UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FILIPPE HABITZREUTER

**Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de
membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por
precipitação *in situ***

FILIPPE HABITZREUTER

**Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de
membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por
precipitação *in situ***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais
Voltados à Agroindústria

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva
Rigo

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Habitzreuter, Filipe

H116a Avaliação das características físico-químicas e
citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana
com hidroxiapatita obtidas por precipitação in situ /
Filipe Habitzreuter ; orientadora Eliana Cristina da
Silva Rigo. -- Pirassununga, 2016.
86 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-
Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais) -
- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos.

FILIPPE HABITZREUTER

Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação *in situ*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria

Data de aprovação: 19/09/2016

Banca Examinadora:

Eliana Cristina da Silva Rigo (Presidente da Comissão Avaliadora)
Professora Doutora – FZEA/USP

Fernando Gustavo Tonin
Professor Doutor – FZEA/USP

Juliana Marchi
Professora Doutora – UFABC

Luci Cristina de Oliveira Vercik
Doutora – FZEA/USP

*À minha mãe, Márcia Virgínia Biagioni
Habitzreuter, que sempre fez o possível e
impossível pelos seus filhos.*

Agradecimentos

À Prof. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo por me receber tão bem em seu laboratório e me conceder esta oportunidade, além de todas as conversas e orientação essenciais para a conclusão deste trabalho;

À Dra. Luci Cristina de Oliveira Vercik, pelas discussões desde a qualificação, inclusive nos horários de café e por me acompanhar durante esta jornada;

À Dra. Giovana Krempel Fonseca Merighe pelo auxílio e discussões sobre o ensaio de viabilidade celular;

Aos Ms. Rodrigo Vinícius Lourenço, Ms. Silvana Marina Piccoli Pugini, Ms. Josiane Gonçalves Borges e Leonardo Martins Pozzobon pelas análises apresentadas neste trabalho;

À minha namorada (e futura esposa) Camila Alves, pela companhia, apoio e suporte, essenciais para o andamento deste trabalho;

Aos colegas do laboratório BioLab;

À minha família, em especial minha irmã Ester Habitzreuter por me acolher em sua casa em Pirassununga;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES e à Pró-Reitoria de Pós Graduação pela bolsa de estudos concedida.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

- *Carl Sagan*

Resumo

HABITZREUTER, F. **Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação *in situ***. 2016. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O crescente interesse na utilização de biomateriais para reparação óssea levou a inúmeros estudos envolvendo formação de diversos produtos, neste sentido, os compósitos obtidos utilizando-se gelatina (G), quitosana (QS) e hidroxiapatita (HA) destacam-se por serem bioativos e bioabsorvíveis, além de apresentarem elevada similaridade com o tecido a ser reparado. Barreiras físicas formadas por tais materiais são extremamente importantes para a odontologia, e o seguinte trabalho tem como objetivo a preparação de membranas de G/QS/HA a partir de um método de co-precipitação *in situ* da HA na matriz polimérica para sua utilização em regeneração tecidual guiada (RTG). As membranas contendo razões de 20/80, 50/50 e 80/20 de G/QS com 0,3M de HA foram preparadas com pequena adição de glicerina (0,5% v/v) e suas características morfológicas e físico-químicas foram analisadas por meio de técnicas como espectroscopia no infravermelho (IV), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e análise termogravimétrica (ATG). Além disso, foram realizados ensaios de intumescimento e ensaios de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células para verificar a possibilidade de utilização das membranas confeccionadas. O processo de precipitação *in situ* foi eficaz para formação das membranas. Além disso, as amostras reticuladas por GTA apresentaram melhores resultados de intumescimento, ao passo que as membranas reticuladas por TPP não se mostraram citotóxicas.

Palavras-chave: quitosana, gelatina, hidroxiapatita, precipitação *in situ*, RTG, doença periodontal

Abstract

HABITZREUTER, F. **Evaluation of the physical-chemical and cytotoxic characteristics of gelatin/chitosan membranes with hydroxyapatite obtained by *in situ* precipitation**. 2016. 86p. Masters Degree Dissertation – Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2016.

The increasing growth in the usage of bio-composites in bone repair has led to several studies involving the formation of several products. In this sense, composites obtained with gelatin (G), chitosan (QS) and hydroxyapatite (HA) stand out since they are bioactive and biodegradable, besides showing high similarity with the tissue to be repaired. Physical barriers made by such materials are extremely important in orthopedics, and the present work aims to craft G/QS/HA membranes by an *in situ* co-precipitation method of HA in the polymeric matrix to use them with a treatment called guided bone regeneration (RTG). The membranes containing 20/80, 50/50 and 80/20 weigh percent of G/QS with 0,3M of HA were prepared with a small amount of glycerin (0,5% v/v) and its morphological and physicochemical properties were analyzed by infrared spectroscopy (IV), X-ray diffraction (DRX), scanning electron microscopy (MEV), electron energy loss spectroscopy (EDS) and thermo gravimetric analysis (ATG). On top of that, swelling essays and *in vitro* cytotoxicity with cell culture were be carried out to check the availability and possible uses of the crafted membranes. The *in situ* precipitation method was effective to form the membranes. The samples crosslinked with GTA showed better swelling results, however the TPP method yielded non-cytotoxic membranes.

Keywords: chitosan, gelatin, hydroxyapatite, *in situ* precipitation, GTR, periodontal disease.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas da quitina (A) e quitosana (B). Adaptado de (ANITHA et al., 2014).	9
Figura 2. Classificação das estruturas de quitina e quitosana, baseada na quantidade de grupos acetilados e desacetilados. Adaptado de (KHOR; YONG, 2003).	10
Figura 3. Estrutura do colágeno tipo I. Adaptado de (GORGIEVA; KOKOL, 2011)...13	
Figura 4. Dois métodos para extração de gelatina de tecidos ricos em colágeno. Adaptado de Ikada, 2002.	15
Figura 5. Estrutura da glicerina.	23
Figura 6. Esquema de reticulação iônica da quitosana com íons tripolifosfato (GONSALVES, 2011).	18
Figura 7. Reação entre aminas primárias e glutaraldeído. (Em vermelho, destaca-se a base de <i>Shiff</i> formada).	19
Figura 8. Mecanismos de reação de GTA com Quitosana. (a) Formação de Base de <i>Schiff</i> , (b) Formação de adutos com aldeídos residuais. (Adaptado de (SCHIFFMAN; SCHAUER, 2007)).	20
Figura 9. Estrutura proposta por (JĀTARIU et al., 2011) para reticulação de blendas de G/QS na presença de GTA e TPP.	21
Figura 10. Interações entre as cadeias de quitosana com moléculas de HA. Adaptado de (XIANMIAO et al., 2009).	28
Figura 11. Interações entre cristais de HA com matriz polimérica de G/QS. (a) Formação de HA manométrica e (b) HA micrométrica. Adaptado de (LI et al., 2009).	32
Figura 12. Método de preparo das membranas contendo gelatina, quitosana e glicerina.	36
Figura 13. Método de preparo para membranas contendo gelatina, quitosana, glicerina e hidroxiapatita.	38
Figura 14. Métodos de reticulação utilizados e amostras resultantes.	39
Figura 15. Esquema para reticulação por vapor de GTA. Fonte própria.	40
Figura 16. Difração de raios X entre dois planos de átomos. Adaptado de (CALLISTER; RETHWISCH, 2007).	43
Figura 17. Espectros de IV das amostras QS, G e GQS.	49

