Departamento de Química-FFCLRP).

Também realizou-se a caracterização da fase mineral das membranas híbridas pela espectroscopia Raman, para auxiliar na análise da precipitação de fosfatos e carbonatos nas membranas produzidas pela metodologia (1), uma vez que diferentes estruturas cristalinas de uma mesma fase mineral apresentam modos vibracionais distintos e podem ser identificados por meio de espectros Raman, com o uso de padrões apropriados, característicos e bem definidos, com impressões digitais das mesmas. Dessa forma, os espectros foram obtidos em espectrômetro Raman HORIBA (Jobin Yvon) – LabRAM-HR equipado com um microscópio Olympus (micro Raman) utilizando como fonte de excitação um laser He/Ne ($\lambda_0 = 632,81 \text{ nm}$) (IQ-UNESP-Araraquara).

Já a cristalinidade das membranas biopoliméricas e híbridas formadas foram analisadas por Difração de raios-X (DRX), utilizando-se um difratômetro Bruker-AXS modelo D5005 (DQ/FFCLRP), tendo como fonte tubo selado de Cu (2,2 kW) com um filtro monocromador de níquel cuja radiação gerada possui $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Padrões de difração das fases cristalinas em estudo foram obtidos usando o banco de crystallography open database (COD).

3.3.4 Caracterização da morfologia das membranas híbridas

As membranas híbridas obtidas foram analisadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Shimadzu, Super Scan – SS550 – DQ/FFCLRP). Informações sobre superfícies com resolução nanométrica devem ser obtidas por MEV. As amostras foram recobertas por filme fino de ouro formado por pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater). Essa técnica permitiu estudar características como

porosidade, mudanças morfológicas nas matrizes devido a incorporação da fase inorgânica e a homegeinidade da superfície da membrana.

3.3.5 Avaliação das propriedades mecânicas

Os testes mecânicos foram realizados em colaboração com o grupo da professora Delia Rita Tapia Blácido – DQ/FFCLRP/USP.

O teste mecânico de tração das membranas híbridas foi realizado em um Texturômetro (TA Instrument –TA. TX Plus) utilizando-se o software “Texture Expert”. As análises foram realizadas em quintuplicata. A tensão e a elongação na ruptura em teste de tração serão determinadas segundo a norma da American Society for Testing and Materials, ASTM D882-12. Dessa forma, as membranas foram cortadas conforme indicado na figura 4, obedecendo o padrão de tiras recomendado por essa norma. Posteriormente, as amostras foram submetidas aos ensaios de tração com velocidade 1 mm/s, partindo-se de uma separação inicial de 80 mm, até a ruptura do filme. A tensão e elongação na ruptura foram obtidas diretamente da curva de tensão *versus* elongação, uma vez que são conhecidas as dimensões iniciais dos corpos de prova. Já o módulo de elasticidade, ou módulo de Young, um parâmetro mecânico que avalia a rigidez de um material sólido, foi obtido a partir da tangente na região linear da curva.

Figura 4 – Esquema do corpo de prova para teste de tração.

3.3.6 Molhabilidade e energia livre de superfície

Realizou-se, medidas de ângulos de contato(θ) automaticamente por meio de um goniômetro (OCA-20 dataphysics) com auxílio de uma câmera de aquisição rápida usando o software SCA-20 (DataPhysics-Germany) com três solventes teste: água deionizada, diiodometano (Sigma-Aldrich, PA) e formamida (J. T. Baker, PA); que apresentam diferentes polaridades. Resumidamente, usando o método da gota sésil, imagens da gota depositada nas superfícies das membranas biopoliméricas e híbridas,

recortadas em discos com diâmetro de 1 cm, como os apresentados na figura 3, foram adquiridas usando uma câmera CCV. O software extraiu o perfil da gota usando a abordagem elíptica e a tangente do ângulo formado entre a superfície e a gota foi medida. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra. A γ_s foi calculada a partir de todos os valores médios de θ obtidos, usando a equação de Owens, Went e Kraeble (Eq 3), que divide a γ_s total em suas componentes dispersiva (γ^d) e polar (γ^p), ou seja, $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$.^{92,93}

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\gamma_L^d \cdot \gamma_s^d)^{1/2} + 2(\gamma_L^p \cdot \gamma_s^p)^{1/2} \quad (\text{Eq. 3}),$$

em que os subscritos S e L representam as superfícies do sólido e do líquido, respectivamente.

Portanto, informando ao software SCA-20 os valores de θ obtidos para os três solventes escolhidos, cada um com suas γ_s , γ^d e γ^p conhecidas, é possível resolver algebricamente a Eq 3 para encontrar o valor da γ_s para cada amostra analisada.

3.3.7 Cultura de osteoblastos *in vitro*

Todos experimentos envolvendo cultura celular foram realizados em colaboração com o Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas – DQ/FFCLRP/USP, sob supervisão do professor Pietro Ciancaglini.

a) Preparo da cultura de células

Células osteoblásticas de linhagem murina MC3T3-E1 (American Type Culture Collection - ATCC) foram, inicialmente, cultivadas em meio essencial mínimo (α -MEM, Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina. Após a confluência, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em α -MEM e semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^4 células/poço e, posteriormente, essas foram incubadas a 37°C, em 5% de pressão CO_2 e 95% de ar atmosférico. O meio osteogênico foi produzido pela adição de ácido ascórbico e β -glicerofosfato, uma vez que são responsáveis pelo processo de diferenciação celular. O meio foi trocado 2-3 vezes por semana. Por fim, deixou-se as células aderidas a superfície inferior das placas durante 24 horas.

b) Viabilidade celular

Após o preparo da cultura, 1,0 mL desse meio de cultura foi adicionado em cada poço de uma placa com 24 poços contendo em cada um disco com diâmetro de 1 cm, como os apresentados na figura 3, das membranas biopoliméricas e híbridas produzidas nesse trabalho. Assim, a viabilidade de osteoblastos cultivados sobre as superfícies das membranas (n=3) foi avaliada pelo método clássico do MTT após, conforme considerado na literatura⁹⁴, 24 e 72 horas de incubação *in vitro* a 37°C, em 5% de pressão CO₂ e 95% de ar atmosférico, utilizando o protocolo descrito por Mosmann⁹⁵ e adaptado por Faria et al.⁹⁶ Nesse método, o sal MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] produz o composto altamente colorido formazan decorrente da redução do NADH presente nas células, refletindo assim a atividade da enzima desidrogenase em células vivas. Após a reação de coloração, a absorbância de cada poço foi mensurada a 560 e 690 nm usando o espectrofotômetro Spectronic (Genesys 2). Resultados foram expressos como média de triplicata para cada amostra e expressos em comparação com o controle de poliestireno (100%).

3.3.8 Incorporação das nanopartículas de prata (NpAg) nas membranas híbridas

a) Síntese de nanopartículas de prata por redução química com NaBH₄

As nanopartículas de prata (NpAg) utilizadas foram sintetizadas por meio da redução de um sal de Ag(I), com base em outras metodologias descritas na literatura.^{97,98} Para isso, considerando o volume de 10 mL adotado nesse trabalho para a produção de uma membrana biopolimérica, foi adicionado gota a gota (cerca de 1 gota / segundo) 1 mL de uma solução aquosa de AgNO₃ em concentração 1 mmol.L⁻¹ em um béquer contendo 4 mL de água deionizada e 5 mL de uma solução de NaBH₄ a 2 mmol.L⁻¹ que tinha sido arrefecida num banho de gelo. Esse sistema reacional foi mantido sob forte agitação, em temperatura ambiente, por 3 minutos até o final da adição de AgNO₃, pois, dessa forma, assegurou-se excesso de NaBH₄ para estabilizar as NpAg. Ao final observou-se uma mudança na coloração do sistema de incolor para amarela, a qual deve estar associada a formação do sol. A redução da prata ocorre segundo a equação química (Eq. 4):⁹⁷

A formação desse sol foi acompanhado por espectroscopia de absorção na região do UV-Visível e medidas de tamanho de partícula e potencial zeta. Ambos podem ser avaliados por meio da técnica de espelhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scatterin*). O potencial zeta das nanopartículas informa sobre a estabilidade das nanopartículas. As nanopartículas estabilizadas eletrostaticamente apresentando um potencial zeta superior a ± 20 mV são consideradas estáveis. Para as nanopartículas estericamente estabilizadas, o valor do potencial zeta não influencia muito a estabilidade coloidal.

É importante ressaltar que as condições de reação incluindo o tempo de agitação e quantidades relativas de reagentes foram cuidadosamente controladas para se obter NpAg coloidal amarela estável, visto que, de acordo com Mulfinger et al.⁹⁷, se a agitação continuar após completa adição de AgNO_3 ocorrerá agregação das nanopartículas, acarretando em uma mudança gradativa na coloração do sistema de amarelo mais escuro para violeta e, por fim, acinzentado, momento no qual as partículas se depositam no fundo do recipiente. Agregação semelhante também pode ocorrer se a reação for interrompida antes que todo o sal de prata tenha sido adicionado ao sistema reacional.

Para a incorporação das NpAg nas membranas biopoliméricas e híbridas, optou-se adotar uma concentração de 0,5 mg/100 cm² e 5 mg/100 cm² de membrana, visto que no trabalho de Wu et al.⁹⁹ foram produzidas membranas de celulose bacteriana contem NpAg em um faixa de concentração de 15 a 45 mg/100 cm² de membrana que apresentaram efeito antimicrobial contra três diferentes bactérias. Dessa forma, assumindo a concentração de 0,5 mg/100 cm², sintetizou-se as nanopartículas a partir da adição de 1 mL de solução de AgNO_3 com concentração de em concentração 1 mmol.L⁻¹ em e 5 mL de uma solução de NaBH_4 a 2 mmol.L⁻¹ enquanto que os hidogéis foram preparados em um volume de 4 mL de acordo com a mesma metodologia descrita acima. Ao final da produção das NpAg, esse sistema reacional foi mantido sob agitação e aquecimento a 60°C, e todo o volume do hidrogel, também a 60°C, foi adicionado ao sol obtido. Posteriormente, o sistema final foi mantido sob agitação por 12 horas para assegurar, além da completa solubilização dos biopolímeros empregados, a estabilização das NpAg no hidrogel. Ao final, observou-se a obtenção de hidrogéis com coloração amarelada, característico devido a presença do sol nos intertícios da matriz biopolimérica, os quais foram empregados nas metodologias propostas nesse trabalho para a incorporação da fase mineral para produção das membranas híbridas. No caso de adotar a concentração

de 5 mg/100 cm², usando a mesma metodologia descrita acima, as nanopartículas foram sintetizadas a partir da adição de 1 mL de solução de AgNO₃ em concentração 0,01013 mol.L⁻¹ em e 5 mL de uma solução de NaBH₄ a 0,05341 mol.L⁻¹.

b) Atividade antimicrobial das membranas híbridas contendo NpAg

Todos experimentos envolvendo atividade antimicrobiana foram realizados em colaboração com o Laboratório de Controle de Qualidade – DCF/FCFRP/USP, sob supervisão da professora Marcia Eliana da Silva Ferreira.

A atividade antimicrobiana das membranas compósitas foi investigada contra as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), utilizando o método de difusão em ágar por disco. Os inóculos bacterianos foram repicados em placas de ágar CM0 131 Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid) 24 horas antes do teste de atividade antimicrobiana. Foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina 0,85% (p/v) utilizando como referência, por meio da comparação aproximada a olho nu, o padrão de turvação 1 da escala nefelométrica de MacFarland (Probac do Brasil), que corresponde a 300 milhões de bactérias por mL de meio. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL da suspensão foi espalhada, com uma alça de Drigalsk, na superfície de placas de Petri contendo 20 mL do meio TSA

Tanto as membranas contendo as NpAg quanto as produzidas sem a incorporação das nanopartículas, os controles desse teste, foram cortadas em forma de disco com 1 cm de diâmetro, os quais, posteriormente, foram esterilizados por radiação ultravioleta a partir de sua incidência durante 5 minutos sob cada lado do disco. Antes de incubado a 37°C por 24 h, os discos foram aplicados com pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo o ágar, previamente inoculada com a solução salina dos micro-organismos escolhidos. Subsequentemente, a zona de inibição bacteriana foi monitorada considerando como atividade inibitória a formação de halo em torno dos discos contendo NpAg, dado como a medida da distância entre a borda do filme e a borda de inibição (mm). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado a partir de uma duplicata técnica e de uma duplicata biológica.

c) Liberação das NpAg das membranas híbridas para o meio fisiológico

A liberação das NpAg foi acompanhada por espectrometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível, com o auxílio do espectrofotômetro Hewlett Packard 8453. Nesse estudo, as amostras foram cortadas em quadrados de 1 cm² e imersas no interior de uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm contendo 1,5 mL de água deionizada e mantidas a 37°C durante 24 horas. Medidas de absorbância foram aferidas em 390 nm durante intervalos pré-estabelecidos dentro do período de imersão tanto das amostras de interesse quanto do controle, que consistiu em membranas sem a incorporação das NpAg. Para a determinação da concentração de NpAg liberada nesses intervalos empregou-se o método de curva de calibração externa, utilizando uma solução estoque padrão de nanopartículas preparada a partir da adição de 1 mL de solução de AgNO₃ em concentração 0,01013 mol.L⁻¹ em um béquer contendo 4 mL de água deionizada e 5 mL de uma solução de NaBH₄ a 0,05341 mol.L⁻¹. Dessa forma, realizou-se uma série de diluições simples para que fosse produzido um intervalo de absorbâncias no qual englobasse os valores aferidos para as amostras analisadas nesse trabalho.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos constituintes da matriz orgânica

Segundo a literatura,^{15,16} a matriz orgânica, formada especificamente por arranjos hierárquicos das fibrilas de colágeno, atua como molde no qual os cristais de HAp são depositados no seu interior. Durante a formação do tecido ósseo, especula-se que a mineralização das fibrilas deve ocorrer a partir de um transiente amorfo, que se infiltra guiado eletrostaticamente em determinadas regiões desse arranjo transformando-se então em cristais de HAp, os quais possuem uma estrutura única que não seria termodinamicamente estável na ausência da matriz orgânica. No entanto, os mecanismos pelos quais essa morfologia é estabilizada ainda permanecem elusivos. Nessa perspectiva, é importante destacar que em pH ácido ocorre forte repulsão entre os monômeros de tropocolágeno, que seriam subunidade das fibrilas de colágeno, negativamente carregados evitando, assim, a sua agregação.³⁶ Contudo, a elevação do pH do meio intensifica as interações hidrofóbicas, favorecendo, assim, a formação das fibrilas de colágeno. Em vista desses aspectos, considerou-se relevante caracterizar tanto a conformação quanto a carga residual das moléculas de colágeno que compuseram a matriz orgânica dos materiais desenvolvidos durante a execução desse trabalho.

Assim, por meio da Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC), buscou-se caracterizar as conformações das moléculas de colágeno hidrolisado tanto em água quanto na mistura entre CaCl_2 e H_3PO_4 adotada nesse trabalho, de modo a ser avaliado a influência do meio reacional na conformação das moléculas desse biopolímero.

Segundo a literatura,¹⁰⁰ é esperado no DC para o colágeno íntegro um pico negativo e outro positivo, referentes às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$, em 198 nm e 221 nm, associados com grupos cromóforos e a estrutura tripla helicoidal do colágeno, respectivamente. No entanto, nesse trabalho, utilizou-se o colágeno hidrolisado, que é um produto de hidrólise desnaturada, promovida a partir da solubilização do colágeno íntegro sob alta temperatura e na presença de base forte, na qual é perdida a estrutura tripla helicoidal do colágeno, reduzindo-a ao nível secundário ou primário.⁴⁸

O espectro de DC para uma estrutura desnaturada como o colágeno hidrolisado, deve apresentar os dois picos esperados para a estrutura tripla helicoidal, porém devem

diminuir de intensidade, de modo que o pico positivo apresente uma elipticidade em torno de zero¹⁰¹. Dessa forma, por meio dos espectros de DC apresentados na figura 5, podemos observar que, tanto em água quanto na mistura entre CaCl_2 e H_3PO_4 , o colágeno hidrolisado, conforme esperado, não apresentou picos positivos em torno de 221nm, comprovando que as moléculas de colágeno utilizadas nesse trabalho não apresentam uma estrutura secundária definida, tanto em água quanto no meio reacional aqui considerado.

Figura 5 – Espectro de DC de colágeno hidrolisado em A) água e em B) uma mistura composta por 5mmol.L⁻¹ CaCl_2 + 1,65 mmol.L⁻¹ H_3PO_4 , pH 2,68 a 20°C.

No entanto, a presença de uma estrutura desnaturada, como o colágeno hidrolisado, em um biomaterial é considerada benéfica para a gestão do osso e para doenças articulares, como artrose e osteoporose, tendo em vista que ele é uma fonte biodisponível de peptídeos e aminoácidos sendo um agente terapêutico na síntese de cartilagem e matriz óssea⁵².

Outro parâmetro importante para proteínas é o ponto isoelétrico (pI), o qual está relacionado com a proporção entre resíduos de aminoácidos ácidos e resíduos de aminoácidos básicos na cadeia polipeptídica, ou seja, o pH em que o balanço de cargas entre os grupos funcionais presentes nas cadeias biopoliméricas resulta em zero. Dessa forma, a carga residual das cadeias dos biopolímeros foi estudada em diferentes valores de pH por meio de medidas de potencial zeta. Avaliou-se, além da influência do meio reacional na carga residual, as possíveis interações entre as moléculas de colágeno e as dos polissacarídeos nas misturas. A figura 6 apresenta a curva de potencial zeta (ζ) *versus* pH de uma solução diluída de colágeno, a qual indica que o pI do colágeno hidrolisado

foi 3,75. Os valores relatados na literatura estão próximos a 4,56.⁴⁸ No caso do colágeno íntegro, tem sido reportado na literatura um pI igual a 8,26, o qual é decorrente da extração ácida que mantém os resíduos de amida lateral intactos.⁴⁸ Nesse sentido, destaca-se que o fato do pI do colágeno hidrolisado estar numa faixa ácida pode ser atribuído à maior densidade de grupos carboxila causada pela hidrólise de grupos amida lateral presentes nas cadeias biopoliméricas.⁴⁸ Assim, de modo geral, pode-se observar que apenas em pHs acima desse ponto isoelétrico as moléculas de colágeno apresentam uma carga residual negativa, a qual pode ser decorrente da desprotonação desses grupos carboxila.

Figura 6 – Curva de titulação pH versus potencial Zeta (mV) para a amostra de 0,3 mg.L⁻¹ de colágeno hidrolisado em água Milli-Q®, diluída 6 vezes.

Dessa forma, além da sua estrutura desordenada, pode-se assumir que a redução do pI em comparação ao do colágeno íntegro, devido ao aumento das cargas negativas em pH fisiológico, ocasiona a perda da capacidade do colágeno formar fibrilas, uma vez que a presença excessiva das cargas negativas ocasiona repulsão de cargas, dificultando, assim, tanto as interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas entre as moléculas, as quais são fundamentais para o processo de fibrilogênese. Com a perda da capacidade de formar uma rede fibrilar, tem-se proposto a incorporação de outros biopolímeros à matriz colagênica, pois, devido às suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, gelificantes e mecânicas, pode-se obter uma matriz para direcionar e a sustentar a

deposição de uma fase mineral. Por essa razão, além de mimetizarem as proteínas não-colagênicas presentes na matriz óssea, esse estudo propõem o uso, devido as notáveis propriedades dos polissacarídeos quitosana e κ -carragenana para formação do hidrogel no qual será incorporado a fase mineral.

Considerando, inicialmente, apenas a presença de colágeno, observa-se que no caso da metodologia 1 adotada para o crescimento da fase inorgânica, na qual partiu-se de um pH inicial próximo a 2,7, as moléculas de colágeno apresentam carga residual líquida positiva, ou seja, os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos que compõem essa proteína se encontram protonados. O mesmo pode ser observado para os hidrogéis em que foram incorporados quitosana à matriz biopolimérica na presença de $0,0165 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_3PO_4 , os quais foram utilizados nas metodologias (2) e (3) adotadas para a incorporação da HAp sintética e bovina, respectivamente. Entretanto, para os hidrogéis em que foram acrescentados κ -carragenana na presença de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de CaCl_2 , empregados nas metodologias (2) e (3), partiu-se de um pH menos ácido, próximo a 7. Nesse caso, as cadeias biopoliméricas do colágeno apresentam carga residual negativa. No entanto, buscou-se avaliar a influência da presença do polissacarídeo na carga residual das blends biopoliméricas em que foram incorporadas a fase inorgânica, de modo a estudar-se as possíveis interações entre as cadeias do colágeno e dos polissacarídeos. Vale ressaltar que matrizes com carga residual negativa são preferíveis devido ao fato de mimetizarem o efeito de polipeptídios aniônicos no processo de calcificação de matrizes ósseas e de servirem como suportes biodegradáveis para liberação controlada de drogas catiônicas.⁴³

Na figura 7, é apresentado a curva de potencial zeta (ζ) *versus* pH de uma solução diluída do polissacarídeo escolhido e de uma mistura diluída composta por 2,5% (p/v) colágeno e 2,5% (p/v) polissacarídeo de interesse.

Figura 7 – Curva de titulação potencial Zeta vs pH para as amostras A) 0,3 mg.L⁻¹ de quitosana, B) 0,15 mg.L⁻¹ de colágeno hidrolisado + 0,15 mg.L⁻¹ de quitosana, C) 0,3 mg.L⁻¹ de κ-carragenana e D) 0,15 mg.L⁻¹ de colágeno hidrolisado + 0,15 mg.L⁻¹ de κ-carragenana diluída 6 vezes em água Milli-Q®.

O pI 6,7 determinado para quitosana está de acordo com o reportado na literatura¹⁰². No caso do hidrogel composto por quitosana, nas 3 metodologias consideradas para a incorporação da fase mineral, esse polissacarídeo, assim como o colágeno hidrolisado, é solubilizado em um pH inicial próximo a 2,7, um meio ácido que acarreta na protonação dos grupos NH₂ (NH₃⁺) da quitosana, resultando, conforme apresentado na figura 7A, em cadeias biopoliméricas com uma carga residual positiva. Nesse caso, como as moléculas de colágeno também apresenta carga residual positiva, a interação na mistura não é favorecida. Com o aumento do pH, da mesma forma como acontece na difusão de NH_{3(g)} no hidrogel utilizada na metodologia 1, a interação entre colágeno hidrolisado e quitosana é favorecida, pois na faixa de pH 3,75-6,72 a quitosana mantém-se positivamente carregada, enquanto o colágeno está com a maior parte de seus

grupos ionizáveis negativamente carregados. De fato, esta interação resulta na diminuição do pI para a mistura quitosana+colágeno verificado na figura 7B.

O comportamento do biopolímeros κ -carragenana é mostrado na figura 7C. Pode-se observar que as cadeias poliméricas desse polissacarídeo apresentam carga residual negativa em toda a faixa de pH analisada, de 2 a 10, a qual é decorrente da presença do grupo sulfato carregado negativamente na unidade repetitiva de dissacarídeo. Este resultado explica o potencial zeta negativo em toda faixa de pH observado para a mistura κ -carragenana + colágeno hidrolisado. Em pH mais ácido, menor do que 3,75, em que as moléculas de colágeno apresentem carga residual positiva, a adição da κ -carragenana deve promover interações eletrostáticas favoráveis com as cadeias da proteína desnaturada. Além disso, a carga residual negativa em toda a faixa de pH, favorece a interação com íons Ca^{2+} , precursores da fase mineral. Portanto, de todas a matrizes propostas nesse trabalho, verificou-se que o uso de κ -carragenana se mostrou vantajoso em relação à quitosana em termos de interações entre as cadeias do biopolímeros, uma vez que todas as matrizes compostas pelo primeiro apresentaram uma carga residual negativa nas condições reacionais utilizadas na preparação das membranas híbridas.