Figura 18. Espectros de IV para as amostras de HA.	50
Figura 19. Espectros de IV para as amostras neutralizadas contendo HA.	52
Figura 20. Difractogramas de raios X das amostras neutralizadas QS, G e QQS.	53
Figura 21. Difractogramas de raios X das amostras neutralizadas contendo HA.	54
Figura 22. Ensaios de intumescimento das amostras neutralizadas.	55
Figura 23. Espectros de IV da amostra QQS 50/50 reticulada por vapor de GTA. ...	57
Figura 24. Detalhe do espectro de IV da amostra QQS 50/50.	58
Figura 25. Espectros de IV da amostra QQSHA 50/50 reticulada por vapor de GTA.	58
Figura 26. Ensaio de intumescimento da amostra QQS 50/50 reticulada por vapor de GTA.	60
Figura 27. Ensaio de intumescimento da amostra QQSHA 50/50 reticulada por vapor de GTA.	61
Figura 28. Espectros de IV da amostra QQS 50/50 reticulada por TPP.	63
Figura 29. Espectros de IV da amostra QQSHA 50/50 reticulada por TPP.	64
Figura 30. Ensaios de Intumescimento da amostra QQS 50/50 reticulada por TPP. 65	
Figura 31. Ensaios de Intumescimento da amostra QQSHA 50/50 reticulada por TPP.	65
Figura 32. Espectros de IV da amostra QQS 50/50 reticulada por GTA 1%.	67
Figura 33. Espectros de IV da amostra QQSHA 50/50 reticulada por GTA1%.	67
Figura 34. Ensaio de Intumescimento da amostra QQS 50/50 reticulada com GTA 1%.	68
Figura 35. Ensaio de Intumescimento da amostra QQSHA 50/50 reticulada com GTA 1%.	69
Figura 36. Imagens de MEV das amostras (1) QQS, (2), QQSHA, (3) QQSHA GTA 1%, (4) QQSHA TPP 1% e (5) QQSHA GTA 10%.	71
Figura 37. Perfis de degradação térmica das amostras.	72
Figura 38. Derivada primeira (DTG) dos termogramas obtidos.	73
Figura 39. Ensaios de viabilidade celular.	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação das biocerâmicas.....	24
Tabela 2. Diferentes tipos de fosfatos de cálcio e suas ocorrências no organismo (OLIVEIRA, 2010).	25
Tabela 3. Nomenclatura das membranas de G/QS.....	36
Tabela 4. Nomenclatura das membranas contendo G/QS/HA.	38
Tabela 5. Picos característicos das amostras QS, G e GQS.	49
Tabela 6. Teores de C, O, P e Ca obtidos pela análise de EDS.	70

Lista de Abreviações

G	Gelatina
QS	Quitosana
HA	Hidroxiapatita
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
e-PTFE	Politetrafluoroetileto Expandido
d-PTFE	Politetrafluoroetileto Denso
MEC	Matrizes Extra Celulares
GA	Grau de Acetilação
GTA	Glutaraldeído
TPP	Tripolifosfato de Sódio
GAG	Glicosaminoglicano
UHT	Temperatura Ultra Elevada
IV	Infravermelho
DRX	Difração de Raios X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ATG	Análise Termogravimétrica
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
β -TCP	β - Fosfato Tricálcico
CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
ATR	Reflectância Total Atenuada
PBS	Phosphate Buffer Saline
GI	Grau de Intumescimento
VC	Viabilidade Celular
DO	Densidade Ótica
UV	Ultravioleta

Sumário

Agradecimentos.....	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviações	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Doença Periodontal.....	3
2.2. Regeneração Tecidual Guiada (RTG).....	4
2.2.1. Membranas não-absorvíveis.....	5
2.2.2. Membranas absorvíveis	5
2.3. Biomateriais	7
2.3.1. Quitosana.....	8
2.3.2. Gelatina.....	12
2.3.3. Blendas de G/QS	16
2.3.3.1. Reticulação	17
2.3.3.2. Glicerina.....	23
2.3.4. Biocerâmicas	24
3. Compósitos de QS/HA	26
4. Compósitos de G/HA.....	29
5. Compósitos de G/QS/HA.....	30
3. Objetivo Geral.....	34
4. Materiais e métodos	35
4.1. <i>Materiais</i>	35
4.2. <i>Obtenção das membranas de gelatina/quitosana (G/QS)</i>	35

4.3. Obtenção das membranas de gelatina/quitosana/hidroxiapatita (G/QS/HA).....	36
4.4. Reticulação	39
4.5. Caracterizações	41
5. Resultados e discussões	48
6. Conclusões	75
7. Referências Bibliográficas	76
Anexo I	84

1. Introdução

Um dos órgãos mais importantes do sistema digestório são os dentes. Através da mastigação podemos cortar, moer e triturar os alimentos, facilitando o processo de digestão. No entanto, a falta de higiene bucal pode levar a diversas complicações. O acúmulo de placa bacteriana nas áreas subgengivais pode provocar uma série de inflamações que levam à perda dentária. A periodontite (ou doença periodontal) é uma das várias doenças que ocorrem na região bucal, e é a principal responsável pela perda de dentes nos indivíduos com mais de 25 anos de idade (DEASY, 1999). Muitos tratamentos convencionais encontram dificuldades de retenção dos fármacos no local lesionado, devido à presença de saliva e de movimentos de mastigação e deglutição. Além disso, o processo de cicatrização das cavidades dentárias ocorre com preenchimento de tecidos fibrosos ao invés de tecido ósseo (LOE, 1986).

Assim, um dos principais obstáculos para o sucesso da cicatrização óssea e criação de novo osso é a formação muito rápida dos tecidos conjuntivo fibroso e epitelial. A migração destes tecidos moles pode atrapalhar ou impedir totalmente a osteogênese no defeito ou área cirúrgica. O princípio de selar fisicamente um sítio anatômico para melhorar a cicatrização de certo tipo de tecido e direcionar a regeneração tecidual tem sido bastante utilizado em odontologia, através da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG). A RTG é um dos tratamentos que reconstitui novos tecidos usando uma membrana como barreira de proteção da área defeituosa impedindo a invasão de outros tecidos, especialmente dos tecidos conjuntivos fibrosos, é um tratamento simples quando comparado com outros tratamentos da engenharia de tecido, tais como a reconstrução *in vitro* de tecidos (DOWELL, 1991).

As membranas utilizadas em RTG podem ser constituídas por materiais absorvíveis ou não absorvíveis. Ambos os tipos vêm sendo amplamente estudados para tratamento de lesões odontológicas, apresentando diversos resultados favoráveis, quando comparado com outros tratamentos existentes (MURPHY, 2003). No entanto, as membranas não absorvíveis exigem um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção, tornando o uso de membranas bioabsorvíveis (formadas normalmente por biopolímeros) mais interessante para tais tratamentos.

Além da função de bloqueio físico da área lesionada, as membranas podem ser utilizadas juntamente com fosfatos de cálcio similares ao tecido ósseo, tais como β - fosfato tricálcico (β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Assim, os compósitos formados apresentam propriedade regenerativa do tecido ósseo, além da sua função original (PENICHE, 2010).

Tais compósitos podem ser formados a partir de diferentes tipos de materiais poliméricos, como gelatina (G) e quitosana (QS), dois polímeros naturais muito versáteis. Sua utilização chamou atenção de diversos pesquisadores devido às suas propriedades físico-químicas e fisiológicas, bem como seus baixos custos por serem amplamente encontradas no meio animal (BIGI, 2000 e DI MARTINI, 2005). A formação de compósitos à base de G/QS, G/HA e QS/HA é bastante estudada em decorrência das características de cada material, no entanto, o procedimento proposto neste trabalho, que envolve a precipitação *in situ* da hidroxiapatita na formação de membranas de gelatina com quitosana ainda é pouco explorado.

Este procedimento de formação da HA é preferível para aplicação em RTG, pois a HA formada na matriz polimérica possui alta similaridade com as apatitas presentes nos tecidos ósseos. Além disso, os materiais obtidos são bastante homogêneos, diminuindo os riscos de inflamações, que normalmente ocorrem com materiais microscopicamente não-homogêneos (MANO, 2004, YAMAGUCHI, 2001).

Assim, a formação de compósitos à base de G/QS/HA para aplicação em RTG no tratamento da doença periodontal é interessante, pois os materiais utilizados possuem características interessantes do ponto de vista físico-químico e fisiológico, além de existirem poucos estudos na literatura envolvendo G/QS/HA para esta aplicação.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Doença Periodontal*

A palavra periodontal define a região bucal formada pelos tecidos de sustentação dos dentes à maxila ou mandíbula, como gengiva, cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. A boca possui centenas de espécies de bactérias vivendo em simbiose com um hospedeiro saudável, estes microorganismos formam colônias de biofilmes na superfície dos dentes e de seus tecidos adjacentes. Parte dessas bactérias pode se acumular nessas regiões, levando à formação de placas bacterianas. Caso não haja remoção da placa, este acúmulo inicia um processo inflamatório chamado gengivite. O avanço desta inflamação para outros tecidos periodontais evolui para a doença periodontal, ou periodontite. Enquanto a gengivite é caracterizada por uma inflamação reversível e não destrutiva dos tecidos moles do periodonto, a doença periodontal é acompanhada de desgaste dos tecidos de sustentação dos dentes, levando à perda dentária (ALBANDAR, 2005).

As doenças periodontais, juntamente com as cáries, são o tipo mais comum de doenças infecciosas da região bucal, e a principal causa da perda dentária em humanos (ALBANDAR, 2005), afetando cerca de 5 a 20% da população mundial (ALJEHANI, 2014). Além de seres humanos, há estimativas de que 80% dos cães sofrem da doença (FERNANDES et al., 2012). A falta de profilaxia bucal é a principal causa que leva ao avanço da doença. Desta forma, higiene bucal, utilização de flúor em dentifrícios e água potável são excelentes maneiras de prevenir o estágio inicial da doença (DENTINO; KASSAB; RENNER, 2005). AlJehani (ALJEHANI, 2014), no entanto, listou uma série de outros fatores que influenciam na evolução da infecção causada por placa bacteriana, como tabagismo, *stress* e diabetes. Além disso, idade, sexo, raça e condições socioeconômicas também contribuem para a incidência da doença periodontal em humanos. Por outro lado, o não tratamento da placa pode causar doenças cardiovasculares, devido à elevada concentração de bactérias que podem atingir os vasos sanguíneos (ALJEHANI, 2014).

Por ser causada por biofilmes bacterianos, o tratamento da doença periodontal é difícil por natureza, visto que é complicado eliminar totalmente as bactérias da cavidade formada pelo desgaste do periodonto. (RYAN, 2005).

O tratamento da doença periodontal é realizado por duas principais técnicas: enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada (RTG). O conceito de compartimentalização dos tecidos periodontais (sua divisão em gengiva, cemento, osso alveolar e ligamento periodontal) permitiu o desenvolvimento da técnica de RTG com uso de barreiras físicas em forma de membrana (WANG; COOKE, 2005). Tsesis e colaboradores (TSESIS et al., 2011) indicaram que esta técnica associada a tratamentos endodônticos obtém sucesso superior a 90% na recuperação da doença periodontal.

2.2. *Regeneração Tecidual Guiada (RTG)*

O princípio da RTG consiste em dar preferência a certos tipos de células para repovoar a área defeituosa a fim de formar novo tecido. Isto é atingido através da utilização de uma barreira física, que isola o tecido ósseo dos tecidos adjacentes. Em estudos realizados a partir de lesões periodontais, Nyman e colaboradores (NYMAN et al., 1993) descobriram que se os tecidos gengivais, de conexão e epiteliais forem excluídos do ferimento periodontal através de uma barreira ou membrana, a regeneração óssea ocorreria com maior facilidade, em relação a tratamentos que não utilizam membranas.

A RTG pode ser utilizada em conjunto com tratamentos cirúrgicos, e em muitos casos os resultados são muito mais promissores quando se aplica a técnica. Já em 1998, Laurell (LAURELL, 1998) apontou vários estudos de caso envolvendo a utilização da RTG no tratamento da periodontite. Um estudo mais recente (CLEMENTINI et al., 2012) indica que, em casos de perda dentária, o uso de RTG aumenta o sucesso de reimplantação em cerca de 90 a 100% dos casos.

Com o avanço dos estudos em RTG, alguns critérios foram estabelecidos para confecção destes materiais. As barreiras utilizadas devem ser biocompatíveis (não devem provocar rejeição *in vivo*) e não permeáveis a células, pois elas devem

criar e manter um espaço no interior da lesão, de modo que permita crescimento de tecido ósseo em detrimento ao crescimento de tecido epitelial e conjuntivo. Além disso, devem selar totalmente o local, impedindo acúmulo de bactérias no interior da região em tratamento (LAURELL; GOTTLOW, 1998; ZHANG et al., 2013). Suas propriedades físico-químicas e mecânicas também devem ser levadas em consideração (BOTTINO et al., 2012), pois as barreiras não devem colapsar durante o tratamento.

As membranas para RTG podem ser divididas em dois grupos: não-absorvíveis e absorvíveis.

2.2.1. Membranas não-absorvíveis

Membranas de materiais não-absorvíveis permanecem no local do implante sem reações negativas pelo tecido ósseo hospedeiro. Dentre os materiais que possuem essa característica pode-se incluir o politetrafluoretileno (PTFE) (MURPHY; GUNSOLLEY, 2003) e malhas de titânio (ZHANG et al., 2013). As membranas de PTFE são consideradas padrão para uso em RTG por não serem absorvíveis e serem biocompatíveis. Diferentes tipos destas membranas são comercializados, como e-PTFE (politetrafluoroetileno expandido) e d-PTFE (politetrafluoroetileno denso) e d-PTFE reforçado com titânio (BOTTINO et al., 2012).

No entanto, estes materiais não-absorvíveis apresentam desvantagens, como memória (tendem a retornar à conformação inicial, dificultando sua adaptação aos defeitos ósseos) e alto custo financeiro, além da necessidade de realização de um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção (BOTTINO et al., 2012; MARTINS; JANJACOMO, 2001).

2.2.2. Membranas absorvíveis

As membranas absorvíveis devem propiciar a regeneração óssea à medida que são reabsorvidas, e tanto o material como seus produtos de degradação devem

ser tolerados adequadamente pelo organismo. Esta característica elimina a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica (BOTTINO et al., 2012). Estas propriedades são necessárias para a estabilidade da membrana e sua integração nos tecidos moles (RODELLA; FAVERO; LABANCA, 2011).