4.2 Análise da fase inorgânica na ausência da matriz biopolimérica

Antes da obtenção das membranas híbridas propostos nesse estudo, buscou-se estudar as condições reacionais para precipitação da fase mineral tanto na ausência quanto na presença das blendas biopoliméricas. Dessa forma, utilizando-se CaCl_2 e H_3PO_4 como fonte de íons, fixou-se, inicialmente, a concentração $0,0165 \text{ mol.L}^{-1}$ para o referido ácido. Em seguida, a partir dessa concentração e considerando a razão Ca/P da HAp igual a 1,67, estimou-se a concentração $0,0275 \text{ mol.L}^{-1}$ para o CaCl_2 . No entanto, além dessas condições, optou-se estudar um segundo sistema composto por excesso de Ca^{2+} , considerando-se uma concentração de CaCl_2 próxima a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. O uso de excesso de íons Ca^{2+} é relevante para matrizes compostas por κ -carragenana em que serão, pela metodologia (1), incorporadas a fase mineral pela precipitação *in locu* nos seus interstícios, uma vez que, além de influenciar a solubilidade desse polissacarídeo, a presença de íons divalentes controla a transição da conformação das cadeias biopoliméricas de um estado novo-ao-acaso à hélice, a qual é uma etapa relevante no processo de gelificação.⁶⁶

Posteriormente, para ambas as condições iniciais de precipitação, seja na presença ou não da matriz orgânica, buscou-se estudar a influência do aumento do pH, decorrente da difusão de $\text{NH}_3(\text{g})$ gerada a partir da decomposição do $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ em dessecador fechado, na formação da fase mineral. A precipitação de HAp é favorecida em meio alcalino numa faixa de pH de 8 a 9.⁵² Dessa forma, recipientes contendo 10 mL da mistura entre CaCl_2 e H_3PO_4 nas concentrações pré-estabelecidas, com e sem excesso de Ca^{2+} , foram expostos à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por diferentes intervalos de tempo, como 5, 15, 30, 45, 60 e 180 minutos. Ao final de cada intervalo de exposição verificou-se o pH de cada solução resultante. A figura 8 apresenta o gráfico o qual relaciona a variação de pH em função dos intervalos de exposição estabelecidos.

Figura 8 – Variação do pH da mistura de CaCl_2 e H_3PO_4 em função do tempo de exposição a atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$.

Analisando a figura 8, pode-se observar que, nas condições reacionais aqui consideradas, 45 minutos de exposição a atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ é o tempo mínimo para elevar o pH do meio, inicialmente, ácido, com pH em torno de 2,74, para uma faixa mais alcalina acima de 9. Além disso, nota-se que, após atingir pH 9,5, em uma exposição mais prolongada do que 45 minutos, o pH atinge um patamar em torno de 9,6-9,7, e por essa razão, pode-se considerar que após 45 minutos as espécies ácidas do meio foram neutralizadas e as alcalinas atingiram o equilíbrio no meio reacional.

Apesar de HAp ser obtida praticamente pura em $\text{pH} \geq 8$, estudos^{52,103} têm buscado trabalhar em $\text{pH} \geq 9$ para a mineralização de matrizes biopoliméricas compostas por

colágeno, uma vez que diferentes auto-organizações das membranas híbridas podem ser obtidas em função do pH de mineralização. No entanto, em termos da formação de HAp, verificou-se que a obtenção da fase mineral em pH = 8 e pH = 10 não resulta em diferenças em termos de composição e morfologia, conforme atestado por FTIR e MEV. Dessa forma, mesmo que por meio da DRX pequenas diferenças podem ser identificadas do ponto de vista da cristalinidade e intensidade e forma relativa dos picos de difração, os precipitados obtidos nessa faixa de pH correspondem à mesma fase mineral.⁵² No presente estudo, o início de formação de material precipitado ocorreu a partir de tempo de exposição de 5 minutos, em que verificou-se um pH de 4,6, no qual é esperada⁵² a formação de outra estrutura cristalina de fosfato de cálcio denominada brushita ($\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

A composição, morfologia e cristalinidade dos precipitados obtidos em pH na faixa de 8-9,6 e da HAp bovina foram analisados. Nesse sentido, tanto a HAp bovina quanto os precipitados obtidos após a exposição das misturas, com e sem excesso de Ca^{2+} , a atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 45 minutos, foram analisados por meio de DRX e de FTIR, a fim de avaliar-se a composição e cristalinidade da fase inorgânica que as constitui. A figura 9 apresenta os espectros FTIR e difratogramas obtidos após análise dos precipitados.

Figura 9 – (A) Espectros de absorção na região do infravermelho e (B) difratogramas de raios-X da HAp bovina (linha vinho) e dos precipitados obtidos, com (linha roxa) e sem excesso (linha azul) de Ca^{2+} , após a exposição à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9011092- hidroxiapatita hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentados na figura 9A revelam a presença de grupos funcionais comuns entre as três amostras analisadas, visto que, de acordo com a literatura, as bandas centradas em 564 cm^{-1} e 600 cm^{-1} estão relacionadas às vibrações de flexão dos grupos fosfato da HAp, enquanto que as bandas em 1035 cm^{-1} e 1101 cm^{-1} estão relacionadas à vibração de estiramento assimétrico das ligações P-O que são apresentadas nos grupos fosfato.⁷¹ O modo de estiramento característicos das vibrações do grupo -OH presente na estrutura da HAp deve ser localizado em torno de 3570 cm^{-1} , mas, devido à sobreposição com a banda forte decorrente da água adsorvida em HAp esse sinal é afetado.⁷¹ Além desses sinais característicos da HAp, observa-se outros, os quais sugerem a existência de mistura nas amostras analisadas. A banda em 1620 cm^{-1} também atribuída à presença de água. A presença das bandas intensas em torno de 1400 cm^{-1} e 860 cm^{-1} devem estar relacionadas, ao estiramento do C-O e vibração fora do plano de curvatura associado ao grupo CO_3^{2-} , respectivamente.^{104,105} A presença dos grupos CO_3^{2-} deve estar relacionado com a formação de CaCO_3 , uma vez que os meios reacionais foram expostos a $\text{NH}_3(\text{g})$ e $\text{CO}_2(\text{g})$, pois ambos são produtos da decomposição do $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Ainda, assim como no caso da HAp bovina comercial, a presença de ligações C-O pode estar associada com resquícios da matriz proteica da qual foi extraída, com a presença de outras fases minerais carbonatadas recorrentes em no tecido ósseo, como MgCO_3 e CaCO_3 ⁷⁰ ou ainda com a substituição dos grupos -OH (substituição do tipo A) ou fosfato PO_4^{3-} (substituição do tipo B) na estrutura da HAp por grupos CO_3^{2-} .¹⁰⁶ Buscando corroborar os resultados obtidos por meio da FTIR, as três amostras em questão foram submetidas à DRX. Dessa forma, os difratogramas obtidos foram comparados com padrões do banco de dados Crystallography Open Database (COD) e as melhores correspondências de fases de fosfato de cálcio foram sobrepostas aos difratogramas dos precipitados analisados. Assim, analisando-se os difratogramas apresentados na figura 9B verificou-se a correspondência com os picos mais intensos em $2\theta=26^\circ$ e $31,8^\circ$, os quais fazem referência aos planos (002) e (211) da fase hexagonal de HAp.¹⁰⁷ Além disso, picos menos intensos em $28,7^\circ$, $39,9^\circ$, $46,7^\circ$, $49,9^\circ$ e $53,4^\circ$, os quais podem ser correlacionados aos planos (210), (310), (222), (213) e (004), respectivamente, também podem ser observados.¹⁰⁷ No caso dos precipitados obtidos com e sem excesso de Ca^{2+} observou-se a ocorrência de misturas de estruturas cristalinas, uma vez que, além da HAp, foi obtido CaCO_3 na forma do polimorfo calcita, de acordo com os picos em $2\theta = 23^\circ$, 29° , 36° , 39° , 43° , 47° e 57°

apresentados na figura 9B.⁶⁸ Essa observação corrobora o que foi apontado na análise dos espectros de FTIR, e, assim, pode ser considerado que a presença de $\text{CO}_{2(g)}$ na atmosfera fechada interfere na disponibilidade de íons Ca^{2+} para a formação da HAp, pois durante a exposição do hidrogel a essa atmosfera pode ser atingido o Kps tanto da calcita ($K_{sp} = 3.31 \times 10^{-9}$ ou $\log(K_{sp}) = -8.48$, em 25°C)¹⁰⁸ quanto o da HAp ($K_{sp} = 2.51 \times 10^{-59}$ ou $\log(K_{sp}) = -58.6$, em 25°C).¹⁰⁹ A presença de CaCO_3 pode ser considerada benéfica em aplicações biomédicas, uma vez que a literatura⁶⁸ reporta sua capacidade de estimular o crescimento de HAp, quando expostas ao SBF. No caso da HAp bovina, não se observa mistura de diferentes fases minerais, sendo então atribuído a presença das ligações C-O a resquícios da matriz orgânica ou à formação de HAp carbonatada.

Outro parâmetro avaliado para caracterizar tanto a HAp bovina quanto os precipitados minerais obtidos nesse trabalho, foi a morfologia dessas partículas. Dessa forma, a figura 10 apresenta as micrografias eletrônicas obtidas.

Figura 10 – Micrografias eletrônicas das (A) partículas obtidas a partir da exposição da mistura $0,05\text{mol.L}^{-1} \text{CaCl}_2 + 0,0165\text{mol.L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$ à atmosfera de $\text{NH}_{3(g)}$ por 45 minutos e (B) HAp bovina comercial.

Observando-se a figura 10A, assim como nas análises de DRX e FTIR, a ocorrência de mistura entre diferentes estruturas cristalinas é confirmada, por meio das micrografias com aumento de 5000 vezes, tendo em vista a existência de partículas com morfologias diferentes, sendo a primeira romboedral com um tamanho médio de $6\ \mu\text{m}$, a qual é característica para a calcita,¹¹⁰ e a segunda tipo flor auto-organizadas em estruturas esféricas, que é comum para a HAp,⁷² apresentando um tamanho médio de $8\ \mu\text{m}$. Em

relação a HAp bovina, pode-se notar, por meio das micrografias apresentadas na figura 10B, com aumento de 60 vezes, a ocorrência de cristais maiores do que os obtidos sinteticamente, tendo em vista o tamanho médio de 400 μm , e com uma morfologia irregular, a qual está de acordo com o reportado na literatura,¹⁰⁶ que pode estar associada com a método de extração do tecido nativo. No entanto, ao ampliar-se as micrografias sobre a superfície dessas partículas pode-se observar uma superfície altamente rugosa formada por aglomerações de esferas nanométricas.

De modo geral, tem sido apontado na literatura⁷⁰ que o tamanho maior do cristal, a área superficial inferior e a maior cristalinidade da HAp, tanto para a sintética quanto a derivada de tecidos vivos, em comparação com o osso humano (baixa cristalinidade e uma faixa de tamanho de 20-40 nm), podem tornar a sua reabsorção por células ósseas *in vivo* substancialmente mais lenta do que a HAp produzida *in situ* pelas próprias células. A literatura tem apresentado^{70,74} estudos que mostram que o tamanho do cristal de HAp pode ser controlado pela presença de uma matriz polimérica, resultando em híbridos com tamanhos de partículas dentro da faixa encontrado no tecido ósseo humano (20-40 nm).

Nessa perspectiva, buscou-se caracterizar a distribuição de tamanho médio das partículas que seriam incorporadas à matriz orgânica por meio da técnica de DLS. As distribuições de tamanho estão apresentadas na figura 11. Pode-se observar na figura 11A que 100% das partículas obtidas sinteticamente apresentaram um tamanho médio de 567 ± 76 nm, o qual se mostrou um pouco menor quando comparada a distribuição de tamanho apresentada na figura 11B para a HAp bovina, em torno de 682 ± 91 nm. Essa faixa de distribuição está próxima com as que tem sido reportada na literatura, uma vez que para HAp extraída de tecidos vivos têm-se encontrado uma faixa de 760 a 950 nm.^{70,111}

Outro parâmetro relevante, apresentado na figura 11, para a caracterização das partículas em questão é a carga superficial ou o potencial zeta. Este pode ser um fator importante na determinação da osteocondutividade ou osteoindutividade de biomateriais.⁷⁰ Valores negativos de potencial zeta tem efeito favorável na adesão e proliferação de células ósseas.⁷⁰ Dessa forma, na figura 11C é apresentado o potencial zeta obtido para as partículas sintetizadas sob condição de excesso de Ca^{2+} , em torno de $-15,2 \pm 5,54$ mV. Grande parte dos métodos de síntese reportados na literatura⁷⁰ resultam em partículas de HAp com potencial zeta positivo. Este fato leva à busca de métodos que reduzam o potencial zeta positivo dessas partículas.^{70,112} As partículas sintetizadas neste projeto por

si já apresentam carga negativa que pode auxiliar na adesão e na proliferação de células ósseas. Vale a pena ressaltar que o osso humano apresenta um potencial zeta igual -70 mV em condições fisiológicas.

Potencial zeta de $-13,9 \pm 6,4$ mV foi obtido para HAp bovina, conforme apresentado na figura 11D. Na literatura⁷⁰, tem sido reportado um potencial zeta igual a -9,25 mV. Os valores semelhantes obtidos para HAp sintética e bovina valida o método desenvolvido em nosso laboratório para precipitação de apatitas biomiméticas e facilita a comparação dos dados de incorporação dessas partículas às membranas biopoliméricas.

Figura 11 – Distribuição de tamanho por número das (A) partículas obtidas a partir da exposição da mistura $0,05\text{mol.L}^{-1}$ CaCl_2 + $0,0165\text{mol.L}^{-1}$ H_3PO_4 à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 45 minutos e (B) HAp bovina comercial, com suas, respectivas, medidas de potencial zeta (ζ) (C) e (D).

As matrizes também apresentam uma carga residual, sendo que a composta por quitosana é carregada positivamente em pH até 6,2 e por κ -carragenana carregada negativamente em toda a faixa de pH. Desta forma, a carga das matrizes também deve influenciar a dispersão das partículas que serão incorporadas. Essas análises serão avaliadas na próxima seção a partir da análise da morfologia das membranas híbridas.

4.3 Caracterização físico-química das membranas híbridas

Nesse estudo, propõe-se a obtenção de membranas híbridas a partir de três metodologias diferentes: (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz biopoliméricas; (2) adição das partículas de HAp sintetizadas e (3) adição de HAp bovina na matriz biopolimérica. No caso da metodologia (2) e (3), as partículas de HAp sintetizadas (HApS) a partir da exposição da mistura com razão molar Ca/P aproximadamente 3, à atmosfera de $\text{NH}_{3(g)}$ por 45 minutos e de HAp bovina (HApB) foram incorporadas aos hidrogéis, compostos por 2,5% de colágeno hidrolisado e 2,5% de um dos polissacarídeos escolhidos, em quantidade de 0,1(indicado por HApS ou HApB 0,1g), 0,01(indicado por HApS ou HApB 0,01g) e 0,001(indicado por HApS ou HApB 0,001g) gramas, de modo a avaliar-se o efeito da quantidade de partículas inorgânicas nas propriedades do material híbrido. No caso da metodologia (1), avaliou-se as condições e o tempo de exposição à atmosfera de $\text{NH}_{3(g)}$ para que ocorresse a precipitação da fase mineral.

Foram avaliados intervalos curtos e longos de exposição, dentro da faixa analisada na ausência da matriz orgânica (0-180 minutos). Matrizes compostas por 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% polissacarídeos foram preparadas, sendo utilizado a mistura com razão molar Ca/P~3 e para a κ -carragenana ainda foram acrescentados 5 mmol. L^{-1} de KCl dada especificidade dessa fração por íons K^+ .⁸⁶ Posteriormente, os hidrogéis obtidos foram expostos à atmosfera de $\text{NH}_{3(g)}$ por 15 e 180 minutos. Dessa forma, na figura 12, é apresentado os difratogramas decorrentes da análise das membranas híbridas por meio da DRX.

Figura 12 – Difratomogramas das membranas (1) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana e (2) 2,5% colágeno + 2,5% κ -carragenana após exposição à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 15 (linhas vinho e azul) e 180 minutos (linha roxa). As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9003124-KCl-Silvina-cúbica, (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 1011129- NH_4Cl -Salamoníaco-cúbica do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Pode-se observar tanto na figura 12(1) quanto na figura 12(2) a presença de um pico alargado em $2\theta \sim 20^\circ$, o qual está relacionado à estrutura amorfa da matriz biopolimérica. Em relação a figura 12(1), pode-se notar que, após a exposição da matriz composta por 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana por 15 minutos à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$, ocorre a formação de HAp, tendo em vista a presença do pico característico de sua fase hexagonal em $2\theta \sim 31,8^\circ$.¹⁰⁷ Nesse contexto, destaca-se a influência da matriz orgânica na formação da fase mineral, uma vez que 15 minutos de exposição da mistura com fração molar $\text{Ca/P} \sim 3$, na ausência da fase orgânica, alcança-se $\text{pH} \sim 7$ (Figura 8), o que não favorece a precipitação de fosfatos básicos.⁵² Esse resultado é considerado relevante, pois, além de ocorrer a formação de HAp em condições que não favoreçam a sua precipitação, esse sistema mimetiza a mineralização da matriz óssea que ocorre em $\text{pH} \sim 7,4$. Outra observação importante decorrente da análise da figura 12(1), é que um tempo longo de exposição, como 180 minutos, resulta na formação, além de HAP, de produtos indesejados como NH_4Cl , o qual pode ocorrer devido à elevada concentração de $\text{NH}_3(\text{g})$ no meio reacional. Os picos destacados por (*) na figura 12(1) mostram a correspondência da fase amoníaca com o padrão do banco de dados COD (1011129-Salamoníaco-cúbica).

Vale ressaltar, que hidrogéis fornecem um modelo tridimensional para o crescimento de HAp, e grupos funcionais, como grupos hidroxila e ácido carboxílico, favorecem a nucleação de fosfato de cálcio.⁷² Os íons fosfato e Ca^{2+} se difundem mais lentamente pelo hidrogel formado pela matriz orgânica, acarretando em supersaturação local nos interstícios da matriz, e dessa forma, atuam como centros de nucleação, levando

à formação de um núcleo de cristal 3D. À medida que o tempo de exposição progride o cristal passa à etapa de crescimento devido a difusão dos íons presentes no meio, do interior da matriz até extravasar para a superfície do gel.

Já no caso da matriz composta por 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5 κ -carragenana, pode-se observar, por meio da figura 12(2), que a presença de uma pequena concentração de K^+ na mistura resulta, após 15 minutos de exposição, na formação de KCl, conforme indicado pela correspondência dos picos em $2\theta \sim 28^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 65^\circ$ e 72° com o padrão do banco de dados COD. O mesmo ocorre em concentrações menores do que 5 mmol.L^{-1} e, por essa razão, dada a interferência desse íon, optou-se em não acrescentar os K^+ no meio reacional dos hidrogéis compostos por κ -carragenana.

Posteriormente, buscou-se avaliar o efeito do excesso de Ca^{2+} na formação da fase inorgânica nos interstícios da matriz biopolimérica. Para isso, utilizou-se um tempo de exposição de 45 minutos, pois, além de ser o mesmo considerado na síntese de HAp na ausência da fase orgânica, é um intervalo intermediário entre os estudados na figura 12. Dessa forma, na figura 13, é apresentado os difratogramas obtidos a partir da análise de DRX das membranas híbridas resultantes.

Figura 13 – Difratogramas das membranas híbridas obtidas a partir da exposição das matrizes (1) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana e (2) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% κ -carragenana, formadas a partir das misturas com razão molar $Ca/P=3$ (linhas roxa e verde) e com $Ca/P=1,67$ (linhas azul e vinho), à atmosfera de $NH_3(g)$ por 45 minutos. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Analisando as figuras 13(1) e 13(2), pode-se notar, além do alargamento em $2\theta \sim 20^\circ$ característico da fase orgânica, a presença dos picos característicos em $2\theta = 26^\circ$ e $31,8^\circ$ da HAp.¹⁰⁷ No caso da figura 13(1), observa-se, primeiramente, que um tempo de

exposição de 45 minutos resultou em picos mais definidos em relação aos observados após exposição de 15 minutos. Além disso, pode-se verificar que o uso de uma Ca/P maior resultou em picos correspondentes ao padrão de HAp, marcados por * na figura 13(1), mais definidos em comparação à membrana obtida a partir de Ca/P=1,67. No caso da matriz composta pela κ -carragenana, comparando a figura 13(2) com a figura 12(2), pode-se notar que, com a ausência de K^+ no meio reacional, ocorreu a formação de HAp no interstícios da matriz. No entanto, o uso de uma Ca/P=3 pode ter acarretado na formação de uma mistura de estruturas cristalinas, visto que, pelo difratograma apresentado na figura 13(2) o pico intenso em ($2\theta=29^\circ$) coincide com o pico principal de calcita. Porém, ou outros picos deste carbonato de cálcio coincidem com os da HAp, o que leva a dificuldade de identificação da mistura, podendo ser possível também uma mudança de orientação preferencial de crescimento da HAp.

Por essa razão, recorreu-se à caracterização das membranas híbridas por espectroscopia Raman. Assim, na figura 14, é apresentado os espectros Raman obtidos para membranas híbridas resultantes a partir da exposição de ambas matrizes orgânicas, (1) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana e (2) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% κ -carragenana, formadas a partir da mistura com razão molar Ca/P=3, à atmosfera de $NH_{3(g)}$ por 45 minutos.

Figura 14 – Espectro Raman das membranas híbridas obtidas a partir da exposição das matrizes (1) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana (linha roxa) e (2) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% κ -carragenana (linha verde), formadas a partir da mistura com razão molar Ca/P=3, à atmosfera de $NH_{3(g)}$ por 45 minutos.

A literatura aponta que a principal banda característica de alta intensidade no espectro Raman observada para a HAp pura é encontrada na posição 963 cm^{-1} , decorrente do modo vibracional de estiramento simétrico do fosfato.¹¹³ Outras bandas também são

reportadas; como nas posições 1049, 431, 450, 581, 592, 610 e 3572 cm^{-1} , no entanto, elas são de baixa ou média intensidade.¹¹³ Também são apontadas na literatura bandas no espectro Raman associadas aos grupos funcionais dos polissacarídeos utilizados nesse trabalho.^{114,115} No caso da presença de quitosana são reportadas bandas características de alta intensidade nas posições 2932 e 2885 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupos CH_2 e CH_3 do anel pirano.¹¹⁴ Quanto à κ -carragenana a literatura relata uma banda de alta intensidade na região 1075–1085 cm^{-1} e bandas com intensidade relativamente elevada em 1240–1260 cm^{-1} , devido aos modos vibracionais associados ao grupo $\text{S}=\text{O}$, e em 845–850 cm^{-1} , decorrente de vibrações do grupamento $\text{C}-\text{O}-\text{SO}_4$ presente na D-galactose-4-sulfato.¹¹⁵

Assim, analisando a figura 14(1), pode-se observar a presença de uma banda de alta intensidade no espectro Raman, obtido para a membrana híbrida contendo 2,5% (p/v) quitosana, em $\sim 956 \text{ cm}^{-1}$. Corroborando os dados obtidos pela análise do difratograma de raios-X, essa banda está relacionada¹¹³ ao estiramento simétrico do grupo fosfato presente na HAp. As bandas características de alta intensidade da quitosana relatadas na literatura não são observadas no intervalo selecionado de 200-1400 cm^{-1} para o espectro Raman apresentado em 14(1).

Já na figura 14(2), além de também ser notada a presença da banda de alta intensidade em $\sim 962 \text{ cm}^{-1}$, verifica-se a existência de uma banda com intensidade relativamente elevada na posição 849 cm^{-1} . Quanto à presença desta última, assume-se, de acordo com a literatura,¹¹⁵ deve estar relacionada aos modos vibracionais associados ao grupo $\text{S}=\text{O}$ presente na estrutura da κ -carragenana. Como as bandas características de alta intensidade da carragenana não estão na região de 900 a 1000 cm^{-1} , verifica-se que a banda em $\sim 962 \text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento simétrico do grupo fosfato da HAp. Além disso, no espectro Raman obtido para a membrana híbrida contendo 2,5% (p/v) κ -carragenana, não foi observado bandas características associadas a presença de calcita, no caso, na posição 1085 cm^{-1} , de alta intensidade, e também em 1435, 711, 280, 154 cm^{-1} , de baixa intensidade.¹¹⁶ Dessa forma, assume-se que nas membranas híbridas, obtidas a partir da exposição da matriz 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% κ -carragenana contendo razão molar $\text{Ca}/\text{P}=3$ à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 45 minutos, não deve ter ocorrido a precipitação de calcita junto a formação de HAp nos interstícios dessa blenda. Portanto, inversão de intensidade nos picos em 29° e 31,8° deve estar relacionada uma mudança de orientação preferencial de crescimento da HAp.