Estas membranas são normalmente formadas por polímeros, como por exemplo, colágeno, gelatina, ácidos polilático e poliglicólico e quitina/quitosana. As vantagens incluem facilidade de manipulação e manutenção pós-operatória, no entanto, podem apresentar desvantagens como reabsorção rápida, reações alérgicas e colapso em defeitos intra-ósseos. Tais defeitos podem ser controlados com a utilização de biocerâmicas, como certos fosfatos de cálcio. (BOTTINO et al., 2012; MARTINS; JANJACOMO, 2001).

Dentre os materiais utilizados para formação de membranas absorvíveis, o colágeno é muito importante por ser o principal constituinte das matrizes extracelulares (MEC). Sua alta afinidade celular e biocompatibilidade tornaram-o uma excelente alternativa às membranas formadas por polímeros sintéticos. Há membranas comerciais à base de pele humana (Alloderm®), tendões bovinos (Cytoplast®) e pele suína (Bio-Gide®). No entanto, por ser um material caro e não possuir fontes definidas (diferentes tipos de colágeno e diferentes fontes animais), é difícil controlar e determinar suas propriedades mecânicas e de degradação. Além disso, conforme a membrana se degrada *in vivo*, suas propriedades são bastante alteradas, diminuindo seu desempenho na aplicação em RTG (BOTTINO et al., 2012). Bunyaratavej e colaboradores (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001) apontam que o uso de técnicas de reticulação (formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas) auxilia no controle da degradação de membranas de colágeno no uso de RTG.

Membranas à base de ácido polilático, poliglicólico e policaprolatona, bem como seus copolímeros (mistura destes monômeros) também são bastante utilizadas. Estes materiais são biocompatíveis e biodegradáveis, além de apresentarem mais facilidade de manuseio quando comparados com as membranas de PTFE. No entanto, a taxa de absorção desses materiais é extremamente importante, visto que as membranas devem durar entre 4 a 6 semanas depois de implantadas para que ocorra regeneração do sistema periodontal (RODELLA;

FAVERO; LABANCA, 2011). Além disso, estudos de compatibilidade indicam que os produtos de degradação desses polímeros podem levar a inflamações (BABENSEE et al., 1998).

Em um estudo recente, Bottino e colaboradores (BOTTINO et al., 2012) compararam diversos trabalhos que utilizam membranas absorvíveis e não absorvíveis para RTG. Eles sugerem que embora os dois tipos de membranas tenham bons resultados no tratamento da doença periodontal, suas desvantagens, como a necessidade de segunda cirurgia (para membranas não absorvíveis) e mudança nas propriedades mecânicas e dificuldade de controlar a degradação das membranas absorvíveis, tornam necessários estudos que busquem melhorar tais características destes materiais. Kasaj e colaboradores (KASAJ et al., 2008) avaliaram o comportamento *in vitro* de diferentes membranas comerciais de colágeno e PTFE e constataram que as membranas absorvíveis são melhores para estimular proliferação celular.

Além disso, trabalhos envolvendo formação de membranas funcionais, com propriedades bioativas têm sido alvo de estudos (BOTTINO; THOMAS; JANOWSKI, 2011). Em outro trabalho, Bottino e colaboradores (BOTTINO et al., 2012) indicam que a formação de novo osso pode ser estimulada com adição de fosfatos de cálcio nas membranas para RTG. Outra modificação interessante envolve a incorporação de fármacos e antibióticos para evitar a proliferação de bactérias no local do implante (ZAMANI et al., 2010).

2.3. *Biomateriais*

Neste trabalho, a palavra biomaterial será utilizada para designar qualquer material que tem como objetivo tratar a doença periodontal. Desta forma, como já citado anteriormente, os biomateriais utilizados deverão ser compatíveis com o organismo. A biocompatibilidade, segundo Williams (WILLIAMS, 2008), é definida como a capacidade de um material de promover uma resposta apropriada no

paciente em determinada situação. Neste contexto, um biomaterial não pode causar efeitos citotóxicos, inflamações ou rejeições de qualquer tipo ao ser implantado.

Os biomateriais naturais podem ser classificados como *autógenos*, *alógenos* e *xenógenos*. Os materiais autógenos são provenientes do próprio indivíduo, enquanto os alógenos são retirados de outros indivíduos da mesma espécie. Já os materiais xenógenos tem sua origem em indivíduos de outras espécies.

Além disso, os biomateriais sintéticos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com suas interações com o organismo: absorvíveis, inertes e bioativos (HENCH e WILSON, 1993).

- (a) Absorvíveis: os materiais absorvíveis têm como característica serem degradados pelo organismo após certo tempo. Como exemplo, podem ser citados fosfatos de cálcio como β -fosfato tricálcico e polímeros como ácido polilático, ácido poliglicólico, quitosana e gelatina.
- (b) Inertes: os materiais inertes apresentam interação mínima com os tecidos adjacentes, como a formação de uma camada fibrosa que separa o implante dos tecidos adjacentes. Materiais à base de cerâmicas como alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2) e óxido de titânio (TiO_2) são exemplos de materiais inertes.
- (c) Bioativos: as interações deste tipo de material com o organismo são de caráter químico. Desta forma, há forte interação entre o implante e os tecidos adjacentes, promovendo união entre ambos. Os fosfatos de cálcio e biovidros são exemplos de materiais deste tipo.

2.3.1. Quitosana

A quitosana (QS) é um polímero natural obtido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo altamente abundante na natureza, encontrado em animais marinhos, como caranguejos, camarões e lagostas e também em insetos, fungos e leveduras. A quitina tem estrutura similar à da celulose, um polímero linear constituído por unidades de N-acetilglicosamina, representada na Figura 1 (A). A

desacetilação da quitina leva à formação da quitosana, onde predominam unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, (B) na Figura 1. Este processo ocorre em decorrência da hidrólise dos grupos acetamida da quitina. O processo normalmente envolve a suspensão do polímero em solução aquosa de NaOH ou KOH (com concentração entre 40% e 60% m/v) e tratamento a temperaturas elevadas (entre 50 a 130°C) por tempos variados (0,5 a 24h). As diferentes variáveis para o processo produzem quitosanas com diferentes pesos moleculares e graus de acetilação (GA). (CAMPANA FILHO, 2008).

Figura 1. Estruturas da quitina (A) e quitosana (B). Adaptado de (ANITHA et al., 2014).

O processo de desacetilação da quitina dificilmente ocorre na sua totalidade, uma vez que isto necessitaria de sucessivas desacetilações, que pode acarretar em degradação do polímero. Define-se como grau médio de acetilação (GA) a quantidade de grupos 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose (marcado como x na Figura 2) que não sofreram hidrólise e se encontram na estrutura primária da quitosana.

Embora seja considerado um material biodegradável, a QS pode apresentar baixas taxas de degradação quando aplicadas em organismos vivos. Através de

ensaios *in vitro* e *in vivo*, Yang e colaboradores. (YANG et al., 2007) constataram que dependendo do grau de desacetilação, fibras de QS apresentaram índice de biodegradabilidade baixos, tornando importante o conhecimento do grau de acetilação da quitosana para aplicação como biomaterial.

Figura 2. Classificação das estruturas de quitina e quitosana, baseada na quantidade de grupos acetilados e desacetilados. Adaptado de (KHOR; YONG, 2003).

A quitosana é solúvel em meios aquosos ácidos (com pH abaixo de 6), como ácido acético ou clorídrico, devido à protonação dos grupos amino presentes em sua estrutura. A concentração da solução aquosa para solubilização da quitosana depende da quantidade de grupos amino (NH_2) presentes, normalmente sendo solubilizada em soluções 1% v/v ou 0,1M de ácido acético (RINAUDO, 2006). Como estes grupos são ácidos fracos (com pKa em torno de 6,5~7,0), a quitosana é insolúvel em pHs neutros e alcalinos, facilitando sua aplicação em engenharia de tecidos (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007).

Por ser proveniente de fontes renováveis e ter propriedades como biodegradabilidade e biocompatibilidade, a quitosana é utilizada para diversos fins.

Campana Filho (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007) enumera usos como tratamentos de águas residuais industriais, processamento e conservação de alimentos, bem como uso nas áreas de farmácia e medicina, entre outros. Atualmente suas aplicações variam desde cosméticos, fármacos e membranas semi-permeáveis para uso medicinal e odontológico. Na área biomédica, de acordo com os resultados encontrados por Vandevord et al (VANDEVORD et al., 2001), materiais a base de quitosana promovem adesão celular, além de serem reabsorvíveis. Biomateriais à base de quitosana causam pouca ou nenhuma reação de encapsulação fibrosa (como ocorre com materiais metálicos). Di Martino e colaboradores (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005) indicam que a natureza catiônica da quitosana é responsável pelas interações com os glicosaminoglicanos (GAGs) aniônicos, componentes fundamentais das matrizes extracelulares. Esta interação é de grande importância, pois diversos fatores de crescimento celular estão relacionados com os GAGs. Além disso, no mesmo trabalho, Di Martino e colaboradores descreve que o principal responsável pela degradação *in vivo* da quitosana é a lisozima, através da hidrólise dos grupos acetilados.

Bhattarai e colaboradores (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010) apontam diversos estudos envolvendo a formação de hidrogéis de quitosana para atuarem como liberadores controlados de fármacos. Através de sua revisão da literatura, eles concluem que a quitosana é um excelente polímero para esta aplicação, pois é possível produzir materiais com diferentes propriedades como porosidade, resistência mecânica, tempo de liberação do fármaco e biodegradabilidade. Em outro trabalho, Ji (JI et al., 2011) produziu nano esferas de quitosana carregadas com gentamicina, um antibiótico amplamente utilizado. Além disso, ele incorporou ácido salicílico às nano esferas, com intuito de diminuir os efeitos colaterais provocados pelo uso do antibiótico.

Outro trabalho de revisão envolvendo aplicações da quitosana foi publicado por Anitha e colaboradores (ANITHA et al., 2014). Eles demonstram que quitina e quitosana também são utilizadas para tratamento de lesões em tendões, cartilagem e pele devido à sua forte interação com o colágeno presente nesses tecidos. Eles concluem que a versatilidade da quitina/quitosana para aplicação tanto como

scaffolds, membranas ou hidrogéis, associados à possibilidade de funcionalização de suas cadeias poliméricas permitem ampla aplicação na área de biomateriais.

Xu et al (XU et al., 2012) demonstraram que a aplicação de quitosana em membranas para RTG é interessante, pois além de ser mais barata que os demais materiais para esta aplicação, a quitosana apresenta propriedades bacteriostáticas. Entretanto, suas propriedades mecânicas podem ser melhoradas através da formação de blendas com outros polímeros ou compósitos com outros materiais, como fosfatos de cálcio. Além do aumento na resistência mecânica, Anitha e colaboradores (ANITHA et al., 2014) indicam que a formação de compósitos de quitina/quitosana com fosfatos de cálcio acelera a formação de tecidos ósseos *in vivo*, além de ser possível produzir *scaffolds* com porosidade alta.

Em um trabalho recente, Ma e colaboradores (MA et al., 2014) desenvolveram uma membrana assimétrica de quitosana para aplicação em RTG. Um dos lados do molde de preparação da membrana foi colocado em contato com nitrogênio líquido. Com isso, eles produziram uma membrana de quitosana em que um dos lados apresentava poros maiores enquanto no outro os poros eram menores. Assim, eles concluíram que a região menos densa da membrana promove crescimento e adesão de osteoblastos. Já a face mais densa previne o crescimento de tecido fibroso e ao mesmo tempo é permeável a nutrientes, sendo eficaz para a RTG.

2.3.2. Gelatina

Outro polímero natural com grande importância na área de biomateriais é a gelatina. Ela é um material bioabsorvível, proveniente da desnaturação ou degradação térmica do colágeno. O colágeno é uma proteína encontrada na matriz extracelular de tecidos conjuntivos (como pele, ligamentos, tendões e cartilagem), somando cerca de 30% da quantidade total de proteínas do organismo (Friess, 2000). Embora mais de 20 formas de colágeno tenham sido identificadas, mais de 90% do colágeno no organismo é do tipo I. Este tipo de colágeno é constituído por três cadeias de aminoácidos, formando uma tripla hélice. Sua molécula apresenta três domínios (Figura 3): N-terminal (ou amino terminal), domínio helicoidal (tripla

hélice, com cerca de 90% dos polipeptídeos da cadeia) e C-terminal (ou carboxi terminal) (Yamauchi & Shiiba, 2008). As principais fontes de colágeno deste tipo são bovinas e suínas, embora possam ser extraídos de outros animais como peixes, águas vivas, ouriços do mar e patas de aves (GORGIEVA, 2011).

Figura 3. Estrutura do colágeno tipo I. Adaptado de (GORGIEVA; KOKOL, 2011).

Por ser isolado e purificado facilmente, além de ter suas propriedades bem documentadas (como biodegradabilidade, biocompatibilidade, acitotoxicidade), o colágeno é amplamente utilizado como biomaterial (GORGIEVA; KOKOL, 2011). As aplicações variam desde válvulas cardíacas e enxertos vasculares a sistemas de liberação de fármacos, entre outros (Lee et al., 2001). No entanto, algumas desvantagens são encontradas, como baixa estabilidade perante intumescimento *in vivo*, baixa resistência mecânica e elasticidade, dificultando determinadas aplicações (GORGIEVA; KOKOL, 2011). Além disso, é possível que ocorram respostas antigênicas e imunogênicas à aplicação de colágeno (LYNN; YANNAS; BONFIELD, 2004), uma vez que muitos desses biomateriais são derivados de colágeno de origem animal. Um estudo de 1984 (Coperman e Michaeli, 1984, apud BERGER et al., 2004) indica que entre 2 a 4% da população mundial apresentam alergias ao colágeno bovino.

Por outro lado, a gelatina, que é o produto proveniente da desnaturação térmica do colágeno, não é imunogênica (LJUBLJANA; GORGIEVA, SELESTINA; KOKOL, 2011; SYDNEY; HOPKINS; WORMALL, 1933). Cientistas vêm pesquisando esta característica da gelatina há um século (LJUBLJANA; GORGIEVA, SELESTINA; KOKOL, 2011; STARIN, 1918), e estudos recentes corroboram que a

ausência de anéis aromáticos (ausência de aminoácidos como triptofano e tirosina) é responsável por não causar respostas antigênicas e imunogênicas. Além disso, os processos atuais de produção e purificação da gelatina (filtração, lavagem, esterilização a altas temperaturas – UHT) permitem diminuir ainda mais seus efeitos alergênicos (GORGIEVA; KOKOL, 2011).