Dessa forma, como os picos referentes a HAp estão mais definidos nas membranas híbridas formados a partir de um excesso de Ca^{2+} no meio reacional, conforme observado na figura 13, as amostras obtidas pela precipitação *in locu* da fase mineral nos interstícios da matriz orgânica foram produzidos a partir da razão molar $\text{Ca/P}=3$ e de sua exposição à atmosfera de $\text{NH}_{3(g)}$ por 45 minutos. Assim, as amostras obtidas foram identificadas como (Exp. 45.).

Posteriormente, buscou-se avaliar o efeito da incorporação da fase mineral na composição, morfologia e bioatividade das membranas. Por essa razão, inicialmente, buscou-se, caracterizar, em termos da composição, os grupos químicos presentes nas membranas biopoliméricas na ausência da fase inorgânica, e, também, a sua resposta a bioatividade após imersão a solução SBF por 30 minutos. Dessa forma, os espectros FTIR obtidos antes (1) e após (2) exposição ao SBF, são apresentados na figura 15. A tabela 2 apresenta as bandas típicas para colágeno,¹¹⁷ quitosana¹¹⁸ e κ -carragenana,^{30,63} com suas frequências nominais.

Comparando-se os espectros de FTIR-ATR, destacados por (A) nas figuras 15(1) e 15(2), com os dados apresentados na tabela 2, pode-se verificar, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos, a presença de bandas características dos biopolímeros, coincidentes com a região em que são observadas as bandas atribuídas às vibrações tanto dos grupos fosfato, como em 1035cm^{-1} e 1101cm^{-1} , quanto do grupo $-\text{OH}$, em torno de 3570cm^{-1} , presentes na estrutura da HAp. Além disso, o preparo das matrizes compostas por quitosana envolveram, mesmo com a ausência da fase mineral, o uso de H_3PO_4 , e por essa razão, bandas intensas na região de $1035\text{-}1100\text{cm}^{-1}$ devem ser observadas.

Figura 15 – Espectros de reflexão na região do infravermelho (FTIR-ATR) das membranas biopoliméricas (1) 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% quitosana e (2) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos, na ausência da fase mineral.

Tabela 2 – Bandas de absorção de infravermelho características do colágeno, quitosana e κ -carragenana

Colágeno		Quitosana		κ -carragenana	
Atribuição	Nº onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Nº onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Nº onda (cm ⁻¹)
Estiramento do grupo N-H (Amide A)	~3305	C=O-NHR	1654	Estiramento dos grupo -OH	3436
Estiramento do grupo C-H (Amide B)	~3081	Grupo amina (-NH ₂)	1540	Estiramento dos grupos O=S=O	1240–1260
Estiramento do grupo C=O (Amide I)	~1635	Estiramento dos grupos -NH ₂ e -OH	3400–3500	Estiramento do C-O da 3,6-anidrogactose	1070 e 930
Deformação do grupo N-H (Amide II)	~1545	Vibração da estrutura sacarídica	1000–1200	Galactose	970–975
Vibração do grupo C-N (Amide III)	~1240			C-O-SO ₃ no C2 do 3,6-anidrogactose	905
Vibrações dos grupos CH ₂	~1240			C-O-SO ₃ no C4 da galactose	845
Grupos CO ₃ ²⁻	~1445, 1414 e 876			C-O-SO ₃ no C2 do 3,6-anidrogactose	805

Dessa forma, a fim de avaliar a bioatividade das membranas biopoliméricas obtidas sem a incorporação da fase mineral, foi calculado a razão entre as áreas das bandas em ~1030 (estiramento assimétrico fosfato) e ~1633 cm⁻¹ (C=O, usada com referência

interna) apresentadas na figura 15(1) e 15(2). O aumento nesta razão após exposição ao SBF por 30 minutos pode ser atribuído à precipitação de outros fosfatos na superfície da membrana constituída exclusivamente pela matriz orgânica. Dessa forma, a tabela 3 apresenta os valores médios das razões entre as áreas dessas bandas.

Tabela 3 – Razão entre as intensidades relativas das bandas de absorção de infravermelho dos grupos PO_4^{3-} (1030 cm^{-1}) e C=O (1633 cm^{-1}) apresentadas nos espectros das membranas contendo 2,5% de polissacarídeos

2,5% Colágeno hidrolisado + 2,5% Quitosana		2,5% Colágeno hidrolisado+ 2,5% κ -Carragenana	
Antes SBF	Após SBF	Antes SBF	Após SBF
2,84	2,79	Controle	1,15
4,61	5,08	(Exp. 45m)	1,18
4,31	5,33	(HApS 0,1g)	1,91
4,14	5,83	(HApS 0,01g)	3,69
3,53	4,75	(HApS 0,001g)	1,42
6,40	7,44	(HApB 0,1g)	2,33
4,03	4,81	(HApB 0,01g)	1,45
3,91	4,35	(HApB 0,001g)	1,48
			2,29
			1,95
			1,75

Ao compararmos as razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O presentes nos espectros apresentado nas figuras 15(1) e 15(2), após a exposição dessas matrizes biopoliméricas ao SBF por 30 minutos, não se observou mudanças significativas em relação a essas bandas de absorção. Dessa forma, deve-se considerar que, na ausência da fase mineral, o tempo de exposição dessas matrizes biopoliméricas ao SBF escolhido não é suficiente para que ocorra a deposição de apatita sob a sua superfície. Hidrogéis de κ -carragenana, preparados com uma proporção molar de grupos Ca^{2+} /sulfônicos = 1,5, induziu a formação de apatita após exposição ao SBF durante 12 horas.⁶⁷ No entanto, propriedades de intumescimento e características de degradação dessas matrizes são problemas a serem contornados durante a uma longa exposição ao SBF.

A modificação das membranas biopoliméricas com a incorporação da fase mineral pode favorecer a bioatividade das membranas, de modo que ela seja atestada a partir da exposição dos híbridos formados ao SBF em intervalos de tempo curto. Por essa razão, buscou-se nesse trabalho estudar esse efeito a partir da comparação dos resultados obtidos por meio da caracterização das membranas biopoliméricas, denominado grupo controle, com a das membranas híbridas obtidas pelas três metodologias propostas nesse trabalho de incorporação da fase mineral.

Dessa forma, após analisar-se os grupos químicos presentes nas membranas biopoliméricas, buscou-se, utilizando a FTIR, avaliar o efeito da incorporação da fase mineral na composição das membranas híbridas resultantes. Dessa forma, as figuras 16 e 17 apresentam os espectros de FTIR-ATR, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos, das membranas compostas, respectivamente, por quitosana e κ -carragenana, além do colágeno hidrolisado e modificadas com a incorporação da fase mineral por meio das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,1g), (HApS 0,01g), (HApS 0,001g), (HApB 0,1g), (HApB 0,01g) e (HApB 0,001g).

Comparando-se os espectros apresentados em 15(1)(A) e 15(2)(A) com os das figuras 16(A) e 17(A), pode-se observar que, após a incorporação da fase mineral, as bandas nas regiões de $1035\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ estão mais definidas e intensas em relação às outras presentes no espectro. No entanto, devido à sobreposição entre as bandas dos biopolímeros, resumidas na tabela 2, e da fase mineral incorporadas as membranas biopoliméricas, avaliou-se o efeito da incorporação da fase mineral através da comparação entre as razões das áreas relativa entre as bandas correspondentes aos grupos PO_4^{3-} e C=O obtidas tanto para o grupo controle quanto para as membranas híbridas (tabela 3). Por meio dessa análise, verificamos que, tanto a matriz contendo quitosana quanto a composta por κ -carragenana, contendo a fase mineral por qualquer das três metodologias adotadas resultou em um aumento significativo nas razões entre as áreas relativas das bandas em comparação com a razão obtida para o grupo controle. Portanto, por meio da comparação entre as razões do grupo controle e das membranas híbridas podemos evidenciar e atestar tanto a incorporação da fase mineral, principalmente para (Exp. 45m), quanto a bioatividade em ambas as matrizes biopoliméricas. As razões das amostras contendo quitosana tender a ser maiores visto que, além da preparação desse hidrogel utilizar H_3PO_4 , pode haver sobreposição de bandas associadas ao biopolímero atribuída, conforme reportada na tabela 2, aos modos vibracionais presentes no grupamento C=O-NHR que resultam em um sinal na posição $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$.

Após exposição ao SBF por 30 minutos, comparando-se as razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O presentes nos espectros (A) e (B) das figuras 16 e 17, também foram observados mudanças significativas, de modo que o aumento nessas razões evidenciam a formação de apatita sobre a superfície do material atestando a bioatividade das membranas híbridas compostas tanto por quitosana quanto por κ -carragenana, independente da metodologia de incorporação da fase mineral adotada.

Posteriormente, recorreu-se a outras técnicas de caracterização para melhor ser avaliado o efeito da incorporação de HAp e a bioatividade das membranas híbridas, de modo a ser adquirido resultados que corroborem com as análises e cálculos feitos a partir do espectro de FTIR apresentados nas figuras 15, 16 e 17.

Figura 16 – Espectros de reflexão na região do infravermelho (FTIR-ATR), antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), em quantidades de 0,1 (*), 0,01(**) e 0,001 (***) gramas.

Figura 17 – Espectros de reflexão na região do infravermelho (FTIR-ATR), antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), em quantidades de 0,1 (*), 0,01(**) e 0,001 (***) gramas.

Outro parâmetro avaliado para investigarmos tanto os efeitos da incorporação da fase mineral as matrizes biopoliméricas quanto a bioatividade dessas membranas, é a morfologia superficial. Assim, por meio da MEV, analisou-se, inicialmente, a morfologia das membranas biopoliméricas, tanto compostas por quitosana (1) quanto por κ -

carragenana (2), na ausência da fase mineral, grupo controle, antes (A) e após (B) a exposição ao SBF por 30 minutos. As micrografias eletrônicas obtidas estão apresentadas na figura 18.

Figura 18 – Micrografias eletrônicas das membranas biopoliméricas (1) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana e (2) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos.

Observando-se as figuras 18(1)(A) e 18(2)(A), pode-se notar que ambas as membranas apresentam uma superfície rugosa. Após exposição ao SBF, por meio das figuras 18(1)(B) e 18(2)(B), pode-se notar uma superfície mais lisa com menos rugosidade para ambas as matrizes analisadas. No entanto, essa mudança superficial não deve ser decorrente da bioatividade dessas membranas, uma vez que não se observa a deposição de HAp sob a superfície. Nessa perspectiva, pode-se considerar que essa mudança deve estar associada com a dissolução parcial dessas membranas após a sua imersão a solução SBF.

Após analisar-se a morfologia superficial do grupo controle, buscou-se, utilizando a MEV, avaliar o efeito da incorporação da fase mineral na morfologia das membranas biopoliméricas. Dessa forma, as figuras 19 e 20 apresentam as micrografias eletrônicas obtidas, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos, das membranas compostas, respectivamente, além do colágeno hidrolisado, por quitosana e κ -carragenana e modificadas com a incorporação da fase mineral por meio das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,1g), (HApS 0,01g), (HApS 0,001g), (HApB 0,1g), (HApB 0,01g) e (HApB 0,001g).

Figura 19 – Micrografias eletrônicas, antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), em quantidades de 0,1 (*), 0,01(**) e 0,001 (***) gramas.

Figura 20 – Micrografias eletrônicas, antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), em quantidades de 0,1 (*), 0,01(**) e 0,001 (***) gramas.

Comparando-se as micrografias das membranas biopoliméricas, grupo controle, antes da exposição ao SBF, apresentadas na figura 18(A), com as apresentadas nas figuras

19(A) e 20(A), referentes às matrizes compostas por quitosana e κ -carragenana, respectivamente, pode-se verificar que a incorporação da fase mineral pelas três metodologias adotadas promoveu modificações na morfologia superficial, de modo que pode-se observar a formação de uma fase particulada incrustada na matriz. Analisando-se a morfologia de todas as membranas híbridas, observou-se que apenas as obtidas pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g) apresentaram a fase mineral dispersa homogeneamente pela fase biopolimérica. No caso das membranas obtidas pelas metodologias (HApS 0,1g), (HApB 0,1g), (HApS 0,001g) e (HApS 0,001g) observa-se, que para as duas primeiras, a adição de 0,1 g resulta em um excesso de partículas, que culmina na formação de agregados de morfologias e tamanhos variados dispersos heterogeneamente pela matriz, enquanto que para as duas últimas, a incorporação de 0,001 g de partículas resulta em uma concentração baixa de fase mineral no material híbrido, de modo que a morfologia superficial dessas membranas se assemelham à observada para o grupo controle.

Após exposição ao SBF por 30 minutos, verificou-se mudança significativa na morfologia superficial das membranas híbridas obtidas a partir de (Exp 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g). Nessas amostras, observa-se aumento de partículas esféricas as quais estão dispersas homogeneamente sobre a superfície do material. A morfologia dessas partículas depositadas é semelhante à descrita para a HAp em outros estudos após exposição ao SBF.¹⁰⁷ No caso das amostras em que se observou excesso de partículas, também ocorre a deposição de uma fase mineral composta por partículas esféricas, mas devido ao excesso, conseqüentemente a formação de agregado, essas membranas possuem morfologia não-homogênea. Já para as membranas híbridas obtidas após adição de 0,001g de partículas, não se observou uma mudança significativa da morfologia superficial, o que pode ser esperado devido à baixa concentração de fase mineral, apresentando um comportamento semelhante às membranas biopoliméricas.

Esses resultados corroboram os aumentos significativos observados nas razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O presentes nos espectros (A) e (B) das figuras 16 e 17 apresentadas na tabela 3, evidenciando e atestando o efeito da incorporação da fase mineral nos interstícios da matriz orgânica e a bioatividade das membranas híbridas.

Posteriormente buscou-se caracterizar a cristalinidade da fase mineral depositada sobre a superfície de todas as membranas biopoliméricas, híbridas ou não, após a exposição ao SBF. Inicialmente analisou-se as membranas biopoliméricas sem

incorporação da fase mineral, grupo controle. Os difratogramas obtidos são apresentados na figura 21.

Figura 21 – Comparação dos difratogramas das membranas biopoliméricas (linha roxa) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana e (linha azul) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, após exposição ao SBF por 30 minutos. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Analisando-se os difratogramas apresentados na figura 21, pode ser observado a presença de um pico alargado em $2\theta \sim 20^\circ$, o qual está relacionado à estrutura amorfa da matriz biopolimérica. A ausência de picos de fases cristalinas corrobora o fato de não ocorrer um aumento significativo nas razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O presentes nos espectros FTIR apresentado nas figuras 15(1) e 15(2) (Tabela 3), após a exposição do grupo controle ao SBF. Dessa forma, pode-se confirmar que, na ausência da fase mineral, de fato 30 minutos de exposição ao SBF não foram suficientes para que fosse atestada a bioatividade do grupo controle, requerendo um tempo de exposição maior, como apontado na literatura⁶⁷ para hidrogéis de κ -carragenana, para que ocorra a deposição de apatita sob a superfície das membranas biopoliméricas. No caso da matriz composta por quitosana é importante ressaltar que no estudo de Mota et al.²⁰ a imersão da membrana contendo esse polissacarídeo a 1% (p/v) em SBF por 5 dias não resultou na formação da camada de apatita sob a sua superfície. Na verdade, os autores²⁰ apontam que somente após a incorporação de uma fase inorgânica a essa membrana ocorreu, depois de 5 dias de exposição SBF, a formação da camada de apatita.

Nessa perspectiva, por meio das análises de DRX, buscou-se avaliar a composição dos minerais depositados após exposição das membranas híbridas a SBF. Analisou-se as membranas formadas a partir das metodologias (Exp 45m), (HApS 0,1g), (HApS 0,01g),

(HApS 0,001g), (HApB 0,1g), (HApB 0,01g) e (HApB 0,001g) após a sua exposição ao SBF por 30 minutos. No caso da metodologia (Exp 45m), ao comparar-se os difratogramas da figura 22(A) e 22(B) com os apresentados nas figuras 13(1) e 13(2) pode-se observar que os picos correspondentes aos padrões de HAp se mostraram melhor definidos após a exposição ao SBF. Além disso, na figura 21(B), pode-se verificar que após a exposição da matriz composta por κ -carragenana ao SBF, não há mais inversão de intensidade nos picos em 29° e $31,8^\circ$ decorrente de uma mudança de orientação preferencial de crescimento da HAp como observado no difratograma apresentado na figura 13(2) para membrana preparada com uma razão Ca/P=3. Dessa forma, a formação de apatita sobre a superfície do material atesta sua bioatividade, corroborando tanto o aumento significativo nas razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O apresentado na tabela 3, quanto a mudança da morfologia superficial mostrada pelas imagens de MEV, em comparação com as anteriores à essa exposição.

Em ambas as matrizes orgânicas estudadas, por meio dos difratogramas apresentados na figura 22, também pode ser observado que no caso da exposição das amostras obtidas pelas metodologias (HApS 0,1g), (HApS 0,01g), (HApB 0,1g) e (HApS 0,01g), além dos picos em $2\theta=26^\circ$ e $31,8^\circ$, picos menos intensos em $28,7^\circ$, $39,9^\circ$, $46,7^\circ$, $49,9^\circ$ e $53,4^\circ$, presentes no padrão de HAp, se mostraram mais definidos após a exposição ao SBF.

Dessa forma, pode-se assumir que a incorporação da fase mineral, por qualquer que seja a metodologia adotada, além mimetizar a composição da matriz óssea, auxilia na bioatividade *in vitro* das superfícies biopoliméricas, visto que, diferente do que ocorreu para o grupo controle, ocorre precipitação de HAp em tempos curtos de exposição ao SBF.

Além disso, analisando-se os difratogramas apresentados na figura 22 para a amostras obtidas tanto pela metodologia (HApS 0,1g) quanto pela (HApS 0,01g), é possível verificar distinções entre as matrizes compostas por quitosana e por κ -carragenana, uma vez que os picos correspondentes à calcita, no caso $2\theta=29^\circ$, são evidentes no difratograma dessa última. Essa observação pode indicar que, mesmo que seja esperado a presença da calcita decorrente da adição de um precipitado formado por uma mistura de estruturas cristalinas, que foi sintetizada na ausência da matriz orgânica, ao hidrogel, a presença do polissacarídeo deve influenciara organização e dispersão dessa fase mineral pela matriz biopolimérica.

Figura 22 – Comparação dos difratogramas obtidos após exposição ao SBF por 30 minutos para as membranas híbridas formadas a partir da incorporação da fase mineral as matrizes (A) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana e (B) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz; e da adição de (2) HAp sintetizada e (3) HAp bovina, em quantidades de 0,1 (*), 0,01 (**) e 0,001 (***) gramas. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Apesar das membranas híbridas obtidas pelas metodologias (Exp 45m), (HApB 0,1g) e (HApB 0,01g) serem constituídos por uma fase mineral contendo apenas HAp, verifica-se que, em termos de bioatividade, apenas as membranas resultantes de (Exp. 45m), para ambas as matrizes biopoliméricas estudadas, apresentam os picos correspondentes ao padrão de HAp melhores definidos. A homogeneidade na dispersão da

fase mineral pode ser responsável por este resultado, visto que nessa metodologia, a matriz orgânica deve orientar e controlar tanto a nucleação e saturação dos íons para formação da fase inorgânica quanto o crescimento do mineral nos interstícios da rede biopolimérica.

No caso das amostras obtidas pelas metodologias (HApS 0,001g) e (HApB 0,001g), não se observa picos definidos que sejam correspondentes a HAp ou a calcita. Essa observação corrobora os dados obtidos pela MEV, pois, devido à baixa concentração de fase mineral na membrana, o comportamento dessas membranas é semelhante ao das amostras obtidas sem a incorporação de fase mineral.

Buscando maior similaridade da composição e organização estrutural do osso, variou-se a proporção entre os biopolímeros, de modo a aumentar a concentração de colágeno hidrolisado em detrimento a de polissacarídeo na composição da matriz orgânica. Dessa forma, preparou-se membranas híbridas a partir das metodologias (Exp 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), visto que resultaram em amostras que apresentaram uma morfologia superficial organizada e homogênea e uma seletividade à precipitação exclusiva de HAp após sua exposição ao SBF. Para isso, utilizou-se 3,5% colágeno e 1,5% polissacarídeo, pois foi a composição mínima para que fosse possível a obtenção de membranas maleáveis e destacáveis do molde de teflon.

Inicialmente, buscou-se avaliar o efeito da composição mínima na precipitação da fase mineral decorrente da, conforme proposto na metodologia (Exp 45m), exposição da matriz orgânica formada à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 45 minutos. Assim, na figura 23, é apresentado os difratogramas obtidos a partir da análise de DRX das membranas híbridas preparadas com razão molar Ca/P=3.

Figura 23 – Difratogramas das membranas híbridas obtidas a partir da exposição das matrizes (A) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) quitosana e (B) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) k-carragenana, formadas a partir das misturas com razão molar Ca/P=3, à atmosfera de $\text{NH}_3(\text{g})$ por 45 minutos. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

Analisando as figuras 23(A) e 23(B), pode-se notar, além do alargamento em $2\theta \sim 20^\circ$ característico da fase orgânica, a presença dos picos característicos em $2\theta = 26^\circ$ e $31,8^\circ$ da HAp.¹⁰⁷ Novamente, como observado na figura 13 para os difratogramas obtidos para a membrana contendo 2,5% (p/v) polissacarídeo, encontra-se dificuldade na análise da presença de calcita nestas amostras utilizando-se DRX. No entanto, utilizou-se espectroscopia Raman para superar esta dificuldade. Conforme mostrado na figura 14 não foram observados picos referentes a CaCO_3 nos espectros. Por essa razão, espera-se que o mesmo deve ocorrer para as membranas constituídas por 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado e 1,5% (p/v) polissacarídeo.

Posteriormente, buscou-se avaliar o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado na composição, morfologia e bioatividade das membranas. Em termos da composição, caracterizou-se os grupos químicos presentes nas membranas biopoliméricas modificadas com a incorporação da fase mineral por meio das metodologias (Exp 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g). Dessa forma, as figuras 24 e 25 apresentam os espectros de FTIR-ATR, antes (A) e após (B) exposição ao SBF por 30 minutos, das membranas compostas por 1,5% (p/v) quitosana ou κ -carragenana, respectivamente, além de 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado.

Comparando-se os espectros apresentados nas Figuras 15(1)(A) e 15(2)(A) com os das figuras 24(A) e 25(A), com os dados apresentados na tabela 2, pode-se observar a presença de bandas características dos biopolímeros, as quais, como mencionado anteriormente, se sobrepõem com as atribuídas às vibrações tanto dos grupos fosfato quanto do $-\text{OH}$ presentes na estrutura da HAp, principalmente nas regiões de $1035\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$.

Dessa forma, a fim de avaliar o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado na composição e na bioatividade das membranas, foi calculado a razão entre as áreas das bandas em ~ 1030 e $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ apresentadas nas figuras 24 e 25, indicados tanto por (A) quanto por (B), para que fosse realizada análise em termos da comparação com razão apresentada pelo grupo controle, apresentada na tabela 3, e também das amostras após exposição ao SBF por 30 minutos. Assim, a tabela 4 apresenta os dados de intensidade relativa entre as bandas correspondentes aos grupos PO_4^{3-} e a banda de $\text{C}=\text{O}$ presente na estrutura dos biopolímeros.

Tabela 4 – Razão entre as intensidades relativas bandas de absorção de infravermelho dos grupos PO_4^{3-} (1030 cm^{-1}) e C=O (1633 cm^{-1})

3,5% colágeno hidrolisado + 1,5% quitosana			3,5% colágeno hidrolisado + 1,5% κ -carragenana	
Antes SBF	Após SBF		Antes SBF	Após SBF
1,80	1,99	(Exp. 45m)	1,97	2,12
1,92	4,50	(HApS 0,01g)	1,93	2,47
1,83	3,65	(HApB 0,01g)	1,91	2,23

No caso das membranas contendo quitosana, verifica-se, por meio da comparação com a razão do grupo controle, no caso 2,84 para membrana contendo 2,5% (p/v), que as razões calculadas para as amostras obtidas pelas três metodologias apontadas, antes do SBF, são substancialmente menores. Além disso, também se observou que essas razões calculadas para as membranas híbridas composta por 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado são menores em comparação as obtidas para as membranas correspondente contendo 2,5% (p/v) (Tabela 3). No entanto o mesmo não é observado para as amostras constituídas por 1,5% (p/v) κ -carragenana, visto que as três razões calculadas são maiores em comparação tanto com o grupo controle, que é 1,15, quanto com as obtidas para as membranas compostas por 2,5% (p/v), apresentadas na tabela 3.