Embora o colágeno seja estudado como biomaterial desde o final do século 19, trabalhos recentes indicam que a gelatina é um excelente substituto, tendo aplicações mais amplas que o colágeno, principalmente na área de engenharia de tecidos, como analisado por Gorgieva (GORGIEVA; KOKOL, 2011) em seu trabalho de revisão.

A gelatina é derivada do colágeno Tipo I. Sua formação envolve quebra das ligações que unem as três cadeias que formam a tripla hélice do colágeno. A Figura 4 ilustra dois processos distintos para a sua desnaturação. O processo ácido, utilizado para colágeno de origem suína, resulta na gelatina Tipo A, que apresenta mais grupos amino, tornando-a básica. Já o processo alcalino, utilizado para colágeno de origem bovina, gera a gelatina Tipo B, que possui grupos carboxílicos, promovendo caráter ácido a esta gelatina (IKADA, 2002).

Figura 4. Dois métodos para extração de gelatina de tecidos ricos em colágeno. Adaptado de Ikada, 2002.

A gelatina é um polímero altamente versátil, graças à sua abundância e baixo custo de produção. Ela apresenta características como formação de filmes e géis, tendo inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (BIGI; PANZAVOLTA; RUBINI, 2004). No entanto, sua alta solubilidade em água facilita sua degradação tanto *in vitro* quanto *in vivo* através de collagenases (ROSE et al., 2014). Gorgieva e colaboradores (GORGIEVA; KOKOL, 2011) sugerem que processos de reticulação e formação de blends de gelatina com outros polímeros ajudam a contornar tais desvantagens, além de aumentar a resistência mecânica dos biomateriais à base de gelatina.

Outra técnica bastante empregada para formação de *scaffolds* a partir de polímeros é a eletrofiação. Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2005) utilizaram esta técnica para formar *scaffolds* fibrosos de gelatina com poli(ϵ -caprolactona), um polímero sintético, e compararam as características biológicas e físicas deste material com fibras formadas com os polímeros individuais. Eles concluem que as

fibras formadas por gelatina e poli(ϵ -caprolactona) apresentam melhor adesão e proliferação de células de medula óssea. Além disso, os compósitos possuem maior flexibilidade que as fibras formadas somente pelos polímeros individuais.

Chong et al (CHONG et al., 2007) utilizaram as fibras obtidas pelo método de Zhang para aplicação em cicatrização de lesões da derme. Eles realizaram o processo de eletrofiação das fibras de gelatina e poli(ϵ -caprolactona) diretamente em um curativo à base de poliuretano (TegadermTM). Seus resultados indicam que houve boa proliferação das células em ambas as faces do compósito, graças à natureza biomimética de biomateriais à base de gelatina.

Em um trabalho recente, Xue e colaboradores (XUE et al., 2014) prepararam membranas de gelatina e poli(ϵ -caprolactona) com incorporação de metronidazol, um antibiótico, a fim de evitar infecções no local do implante. Seus resultados indicam que a resistência mecânica das membranas aumenta com a quantidade de gelatina da membrana, assim como a biodegradabilidade e adesão celular, evidenciando a versatilidade de se produzir biomateriais utilizando blendas.

2.3.3. *Blendas de G/QS*

As blendas poliméricas são amplamente utilizadas na busca por materiais com características ideais para diversas aplicações. A utilização de gelatina e quitosana como biomateriais é bastante encorajada, pois além de serem materiais baratos e abundantes, apresentam elevada biocompatibilidade (CHENG et al., 2003). Além disso, as outras características desses polímeros, apresentadas nas seções anteriores, tornam a utilização conjunta de gelatina e quitosana como materiais para RTG muito interessante do ponto de vista acadêmico.

A gelatina pode ser utilizada para melhorar a atividade biológica da quitosana, pois contém uma sequência de aminoácidos que age como um sinalizador que promove diferenciação, adesão e proliferação celular. Além disso, ela forma um complexo polieletrólítico com a QS (HUANG et al., 2005). Neste trabalho, Huang

produziu *scaffolds* 2D e 3D de gelatina e quitosana e estudou suas propriedades mecânicas e biológicas. Ele concluiu que a adição de gelatina melhora as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, além de facilitar a taxa de degradação na presença de lisozima. Além disso, o uso do processo de reticulação por imersão dos *scaffolds* em solução de glutaraldeído pode aumentar ainda mais a resistência mecânica da blenda.

Yang, et al.(YANG, 2010) estudaram a formação de hidrogéis de G/QS e constataram que estes materiais apresentaram melhor flexibilidade e melhor capacidade de absorção de água em comparação com os hidrogéis formados somente por gelatina. Além disso, eles averiguaram que em contato com soluções de tampão fosfato e enzimas estes hidrogéis apresentaram elevada biodegradabilidade. Nagahama et al (NAGAHAMA et al., 2009) demonstraram que as blendas de G/QS apresentam máxima resistência mecânica quando úmidas na proporção de 50:50 em massa. Whu e colaboradores (WHU et al., 2013) apontam que essa proporção também é ideal para promover crescimento de células de tecido cartilaginoso, além de corroborar os resultados de resistência mecânica e degradação de Nagahama (NAGAHAMA et al., 2009) .

A formação de *scaffolds* a base de gelatina e quitosana para regeneração de tecido ósseo foi estudada por Kavya e colaboradores (KAVYA et al., 2013). Eles incorporaram sílica nanométrica (n-SiO₂) na matriz polimérica com intuito de estimular o crescimento ósseo, facilitando a nucleação e orientação da fase mineral do osso. Seus resultados indicam que houve maior proliferação celular nos materiais com gelatina/quitosana/n-SiO₂. Em um estudo similar, Yin e colaboradores (YIN et al., 2003) utilizaram fosfatos de cálcio em *scaffolds* de gelatina/quitosana para a mesma aplicação, e embora pequenas inflamações tenham sido reportadas, o crescimento e proliferação de osteoblastos (células ósseas) foram satisfatórios.

2.3.3.1. Reticulação

Os processos de reticulação (ou entrecruzamento) são utilizados para modificar as estruturas de polímeros, a fim de conferir melhores propriedades

mecânicas, químicas ou térmicas a estes materiais. Estas modificações consistem na união de cadeias poliméricas, bem como ligações entre as cadeias de polímeros diferentes, levando à formação de redes híbridas (GONSALVES, 2011).

A reticulação pode ocorrer de diferentes formas:

- *Reticulação iônica*: este tipo de entrecruzamento ocorre através de interações físicas (eletrostáticas) entre as cadeias poliméricas, a partir de grupos altamente carregados (como por exemplo, grupos amino). Este processo é reversível, pois estas interações não são permanentes e dependem do pH do meio.
- *Reticulação covalente*: também chamada de reticulação química, este processo envolve a formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, a partir de seus grupos funcionais. Diversos agentes reticulantes podem ser empregados, dependendo do tipo de cadeia polimérica a ser reticulado.

Como exemplo de processo de reticulação iônica, pode-se citar o uso do tripolifosfato (TPP), utilizado normalmente na sua forma de sal de sódio para reticulação de polímeros como quitosana. A Figura 5 ilustra duas cadeias poliméricas reticuladas ionicamente por uma molécula de TPP.