Dessa forma, verifica-se que o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado na composição é mais pronunciado para as membranas contendo quitosana. A redução da razão deve, considerando as mesmas condições para a incorporação da fase mineral pelas três metodologias apontadas, estar relacionada a mudanças na área relativa das bandas consideradas.

Após exposição ao SBF por 30 minutos, comparando-se as razões entre as áreas das bandas de PO_4^{3-} e C=O presentes nos espectros (A) e (B) das figuras 24 e 25, também foi observado, como para as membranas contendo 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado, um aumento significativo evidenciando a formação de apatita sobre a superfície do material e atestando a bioatividade das membranas híbridas compostas tanto por quitosana quanto por κ -carragenana, independente da metodologia de incorporação da fase mineral adotada. No entanto, observa-se aumentos significativos para as membranas contendo quitosana, indicando que a bioatividade pode ser influenciada pelo tipo de polissacarídeo.

Em comparação com os resultados obtidos para as membranas compostas por 2,5% colágeno hidrolisado + 2,5% polissacarídeo (figuras 16 e 17), verifica-se que o aumento da razão após exposição das membranas híbridas obtidas por (Exp. 45m), (HApS 0,01g), (HApB 0,01g) ao SBF por 30 minutos pode ser afetado pelo aumento da

concentração de colágeno hidrolisado. Em geral, as membranas contendo 3,5% (p/v) desse biopolímero resultou em aumentos relativamente menores, em comparação com os valores obtidos para as membranas constituídas por 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado (Tabela 3). Como esse biopolímero é uma estrutura proteica desnaturada reduzida ao nível secundário ou primário, a redução da concentração de polissacarídeo na membrana híbrida pode resultar no aumento de sua solubilidade em SBF, acarretando em alta degradabilidade da membrana híbrida.

Posteriormente, serão apresentados outros resultados adquiridos por outras técnicas que nos permitirão melhor avaliar o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado tanto na composição quanto na bioatividade das membranas biopoliméricas.

Figura 24 – Espectros de reflexão na região do infravermelho (FTIR-ATR), antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) quitosana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas.

Figura 25 – Espectros de reflexão na região do infravermelho (FTIR-ATR), antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas.

Dentre essas, destaca-se a MEV, a qual permitiu que fosse avaliado mudanças da morfologia superficial decorrentes tanto da incorporação da fase mineral quanto da bioatividade dessas membranas híbridas. Dessa forma, as figuras 26 e 27 apresentam as micrografias eletrônicas obtidas, antes (A) e após exposição ao SBF por 30 minutos, das membranas compostas, por colágeno hidrolisado e por quitosana e κ -carragenana,

respectivamente, modificadas com a incorporação da fase mineral por meio das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

Da mesma forma observada anteriormente, comparando-se as micrografias apresentadas nas figuras 18(1)(A) e 18(2)(A) com as apresentadas nas figuras 26(A) e 27(A), pode-se verificar que a incorporação da fase mineral pelas três metodologias adotadas promoveu modificações na morfologia superficial, a qual é caracterizada por uma fase particulada dispersa homogeneamente e incrustada pelos interstícios da matriz biopolimérica, com a ocorrência de alguns pontos de aglomeração de partículas. No caso das amostras obtidas a partir da metodologia (Exp. 45m), observa-se que a fase mineral está dispersa mais homogeneamente pela fase biopoliméricas em comparação com as amostras obtidas pelas metodologias (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

Após exposição ao SBF por 30 minutos, verificou-se mudança significativa na morfologia superficial das membranas, caracterizada por um aumento no número de partículas as quais estão depositadas sob a superfície da membrana híbrida. A morfologia dessas partículas depositadas sob as superfícies é semelhante à descrita para a HAp em outros estudos após exposição ao SBF.¹⁰⁷ Pode-se notar, que as membranas formadas por 1,5% (p/v) κ -carragenana, após a exposição ao SBF, apresentam excesso de partículas as quais se agrupam formando aglomerados dispersos pela superfície (figura 27). O mesmo não é observado para as membranas compostas por 1,5% (p/v) quitosana (figura 26), as quais apresentaram morfologia mais particulada e homogênea com a presença de alguns aglomerados sob a superfície. No caso da membrana híbrida composta por κ -carragenana e obtido pela metodologia (HApB) verifica-se menor número de partículas e poucos aglomerados dispersos pela superfície após exposição ao SBF, diferindo da morfologia observada no grupo controle (Figura 18).

Dessa forma, em termos das mudanças na morfologia superficiais, não se verificou, em comparação com as micrografias das amostras correspondente apresentadas nas figuras 19 e 20, efeito pronunciado decorrente do aumento da concentração de colágeno hidrolisado.

Essas mudanças na morfologia para todas as amostras analisadas corroboram os resultados obtidos por meio das análises de FTIR, visto que, para todas as amostras, os aumentos observados nas razões entre as áreas relativas das bandas decorrentes dos modos vibracionais dos grupos PO_4^{3-} e C=O , apresentadas na tabela 4, evidenciam a formação de apatita sobre a superfície do material atestando a bioatividade das

membranas híbridas compostas tanto por quitosana quanto por κ -carragenana, independente da metodologia adotada.

Figura 26 – Micrografias eletrônicas, antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) quitosana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas.

Figura 27 – Micrografias eletrônicas, antes (A) e após (B) a exposição ao SBF, das membranas híbridas obtidas a partir a incorporação da fase inorgânica na matriz 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas.

Posteriormente buscou-se caracterizar a cristalinidade da fase mineral depositada sob a superfície após a exposição ao SBF. A figura 28 apresenta os difratogramas de raios-X obtidos após exposição ao SBF das membranas compostas por colágeno hidrolisado e por (A) quitosana e (B) κ -carragenana modificadas com a incorporação da fase mineral por meio das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

Figura 28 – Comparação dos difratogramas obtidos após exposição ao SBF por 30 minutos para as membranas híbridas formadas a partir da incorporação da fase mineral as matrizes (A) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) quitosana e (B) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 34m.); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas. As fases minerais analisadas foram identificadas com os padrões de difração (■) 9001233-hidroxiapatita-hexagonal e (●) 9009668- calcita hexagonal do banco de dados Crystallography Open Database (COD).

No caso das membranas híbridas obtidas a partir da metodologia (Exp. 45m), pode-se observar, comparando os difratogramas apresentados em 23 e 28, para ambas as matrizes biopoliméricas, pode-se observar que os picos correspondentes aos padrões de HAp se mostraram mais bem definidos após a exposição ao SBF por 30 minutos.

No entanto, mesmo após essa exposição, verifica-se ainda, em ambas as blendas, a ocorrência, nas amostras obtidas pela metodologia (Exp. 45m), da inversão de intensidade nos picos em 29° e $31,8^\circ$ decorrente da mudança de orientação preferencial de crescimento da HAp. No entanto, comparando-se com os resultados apresentados na figura 22 com os da 28, nota-se que o mesmo não é observado antes da exposição para membranas contendo 2,5% (p/v) quitosana e após exposição de ambas as matrizes compostas por 2,5% (p/v), tendo em vista a ausência de picos na posição $2\theta=29^\circ$. Dessa forma, considera-se que a redução da concentração de ambos os polissacarídeos deve influenciar a orientação preferencial de crescimento da fase mineral, visto que a agregação das cadeias dos polissacarídeos é responsável pela formação da rede tridimensional na qual a fase mineral irá crescer nos seus interstícios e se depositar sob a sua superfície na exposição ao SBF.

Já no caso das membranas híbridas obtidas a partir das metodologias (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g) também pode-se observar apenas os picos correspondentes aos padrões de HAp bem definidos. Para as amostras obtidas pela metodologia (HApB 0,01g), observa-se que o aumento da concentração de colágeno hidrolisado na formulação dessas membranas híbridas, não resultam em efeito pronunciado na bioatividade dessas membranas.

Posteriormente, buscou-se avaliar o efeito da variação da composição da matriz orgânica na precipitação *in locu* da HAp nos interstícios da rede tridimensional formada pela agregação das cadeias do polissacarídeo. Considerando que na literatura⁷⁴ é reportado que o tamanho das partículas da fase mineral pode ser controlado pela presença de uma matriz polimérica, calculou-se o tamanho médio dos cristais de HAp formados na presença das blendas biopoliméricas adotadas nesse trabalho por meio da metodologia (Exp. 45m). Dessa forma, conforme reportado na literatura,¹¹⁹ o tamanho do cristal formado ao longo do plano (002) foi calculado, após correção da linha base dos difratogramas apresentados nas figuras 13, 22, 23 e 28, a partir do pico de reflexão indexado em $2\theta = 26^\circ$ de acordo com a equação de Scherrer (4):

$$L = \frac{K.\lambda}{\beta.\cos\theta} \quad (4)$$

onde λ representa o comprimento de onda da radiação de raios-X (0,154 nm), θ é o ângulo de difração, K é uma constante de proporcionalidade dependente da forma geométrica das partículas, e β é o alargamento da linha de difração medida à meia altura de sua intensidade máxima do referido pico de difração em radianos. Os valores de K podem variar na faixa de 0,84 a 0,89 dependendo da geometria. No estudo de Fang et al.¹¹⁹ foi utilizado K=0,89 para o cálculo do tamanho médio dos cristais de HAp sintetizados na presença dos polissacarídeos quitosana e iota-carragenana. Por essa razão, neste estudo assumiu-se o mesmo valor.

Os tamanhos médios calculados para a fase mineral precipitada tanto nos interstícios quanto na superfície, após exposição ao SBF, das matrizes orgânicas compostas por 2,5% (p/v) e 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado estão apresentados na figura 29.

Figura 29 – Tamanho médio de cristalito calculado a partir do pico de reflexão (002) do cristal de HAp sintetizado na presença de matriz orgânica, contendo 2,5% (p/v) ou 1,5% (p/v) polissacarídeos, antes e após exposição ao SBF por 30 minutos.

Analisando a figura 29, verifica-se que, para todas amostras obtidas pela metodologia (Exp. 45m), a fase mineral precipitada nos interstícios da matriz orgânica apresentou tamanhos menores quando comparados à faixa de 20-40 nm, reportada para apatita do osso humano.^{70,119}

A partir dos difratogramas apresentados na figura 9, calculou-se o tamanho de cristalito para HApS e HApB. Os valores obtidos foram próximo as 15 e 11 nm, respectivamente na presença da matriz polimérica contendo 2,5% (p/v) polissacarídeos. Esses resultados mostram que produção das membranas híbridas pela metodologia (Exp. 45m) resulta em partículas com tamanho próximos às partículas obtidas na ausência de biopolímero (HApS) e próximo do obtido para os cristalitos da HApB, que foram extraídos do tecido ósseo natural bovino.

De acordo com a literatura,¹¹⁹ o tamanho do cristalito pode depender do tipo de polissacarídeo, tendo em vista as diferentes interações entre a fase mineral e a matriz orgânica. A precipitação de HAp na presença de quitosana e iota-carragenana, resultou na obtenção dos tamanhos de cristal de 15,1 e 13,1 nm, respectivamente.¹¹⁹ Dessa forma, analisando a figura 29, foi obtido tamanhos próximos ao reportado na literatura, no caso, ~13 nm para a membrana contendo 2,5% (p/v) quitosana e ~12 nm para membranas compostas por 2,5% (p/v) κ -carragenana.

Além disso, em termos da composição a matriz orgânica, observa-se, por meio da figura 29, que o aumento da concentração de colágeno atrelada à redução da quantidade de polissacarídeo na formulação da blenda resulta em um efeito mais pronunciado para a matriz contendo κ -carragenana, dado o aumento do tamanho do cristal de HAp de 12 para 18 nm. No caso das membranas compostas por quitosana, não se observa variação significativa, visto que para a membrana formada por 2,5% (p/v) têm-se um tamanho de 13 nm, enquanto que a blenda produzida com 1,5% (p/v) resulta na formação de cristais com tamanho médio de 15 nm.

Essa distinção pode ser atribuída às diferentes interações entre matriz orgânica e a fase mineral, pois, tendo em vista que integridade estrutural dos hidrogéis é dependente da natureza, (químico ou físico) do entrecruzamento das cadeias biopoliméricas,⁶⁶ os cristais de HAp podem se agrupar em nanopartículas maiores através de interações químicas superficiais com grupos funcionais presentes da estrutura do polissacarídeo.¹¹⁹

Nas membranas contendo κ -carragenana, um poliânion, os Ca^{2+} presentes devem interagir com os grupos sulfatos presentes na estrutura da unidade repetitiva desse polissacarídeo promovendo a estabilização das suas cadeias poliméricas na formação do hidrogel. É reportado na literatura¹¹⁹ que os grupos sulfatos são de especial importância na nucleação de cristal de HAp, pois, podem efetivamente ligar o Ca^{2+} para induzir um número muito grande de núcleos para o crescimento do cristal de HAp, resultando na formação de cristais de HAp com um tamanho pequeno. Portanto, o grupos sulfatos são considerados como iniciadores para a nucleação heterogênea de cristais de HAp, visto que a presença de um grupo sulfato por unidade repetitiva pode resultar em muitos pontos de nucleação ($-\text{OSO}_3\text{Ca}^+$ e $(-\text{OSO}_3)_2\text{Ca}$), facilitando o crescimento de cristais.¹¹⁹ Assim, a redução da concentração de κ -carragenana deve resultar em uma diminuição dos pontos de nucleação para a formação da fase mineral, resultando na obtenção de cristais de HAp com tamanho maior, mais próximos do que foi observado para a HApS.

No caso das membranas contendo quitosana, um policátion, é apontado na literatura¹¹⁹ que as interações eletrostáticas entre os grupos PO_4^{3-} e $-\text{NH}_2$, em conjunto com a coordenação de $-\text{NH}_2$ com o Ca^{2+} , são essenciais para a nucleação e crescimento do cristal de HAp nos interstícios da rede tridimensional formada pela agregação das cadeias desse polissacarídeo. No entanto, é destacado que essas interações são mais fracas em comparação às que ocorrem entre o Ca^{2+} e os grupos sulfatos da κ -carragenana, e por essa razão, resultam em menos pontos de nucleação e, conseqüentemente, cristais de HAp com tamanhos maiores são formados. Já a redução da quantidade de quitosana também deve resultar em uma diminuição no número de pontos de nucleação para a formação da fase mineral, acarretando na formação de cristais de HAp com tamanho maior, variando de 13 para 15 nm, próximo ao observado para a HApS obtida na ausência da matriz orgânica.

De fato, pode ser observado na figura 29 que as membranas contendo 2,5% (p/v) κ -carragenana resultou na formação de HAp com tamanho menor do que o obtido na presença da matriz composta por quitosana na mesma concentração. Além disso, isso também deve justificar o efeito mais pronunciado para a matriz contendo κ -carragenana, decorrente da redução da concentração de polissacarídeo em conjunto com o aumento da quantidade de colágeno hidrolisado na formulação da fase orgânica, em que se observou um aumento mais significativo do tamanho do cristal de HAp em comparação com o obtido para matriz composta por quitosana.

Após a exposição ao SBF por 30 minutos, pode-se verificar na figura 29, que a ocorrência de precipitação de uma nova fase mineral na superfície de todas as membranas híbridas estudadas, resultou na formação de uma fase mineral que apresenta tamanhos de cristais de HAp dentro da faixa de 8-11 nm, menores do que o observado antes da exposição ao SBF. Esses dados corroboram as análises de DRX. Além disso, nota-se que, o aumento da concentração de colágeno hidrolisado associado com a redução da quantidade de polissacarídeo não resulta em um efeito significativo no tamanho dos cristais da fase mineral depositada sob a superfícies das membranas híbridas, visto que se observou uma pequena variação média de 1,7 nm para ambas as blendas.

4.4 Avaliação das propriedades mecânicas das membranas híbridas

Nesse estudo, buscou-se avaliar as propriedades mecânicas das membranas biopoliméricas com e sem a incorporação da fase mineral, de modo que fosse possível comparar o efeito, além da adição das partículas, das metodologias adotadas para formação das membranas híbridas. Os valores encontrados para os parâmetros módulo de Young, elongação e tensão, obtidos nos testes de tração das matrizes compostas por quitosana e κ -carragenana, são apresentados e comparados na figura 30A e figura 30B, respectivamente.

Em geral, sabe-se que a adição de nanopartículas a matrizes poliméricas, organizadas tridimensionalmente, aumenta a resistência mecânica da membrana quando as partículas inorgânicas são uniformemente dispersas, uma vez que a interação entre as cadeias poliméricas e as partículas resulta no sinergismo entre a fase orgânica e inorgânica, conferindo um aumento na rigidez das membranas.¹²⁰ Por exemplo, no trabalho de Lee et al.¹²¹ membranas de quitosana modificadas com sílica apresentaram módulo de Young variando entre 15 e 61 MPa, conforme aumenta-se a quantidade de sílica. Já no estudo de Jegal et al.¹²⁰ verificou-se que, além da adição de apatita nas membranas, a variação das proporções entre poli (lactida-co-caprolactona) (PLCL) e gelatina em uma blenda resulta em mudanças do módulo de Young de ~5 MPa, para membrana de PLCL pura, para uma faixa de 25 a 60 MPa, dependendo da concentração de gelatina e de apatita na amostra.

Figura 30 – Comparação dos parâmetros obtidos nos testes de tração, módulo de Young, elongação e tensão das membranas híbridas formadas a partir da incorporação da fase mineral as matrizes (A) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana e (B) 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), em quantidades de 0,1 (*), 0,01(**) e 0,001 (***) gramas.

Nesse sentido, ao analisar-se os valores de Módulo de Young encontrados na figura 30, pode-se observar que a incorporação da fase inorgânica pelas 3 metodologias adotadas nesse estudo promove o aumento desse parâmetro, sendo que uma dispersão

homogênea da fase mineral pela matriz orgânica deve favorecer o sinergismo, resultando no aumento da rigidez do material.¹⁵ No caso da matriz composta por 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) quitosana, o módulo de Young varia de $16,4 \pm 0,54$ MPa para as membranas obtidas na ausência das partículas, até $130,1 \pm 15,9$, $97,2 \pm 6,7$ e $93,7 \pm 6,4$ MPa, para as membranas (Exp. 45m), (HApS 0,1g) e (HApB 0,1g), respectivamente Figura 30A. Para as membranas constituídas por 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ -carragenana, observa-se uma mudança do módulo de Young de $67,5 \pm 15,8$ a $110 \pm 23,9$, $84,7 \pm 3,6$ e $49,3 \pm 14,9$ MPa para as membranas (Exp. 45m), (HApS 0,1g) e (HApB 0,1g), respectivamente. No caso da última metodologia, nota-se uma redução do módulo de Young em comparação com o exibido pelo grupo controle. No caso essa redução deve estar associada, como observado nas micrografias eletrônicas apresentadas na figura 20, a dispersão não-homogênea da fase mineral pela membrana biopolimérica, afetando o sinergismo entre as fases orgânica e inorgânica.

Em relação as membranas biopoliméricas obtidas sem a incorporação da fase mineral, pode-se notar que o valor de módulo de Young encontrado para matriz composta por quitosana está próximo do que é reportado na literatura¹²¹ para membranas constituídas exclusivamente por esse polissacarídeo. No entanto, esse valor em comparação com o obtido para matriz formada por κ -carragenana difere significativamente. Essa distinção pode ser atribuída às interações eletrostáticas entre os Ca^{2+} e os grupos sulfato presente na estrutura da κ -carragenana que promovem ordenamento das cadeias desse polissacarídeo formando uma rede tridimensional com elevada coesão. No caso das membranas formadas pela combinação do colágeno hidrolisado com a quitosana, os hidrogéis são preparados em pH em torno de 2,7, um pH em que tanto as cadeias da quitosana quanto as do colágeno hidrolisado apresentam carga residual positiva, o que desfavorece interações eletrostáticas tipo atrativas do sistema. No entanto, quando se eleva o pH, as cadeias do colágeno passam a exibir carga residual negativa decorrente da desprotonação dos seus grupos carboxílicos, os quais interagem eletrostaticamente com os grupos aminos carregados positivamente da quitosana, culminando na formação de um complexo polieletrólítico. Esse comportamento ocorre apenas na metodologia (Exp. 45m), e justifica o fato do módulo de Young dessa membrana aumentar, em relação a matriz biopolimérica, em cerca de 130%, em comparação as membranas compostas por κ -carragenana, cujo aumento está em torno de 115%.

Pode-se verificar, de modo geral, que a incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,1g), (HApS 0,01g), (HApB 0,1g) e (HApB 0,01g), resultaram no aumento do módulo de Young para valores que estão dentro da faixa observada, de acordo com a literatura,¹²² para o osso esponjoso (50-500 MPa).

Além disso, pode-se observar que, apesar de todas metodologias promoverem aumento do módulo de Young, a metodologia (Exp. 45m) resultou num aumento mais significativo em comparação aos outros, em ambas as matrizes biopoliméricas analisadas. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato das amostras resultante da metodologia (Exp. 45m) apresentarem dispersão mais uniforme das partículas inorgânicas pela matriz quando comparada as membranas obtidas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), conforme observado pelas micrografias eletrônicas apresentadas nas figuras 19, para matrizes compostas por quitosana, e figura 20, para membranas contendo κ -carragenana. Na verdade, em ambos os casos, nota-se que em (HApS 0,1g) e (HApB 0,1g), a adição de partículas resulta na formação de agregados dispersos heterogeneamente pela membrana biopolimérica, evidenciando um excesso de partículas no material híbrido. Por essa razão, o aumento da resistência não foi tão pronunciado em comparação com o obtido para amostras resultante da metodologia (Exp. 45m).

Ao variar-se a quantidade de partículas adicionadas a matriz orgânica, pode-se observar que uma massa de 0,01g, como no caso das metodologias (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), resulta em aumento significativo do módulo de Young, de $16,4 \pm 0,54$ MPa para, respectivamente, $113,7 \pm 15,4$ e $61,6 \pm 1,4$ MPa, para a matriz de quitosana, e de $67,5 \pm 15,8$ para $132,9 \pm 25,8$ e $109,6 \pm 6,8$ MPa, para κ -carragenana. Mais uma vez, pode-se atribuir esse comportamento ao fato dessa quantidade de partícula adicionada resultar, conforme as micrografias apresentadas nas figuras 19 e 20, em dispersão homogênea da fase mineral. Além disso, também se verificou que uma quantidade de 0,001g não promove um aumento considerável do módulo de Young, pois essa adição resulta em uma concentração muito baixa de fase mineral na membrana híbrida.

Em relação aos outros parâmetros obtidos nos testes de tração e alongação sabe-se que esses estão relacionados com o módulo de Young, de modo que quanto maior o módulo de Young, maior a resistência do material a sofrer deformações, conseqüentemente menor será a sua alongação e maior será a tensão necessária para deformar a amostra.³³ Dessa forma, as amostras que apresentaram aumentos significativos no módulo de Young em relação as membranas biopoliméricas sem a

incorporação da fase mineral, que seriam as amostras obtidas por meio das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), também exibiram uma baixa taxa de alongação e exigiram uma tensão maior para sofrerem deformação. No caso das matrizes compostas por quitosana e κ -carragenana na ausência da fase mineral, verificou-se que para uma mesma taxa de alongação, em torno de 27%, as tensões aplicadas são $1,10 \pm 0,11$ MPa em comparação com $3,7 \pm 0,6$ MPa, respectivamente. Este resultado reflete a organização das cadeias de carragenana num arranjo tridimensional estabilizado por interações eletrostáticas.

Posteriormente, avaliou-se o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado, em detrimento a de polissacarídeo na composição da matriz orgânica, nas propriedades mecânicas do material híbrido analisado. Nesse contexto, destaca-se que a matriz orgânica apresenta um papel fundamental em dissipar a energia decorrente da aplicação de uma força.^{15,16} Devido ao fato das fibrilas de colágeno de tipo I ser o componente majoritário na matriz orgânica do tecido ósseo, considerou-se que a reticulação intermolecular nesta matriz fibrilar proporciona propriedades mecânicas ao tecido ósseo, como resistência à tração e viscoelasticidade e capacidade de dissipação de energia sob deformação mecânica.^{15,16} Dessa forma, baseando-se nestas constatações, na literatura, essas ligações foram denominadas como ligações de sacrifício, uma vez que elas devem ser parcialmente responsáveis pela dureza do osso.¹⁶ No entanto, nesse trabalho optou-se pelo uso de colágeno hidrolisado e, em decorrência disso, os mecanismos de dissipação de energia envolvidos pelo arranjo das fibrilas de colágeno são perdidos.