Figura 5. Esquema de reticulação iônica da quitosana com íons tripolifosfato (GONSALVES, 2011).

Para os processos de reticulação covalente, tem-se como exemplo o agente glutaraldeído (GTA), que é um dialdeído alifático com estrutura destacada na Figura 6. Em condições ambientes, é um líquido incolor de baixa viscosidade, altamente solúvel em água e em solventes orgânicos. Por ser uma molécula altamente reativa, com dois grupos do tipo aldeído em sua cadeia, é largamente utilizado como agente para formação de ligações cruzadas em polímeros com grupos amino presentes, como na quitosana e na gelatina (JAYAKRISHNAN, 1996).

A Figura 6 representa a reação que ocorre entre os grupos aldeído ($-CHO$) do GTA com as aminas primárias (NH_2) presentes tanto na gelatina quanto na quitosana, e a ligação formada é chamada de base de *Shiff*. Este tipo de ligação confere maior resistência à absorção de água nos materiais à base de quitosana e gelatina, bem como melhorar as propriedades mecânicas dos filmes formados pelos dois polímeros (BARKOULA et al., 2008).

Figura 6. Reação entre aminas primárias e glutaraldeído. (Em vermelho, destaca-se a base de *Shiff* formada).

Na Figura 7 estão representados dois mecanismos de reação do GTA com grupos amino. A Figura 7a ilustra a formação da base de *Schiff* descrita anteriormente. Já a Figura 7b, indica outra possível reação, em que uma molécula de GTA tem um próton do carbono α removido pela presença de uma base. O ânion carbono formado pode reagir com outra molécula de GTA, conforme demonstrado na figura. Desta forma, as ligações cruzadas ocorrem entre as moléculas de GTA, e

não exclusivamente através das ligações imina formadas, resultando em grupos carbonila na estrutura final (SCHIFFMAN; SCHAUER, 2007).

Figura 7. Mecanismos de reação de GTA com Quitosana. (a) Formação de Base de Schiff; (b) Formação de adutos com aldeídos residuais. (Adaptado de (SCHIFFMAN; SCHAUER, 2007)).

Os efeitos da reticulação de polímeros como gelatina e quitosana têm sido amplamente estudados, e indicam que propriedades como estabilidade em água (BERGER et al., 2004), intumescimento (TIWARY; RANA, 2010), resistência mecânica e térmica (BIGI et al., 2001; NGUYEN, 2010), porosidade (MIRZAEI B. et al., 2013) entre outros, são facilmente manipulados através destes processos (GONSALVES et al., 2011).

Jătariu e colaboradores (JĂTARIU et al., 2011) estudaram os efeitos de reticulação de blendas de G/QS a partir do uso simultâneo de TPP e GTA para formação de hidrogéis com capacidade para liberação de fármacos, e elaboraram um esquema para ilustrar as interações que ocorrem entre as cadeias poliméricas na presença dos agentes reticulantes (Figura 8). Eles justificaram o uso da reticulação pois os hidrogéis de G/QS possuem baixa resistência mecânica, bem como são difíceis de manusear. Além disso, o uso de TPP teve como objetivo reduzir o efeito citotóxico do GTA e manter a alta capacidade de intumescimento do material em meio aquoso. As ligações iônicas (TPP) e covalentes (GTA) formadas foram identificadas através da técnica de espectroscopia no infravermelho (IV).

Figura 8. Estrutura proposta por (JĂTARIU et al., 2011) para reticulação de blendas de G/QS na presença de GTA e TPP.

Berger e colaboradores (BERGER et al., 2004), enumeram diversos trabalhos envolvendo reticulação de hidrogéis de quitosana para aplicações biomédicas. Eles sugerem que o uso de reticulação covalente, por sua característica irreversível, é preferível para formação de materiais com resistência mecânica elevada em diversas faixas de pH, às custas de possível toxicidade e baixa flexibilidade. Por outro lado, hidrogéis obtidos a partir de reticulação iônica tendem a apresentar

menor toxicidade e serem mais flexíveis. Isto os torna interessantes para aplicações como liberação de fármacos, uma vez que apresentam baixa resistência mecânica e elevadas taxas de dissolução, devido à natureza iônica das ligações cruzadas.

Rose *et al* (ROSE et al., 2014) avaliaram diversos trabalhos da literatura envolvendo o uso de processos de reticulação para formação de biomateriais à base de gelatina para aplicação em oftalmologia. Eles compararam dois processos diferentes, chamados de “comprimento não-nulo” e “comprimento nulo”. O primeiro envolve reagentes que se ligam à estrutura do polímero, promovendo a reticulação. Como exemplo, Rose cita trabalhos que utilizam glutaraldeído. Por outro lado, os processos de comprimento nulo promovem ativação dos grupos carboxílicos da gelatina, facilitando sua reação com os grupos amino da própria gelatina, nesse caso são utilizados acil azida e carboxidiimidas para este procedimento. Segundo os autores, o processo de reticulação diminui a chance de reações imunogênicas da gelatina, além de tornar os materiais mais resistentes à degradação quando comparados com materiais à base de colágeno. No entanto, eles apontam que os estudos que utilizam GTA tendem a apresentar maior citotoxicidade quando comparados a processos de “comprimento nulo”. Os trabalhos levantados por eles para aplicação em oftalmologia variam desde bioadesivos para tratamento de descolamento de retina até *scaffolds* para crescimento de células da córnea.

Liu e Ma (LIU; MA, 2009) desenvolveram *scaffolds* 3D de gelatina através de uma técnica de separação de fases, seguida por reticulação pelo procedimento de “comprimento nulo”, com EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS (N-hidroxissuccinimida). Eles obtiveram uma estrutura com poros interconectados e grande área superficial, além de apresentar boa estabilidade dimensional, ideal para crescimento celular. Eles concluíram que, como a gelatina se assemelha com boa parte das matrizes extra-celulares (MEC), seu uso como *scaffold* é interessante, podendo ser utilizado para regeneração de diversos tipos de tecidos.

Em um trabalho recente, Destaye et. al. (DESTAYE; LIN; LEE, 2013) estudaram o efeito da reticulação de fibras de poli vinil álcool utilizando o vapor de uma solução de GTA. Eles concluem que este método foi eficaz para formar fibras mais estáveis e com maior resistência mecânica. Além disso, eles detectaram

presença de GTA não reagido na superfície das fibras, que pode ser utilizado para formação de partículas de prata – e conferir caráter bacteriostático ao material.

Oliveira (PAULA; OLIVEIRA, 2013) estudou o processo de reticulação de membranas de GQS por imersão em diferentes soluções aquosas de GTA (0,5%, 1% e 2% v/v de GTA em água).

2.3.3.2. *Glicerina*

A glicerina (ou glicerol) é um poliálcool com estrutura representada na Figura 9. É um líquido viscoso e incolor, altamente solúvel em álcool e água. Por ser uma substância atóxica, possui diversas aplicações em indústrias alimentícias e farmacêuticas (ARRUDA, 2007).

Figura 9. Estrutura da glicerina.