Destaca-se ainda que na matriz óssea há presença de proteínas não-colagênicas a qual confere ao osso propriedades dissipativas adicionais.^{15,16} No caso desse estudo, a mimetização dessa fase proteica é feita utilizando-se quitosana e κ -carragenana, e por essa razão a sua concentração afeta drasticamente as propriedades do material híbrido proposto. Nesse sentido, ao analisar-se os valores de módulo de Young encontrados na figura 31, pode-se observar que o aumento da concentração de colágeno hidrolisado em detrimento a de polissacarídeo na composição da matriz orgânica afeta a rigidez do material, mesmo com a incorporação da fase mineral, sendo os módulos de Young obtidos para as membranas híbridas menores, ou próximos, aos observado para as membranas biopoliméricas. A redução da concentração de polissacarídeo de 2,5% a 1,5% resulta em perda de rigidez de cerca de 80% após a incorporação da fase mineral, independente da

metodologia adotada. Além disso, verifica-se que os valores de módulo de Young obtidos, mesmo após incorporação da fase mineral por qualquer que seja a metodologia adotada, para membranas compostas por 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado e 1,5% (p/v) polissacarídeo estão fora da faixa observada para o osso esponjoso (50-500 MPa).¹²² Portanto, pode-se assumir que quanto maior a concentração de polissacarídeos maior o grau de interação e coesão entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a membrana híbrida será mais rígida, apresentando valores que estejam próximos aos reportados para o osso esponjoso.¹²²

Em relação aos outros parâmetros obtidos nos testes de tração, alongação e tensão, verificou-se, a partir da figura 31, que a redução da concentração de polissacarídeo na blenda biopolimérica, resultou em baixa taxa de tensão e uma alongação relativamente elevada, a qual se equipara a observada para as membranas constituídas por 2,5% polissacarídeo. Esse comportamento é esperado tendo em vista que quanto menor o módulo de Young menor a resistência do material a sofrer deformações, conseqüentemente maior será a sua alongação e menor será a tensão necessária para deformar a amostra.

Dessa forma, pode-se observar que as propriedades mecânicas são fortemente influenciadas pelo tipo e pela concentração de polissacarídeo na blenda, metodologia adotada para a incorporação da fase mineral, e concentração de fase mineral presente na membrana híbrida. Além de um efeito de reforço, a manutenção de um elevado grau de flexibilidade deve favorecer o uso dessas membranas híbridas na regeneração do tecido ósseo, pois, mesmo apresentando um Módulo de Young mais elevado, dentro da faixa observada para o osso esponjoso, essas amostras apresentam baixa taxa de alongação.

Figura 31 – Comparação dos parâmetros obtidos nos testes de tração, módulo de Young, elongação e tensão das membranas híbridas formadas a partir da incorporação da fase mineral as matrizes (A) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) quitosana e (B) 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ -carragenana, por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 (**) gramas.

4.5 Avaliação das propriedades de intumescimento e degradabilidade das membranas híbridas

Posteriormente, as membranas biopoliméricas, grupo controle, e híbridas, obtidas pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), foram avaliadas com relação às suas propriedades de intumescimento, ou seja, sua capacidade de absorção de água (Aa%), e, também, de degradação *in vitro*, perda de massa (Pp%) a partir da imersão dessas amostras em PBS, pH = 7,4 a 37°C, e incubação por 60 minutos. É importante ressaltar que apenas essas metodologias de incorporação da fase mineral foram adotadas, pelo fato de as amostras resultantes apresentarem, em comparação com todas as obtidas, os melhores resultados quanto a morfologia, bioatividade e propriedades mecânicas.

Dessa forma, as membranas biopoliméricas, grupo controle, e híbridas, preparadas tanto com 2,5% (p/v) quanto com 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado, foram cortados em quadrados com 6,25 cm², e pesadas (n=3) em uma balança analítica (peso inicial, Pi) e, posteriormente, imersas, a 37°C, em um béquer contendo 10 mL de PBS, pH= 7,4. Após 60 minutos, as membranas foram retiradas do béquer para que fosse removido o excesso de solução sob a sua superfície e novamente pesadas (n=3) (peso molhado, Pm). Assim, a partir das duas pesagens realizadas, utilizou-se a Eq. 1, retirada da literatura,⁹¹ para ser calculado a porcentagem de absorção de água das membranas biopoliméricas e híbridas após exposição ao PBS por 60 minutos. Todos valores obtidos são apresentados na tabela 5.

Analisando os dados apresentados na tabela 5, verifica-se, quanto ao grupo controle, que para as amostras contendo 2,5% (p/v) quitosana a absorção de água foi de ~143% enquanto que para membrana composta por 2,5% (p/v) κ-carragenana foi obtida uma porcentagem de ~611%. No caso da matriz composta por quitosana, observa-se que a porcentagem obtida está próxima ao reportado na literatura,²⁰ no caso 130% para membranas sintetizadas apenas com 0,7% (p/v) quitosana. Já para κ-carragenana, verificou-se que para compósitos preparados a partir de hidrogel formado por 4% (p/v) κ-carragenana obteve-se uma porcentagem de 2180%.¹²³ Em comparação com o obtido desse trabalho, nota-se, a partir da literatura,^{20,123} que a porcentagem é maior do que a obtida para o membrana composta por quitosana e menor do o reportado para membranas constituídas por κ-carragenana. Nesse sentido, destaca-se que essas distinções de valores podem ser atribuídas tanto ao uso de diferentes concentrações desses polissacarídeos quanto a presença de colágeno hidrolisado na formulação das membranas híbridas.

Tabela 5 – Porcentagem de absorção de água nas membranas híbridas após exposição ao PBS, pH 7,4, 37°C

	Massa das amostras (g)		Média do	Absorção
Metodologia	Antes PBS (Pi)	Após PBS (Pm)	aumento de massa (g)	de água (Aa%)
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) Quitosana				
Controle	0,2496 ± 0,0020	0,6079 ± 0,0013	1,4355 ± 0,0016	143,5
(Exp. 45m)	0,3611 ± 0,0018	5,2078 ± 0,0011	13,4220 ± 0,00145	1342,2
(HApS 0,01g)	0,2923 ± 0,0016	0,7603 ± 0,0018	1,6011 ± 0,0017	160,1
(HApB 0,01g)	0,3092 ± 0,0015	0,8042 ± 0,0010	1,6009 ± 0,0012	160,1
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) Quitosana				
(Exp. 45m)	0,3610 ± 0,0017	5,1387 ± 0,0019	13,2346 ± 0,0018	1323,5
(HApS 0,01g)	0,2899 ± 0,0011	0,7901 ± 0,0015	1,7254 ± 0,0013	172,5
(HApB 0,01g)	0,2703 ± 0,0013	0,8523 ± 0,0010	2,1532 ± 0,0011	215,3
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ-Carragenana				
Controle	0,2641 ± 0,0010	1,8789 ± 0,0017	6,1144 ± 0,0013	611,4
(Exp. 45m)	0,3113 ± 0,0014	2,2305 ± 0,0011	6,1651 ± 0,0012	616,5
(HApS 0,01g)	0,3502 ± 0,0023	2,9202 ± 0,0016	7,3387 ± 0,0019	733,9
(HApB 0,01g)	0,3317 ± 0,0019	2,5565 ± 0,0016	6,7073 ± 0,0017	670,7
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ-Carragenana				
(Exp. 45m)	0,2870 ± 0,0018	1,6653 ± 0,0015	4,8024 ± 0,0016	480,2
(HApS 0,01g)	0,2683 ± 0,0019	1,2766 ± 0,0012	3,7581 ± 0,0015	375,8
(HApB 0,01g)	0,2663 ± 0,0012	1,6764 ± 0,0013	5,2952 ± 0,0012	529,5

A capacidade de absorção de água do material pode estar relacionada a diferentes fatores, como, por exemplo, a sua porosidade e solubilidade. Dessa forma, para as membranas do grupo controle, considera-se que a presença do polissacarídeo pode contribuir para sua capacidade de absorção de água, tendo em vista que o fato da quitosana ser pouco solúvel em soluções neutras e alcalinas,⁵⁵ pode acarretar em membrana com menor solubilidade. No caso da κ-carragenana, devido a presença do grupo sulfato na estrutura da unidade repetitiva desse polissacarídeo, apresenta uma boa solubilidade em fluidos polares, principalmente, na presença de íons.¹²⁴ No entanto, é importante destacar que o essas diferentes blendas podem resultar em membranas com diferentes porosidades, em decorrência da reticulação e ordenamento das cadeias

biopoliméricas durante a formação do hidrogel. Apesar da porosidade também contribuir para a capacidade de absorção de água dessas membranas, esse parâmetro ainda não foi avaliado neste trabalho. De fato, a partir da tabela 5, verifica-se, em termos do grupo controle, que a taxa de absorção de água da membrana contendo κ -carragenana é significativamente maior, cerca de 4 vezes, do que a obtida para a membrana constituída por quitosana.

Quanto a incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), verifica-se, a partir dos dados apresentado na tabela 5, que a presença da HAp nos interstícios da matriz biopoliméricas resulta, em comparação com o observado para o grupo controle, no aumento da porcentagem de absorção de água para todas as membranas híbridas sintetizadas com uma concentração de polissacarídeo a 2,5% (p/v). No caso das amostras obtidas por (Exp. 45m), essa taxa aumentou aproximadamente 9 vezes para as membranas compostas por quitosana, enquanto que para as contendo κ -carragenana se manteve praticamente constante. Para as membranas sintetizadas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), observa-se que, de modo geral, as taxas de absorção de água não apresentam variação significativa para ambas as blends biopoliméricas.

Dessa forma, em termos das metodologias adotadas para a incorporação da fase mineral, nota-se que, para as membranas híbridas compostas por quitosana a 2,5% (p/v) obtidas por (Exp 45m), ocorre aumento da hidrofiliabilidade da membrana, um parâmetro importante para indicar como o fluido corpóreo, que apresenta características predominantemente polares, poderá interagir com essas membranas híbridas.

A significativa distinção do aumento da taxa de absorção de água, cerca de 9 vezes maior, entre as membranas contendo quitosana a 2,5% (p/v) resultantes de (Exp. 45m) em relação as outras, (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), deve estar associada a dois fatores, os quais podem influenciar, por exemplo, a porosidade e solubilidade da membrana. O primeiro pode ser atribuído a uma diferença na quantidade de fase mineral incorporado na membrana, visto que a adição de 0,01g tanto de HApS e HApB resultou em porcentagens de absorção de água muito próximas entre si. Já o segundo pode estar relacionado com organização de cristais hidrofílicos de fosfato de cálcio pela matriz biopoliméricas, pois de acordo com Caridade et al.¹²⁵ dispersão da fase mineral pela superfície do material pode influenciar a hidrofiliabilidade da membrana híbrida.

Ainda considerando as membranas resultantes de (Exp. 45m), observa-se que, por meio da comparação entre os resultados obtidos para a membranas contendo quitosana e κ -carragenana a 2,5% (p/v), a porcentagem de absorção de água da primeira é maior, cerca de 2 vezes, do que a da segunda. Nesse sentido, destaca-se que, como para as matrizes compostas por κ -carragenana pode haver menor disponibilidade de Ca^{2+} para formação da fase mineral, tendo em vista que parte atua na estabilização das cadeias biopoliméricas, deve ocorrer a formação de diferentes quantidades de precipitado nos interstícios da rede tridimensional formada por esses polissacarídeos. Além disso, a interação entre os Ca^{2+} e os grupos sulfatos presentes na estrutura desse polissacarídeo deve resultar em membranas, devido a reticulação e ordenamento das cadeias poliméricas, com menor porosidade em comparação com as compostas por quitosana.

Nesse sentido, pode ser considerado que a ocorrência dessa reticulação por interações eletrostáticas nas membranas contendo κ -carragenana a 2,5% (p/v), também pode justificar o fato de, diferente do que foi observado para membrana composta por quitosana, não haver significativa diferença entre as porcentagens de absorção de água obtidas para as membranas resultantes de (Exp. 45m) em relação a (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g). Ou seja, a reticulação do hidrogel de κ -carragenana deve resultar em membranas com porosidades semelhantes, independente da metodologia adotada para a incorporação da fase mineral.

Quanto ao efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado, atrelada a redução da quantidade de polissacarídeo na composição da matriz orgânica, pode-se notar, para a fase orgânica contendo quitosana, pouca variação em relação as porcentagens de absorção de água, obtidas para as membranas híbridas resultante das 3 metodologias apontadas na tabela 5. Essa constatação reforça o fato de que a quitosana não deve influenciar significativamente na capacidade das membranas híbridas em absorver água nos seus interstícios, tendo em vista a pouca solubilidade desse polissacarídeo em soluções neutras e alcalinas.⁵⁵ Além disso, constatou-se que a redução desse polissacarídeo não afetou, aparentemente, na porosidade dessas membranas, indicando que a sua reticulação não a influencia significativamente. No entanto, o mesmo não é observado para as membranas constituídas por κ -carragenana, visto que a redução da concentração desse polissacarídeo na composição da matriz orgânica resulta em uma redução significativa da taxa de absorção de água, em torno de 2 vezes, em média. Assim, é reforçado que esse polissacarídeo, devido a sua boa solubilidade em fluidos polares,

principalmente, na presença de íons, ¹²⁴ contribui significativamente para capacidade de absorção de água. Também, assume-se que, diferente da quitosana, de fato a reticulação e ordenamento das cadeias biopoliméricas da κ -carragenana deve influenciar a porosidade da membrana.

Após ser avaliada a capacidade absorção de água das membranas biopoliméricas e híbridas, grupo controle e as obtidas pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), todas as amostras foram levadas à estufa a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ para secagem controlada. Estando secas, as amostras foram novamente pesadas ($n=3$) em uma balança analítica (peso seco, Ps). Posteriormente, sabendo a massa inicial de todas amostras, utilizou-se a Eq. 2 para ser calculado a porcentagem de perda de massa (Pp%) das membranas biopoliméricas e híbridas após exposição ao PBS por 60 minutos. Todos valores obtidos são apresentados na tabela 6.

Iniciando a análise em termos da comparação entre os grupos controles, verifica-se, a partir dos dados apresentados na tabela 6, que para as amostras contendo 2,5% (p/v) quitosana a perda de massa foi de $\sim 59\%$ enquanto que para membrana composta por 2,5% (p/v) κ -carragenana foi obtida uma porcentagem de 64%. Na literatura, é reportada taxa de degradação de $\sim 35\%$ para uma membrana composta por quitosana após sua incubação em PBS (pH 7,4, 37°C), por 24 horas.⁹¹

No caso das membranas produzidos nesse trabalho, o uso do colágeno hidrolisado pode contribuir para a rápida degradação *in vitro* dessas membranas, visto que, na literatura, é mencionado a elevada solubilidade dessa proteína desnaturada em água e fluidos polares.⁵⁴ Além disso, o comportamento distinto observado para essas blendas pode ser, novamente, justificado pela diferença de solubilidade entre esses polissacarídeos, como observado na comparação entre as taxas de absorção de água, visto que, durante 60 minutos em PBS (pH 7,4, 37°C), as membranas contendo quitosana apresentam menor perda de massa, ou seja, são menos solúveis nesse meio, em comparação os constituídos por κ -carragenana.

Em relação às metodologias adotadas para a incorporação da fase mineral nessas blendas biopoliméricas, verifica-se que a adição de HAp afeta, em comparação com o grupo controle, a estabilidade química e integridade das membranas híbridas produzidas. Nesse caso, pode ser o observado que a taxa de degradação dessas membranas híbridas sofre uma redução de cerca de 2,5% para as amostras contendo quitosana e um aumento em torno de 0,67% para membranas compostas por κ -carragenana.

Tabela 6 – Porcentagem de degradação *in vitro* das membranas híbridas após exposição ao PBS, pH 7,4, 37°C

Massa das amostras (g)			Perda de massa (Pp%)
Metodologia	Antes PBS (PI)	Após PBS (Ps)	
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) Quitosana			
Controle	0,2641 ± 0,0010	0,1091 ± 0,0017	58,7
(Exp. 45m)	0,3611 ± 0,0018	0,1645 ± 0,0010	54,4
(HApS 0,01g)	0,3502 ± 0,0023	0,1471 ± 0,0015	58,0
(HApB 0,01g)	0,3317 ± 0,0019	0,1455 ± 0,0014	56,1
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) Quitosana			
(Exp. 45m)	0,3610 ± 0,0017	0,1248 ± 0,0013	65,4
(HApS 0,01g)	0,2899 ± 0,0011	0,0709 ± 0,0012	75,5
(HApB 0,01g)	0,2703 ± 0,0013	0,0848 ± 0,0015	68,6
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ-Carragenana			
Controle	0,2496 ± 0,0020	0,0901 ± 0,0017	63,9
(Exp. 45m)	0,3113 ± 0,0014	0,1075 ± 0,0019	65,5
(HApS 0,01g)	0,2923 ± 0,0016	0,1049 ± 0,0014	64,1
(HApB 0,01g)	0,3092 ± 0,0015	0,1109 ± 0,0019	64,1
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ-Carragenana			
(Exp. 45m)	0,2870 ± 0,0018	0,0816 ± 0,0013	71,6
(HApS 0,01g)	0,2683 ± 0,0019	0,0832 ± 0,0018	69,0
(HApB 0,01g)	0,2663 ± 0,0012	0,0784 ± 0,0017	70,6

Na literatura,⁹¹ é reportado que a adição de uma fase inorgânica a matriz formada por apenas quitosana a 2% (p/v) melhorou a estabilidade química dessa membrana biopolimérica em PBS a 37°C, tendo em vista a ocorrência de uma redução na taxa de degradação em todos os diferentes intervalos de tempo considerados para a imersão no referido tampão (1, 3 e 7 dias). Dessa forma, observa-se que apenas as matrizes compostas por quitosana apresenta esse comportamento após incorporação da fase mineral.

No caso da κ-carragenana, é importante destacar que, de acordo com a literatura,¹⁸ o controle inadequado sobre as propriedades de intumescimento e de degradação desses hidrogéis, reticulados por interações intermoleculares (tais como interações iônicas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio), é decorrente da presença da água absorvida na

matriz,¹²⁶ uma vez que ela pode romper interações intra e intermoleculares, e, no caso de estabilização por interações iônicas, da troca incontrolável de íons com outros cátions do ambiente fisiológico circundante. Por essa razão, a fim de reduzir a taxa de degradação dessas membranas biopoliméricas e híbridas em água ou PBS, é preciso que, como indicado na literatura,^{127,128} seja incorporado a essas matrizes orgânicas agentes reticulantes como Genipina e Gluteraldeído, para que ocorra uma reação de oxidação entre grupos químicos das cadeias poliméricas e do agente reticulante criando novas ligações para que, conseqüentemente, a rede tridimensional dos hidrogéis seja estabilizada covalentemente. Os estudos reportam que, de fato, a incorporação de genipino a matriz de κ -carragenana¹²⁷ e também de quitosana,¹²⁸ resulta em, além de melhores propriedades mecânicas, uma maior resistência à degradação em água ou PBS.

Avaliando o efeito da variação de composição a matriz orgânica, pode-se notar, por meio dos dados apresentados na tabela 6, que o aumento da concentração de colágeno hidrolisado associada com a redução da quantidade de polissacarídeo favorece a degradação durante a sua exposição em SBF por 60 minutos, visto que a taxa de degradação aumenta cerca de 17%, para membranas contendo quitosana, e 6%, para membranas compostas por κ -carragenana. De fato, o colágeno hidrolisado, uma estrutura desnaturada reduzida ao seu nível secundário ou primário,⁴⁸ apresenta, diferente do colágeno íntegro, grupos carregados decorrentes do processo de hidrólise de grupos amida lateral presentes em suas cadeias biopoliméricas,⁴⁸ que influenciam a sua boa solubilidade em fluidos polares, como água e PBS. Por essa razão, quanto maior quantidade de colágeno hidrolisado na composição da matriz, mais solúvel será a membrana, ou seja, não apresenta uma boa estabilidade para que resista tempo longos no meio fisiológico. Em termos da regeneração do tecido ósseo, esse aspecto pode ser considerado ruim, visto que a membrana pode ser solubilizada antes que ocorra, sob a sua superfície, a adesão, proliferação e diferenciação das células responsáveis pela regeneração do novo tecido, ou seja, a biodegradação do material pode ocorrer em uma velocidade maior do que a de crescimento do tecido sob o defeito.^{6,17}

4.6 Caracterização das propriedades de superfície das membranas híbridas

A molhabilidade é uma importante propriedade de superfície dada a sua influência na resposta biológica do biomaterial, pois, esse parâmetro irá determinar como a

superfície interage com o fluido corpóreo, afetando, conseqüentemente, a adesão celular e proteica, os primeiros eventos do processo de osteointegração que ocorrem na superfície do material implantado.^{129,130} A literatura¹⁸ demonstra que, em comparação com superfícies hidrofóbicas, as hidrofílicas levaram a melhor adesão e proliferação celular, devido à maior absorção de vitronectina e fibronectina, que são proteínas essenciais para a ligação com os receptores da superfície celular.

Dessa forma, avaliou-se a molhabilidade das membranas biopoliméricas, grupo controle, e híbridas, obtidas pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), por medidas de θ entre as superfícies dessas amostras e gotas de água depositadas sobre elas. Além disso, medidas de θ com líquidos de diferentes polaridades, no caso formamida e diiodometano, também foram realizadas para que, posteriormente, fossem informados ao software SCA-20 para que fosse possível resolver algebricamente a Eq 3 encontrando, para cada amostra, os valores de γ_s e de suas componentes γ_s^p e γ_s^d . Os dados obtidos são apresentados na tabela 7.

Iniciando a análise em termos da comparação entre os grupos controle, verifica-se, a partir dos dados apresentados na tabela 7, que para as amostras contendo 2,5% (p/v) quitosana foi obtido um θ de $72,38 \pm 8,16$ enquanto que as membranas compostas por 2,5% (p/v) κ -carragenana apresentaram um θ de $58,99 \pm 7,66$. Na literatura,^{125,131} pode-se constatar que filmes compostos por apenas quitosana a 1% (p/v) exibiram θ de 93 ± 4 e os formados por κ -carragenana a 2,67% (p/v) resultaram em um θ de $48,09 \pm 1,69$. Esses valores refletem a presença de grupos hidrofóbicos, como acetilenos, na estrutura da quitosana.

Tem sido reportado¹²⁵ que tanto as características topográficas quanto a química influenciam a molhabilidade das superfícies. Dessa forma, ao ser comparado os θ obtidos para os grupos controle com os apresentados na literatura, nota-se uma distinção entre esses valores, a qual pode ser atribuída a presença de colágeno hidrolisado, proteína desnaturada por hidrólise de grupos amida que resulta em uma maior densidade de grupos carboxila, na formulação dessas duas matrizes biopoliméricas. Assim, a sua incorporação pode resultar mudanças tanto na topografia quanto nas características químicas das membranas, tendo em vista a inserção de grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos (glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina) que podem ser apolares, polares ou carregados.

Tabela 7 – Propriedades da superficiais das membranas híbridas: molhabilidade, energia livre de superfície (γ_s) e seus componentes dispersiva (γ_s^D) e polar (γ_s^P)

Metodologia	$\theta_{\text{água}}$	γ_s (mJ.m ⁻²)	γ_s^P (mJ.m ⁻²)	γ_s^D (mJ.m ⁻²)
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) Quitosana				
Controle	72,38 ± 8,16	36,12 ± 8,45	9,57 ± 5,24	26,56 ± 6,63
(Exp. 45m)	17,85 ± 1,79	70,47 ± 1,71	61,04 ± 1,6	9,43 ± 0,58
(HApS 0,01g)	53,62 ± 3,19	53,49 ± 5,94	46,47 ± 5,04	7,02 ± 2,42
(HApB 0,01g)	42,55 ± 7,64	54,95 ± 5,81	45,5 ± 5,15	9,44 ± 2,69
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) Quitosana				
(Exp. 45m)	33,23 ± 4,40	59,13 ± 6,54	46,18 ± 5,52	12,95 ± 5,51
(HApS 0,01g)	42,11 ± 3,67	45,13 ± 5,59	28,53 ± 4,79	16,60 ± 3,50
(HApB 0,01g)	48,27 ± 1,27	45,97 ± 2,38	20,79 ± 1,63	25,18 ± 1,74
Membrana: 2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) κ-Carragenana				
Controle	58,99 ± 7,66	36,73 ± 8,22	15,96 ± 6,16	20,77 ± 5,44
(Exp. 45m)	17,58 ± 5,35	68,87 ± 3,8	56,33 ± 3,6	12,54 ± 1,23
(HApS 0,01g)	23,58 ± 5,89	65,21 ± 5,24	49,41 ± 4,83	15,8 ± 2,04
(HApB 0,01g)	21,29 ± 5,19	66,75 ± 4,52	53,82 ± 4,19	12,92 ± 1,7
Membrana: 3,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) κ-Carragenana				
(Exp. 45m)	35,16 ± 3,36	59,92 ± 4,24	52,60 ± 4,09	7,32 ± 1,11
(HApS 0,01g)	37,65 ± 6,71	54,10 ± 7,69	43,95 ± 7,23	10,15 ± 2,63
(HApB 0,01g)	26,56 ± 2,77	65,98 ± 5,15	56,63 ± 4,42	9,35 ± 2,63

Apesar dessa diferença entre os valores de θ , pode-se notar que a tendência da matriz composta por quitosana em exibir um θ maior do que o obtido para a amostra contendo κ -carragenana é mantida. Dessa forma, verifica-se que a molhabilidade dessas

membranas é determinada principalmente pela presença do polissacarídeo, visto que, como reportado pela literatura, a primeira apresenta uma molhabilidade menor do que a segunda, ou seja, a presença do polissacarídeo sulfatado resulta em uma membrana mais hidrofílica. Além disso, essas observações corroboram os dados de taxa de absorção de água apresentados na tabela 5, uma vez que a membrana contendo κ -carragenana apresenta uma taxa significativamente maior, do que a obtida para a membrana constituída por quitosana.

Quanto à incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), observa-se, a partir dos dados apresentados na tabela 7, que a presença da HAp, em todas as membranas híbridas, resulta em θ menores em comparação com os apresentados pelos respectivos grupos controle, em taxa média de redução de 52,5%, para matriz contendo quitosana, e de 35,3%, para as membranas constituídas por κ -carragenana. Essas reduções no θ indicam aumento na hidrofiliabilidade das membranas, ou seja, a superfície foi mais molhável pela água. Esse aspecto é importante, pois como o fluido corpóreo apresenta características predominantemente polares, superfícies hidrofílicas apresentam interações favoráveis com o meio fisiológico. Esse comportamento tem sido relatado no estudo de Caridade et al.¹²⁵, em que foi correlacionado com a natureza da fase mineral dispersa pela superfície do material, pois é caracterizada pela organização de cristais hidrofílicos de fosfato de cálcio pela matriz biopoliméricas resultando em uma morfologia rugosa com uma organização hierárquica nos níveis nano e micro.

Dessa forma, verifica-se pela redução dos θ , que as modificações da composição química dessas membranas biopoliméricas promovida pela incorporação da HAp contribui significativamente para o aumento da hidrofiliabilidade dessas amostras.

Em termos da metodologia adotada para produção das membranas híbridas, verifica-se que as membranas obtidas por (Exp. 45m), contendo tanto quitosana quanto κ -carragenana, apresentaram, em comparação com as sintetizadas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), a maior redução do θ em relação aos exibidos pelos grupos controle. Nesse sentido, é importante ressaltar que na metodologia (Exp. 45m) a precipitação lenta guiada pela estrutura organizada do hidrogel favorece a obtenção de membranas com partículas homogeneamente distribuídas em toda sua estrutura. Dessa forma, além desse aspecto resultar em um maior módulo de Young, a dispersão mais homogênea da fase mineral pela blenda biopolimérica pode resultar, de acordo com Caridade et al.,¹²⁵ em

uma maior interação superficial entre as fases orgânica e inorgânica, facilitando a penetração de água. Além disso, a precipitação da fase mineral nos interstícios do hidrogel pode resultar em uma concentração de HAp na membrana híbrida diferente da considerada para as amostras obtidas pelas metodologias (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

No caso do efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado associada com a redução da quantidade de polissacarídeo na composição da matriz orgânica, nota-se, a partir dos dados apresentados na tabela 7, que a incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g) ainda resulta em uma redução significativa dos θ em comparação com os apresentados pelos respectivos grupos controle, em média 57% para membranas composta por quitosana, e cerca de 56% para amostras contendo κ -carragenana.

No entanto, esses θ são, praticamente para todas as amostras, maiores do que os obtidos para a membranas híbridas contendo colágeno hidrolisado e polissacarídeo a 2,5% (p/v), sintetizadas pelas mesmas três metodologias, em torno de 7,7% para matrizes contendo quitosana, e por volta de 37,1% para membranas com κ -carragenana na sua composição. A partir dessas observações, verifica-se uma importância do tipo de polissacarídeo presente na composição da matriz orgânica, visto que a redução de sua concentração resulta em uma mudança do θ mais significativa em membranas compostas por κ -carragenana em comparação com a obtida para membranas híbridas contendo quitosana. Dessa forma, nota-se, de fato, que os grupos funcionais presentes nas estruturas desses polissacarídeos influenciam a molhabilidade dessas amostras pela água.

Além disso, como o colágeno hidrolisado perde a sua capacidade de formar uma rede fibrilar (fibrilogênese) devido a sua produção pela hidrólise em meio ácido a 125°C, os polissacarídeos, devido às suas propriedades gelificantes, são fundamentais na composição da matriz orgânica devido a sua função de direcionar e sustentar a deposição da fase mineral para síntese das membranas híbridas. Por essa razão, assume-se que essa distinção entre os valores de θ obtidos é decorrente da redução da concentração de polissacarídeo na composição das membranas, pois deve afetar a dispersão homogênea da fase mineral pela blenda biopoliméricas, afetando interação superficial entre as fases orgânica e inorgânica, fator importante nas características topográficas e química.

A γ_s está relacionada com os grupos químicos presentes nas superfícies das amostras e, conseqüentemente, com o tipo de interações moleculares superficiais, de modo que, quanto maior a γ_s mais reativa é a superfície.¹³² Estas irão determinar

seletivamente como que os grupos polares e apolares de proteínas e membranas celulares irão interagir com diferentes superfícies.¹³² Nesse sentido, a γ_s , como também a molhabilidade, influencia os tipos de células que inicialmente se aderem ao material, que é um dos primeiros eventos que ocorrem na superfície implantada, e que, posteriormente, se diferenciam na interface implante/célula e podem afetar as fases posteriores de calcificação e formação óssea.^{132,133}

Em termos da γ_s , verifica-se, a partir dos dados apresentados na tabela 7, que para as amostras contendo 2,5% (p/v) de polissacarídeo não houve variação significativa. No entanto, pode ser observado que, apesar de ambas as blendas possuírem colágeno hidrolisado, as características químicas dos polissacarídeos influenciam as componentes da γ_s , uma vez que as amostras contendo κ -carragenana apresentaram uma maior contribuição da componente γ_s^p em comparação a observada para membrana composta por quitosana.

Na literatura,¹³⁴ pode-se constatar que membranas compostas por apenas quitosana a 1% (p/v) exibiram γ_s de $32,9 \pm 0,3$. Dessa forma, pode ser considerado que o valor obtido nesse estudo está de acordo com o encontrado na literatura. No caso da κ -carragenana, o resultado obtido está em concordância com dados previamente publicados por nosso grupo, no caso, $32,7 \pm 3,0$, para membrana contendo κ -carragenana a 5% (p/v).¹³⁵

Analisando os dados da tabela 7, pode-se notar que a incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), resulta, para todas as membranas híbridas analisadas, em um aumento significativo da γ_s em comparação com os apresentados pelos respectivos grupos controle, em torno de 165,1%, para amostras contendo quitosana, e de 182,2%, para membranas compostas por κ -carragenana. Além disso, observa-se que para essas membranas híbridas a maior contribuição, diferente do que ocorre para os grupos controle, para a γ_s é da componente γ_s^p , em média 85,5%, em matrizes constituída por quitosana, e 79,5%, em membranas integrando κ -carragenana em sua composição.

Estes valores indicam maior propensão da superfície das membranas híbridas em participar de reações químicas e interagir preferencialmente com substâncias polares, o que favorece o contato de biomoléculas com as superfícies. Portanto, modificações superficiais que promovam o aumento da componente polar são desejáveis em sistemas

para aplicações biomédicas, uma vez que favorecem a adesão de proteínas e de células necessária para os primeiros eventos do processo de osteointegração.^{18,130}

Em termos da metodologia adotada para produção das membranas híbridas, verifica-se que para as membranas contendo κ -carragenana a 2,5% (p/v) não houve diferença significativa entre os valores de γ_s e γ_s^p de obtidos. Estes resultados indicam que as superfícies dessas membranas híbridas são semelhantes, ou seja, a estruturação dos minerais se dá preferencialmente nos interstícios dos hidrogéis, e que os mesmos não se encontram expostos de maneiras distintas nas superfícies. No entanto, o mesmo não é observado para as matrizes compostas por quitosana a 2,5% (p/v), em que se obteve um aumento de ~130% para γ_s e de ~132,7% para a γ_s^p .

Mesmo com o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado associada com a redução da quantidade de polissacarídeo, a incorporação da fase mineral pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g) ainda resulta, conforme apresentado na tabela 7, em um aumento tanto da γ_s quanto da γ_s^p em comparação com os apresentados pelos respectivos grupos controle. Esse aumento é dado em torno de 138,6%, para amostras contendo quitosana, e de 163,4%, para membranas compostas por κ -carragenana. No entanto, esses valores são menores, cerca de 16% e 10,4%, respectivamente, em comparação com os observados para as membranas híbridas contendo colágeno hidrolisado e polissacarídeo a 2,5% (p/v), sintetizadas pelas mesmas três metodologias.

Como considerado na análise da molhabilidade, essa distinção deve estar associada com mudanças na dispersão e estruturação dos minerais nas redes tridimensionais do hidrogéis, pois os mesmos não devem se encontrar expostos da mesma maneira nas superfícies em comparação as amostras com concentração de polissacarídeos de 2,5% (p/v).

Portanto, pelas análises tanto de molhabilidade quanto de γ_s evidenciou-se que houve a formação de membranas híbridas após a incorporação de HAp pelas três metodologias apontadas, uma vez que, devido ao crescimento ou presença da fase mineral, ocorre a adição de novos grupos polares a superfície. Esses dados corroboraram as análises de MEV e propriedades mecânicas, no sentido de que a metodologia (Exp. 45m) se mostrou mais vantajosa pois, assume-se que as suas melhores propriedades mecânicas e superficiais, em comparação às apresentadas pelas amostras obtidas nas outras sínteses, são decorrentes da distribuição mais homogênea da fase mineral por toda sua estrutura.

4.7 Avaliação da toxicidade das membranas híbridas em cultura de osteoblastos

Os osteoblastos são células derivadas das células tronco mesenquimais, que sofrem caminhos específicos de regulação gênica para a completa diferenciação.¹³⁶ Estão localizadas ao longo da superfície do osso com função principal no processo de formação do tecido ósseo.¹³⁶ O desenvolvimento dos osteoblastos podem ser divididos em três etapas: crescimento (proliferação) e biossíntese da matriz extracelular (MEC); organização, desenvolvimento e maturação da MEC e, por fim, mineralização da MEC.^{136,137} Estudos da literatura^{136,137} tem relatado que todos esses processos podem ser acompanhados *in vitro* com o uso de culturas de células, permitindo obter informações relacionadas a citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, a resposta biológica às membranas biopoliméricas, grupo controle, e híbridas, obtidas pelas metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), foi avaliada em cultura *in vitro* de osteoblastos pelo método clássico do MTT após 24 e 72 horas de incubação, com considerado na literatura,⁹⁴ a 37°C.

A Figura 32 apresenta os resultados obtidos para osteoblastos cultivados em presença das membranas contendo 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado e 2,5% (p/v) polissacarídeos, obtidas antes (grupo controle) e após a incorporação da fase mineral pelas três metodologias propostas. As amostras contendo quitosana (Figura 32A) não foram tóxicas aos osteoblastos, conforme indicado pela viabilidade comparável ao grupo cultivado sobre discos de poliestireno. Porém, as amostras contendo κ -carragenana são citotóxicas e reduziam a viabilidade celular após 72h de cultura.

Figura 32 – Cultura *in vitro* de osteoblastos sobre as superfícies das membranas 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ -carragenana, obtidas antes, grupo controle, e após incorporação da fase mineral por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 gramas.

Em termos da incorporação da fase inorgânica nessas blendas, pode ser apontado, a partir da análise da figura 32, que, após 72 horas, a presença da HAp na matriz orgânica, por qualquer das três metodologias adotadas, não resultou em um aumento na proliferação celular em comparação com o observado para as membranas biopoliméricas obtidas na ausência dessa fase mineral, o grupo controle deste trabalho. Esse comportamento difere do reportado pela literatura,²⁰ em que se observou o aumento da proliferação celular em membranas híbridas em comparação com as membranas obtidas na ausência da fase inorgânica.

Na literatura¹⁸ é reportado que, hidrogéis de κ -carragenana reticulados por interações iônicas devem apresentar problemas no controle de suas propriedades de intumescimento e características de degradação devido à troca incontrolável de íons com outros cátions do ambiente fisiológico circundante. Nesse sentido, é importante ressaltar que a membrana polimérica deve desempenhar um papel crucial na regeneração de tecidos, pois uma das suas principais funções é servir como matriz para suportar e facilitar o crescimento e a diferenciação celular no local do defeito ósseo, fornecendo apoio para a estruturação do novo tecido.^{125,138} Essa finalidade deve ter como base propriedades convenientes dos polímeros que o compõe, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e flexibilidade.¹²⁵ No caso da degradação, é destacado por Ocampo et al.¹³⁸ que essa não

deve interferir no crescimento das células, visto que elas são essenciais para produção da matriz extracelular do tecido ósseo.

Em termos da degradação das amostras em PBS a 37°C, verificou-se neste trabalho, a partir dos dados apresentados na tabela 6, que as membranas contendo κ -carragenana apresenta uma porcentagem de perda de massa maior, em média 7,6%, em comparação com as membranas que integram quitosana na sua composição. Dessa forma, pode ser considerado, a partir da figura 32, que a proliferação dos osteoblastos na presença das matrizes compostas por κ -carragenana a 2,5% (p/v) é afetada negativamente pela baixa estabilidade e integridade dessa matriz polimérica no meio em que as células são cultivadas.

Nesse sentido, a fim de contornar esses problemas potenciais, têm-se buscado aprimorar o comportamento de degradação e o desempenho mecânico dessas matrizes biopoliméricas a partir do uso de agentes reticulantes que estabilizam covalentemente a rede tridimensional dos hidrogéis sem comprometer a viabilidade celular.^{127,128}

Por exemplo, no estudo de Ocampo et al.¹³⁸ foram produzidos sistemas híbridos a partir da combinação de HAp e hidrogéis de κ -carragenana em concentrações de 1, 1,5 e 2,5% (p/v) utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. Em termos da citotoxicidade, esse trabalho¹³⁸ aponta que a presença dessas matrizes biopoliméricas reticuladas não acarretaram em morte celular de osteoblastos humanos, indicando que as modificações propostas são atóxicas. Além disso, Ocampo et al.¹³⁸ reporta que, para os sistemas correspondentes as três concentrações adotada, em 24 horas de incubação não se observa diferença significativa na proliferação celular referente às três amostra e o controle. Após 168 e 336 horas esses autores¹³⁸ observaram, em comparação com o controle, um aumento significativo da proliferação dos osteoblastos humanos na presença desses três hidrogéis. No entanto, nesse trabalho¹³⁸ não foi observado diferença estatística significativa entre as amostras e, também, entre os resultados obtidos após 168 e 336 horas.

É importante ressaltar que, de acordo com a literatura,¹⁸ as carragenanas podem desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, dependendo da dose e do grau de sulfatação do polissacarídeo. No entanto, neste trabalho, além do uso da carragenana com menor grau de sulfatação, foram empregadas as mesmas concentrações consideradas no trabalho de Ocampo et al.¹³⁸ Portanto, comparado as observações e análises deste trabalho, obtidas a partir da Figura 32, com as relatadas por Ocampo et al.,¹³⁸ nota-se que

a melhora da proliferação celular deve ser atribuída ao uso do gluteraldeído, que estabiliza covalentemente a rede tridimensional formada pela agregação das cadeias de κ -carragenana, evitando a indesejada citotoxicidade decorrente da degradação da amostra.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do aumento da concentração de colágeno hidrolisado, associada com a redução da quantidade de polissacarídeo na composição da matriz orgânica, na citotoxicidade e proliferação celular em cultura *in vitro* de osteoblastos após 24 e 72 horas de incubação. Dessa forma, a figura 33 apresenta os resultados obtidos para osteoblastos cultivados em presença das membranas híbridas contendo 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado e 1,5% (p/v) polissacarídeos, resultantes das metodologias (Exp. 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

Figura 33 – Cultura *in vitro* de osteoblastos sobre as superfícies das membranas 3,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 1,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ -carragenana, obtidas após incorporação da fase mineral por meio da (1) precipitação *in locu* nos interstícios da matriz (Exp. 45m); e da adição de (2) HAp sintetizada (HApS) e (3) HAp bovina (HApB), a quantidade de 0,01 gramas.

Analisando a figura 33, verifica-se que, para as membranas compostas por quitosana a 1,5% (p/v), não se observa citotoxicidade após 24 horas de incubação. No entanto, as amostras obtidas por (Exp. 45m) apresentaram um resultado significativamente menor em comparação com o observado para as membranas sintetizadas a partir de (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g). Além disso, verifica-se que a redução da concentração de quitosana nas membranas híbridas, formados apenas por essa primeira metodologia, resultou em uma redução estatística da viabilidade celular em comparação a observada na figura 32 para amostra contendo esse polissacarídeo a 2,5%

(p/v). Ao ser considerado 72 horas de incubação, nota-se que a viabilidade é maior do que a obtida na presença apenas do poliestireno, apenas para membranas obtidas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g).

Essas diferenças observadas para as membranas contendo quitosana a 1,5% (p/v), corroboram os dados apresentados nas tabelas 6 e 7. No caso de ambas, foi observado que a diminuição da concentração do polissacarídeo resultou em aumento da taxa de degradação, aumento da γ_s^D e diminuição da hidrofiliicidade e da γ_s . Conforme discutido anteriormente, todos esses fatores interferem na toxicidade e proliferação dos osteoblastos, visto que é preciso que ocorra a adesão dessas células em superfícies, que sejam estáveis no meio aquoso e apresentem propriedades físico-químicas que favoreçam a sua interação com as células, para seguir desenvolvimento dos osteoblastos.

No caso da redução da concentração da κ -carragenana na composição da matriz orgânica, verifica-se que (Figura 33), tanto em 24 quanto em 72 horas de incubação, as amostras obtidas por (Exp. 45 m) apresentaram viabilidade celular menor em comparação com a observada na presença do poliestireno e das amostras sintetizadas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g). Como observado para as membranas compostas por quitosana, nota-se que a redução da concentração de κ -carragenana na composição apenas das membranas híbridas obtidas por (Exp 45m), resulta, em ambos os tempos de incubação, em um decréscimo da viabilidade celular em comparação com a apresentada na figura 32 para amostra contendo esse polissacarídeo a 2,5% (p/v). Assim como pontuado anteriormente, a redução da concentração desse polissacarídeo afeta a degradabilidade e as propriedades superfícies dessas membranas híbridas, resultando em um efeito citotóxico ao osteoblasto.

Em relação às membranas sintetizadas por (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g), nota-se, a partir da análise da figura 33, que em 24 horas apresentam uma viabilidade celular maior em comparação com a obtida na presença, além do poliestireno, das membranas híbridas compostos por κ -carragenana a 2,5% (p/v) (Figuras 32). No entanto, observa-se que, assim como na figura 32, após 72 horas de incubação a presença dessas duas amostras resultou em uma viabilidade celular estatisticamente menor do que a obtida para o poliestireno, visto que a redução da concentração desse polissacarídeo favorece o aumento da taxa de degradação dessas amostras.

4.8 Incorporação das nanopartículas de prata (NpAg) nas membranas híbridas

4.8.1 Caracterização das NpAg sintetizadas

O espectro UV-Vis obtido para a dispersão coloidal de NpAg é apresentado na figura 34. Pode-se observar uma banda de absorção com pico em 390 nm, característico de nanopartículas esféricas de prata.^{139,140} Esse pico de absorção está relacionado a oscilação coletiva de elétrons livres na superfície da partícula metálica devido a interação com o campo elétrico da luz, ou seja, corresponde a uma banda de ressonância plasmônica.¹⁴¹

Figura 34 – Espectro UV-Vis da dispersão coloidal de nanopartículas de prata (NpAg).

O potencial zeta determinado para estas partículas foi -36 ± 17 mV (Figura 35A), indicando elevada estabilidade coloidal. O potencial negativo da NpAg é devido à adsorção de íons BH_4^- , oriundos da redução química de nitrato de prata com boro-hidreto de sódio, nas superfícies das nanopartículas, estabilizando-as eletrostaticamente. Em relação à distribuição de tamanho, pode-se observar, de acordo com a figura 35B, não-homogeneidade, em que aproximadamente 74% das partículas possuem um tamanho médio de 8,2 nm, enquanto 24% delas apresentam um tamanho médio de 3,8 nm, valores próximos ao reportado na literatura usando 2 mmol.L^{-1} de AgNO_3 na síntese.¹⁴²

Figura 35 – (A) Medida de potencial zeta (ζ) e (B) distribuição de tamanho de partícula da dispersão coloidal de prata (NpAg) obtidas pela técnica de espelhamento dinâmico de luz.

De acordo com a literatura,^{79,99} as NpAg tem sido amplamente estudadas devido às suas potencias atividades antimicrobiana frente a diversas bactérias, fungos e vírus resistentes a antibióticos. Embora o efeito altamente antibacteriano das NpAg tem sido amplamente descrito, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado.⁷⁹ Apesar disso, assume-se que NpAg são capazes de interagir fisicamente com a superfície da célula de várias bactérias, podendo resultar em qualquer dano que pode levar a morte celular.⁷⁹ Nesse sentido, destaca-se que atividade dessas nanopartículas metálicas é fortemente dependente do tamanho, potencial zeta e forma.^{79,99}

Um tamanho de partícula menor, dentro da faixa 1 a 100 nm, deve resultar em um aumento considerável na relação entre a área superficial e o volume, favorecendo a sua capacidade penetrar a membrana celular dos microorganismos.⁷⁹ Como consequência, as propriedades físicas, químicas e biológicas são significativamente influenciadas. De fato, a literatura⁷⁹ reporta que a atividade bactericida de NpAg com dimensões menores (< 30 nm) foi extremamente significativa contra *S. aureus*.

No caso das NpAg obtidas neste trabalho, verificou-se que elas apresentaram um tamanho menor do que 30 nm (Figura 35). Dessa forma espera-se que essas nanopartículas apresentem uma atividade antimicrobiana eficaz.

A forma das nanopartículas é um outro parâmetro que também influencia a sua atividade antimicrobiana.^{79,99} Como exemplo,⁷⁹ destaca-se que NpAg triangulares apresentaram um efeito bactericida mais significativo contra *E. coli*. Apesar dessa relevância na atividade antibacteriana, nesse trabalho não foi investigado o formato das NpAg.

4.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas híbridas contendo NpAg

A concentração de NpAg também é um fator muito importante na eficiência de sua ação antimicrobiana. No entanto, de acordo com a literatura,⁷⁹ a correlação entre o efeito bactericida e as concentrações de NpAg é dependente da classe bacteriana. Por exemplo, Franci et al.⁷⁹ reporta que *E. coli* é inibida em baixas concentrações, enquanto os efeitos inibitórios sobre o crescimento de *S. aureus* foram pouco significativos. Também relatam⁷⁹ que, apesar da *P. aeruginosa* ser mais resistente do que *E. coli*, o crescimento de ambas foi inibido em concentrações acima de 75 µg/mL.

No caso da incorporação de NpAg em materiais projetados para aplicações biomédicas, a concentração dessas nanopartículas é extremamente relevante, pois, além de influenciar sua atividade antimicrobiana, elas são tóxicas para células de mamíferos em elevadas concentrações. Wu et al.⁹⁹ observaram que sistemas híbridos formados por celulose bacteriana e NpAg, nas concentrações 18, 30 e 45 mg/100 cm² de amostra, apresentaram atividade antibacteriana contra *E.coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ainda permitiram a adesão e crescimento de células epidérmicas sem citotoxicidade.

Em termos do tecido ósseo, verificou-se que nenhuma citotoxicidade induzida pela presença de NpAg em concentração de 10 µg / g contra osteoblastos humanos após incubação por 24 e 168 horas.⁸⁰ No entanto, a inibição da proliferação de osteoblastos causada por NpAg começou em uma concentração de 10 µg / g após 21 dias.⁸⁰ Dessa forma, verifica-se que impacto dessas nanopartículas na viabilidade dos osteoblastos é dependente da dose e do tempo.⁸⁰ Por essa razão, durante a produção de materiais para a regeneração óssea, é preciso que seja desenvolvido sistemas com liberação controlada de NpAg para que não ocorra, com o tempo, um efeito citotóxico.⁹⁹

Assim, neste trabalho, com base nas observações de Wu et al.⁹⁹ e Pauksch et al.,⁸⁰ a incorporação das NpAg nas blendas contendo colágeno hidrolisado e polissacarídeos a 2,5% (p/v) foi realizado a fim de ser alcançado as concentrações 0,5 e 5 mg/100 cm² de amostra, que devem ser não-citotóxicas ao osteoblastos e eficaz na ação antibacteriana. Para isso, escolheu-se as membranas resultantes da incorporação de HAp pela metodologia (Exp 1), pois foram os sistemas que apresentaram uma dispersão da fase mineral mais homogênea, menor θ e maiores resistência mecânica, γ_s e γ^p .

Dessa forma essas membranas híbridas contendo as NpAg foram cortados em discos com diâmetro de 1 cm, os quais foram utilizados nos ensaios de a atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Após 24 horas de incubação, procurou-se monitorar a inibição bacteriana por meio da formação de halo em torno dos discos contendo NpAg, por meio da medida do diâmetro do espaço formado entre a borda membrana e a borda do meio sólido de TSA (mm). De acordo com a literatura,¹⁴³ o diâmetro do halo de inibição, medido com auxílio de uma régua milimétrica, é proporcional a sensibilidade do microrganismo contra o disco testado, sendo que quanto maior o halo menor é a resistência da bactéria, ou seja, maior a ação antimicrobiana.

Inicialmente, foram testadas as membranas contendo NpAg em uma concentração 0,5 mg/100 cm². A figura 36 apresenta as fotografias das placas de petri resultantes do ensaio da atividade antimicrobiana, que registraram o efeito da presença das NpAg sobre o crescimento das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* após 24 horas de incubação. O efeito inibitório foi avaliado considerando como controle as membranas híbridas, também resultantes da metodologia (Exp 45m), sem incorporação dessas nanopartículas metálicas.

Figura 36 – Avaliação do efeito das NpAg, adicionadas a 0,5 mg/100 cm² das membranas híbridas 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ-carragenana, obtidas pela precipitação *in locu* de HAp nos interstícios da matriz (Exp. 45m), contra bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P.*

aeruginosa após 24 horas de incubação. Os índices “C” e “T” indicam, respectivamente, as membranas híbridas sem e com incorporação das NpAg.

Analisando a figura 36, pode ser observado que a incorporação de NpAg em concentração de 0,5 mg/100 cm² das membranas híbridas, formadas tanto por quitosana quanto κ -carragenana a 2,5% (p/v), não resultou na formação de halo de inibição, após 24 horas de incubação da amostra em contato com os meios sólidos em que foram inoculados cada uma das três bactérias adotadas neste trabalho. Nesse caso, considera-se que a ação antibacteriana das NpAg contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* pode ter sido afetada, além do potencial zeta negativo, pela baixa concentração adotada, em comparação com a adotada no trabalho de Wu et al.⁹⁹

Verifica-se também, por meio da figura 36, que a presença dessas membranas híbridas no meio sólido desencadeia na liberação de pigmentos. No caso, as membranas híbridas, tanto o controle quanto as contendo NpAg, ocasionaram um stress na sobrevivência e colonização dos microrganismos, acarretando em um aumento na liberação de pigmentos coloridos, no caso esbranquiçado (*E. coli*), amarelado (*S. aureus*) e esverdeado (*P. aeruginosa*); que podem ser ou catalisar a produção de substâncias tóxicas que ocasione danos, por exemplo, em tecidos vivos e nos mecanismos de defesa de um hospedeiro.

Vale ressaltar que a presença de proteínas e outras substâncias orgânicas na composição do material pode promover a adsorção e replicação das bactérias sobre a superfície da membrana híbrida, acarretando em infecções relacionadas com o implante.^{76,77} No entanto, pode ser notado, a partir da figura 36, que, na presença das três bactérias escolhidas, não ocorreu crescimento desses microrganismos na superfície das membranas híbridas tanto sem quanto com incorporação das NpAg.

Nesse sentido, pode ser lembrado, a partir da literatura,^{78,144,145} que a quitosana se destaca dentre os biopolímeros devido a capacidade das matrizes poliméricas formadas por ela em ocasionar a morte de células bacterianas por contato. No entanto, por meio da figura 36, não observou nenhuma ação antibacteriana associada a presença das membranas híbridas contendo quitosana a 2,5% (p/v).

No caso das amostras testadas nesse ensaio antibacteriano, é importante pontuar que, na metodologia (Exp 45 min), o fato de elevar o pH inicial ~ 2,7 até 9,5, devido a difusão de NH_{3(g)} no hidrogel, pode acarretar na desprotonação dos grupos NH₂ (NH₃⁺) da quitosana, pois, como observado na figura 7B, esses grupos são protonados apenas na

faixa de pH 3,75-6,72. Essa consideração é relevante para a esperada ação antibacteriana promovida pela presença de quitosana, pois esse efeito é atribuído a ocorrência da interação eletrostática entre esses grupos amina positivamente carregados com as membranas celulares bacterianas.⁷⁸ Portanto, apesar de ter sido utilizado praticamente a mesma concentração adotada em outros trabalhos,^{144,145} as condições adotadas em (Exp 45m) para produção das membranas híbridas pode ter afetado o efeito antibacteriano da quitosana.

Nesse sentido, destaca-se que para as membranas híbridas consideradas nesses ensaios de atividade antimicrobiana, o efeito antibacteriano esperado deve ser associado com a incorporação das NpAg às blendas biopoliméricas estudadas neste trabalho. Dessa forma a concentração dessas nanopartículas foi aumentada cerca de 10 vezes para que fosse alcançado a quantidade de 5 mg / 100 cm² de membrana híbrida. A figura 37 apresenta a fotografia das amostras resultantes. Em comparação com os controles, constituídos pela mesma membrana híbrida sem adição das nanopartículas, pode ser observado que o aumento da concentração de NpAg na membrana híbrida ocasionou em uma mudança significativa em sua coloração, evidenciando a dispersão dessas nanopartículas por toda matriz biopoliméricas.

Figura 37 – Comparação das fotografias das membranas híbridas 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ -carragenana, obtidas pela precipitação *in locu* de HAp nos interstícios da matriz (Exp. 45m), antes e após a incorporação de NpAg a 5 mg/100 cm² de membrana.

Posteriormente, essas amostras foram testadas sobre o crescimento das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* após 24 horas de incubação. A figura 38 apresenta o

registro do efeito da presença das NpAg por meio de fotografias das placas de petri resultantes desse ensaio da atividade antimicrobiana. O efeito inibitório foi avaliado considerando a comparação com o controle, amostras sem incorporação dessas nanopartículas metálicas.

Analisando a figura 38, pode ser observado que a incorporação de NpAg em concentração de 5 mg/100 cm² das membranas híbridas, formadas tanto por quitosana quanto κ -carragenana a 2,5% (p/v), resultou na formação de halo de inibição, após 24 horas de incubação dessas membranas híbridas em contato com os meios sólidos em que foram inoculados cada uma das três bactérias adotadas nesse ensaio. Nesse caso, verificou-se que a ação antibacteriana das NpAg, contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, incorporadas nessas amostras é, apesar do potencial zeta negativo, de fato dependente da concentração. Além disso, nota-se que houve formação de halo utilizando uma concentração menor do que a mínima considerada no trabalho de Wu et al.⁹⁹ (~18 mg/100 cm² de membrana híbrida).

Essa distinção pode estar associado com o tamanho e forma dessas nanopartículas. Em termos do tamanho, destaca-se que Wu et al.⁹⁹ relataram que o tamanho de partícula de mais de 75% da população de NpAe estava na faixa de 10-30 nm. Neste estudo, por meio da figura 35, foi mostrado que 74% das partículas possuem um tamanho médio de 8,2 nm e 24% delas apresentam um tamanho médio de 3,8 nm. Portanto, a obtenção de NpAg menores neste trabalho favoreceu, de fato, a ocorrência da ação antibacteriana em concentrações menores, tendo em vista a sua maior relação entre a área superficial e o volume que favorece a capacidade dessas nanopartículas de penetrar a membrana celular das bactérias usadas nesse ensaio.

Figura 38 – Avaliação do efeito das NpAg, adicionadas a 5 mg/100 cm² das membranas híbridas 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ -carragenana, obtidas pela precipitação *in locu* de HAp nos interstícios da matriz (Exp. 45m), contra bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* após 24 horas de incubação. Os índices “C” e “T” indicam, respectivamente, as membranas híbridas sem e com incorporação das NpAg.

Em termos da formação de halos, destaca-se que o seu diâmetro foi medido com auxílio de uma régua milimétrica em 5 pontos diferentes para o cálculo médio. Assim, os tamanhos médios dos halos de inibição gerados pela ação das NpAg em concentração de 5 mg/100 cm² das membranas híbridas, contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, são apresentados na figura 39.

Figura 39 – Tamanho médio do diâmetro do halo de inibição formado a partir da ação antibacteriana das NpAg, adicionadas a 5 mg/100 cm² das membranas híbridas 2,5% (p/v) colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) polissacarídeo, quitosana ou κ-carragenana, obtidas pela precipitação *in locu* de HAP nos interstícios da matriz (Exp. 45m), contra bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* após 24 horas de incubação.

No caso das matrizes contendo quitosana a 2,5% (p/v) observaram-se halos com tamanhos médio de $2,7 \pm 0,3$ (*E. coli*), $2,4 \pm 0,4$ (*S. aureus*) e $1,9 \pm 0,3$ (*P. aeruginosa*) mm. Já para as membranas compostas por κ-carragenana a 2,5% (p/v) verifica-se a ocorrência de halos com tamanhos médio de $3,5 \pm 0,7$ (*E. coli*), $3,9 \pm 0,7$ (*S. aureus*) e $3,7 \pm 0,8$ (*P. aeruginosa*) mm.

No estudo de Wu et al.⁹⁹, nota-se que as amostras contendo NpAg em uma concentração de ~45 mg/ 100 cm² resultaram nas melhores resposta em termos da ação antibacteriana, tendo vista a obtenção dos maiores, em comparação com os obtidos para membranas híbridas contendo concentrações menores de nanopartículas, halos de inibição, que variaram de 1,5-2,4 mm. Dessa forma, pode ser observado que os tamanhos médios dos halos formados no ensaio das amostras contendo NpAg a 5 mg/100 cm² das membranas híbridas estão dentro ou acima da faixa de diâmetro reportada por Wu et al.⁹⁹

De acordo com a literatura,⁹⁹ ligeiras diferenças entre as atividades antibacterianas observadas contra cada uma das bactérias podem ser atribuídas, provavelmente, à diferença na parede celular entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto,

neste estudo esse fator não é preponderante uma vez que as NpAg sintetizadas apresentaram um potencial zeta negativo. Contudo, ao ser analisado a figura 39, observa-se dentro da resposta de cada microrganismo a presença das nanopartículas, que há uma significativa diferença entre as membranas híbridas testadas. No caso, pode ser verificado que as matrizes contendo quitosana a 2,5% (p/v) resultaram em halos com tamanhos médios menores do que os obtidos para as amostras compostas por κ -carragenana também a 2,5% (p/v). Esse aspecto é relevante, visto que quanto maior o halo, maior a ação antibacteriana. Entretanto, essa distinção pode ser atribuída a diferenças do controle de liberação das NpAg por essas matrizes. Por essa razão, esse é um parâmetro relevante a ser analisado.

4.8.3 Estudo da liberação das NpAg a 37°C por Espectroscopia UV/VIS

O uso de hidrogéis para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada permitiu a liberação progressiva de substâncias químicas, de modo a assegurar a sua presença prolongada, favorecendo, assim, a sua concentração e consequentemente sua atuação por um período de tempo longo.¹⁴⁶ Além disso, o uso de sistemas de liberação de substâncias químicas controladas diminuiu consideravelmente os riscos da superdosagem, evitando, principalmente, efeitos citotóxicos nos tecidos dos indivíduos.^{99,146}

Após a incorporação do composto de interesse, os hidrogéis são desidratados, para que as cadeias poliméricas que o compõem sejam comprimidas, retendo assim esse composto em sua estrutura.^{146,147} Quando o sistema polimérico é colocado em contato com a água, o que ocorre é o intumescimento da rede polimérica, ou seja, a absorção de água expande estas cadeias, o que permite, assim, a liberação do composto aprisionado.^{146,147} Como a hidratação do hidrogel ocorre lentamente, as substâncias devem ser liberadas de modo controlado para o meio.^{146,147}

Dessa forma, buscou-se avaliar a liberação das NpAg através da imersão das membranas híbridas, contendo colágeno hidrolisado e polissacarídeos a 2,5% (p/v), obtidas pela metodologia (Exp 45m), as quais continham uma concentração inicial de nanopartícula de 5 mg/100 cm² de amostra. A liberação das NpAg foi acompanhada por espectrometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível. A Tabela 8 apresenta a taxa

de liberação dessas nanopartículas após 1, 3, 5, 18, 20 e 24 horas de imersão em água a 37°C.

Tabela 8 – Cálculo da concentração de NpAg liberada pelas membranas híbridas durante imersão em água a 37°C.

Equação: $y = 35425x + 0,0065$ (R=0,99979998)				
2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado + 2,5% (p/v) Quitosana				
Tempo (H)	Absorbância em 390 nm	Concentração de NpAg liberada (mol.L⁻¹)	Concentração de NpAg liberada (mg.cm⁻²)	Taxa de liberação (%)
1	0,00704	$1,5244 \cdot 10^{-8}$	$2,4695 \cdot 10^{-6}$	0,0049
3	0,03077	$6,8519 \cdot 10^{-7}$	$1,1100 \cdot 10^{-4}$	0,2220
5	0,03992	$9,4329 \cdot 10^{-7}$	$1,5281 \cdot 10^{-4}$	0,3056
18	0,11139	$2,9609 \cdot 10^{-6}$	$4,7966 \cdot 10^{-4}$	0,9593
20	0,14879	$4,0167 \cdot 10^{-6}$	$6,5070 \cdot 10^{-4}$	1,3014
24	0,19935	$5,4439 \cdot 10^{-6}$	$8,8191 \cdot 10^{-4}$	1,7638
2,5% (p/v) Colágeno hidrolisado+ 2,5% (p/v) κ-Carragenana				
Tempo (H)	Absorbância em 390 nm	Concentração de NpAg liberada (mol.L⁻¹)	Concentração de NpAg liberada (mg. 100 cm⁻²)	Taxa de liberação (%)
1	0,183	$4,9824 \cdot 10^{-6}$	0,0008	1,6142
3	0,26155	$7,1997 \cdot 10^{-6}$	0,0012	2,3327
5	0,36304	$1,0065 \cdot 10^{-5}$	0,0016	3,2610
18	0,69551	$1,9450 \cdot 10^{-5}$	0,0032	6,3018
20	0,70574	$1,9739 \cdot 10^{-5}$	0,0032	6,3954
24	0,95999	$2,6916 \cdot 10^{-5}$	0,0044	8,7208

Analisando os dados mostrados na tabela 8, observa-se que após 24 horas de imersão, as membranas híbridas contendo quitosana exibiram uma taxa de liberação de NpAg menor em comparação às apresentadas pelas membranas compostas por κ -carragenana.

Wu et al.⁹⁹ reportam que a taxa de liberação NpAg observada, para os materiais híbridos formados entre as NpAg, em concentração variando entre 18-45 mg.100cm⁻², e a celulose bacteriana, foi de 16,5% em 72 horas. Além disso, os autores observaram que

mesmo com baixa taxa de liberação, as taxas de ação antibacteriana foram significativas com redução de mais de 99% contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Portanto, uma taxa de liberação mais lenta, além de resultar em um efeito antibacteriano, evita um efeito citotóxico nas células dos indivíduos. Em comparação a esse perfil relatado por Wu et al.⁹⁹, verifica-se que as taxas observadas para as membranas deste trabalho, apesar da menor concentração incorporada a matriz biopolimérica, também apresentam uma taxa de liberação lenta em 24 horas e uma ação antibacteriana significativas contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, como observado nas figuras 38 e 39.

No caso das membranas híbridas, foi observado a partir dos dados reportados nas tabelas 5 e 6, que a incorporação de HAp pela metodologia (Exp 45) resultou em um aumento significativo da capacidade a absorção de água e uma redução na taxa de degradação apenas para as membranas contendo quitosana a 2,5% (p/V). No caso das membranas híbridas contendo κ -carragenana, obtidos pela mesma metodologia, além de não ocorrer um aumento significativo da taxa de absorção de água, foi observado um aumento na taxa de degradação, tendo em vista um controle inadequado sobre as propriedades de intumescimento desses hidrogéis reticulados por interações iônicas. No caso do estudo de liberação de NpAg dessas amostras, a presença da água absorvida na matriz biopolimérica deve romper a interações que a estabilizam acarretando, assim, na sua degradação e, conseqüentemente, na liberação rápida e de concentrações maiores de NpAg no meio. Por essa razão, justifica-se o motivo pelo qual, na figura 39, foi observado que para as amostras contendo κ -carragenana a obtenção de halos de inibição com diâmetros maiores em comparação com os obtidos para as membranas compostas por quitosana.

No entanto, em termos da aplicação dessas membranas na regeneração óssea, essa baixa estabilidade e maior degradação das amostras contendo κ -carragenana em fluidos com características predominantemente polares, pode resultar em um efeito citotóxico nas células do tecido ósseo, como o osteoblasto, em decorrência da liberação não controlada das NpAg. Por essa razão, considera-se que a membrana híbrida composta por quitosana deve ser a mais indicada para o desenvolvimento de sistemas de regeneração óssea que exibam a possibilidade de evitar e combater processos inflamatórios na interface tecido/implante associados com a presença de microrganismos a partir da liberação controlada *in situ* de agentes antimicrobianos, como as NpAg.

5 Conclusão

O desenvolvimento desse estudo permitiu sintetizar e caracterizar membranas biopoliméricas híbridas obtidas partir da incorporação de fosfato de cálcio a uma matriz composta por colágeno hidrolisado e polissacarídeos.

Foram inicialmente sintetizadas partículas de fosfatos de cálcio a partir da mistura de $\text{CaCl}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$ exposta a atmosfera de $\text{NH}_{3(\text{g})}$ e $\text{CO}_{2(\text{g})}$. A precipitação e composição das partículas foi acompanhada em função do pH, na presença e ausência de biopolímeros. Na presença da fase orgânica hidroxiapatita foi obtida em pHs menos básicos evidenciando a influência da matriz na concentração de supersaturação.

A inserção de partículas na matriz polimérica para obtenção das membranas híbridas foi realizada por 3 metodologias: 1) crescimento da fase mineral *in locu* por meio da exposição dos hidrogéis a atmosfera de $\text{NH}_{3(\text{g})}$ e $\text{CO}_{2(\text{g})}$; 2) adição de partículas previamente sintetizadas em nosso laboratório; e 3) adição de hidroxiapatita bovina comercial. Através das análises de FTIR, Raman, MEV e DRX atestou-se a efetividade da incorporação da fase mineral pelas metodologias adotadas neste trabalho e a bioatividade das membranas após 30 minutos de imersão no SBF. Este teste revelou que membranas bioativas foram obtidas apenas com a presença da fase mineral.

Entretanto, verificou-se que as membranas híbridas obtidas pelas metodologias (Exp 45m), (HApS 0,01g) e (HApB 0,01g) apresentaram morfologia organizada e homogênea, além de se mostrarem mais seletivos à precipitação exclusiva de HAp após sua exposição ao SBF. A metodologia (Exp 45m) mostra-se vantajosa, pois a precipitação lenta guiada pela estrutura organizada do hidrogel favorece a obtenção de membranas com partículas homogeneamente distribuídas em toda sua estrutura. Os resultados de DRX após a exposição a SBF indicam que essas membranas apresentaram maior seletiva à precipitação de HAp.

Em termos da metodologia (Exp 45 min), a concentração dos polissacarídeos com diferentes grupos funcionais influenciou a nucleação e crescimento de cristais de HAp, pois, devido às diferentes interações entre as fases orgânica e mineral.

Em relação às propriedades mecânicas, pode-se verificar que os parâmetros módulo de Young, elongação e tensão são fortemente influenciados pela presença do polissacarídeo na blenda, metodologia adotada para a incorporação e concentração da fase mineral. Observou-se que, na ausência de mineral, as membranas compostas por κ -

carragenana apresentaram módulo de Young maior em comparação ao obtido para as constituídas pela quitosana, pois as interações eletrostáticas entre os Ca^{2+} e os grupos sulfato presente na estrutura da κ -carragenana, promovem ordenamento das cadeias desse polissacarídeo formando uma rede tridimensional com elevada coesão. Em relação à metodologia e, conseqüentemente, a quantidade de partículas utilizada para incorporar a fase mineral a matriz biopolimérica, verificou-se, novamente, que a (1) precipitação *in locu* nos interstícios da fase orgânica (Exp 45m) e a adição de (HApS 0,01g) ou (HApB 0,01g) resultaram em um sistema híbrido que apresentaram os mais elevados módulos de Young em relação as matrizes sem incorporação da fase mineral. Este resultado corrobora os de micrografias eletrônicas, uma vez que a dispersão homogênea da fase mineral deve resultar em membranas com propriedades mecânicas aprimoradas. Como consequência, esses híbridos apresentaram maior resistência para sofrer deformações, exigindo tensão maior para tracionar o sistema. Em decorrência do módulo de Young mais elevado, as membranas apresentam faixa de alongação relativamente baixa, de 8 a 15%, mas o efeito de reforço e a relativa flexibilidade desses materiais híbridos favorece o seu uso na regeneração do tecido ósseo. Em relação à composição da matriz orgânica, observou-se também que as propriedades mecânicas são fortemente influenciadas pela presença e pela concentração do polissacarídeo, indicando uma vantagem no emprego de uma blenda polimérica no desenvolvimento do sistema híbrido, uma vez que a rigidez do material é maior para as maiores concentrações de polissacarídeos.

A caracterização das membranas biopoliméricas obtidas sem incorporação da fase mineral, grupo controle, permitiu avaliar a influência do polissacarídeo nas propriedades de intumescimento, degradabilidade, molhabilidade e γ_s . O fato da quitosana, diferente da κ -carragenana, ser pouco solúvel em soluções neutras e alcalinas, resultam em membranas com menor taxa de absorção de água, menor degradabilidade em PSB, maior θ com água e maior contribuição da γ_s^D na γ_s . No caso desses três últimos parâmetros, destaca-se que os diferentes grupos funcionais desses polissacarídeos presentes na superfície desses materiais influencia a γ_s e molhabilidade dessas amostras pela água.

Em termos da incorporação da fase mineral, foi verificado que a presença da HAp nos interstícios da blenda biopoliméricas resultou, para ambas as blendas, em aumento da taxa de absorção de água, redução da degradabilidade em PBS, redução do θ com água e maior contribuição da γ_s^P em associação com o aumento da γ_s . A partir desses

parâmetros, pode-se destacar que o aumento da hidrofiliidade e da γ_s com a síntese das membranas híbridas são aspectos relevantes na aplicação desse material em sistemas de regeneração óssea, pois resulta em uma melhor adesão e proliferação celular, favorecendo os primeiros eventos que ocorre na superfície implantada durante o processo de calcificação e formação óssea.

Esses dois aspectos são influenciados pelo tipo de metodologia adotada para a incorporação da fase inorgânica, visto que os maiores aumentos foram observados para as membranas resultantes pela metodologia (Exp 45m). Nesse caso, a precipitação lenta e guiada pela matriz biopoliméricas do hidrogel resulta em uma dispersão homogênea da fase mineral, favorecendo uma maior interação entre as fases orgânica e inorgânica e adição de novos grupos polares na superfície, o que, consequentemente, facilita a penetração da água. Outro fator relevante considerado, é que nessa metodologia não quantificou-se a precipitação de mineral, pois ela pode ser maior do que 0,01g, a considerada nas outras metodologias, o que pode favorecer o aumento da hidrofiliidade e γ_s . Além disso, foi observado distinções desses aspectos em termos das blends utilizadas na síntese das membranas híbridas por (Exp 45m), o que foi associado a formação de diferentes quantidades de HAp nas membranas híbridas, sendo maior na presença de quitosana do que na de κ -carragenana, visto que na matriz composta pelo segundo deve ocorrer menor disponibilidade de Ca^{2+} para formação da fase mineral pelo fato de parte desses íons estarem atuando na estabilização de suas cadeias biopoliméricas.

Foi verificado que a incorporação de HAp melhorou a estabilidade e integridade das membranas híbridas em PBS, tendo em vista a redução da taxa de degradação. No caso da matriz contendo κ -carragenana foi observado que, além de sua boa solubilidade em fluidos com características predominantemente polares, o fato dessa matriz biopolimérica ser reticulada por meio de interações eletrostática resulta em sistemas instáveis e com elevada taxa de degradação mesmo com a adição de fase mineral, devido ao rompimento das interações intra e intermoleculares com intumescimento do sistemas e, também, a troca incontrolável de íons com outros cátions do meio fisiológico circundante. Esse comportamento das membranas compostas por κ -carragenana a 2,5% (p/v) explica o efeito citotóxico observado nas culturas com osteoblastos após 72 horas de incubação, visto que não há uma superfície estável para que ocorra a adesão e proliferação celular, primeiros eventos do processo de osseointegração.

O aumento da concentração de colágeno hidrolisado resulta em membranas com taxa de degradação maiores e propriedades superficiais inferiores em comparação com sistemas contendo essa proteína desnaturada e os polissacarídeos com a mesma concentração de 2,5% (p/v). Devido a isso, os sistemas com colágeno hidrolisado a 3,5% (p/v) resultaram em uma viabilidade de osteoblastos menor em comparação aos sistemas obtidos a partir da concentração 2,5% (p/v). Além disso, o aumento da taxa de degradação, devido ao fato dessa proteína desnaturada apresentar boa solubilidade em fluidos com características predominantemente polares, pode ocasionar um efeito citotóxico, principalmente para matriz contendo κ -carragenana, devido instabilidade e falta de integridade da amostra no meio em que os osteoblastos foram cultivados.

Dessa forma, devido ao fato das membranas contendo colágeno hidrolisado e quitosana a 2,5% (p/v) não apresentarem efeito citotóxico após 24 e 72 horas de incubação em cultura de osteoblasto, assume-se que, a partir de todos os resultados obtidos nesta dissertação, que os sistemas híbridos compostos por essa blenda e obtidos por (Exp 45m) podem, potencialmente, ser usadas como membranas de regeneração tecidual guiada temporária em defeitos ósseos.

Além disso, a incorporação de NpAg pode favorecer a sua aplicação na regeneração óssea, pois permite a possibilidade de evitar e combater processos inflamatórios na interface tecido/implante associados com a presença de microrganismos. Essas matrizes híbridas contendo NpAg, devido a sua menor taxa de degradabilidade, se apresentaram como sistemas de liberação controlada, que evita um efeito citotóxico, dessas nanopartículas exibindo uma ação antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, o seu efeito antibacteriano, apesar de um potencial zeta negativo, se mostrou dependente do tamanho de partícula e da concentração de NpAg incorporada a matriz biopolimérica dos sistemas híbridos estudados.

6 Referências

1. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897–5909 (2009).
2. Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O. & Planell, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1137–58 (2008).
3. Narayan, R. J. The next generation of biomaterial development. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1831–7 (2010).
4. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–53 (2008).
5. Zadpoor, A. A. Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **35**, 134–43 (2014).
6. Agarwal, R. & García, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **94**, 53–62 (2015).
7. Ariga, K., Hill, J. P. & Ji, Q. Biomaterials and biofunctionality in layered macromolecular assemblies. *Macromol. Biosci.* **8**, 981–90 (2008).
8. Morais, J. M., Papadimitrakopoulos, F. & Burgess, D. J. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* **12**, 188–96 (2010).
9. Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B. & Nguyen, K. T. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **85**, 573–82 (2008).
10. Xie, M. *et al.* Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks. *Acta Biomater.* **6**, 3665–3675 (2010).
11. Elango, J. *et al.* Cross-talk between primary osteocytes and bone marrow macrophages for osteoclastogenesis upon collagen treatment. *Sci. Rep.* **8**, 5318 (2018).
12. Feng, X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr. Chem. Biol.* **3**, 189–196 (2009).
13. Klinkaewnarong, J. & Utara, S. Ultrasonic-assisted conversion of limestone into needle-like hydroxyapatite nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* **46**, 18–25 (2018).
14. Wang, Y.-Y., Yao, Q.-Z., Zhou, G.-T. & Fu, S.-Q. Formation of elongated calcite mesocrystals and implication for biomineralization. *Chem. Geol.* **360–361**, 126–133 (2013).

15. Fratzl, P., Gupta, H. S., Paschalis, E. P. & Roschger, P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J. Mater. Chem.* **14**, 2115–2123 (2004).
16. Ritchie, R. O., Buehler, M. J. & Hansma, P. Plasticity and toughness in bone. *Phys. Today* **62**, 41–47 (2009).
17. Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H. & Kim, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 269–281 (2015).
18. Goonoo, N. *et al.* κ -Carrageenan Enhances the Biomineralization and Osteogenic Differentiation of Electrospun Polyhydroxybutyrate and Polyhydroxybutyrate Valerate Fibers. *Biomacromolecules* **18**, 1563–1573 (2017).
19. Nourmohammadi, J., Roshanfar, F., Farokhi, M. & Haghbin Nazarpak, M. Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications. *Mater. Sci. Eng. C* **76**, 951–958 (2017).
20. Mota, J. *et al.* Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomater.* **8**, 4173–4180 (2012).
21. Pandele, A. M. *et al.* Cellulose acetate membranes functionalized with resveratrol by covalent immobilization for improved osseointegration. *Appl. Surf. Sci.* **438**, 2–13 (2018).
22. Kwon, K.-J. & Seok, H. Silk Protein-Based Membrane for Guided Bone Regeneration. *Appl. Sci.* **8**, 1214 (2018).
23. Gorgieva, S., Vuherer, T. & Kokol, V. Autofluorescence-aided assessment of integration and μ -structuring in chitosan/gelatin bilayer membranes with rapidly mineralized interface in relevance to guided tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **93**, 226–241 (2018).
24. Vaquette, C. *et al.* Tissue Engineered Constructs for Periodontal Regeneration: Current Status and Future Perspectives. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1800457 (2018).
25. Ramos, A. P., Espimpolo, D. M. & Zaniquelli, M. E. D. Influence of the type of phospholipid head and of the conformation of the polyelectrolyte on the growth of calcium carbonate thin films on LB/LbL matrices. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **95**, 178–85 (2012).
26. Amna, T., Shamshi Hassan, M., Khil, M. & Hwang, I. Biological interactions of muscle precursor C2C12 cells with biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) scaffoldings. *Ceram. Int.* **40**, 14305–14311 (2014).
27. Swetha, M. *et al.* Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **47**, 1–4 (2010).

-
28. Nwe, N., Furuike, T. & Tamura, H. Selection of a biopolymer based on attachment, morphology and proliferation of fibroblast NIH/3T3 cells for the development of a biodegradable tissue regeneration template: Alginate, bacterial cellulose and gelatin. *Process Biochem.* **45**, 457–466 (2010).
 29. Mozumder, M. S., Mairpady, A. & Mourad, A. H. I. Polymeric nanobiocomposites for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **105**, 1241–1259 (2017).
 30. Sharifzadeh, G., Wahit, M. U., Soheilmoghaddam, M., Whye, W. T. & Pasbakhsh, P. Kappa-carrageenan/halloysite nanocomposite hydrogels as potential drug delivery systems. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **67**, 426–434 (2016).
 31. Zeugolis, D. I. *et al.* Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* **29**, 2293–2305 (2008).
 32. Venkatesan, J. & Kim, S. K. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Mar. Drugs* **8**, 2252–2266 (2010).
 33. Li, J. *et al.* Iota-carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **103**, 1498–1510 (2015).
 34. Yang, X., Guo, L., Fan, Y. & Zhang, X. Preparation and characterization of macromolecule cross-linked collagen hydrogels for chondrocyte delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 487–93 (2013).
 35. Söderhäll, C. *et al.* Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol.* **5**, e242 (2007).
 36. Smith, J. W. Packing Arrangement of Tropocollagen Molecules. *Nature* **205**, 356 (1965).
 37. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
 38. Usha, R. & Ramasami, T. Influence of hydrogen bond, hydrophobic and electrovalent salt linkages on the transition temperature, enthalpy and activation energy in rat tail tendon (RTT) collagen fibre. *Thermochim. Acta* **338**, 17–25 (1999).
 39. Zhang, Y., Herling, M. & Chenoweth, D. M. General Solution for Stabilizing Triple Helical Collagen. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9751–9754 (2016).
 40. Schweizer, S., Bick, A., Subramanian, L. & Krokidis, X. Influences on the stability of collagen triple-helix. *Fluid Phase Equilib.* **362**, 113–117 (2014).
 41. Sader, M. S., Martins, V. C. A., Gomez, S., LeGeros, R. Z. & Soares, G. A. Production and in vitro characterization of 3D porous scaffolds made of magnesium carbonate apatite (MCA)/anionic collagen using a biomimetic

- approach. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 4188–4196 (2013).
42. Han, B., Jauregui, J., Tang, B. W. & Nimni, M. E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A* **65**, 118–24 (2003).
 43. Chaudry, Z. F., Rocha, J. L., Plepis, A. M. G., Rossi, M. & Goissis, G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. *Polímeros* **7**, 40–46 (1997).
 44. Hu, C., Zhang, L. & Wei, M. Development of Biomimetic Scaffolds with Both Intrafibrillar and Extrafibrillar Mineralization. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**, 669–676 (2015).
 45. Sripriya, R., Kumar, R., Balaji, S., Senthil Kumar, M. & Sehgal, P. K. Characterizations of polyanionic collagen prepared by linking additional carboxylic groups. *React. Funct. Polym.* **71**, 62–69 (2011).
 46. Veríssimo, D. M. *et al.* Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. *Acta Biomater.* **6**, 4011–4018 (2010).
 47. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. & Montero, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* **25**, 1813–1827 (2011).
 48. Zhang, Z., Li, G. & Shi, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *J. Soc. Leather Technol. Chem.* **90**, 23–28 (2006).
 49. Huang, C.-H. *et al.* Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 2476–2483 (2012).
 50. Peter, M. *et al.* Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **80**, 687–694 (2010).
 51. Schuurman, W. *et al.* Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Macromol. Biosci.* **13**, 551–561 (2013).
 52. Ficaí, A. *et al.* Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. *J. Mol. Struct.* **1037**, 154–159 (2013).
 53. Ramadass, S. K. *et al.* Sol–Gel Assisted Fabrication of Collagen Hydrolysate Composite Scaffold: A Novel Therapeutic Alternative to the Traditional Collagen Scaffold. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 15015–15025 (2014).
 54. Pei, Y. *et al.* Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen

-
- hydrolysate composite films. *Carbohydr. Polym.* **92**, 1752–1760 (2013).
55. Singh, R., Shitiz, K. & Singh, A. Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. *Int. Wound J.* **14**, 1276–1289 (2017).
 56. Deepthi, S., Venkatesan, J., Kim, S. K., Bumgardner, J. D. & Jayakumar, R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**, 1338–1353 (2016).
 57. Huang, M., Khor, E. & Lim, L.-Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharm. Res.* **21**, 344–353 (2004).
 58. Mao, J. S., Liu, H. F., Yin, Y. J. & Yao, K. De. The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* **24**, 1621–1629 (2003).
 59. Tseng, H.-J., Tsou, T.-L., Wang, H.-J. & Hsu, S. Characterization of chitosan–gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **7**, 20–31 (2013).
 60. Thein-Han, W. W., Saikhun, J., Pholpramoo, C., Misra, R. D. K. & Kitiyanant, Y. 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**, 3453–3466 (2009).
 61. JIANKANG, H. *et al.* Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater.* **5**, 453–461 (2009).
 62. Zhang, L. *et al.* A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **77A**, 277–284 (2006).
 63. Feng, W. *et al.* A novel composite of collagen-hydroxyapatite/kappa-carrageenan. *J. Alloys Compd.* **693**, 482–489 (2017).
 64. Meng, F. *et al.* Mechanical, hydrophobic and thermal properties of an organic-inorganic hybrid carrageenan-polyvinyl alcohol composite film. *Compos. Part B Eng.* **143**, 1–8 (2018).
 65. Chopra, P. *et al.* Fabrication of poly(vinyl alcohol)-Carrageenan scaffolds for cryopreservation: Effect of composition on cell viability. *Carbohydr. Polym.* **147**, 509–516 (2016).
 66. Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y. & Wang, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydr. Polym.* **121**, 27–36 (2015).
 67. Kim, I. Y. *et al.* Thermoreversible behavior of κ -carrageenan and its apatite-forming ability in simulated body fluid. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 1472–1476 (2011).

-
68. Cruz, M. A. E. *et al.* Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **370**, 459–468 (2016).
 69. Bakan, F., Laçin, O. & Sarac, H. A novel low temperature sol–gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite. *Powder Technol.* **233**, 295–302 (2013).
 70. Doostmohammadi, A. *et al.* Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. *Mater. Chem. Phys.* **132**, 446–452 (2012).
 71. Ma, M.-G. Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 1781–1791 (2012).
 72. Li, Z. *et al.* Hollow hydroxyapatite spheres fabrication with three-dimensional hydrogel template. *CrystEngComm* **16**, 4202–4209 (2014).
 73. Chen, L., Mccrate, J. M., Lee, J. C. M. & Li, H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology* **22**, (2011).
 74. Rajapakse, R. M. G. *et al.* Colloidal Hydroxyapatite/Poly(Acrylic Acid) Hybrids Using Calcium Sucrate and Ammoniumdihydrogen Orthophosphate. *J. Appl. Solut. Chem. Model.* **5**, 21–29 (2016).
 75. Ficai, A. *et al.* Collagen / Hydroxyapatite Interactions in Composite Biomaterials. *Mater. Plast.* **1**, 11–15 (2009).
 76. Tian, B. *et al.* Fabrication of silver nanoparticle-doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **61**, 345–359 (2016).
 77. Tian, B. *et al.* Silver nanoparticle-loaded hydroxyapatite coating: structure, antibacterial properties, and capacity for osteogenic induction in vitro. *RSC Adv.* **6**, 8549–8562 (2016).
 78. Junter, G., Thébault, P. & Lebrun, L. Polysaccharide-based antibiofilm surfaces. *Acta Biomater.* **30**, 13–25 (2016).
 79. Franci, G. *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules* **20**, 8856–8874 (2015).
 80. Pauksch, L. *et al.* Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater.* **10**, 439–449 (2014).
 81. Chaloupka, K., Malam, Y. & Seifalian, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **28**, 580–588 (2010).

-
82. Chen, X. & Schluesener, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* **176**, 1–12 (2008).
 83. Alt, V. *et al.* An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* **25**, 4383–4391 (2004).
 84. Kelly, S. & Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–384 (2000).
 85. Miles, A. J. & Wallace, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 39–51 (2006).
 86. Funami, T. *et al.* Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocoll.* **21**, 617–629 (2007).
 87. Vieira, M. G. A., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. O. & Beppu, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur. Polym. J.* **47**, 254–263 (2011).
 88. Tas, A. C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials* **21**, 1429–38 (2000).
 89. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 721–734 (1990).
 90. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
 91. Khoshakhlagh, P. *et al.* Development and characterization of a bioglass/chitosan composite as an injectable bone substitute. *Carbohydr. Polym.* **157**, 1261–1271 (2017).
 92. Rudawska, A. & Jacniacka, E. Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen–Wendt method. *Int. J. Adhes. Adhes.* **29**, 451–457 (2009).
 93. Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X. & Zhang, X. D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* **24**, 4663–4670 (2003).
 94. Liu, H. *et al.* Biomimetic and Cell-Mediated Mineralization of Hydroxyapatite by Carrageenan Functionalized Graphene Oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 3132–3140 (2014).
 95. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).

-
96. de Faria, A. N., Zancanela, D. C., Ramos, A. P., Torqueti, M. R. & Ciancaglini, P. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. *Cytotechnology* **68**, 1623–1632 (2016).
 97. Mulfinger, L. *et al.* Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **84**, 322 (2007).
 98. Kim, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 95–101 (2007).
 99. Wu, J. *et al.* In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **102**, 762–771 (2014).
 100. Tenboll, A. *et al.* Controlled deposition of highly oriented type I collagen mimicking in vivo collagen structures. *Langmuir* **26**, 12165–72 (2010).
 101. Zeugolis, D. I. *et al.* Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* **29**, 2293–305 (2008).
 102. Popat, A., Liu, J., Lu, G. Q. & Qiao, S. Z. A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **22**, 11173–11178 (2012).
 103. Ficai, A. *et al.* Self-assembled collagen/hydroxyapatite composite materials. *Chem. Eng. J.* **160**, 794–800 (2010).
 104. GEORGE, A. & VEIS, A. FTIRS in water demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. *Acta Chem. Scand.* **30**, 2372–2377 (1991).
 105. Guo, Y. P. & Zhou, Y. Conversion of nacre powders to apatite in phosphate buffer solutions at low temperatures. *Mater. Chem. Phys.* **106**, 88–94 (2007).
 106. Rodrigues, C. V. M. *et al.* Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4987–4997 (2003).
 107. Wang, J. *et al.* Self-assembled peptide nanofibers on graphene oxide as a novel nanohybrid for biomimetic mineralization of hydroxyapatite. *Carbon N. Y.* **89**, 20–30 (2015).
 108. Burbank, M. B., Weaver, T. J., Green, T. L., Williams, B. C. & Crawford, R. L. Precipitation of Calcite by Indigenous Microorganisms to Strengthen Liquefiable Soils. *Geomicrobiol. J.* **28**, 301–312 (2011).
 109. Fernández, E. *et al.* Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **10**, 169–176 (1999).
 110. Falini, G., Fermani, S., Goisis, M. & Manganelli, G. Calcite Morphology and

- Aggregation in the Presence of Comb-like Polymers Adsorbed on Cement Particles. *Cryst. Growth Des.* **9**, 2240–2247 (2009).
111. Khandan, A., Abdellahi, M., Ozada, N. & Ghayour, H. Study of the bioactivity, wettability and hardness behaviour of the bovine hydroxyapatite-diopside bio-nanocomposite coating. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **60**, 538–546 (2016).
 112. Sadat-Shojai, M., Atai, M., Nodehi, A. & Khanlar, L. N. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent. Mater.* **26**, 471–482 (2010).
 113. Yamini, D., Devanand Venkatasubbu, G., Kumar, J. & Ramakrishnan, V. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **117**, 299–303 (2014).
 114. Zając, A., Hanuza, J., Wandas, M. & Dymińska, L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **134**, 114–120 (2015).
 115. Pereira, L., Amado, A. M., Critchley, A. T., van de Velde, F. & Ribeiro-Claro, P. J. A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **23**, 1903–1909 (2009).
 116. Kontoyannis, C. G. & Vagenas, N. V. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst* **125**, 251–255 (2000).
 117. Ficaí, A. *et al.* Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. *J. Mol. Struct.* **1037**, 154–159 (2013).
 118. Boonsongrit, Y., Mueller, B. W. & Mitrevej, A. Characterization of drug-chitosan interaction by ¹H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 388–95 (2008).
 119. Fang, W. *et al.* Hydroxyapatite Crystal Formation in the Presence of Polysaccharide. *Cryst. Growth Des.* **16**, 1247–1255 (2016).
 120. Jegal, S.-H. *et al.* Functional composite nanofibers of poly(lactide-co-caprolactone) containing gelatin-apatite bone mimetic precipitate for bone regeneration. *Acta Biomater.* **7**, 1609–1617 (2011).
 121. Lee, E.-J. *et al.* Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials* **30**, 743–750 (2009).
 122. Isikli, C., Hasirci, V. & Hasirci, N. Development of porous chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 135–143 (2012).
 123. Salgueiro, A. M., Daniel-da-Silva, A. L., Fateixa, S. & Trindade, T. κ -Carrageenan hydrogel nanocomposites with release behavior mediated by morphological

- distinct Au nanofillers. *Carbohydr. Polym.* **91**, 100–109 (2013).
124. Yegappan, R., Selvaprithiviraj, V., Amirthalingam, S. & Jayakumar, R. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. *Carbohydr. Polym.* **198**, 385–400 (2018).
 125. Caridade, S. G. *et al.* Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles: evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **20**, 173–183 (2013).
 126. Lim Soo, P. *et al.* Drug release mechanism of paclitaxel from a chitosan–lipid implant system: Effect of swelling, degradation and morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 149–157 (2008).
 127. Selvakumaran, S., Muhamad, I. I. & Abd Razak, S. I. Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of pore forming agents. *Carbohydr. Polym.* **135**, 207–214 (2016).
 128. Delmar, K. & Bianco-Peled, H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydr. Polym.* **127**, 28–37 (2015).
 129. Puleo, D. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials* **20**, 2311–2321 (1999).
 130. Gentleman, M. M. & Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *Int. Mater. Rev.* **59**, 417–429 (2014).
 131. Rhim, J.-W. Physical-Mechanical Properties of Agar/κ-Carrageenan Blend Film and Derived Clay Nanocomposite Film. *J. Food Sci.* **77**, N66–N73 (2012).
 132. Rupp, F. *et al.* Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **76A**, 323–334 (2006).
 133. Chrzanowski, W. *et al.* Chemical, Corrosion and Topographical Analysis of Stainless Steel Implants after Different Implantation Periods. *J. Biomater. Appl.* **23**, 51–71 (2008).
 134. López-Pérez, P. M., Marques, A. P., Silva, R. M. P. da, Pashkuleva, I. & Reis, R. L. Effect of chitosan membrane surface modification via plasma induced polymerization on the adhesion of osteoblast-like cells. *J. Mater. Chem.* **17**, 4064 (2007).
 135. Nogueira, L. F. B., Maniglia, B. C., Pereira, L. S., Tapia-Blácido, D. R. & Ramos, A. P. Formation of carrageenan-CaCO₃ bioactive membranes. *Mater. Sci. Eng. C* **58**, 1–6 (2016).
 136. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).

-
137. Novaes Jr, A. B. *et al.* Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz. Dent. J.* **21**, 471–481 (2010).
 138. Ocampo, J. I. G. *et al.* Osteoblast Responses to Injectable Bone Substitutes of kappa-Carrageenan and Nano Hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **In Press**, 1–45 (2018).
 139. Parab, H., Jung, C., Woo, M.-A. & Park, H. G. An anisotropic snowflake-like structural assembly of polymer-capped gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 2173–2180 (2011).
 140. Sun, H., Gao, Z., Gao, L. & Hou, K. Star-PDMAEMA- β -CD-Stabilized Colloidal Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization and pH-Controlled Assembly. *J. Macromol. Sci. Part A* **48**, 291–298 (2011).
 141. Khlebtsov, N. G. Optics and biophotonics of nanoparticles with a plasmon resonance. *Quantum Electron.* **38**, 504–529 (2008).
 142. Guidelli, É. J., Kinoshita, A., Ramos, A. P. & Baffa, O. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. *J. Nanoparticle Res.* **15**, 1536 (2013).
 143. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clark, D. P. *Brock Biology of Microorganisms 13th Edition. Benjamin Cummings* (2009). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
 144. Park, S.-I., Daeschel, M. A. & Zhao, Y. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films. *J. Food Sci.* **69**, M215–M221 (2004).
 145. Zivanovic, S., Li, J., Davidson, P. M. & Kit, K. Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. *Biomacromolecules* **8**, 1505–1510 (2007).
 146. Torelli-Souza, R. R., Cavalcante Bastos, L. A., Nunes, H. G. L., Camara, C. A. & Amorim, R. V. S. Sustained release of an antitumoral drug from alginate-chitosan hydrogel beads and its potential use as colonic drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* **126**, E409–E418 (2012).
 147. Colombo, P. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 37–57 (1993).