Sua função como plastificante é bastante visada na formação de filmes poliméricos, pois reduz a fragilidade dos materiais deste tipo, além de torná-los mais maleáveis e menos quebradiços (GONTARD, 1993). Arvanitoyannis et al. (ARVANITOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998) estudaram o uso de plastificantes como a glicerina em filmes e identificaram que seu uso promove maior mobilidade entre as cadeias poliméricas, além de melhorar suas propriedades mecânicas.

Diferentes teorias tentam explicar os mecanismos de plastificação: a “teoria da lubrificação” sugere que os plastificantes reduzem o atrito entre as cadeias poliméricas. Já a “teoria do gel” postula que as estruturas tridimensionais dos polímeros são responsáveis por sua rigidez, e os plastificantes ajudam a quebrar as ligações entre as diferentes cadeias poliméricas (ligações de hidrogênio e interações de van der Waals) (DI GIOIA; GUILBERT, 1999; SUYATMA et al., 2005).

Suyatma e colaboradores (SUYATMA et al., 2005) indicam que dentre os plastificantes como polietilenoglicol, polipropilenoglicol, etilenoglicol e glicerol os dois últimos são mais viáveis, pois apresentam maior eficiência e estabilidade no processo de plastificação. Rivero e colaboradores (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009) confeccionaram filmes de gelatina e quitosana com e sem glicerina e avaliaram suas propriedades físico-químicas e morfológicas. Eles concluíram que o uso de glicerina aumenta a flexibilidade dos filmes, e também sua permeabilidade a vapor d'água.

2.3.4. Biocerâmicas

Biocerâmicas são materiais sólidos e inorgânicos, normalmente cristalinos, e muitas vezes inertes quimicamente. Tais materiais têm como características alta dureza e resistência mecânica. Além disso, possuem altos pontos de fusão e baixa condutividade térmica e elétrica. Segundo Carter e Norton (CARTER; NORTON, 2007), as biocerâmicas possuem melhor estabilidade química e biocompatibilidade quando comparadas com implantes metálicos.

As biocerâmicas podem ser classificadas conforme a Tabela 1 adaptada de Hench (HENCH, 1998):

Tabela 1. Classificação das biocerâmicas.

<i>Tipo de biocerâmica</i>	<i>Interações com os tecidos</i>	<i>Exemplos</i>
Inertes	Não há interações químicas e biológicas	Alumina, zircônia
Bioativas	Ocorre forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitro-cerâmicas
Absorvíveis	São absorvidas e formam o tecido ósseo	Gesso e fostato tricálcico

As biocerâmicas inertes não interagem com o organismo, sendo somente toleradas por ele. Normalmente ocorre a formação de uma película fibrosa entre o implante e os tecidos adjacentes (WILLIAMS, 1997). Já as biocerâmicas ativas interagem fortemente com o tecido adjacente, sem necessidade da interface fibrosa entre implante e tecido adjacente.

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados devido às suas características biocompatíveis, bioativas e por serem condutores ósseos, pois sua composição química é muito similar a da fase mineral óssea. Estudos que envolvem biocerâmicas baseadas em tais fosfatos concentram-se em compósitos utilizando principalmente β fosfato tricálcico (β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (estequiométrica ou deficiente em cálcio, CDHA) (BOHNER, 2000). A Tabela 2, adaptada de (VAZ, 2007), ilustra os diferentes tipos de fosfatos de cálcio presentes em meios biológicos.

Tabela 2. Diferentes tipos de fosfatos de cálcio e suas ocorrências no organismo (OLIVEIRA, 2010).

<i>Fosfatos de Cálcio</i>	<i>Fórmula Química</i>	<i>Razão Ca/P</i>	<i>Ocorrências</i>
Apatita	$(\text{Ca},\text{Z})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{X})_2$ (Z = Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ; Y = HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} ; X = Cl^- , F^-)	Varia com Z e Y	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Tecidos ósseos em geral
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Cálculos dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Cálculos dentário e urinário, pedras salivares.
Pirofostato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	Depósitos de pseudogotas em fluidos

A hidroxiapatita é amplamente utilizada como biomaterial, pois apresenta elevado potencial ortopédico, sendo utilizada para tratamento de defeitos ósseos tanto como implantes diretos, ou como recobrimento de outros materiais cerâmicos e até metálicos (TORRECILLAS et al., 2009). Adicionalmente, a HA possui uma grande similaridade com as apatitas biológicas com relação à sua estequiometria e cristalinidade, características que a tornam ainda mais reativas no meio biológico, sendo considerada um material osteocondutor (HENCH, 1998; TIRRELL; KOKKOLI; BIESALSKI, 2002). Uma vez implantada é rapidamente integrada na estrutura óssea e ocorre a formação de novo osso. A velocidade do processo, no entanto, dependerá em grande parte das características do material empregado (como densidade, formato, cristalinidade, área superficial, porosidade, entre outros) (LE GEROS, 1991).

No entanto, materiais à base de HA, quando aplicados diretamente no tecido defeituoso, tendem a migrar para os tecidos adjacentes, causando complicações quem podem levar à falha cirúrgica (NIKPOUR; RABIEE; JAHANSHAHI, 2012). Para contornar tais limitações, seu uso em compósitos com biopolímeros tornou-se alvo de diversos estudos (VALLET-REGÍ, 2001; WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011). Além disso, a formação de compósitos entre polímeros e HA ajuda a melhorar as propriedades mecânicas de materiais de HÁ (NIKPOUR; RABIEE; JAHANSHAHI, 2012; WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011; WANG et al., 2007).

3. Compósitos de QS/HA

Por serem materiais biocompatíveis, e por apresentarem propriedades interessantes para aplicação como biomateriais, quitosana e hidroxiapatita tornam-se candidatos interessantes para formação de compósitos. A HA proporciona bioatividade e osteocondutividade, enquanto que a QS apresenta biodegradabilidade, flexibilidade e adesão celular. Além disso, devido à natureza viscoelástica e de mucoadesividade da QS, a migração de partículas de HA é

minimizada, e a textura suave do compósito evita danos aos tecidos moles próximos ao implante (GINEBRA, 2006).

Estas características atraíram o interesse na preparação de compósitos de QS/HA para seu uso em ortopedia e engenharia de tecidos. Tais compósitos são preparados por variados métodos, gerando produtos com diferentes formas, como por exemplo, filmes (KIM et al., 2008), membranas (TENG et al., 2008), esferas (DING; TENG; PAN, 2012), nanocompósitos (NIKPOUR; RABIEE; JAHANSHAH, 2012) e *scaffolds*.

Em um recente trabalho de revisão, Pighinelli (PIGHINELLI; KUCHARSKA, 2013) sugere que compósitos de QS e HA podem ser utilizados para regeneração de tecido ósseo. Diversos tipos de compósitos com porosidade adequada para crescimento celular podem ser produzidos graças à versatilidade da QS, com capacidade para serem injetados e moldados sem necessidade de solventes tóxicos.

A aplicação em RTG também vem sendo estudada. Teng et al (TENG et al., 2008) analisaram membranas com diferentes teores de QS:HA e concluíram que a distribuição das partículas de HA na matriz polimérica é uniformemente dispersa ao se utilizar o método de precipitação *in situ*. Além disso, concluíram que a incorporação de HA na matriz polimérica de quitosana é limitada: quantidades superiores a 30% m/m de HA em QS interferem negativamente nas propriedades mecânicas dos compósitos.

Em outro estudo, Xianmiao et al (XIANMIAO et al., 2009) confeccionaram membranas de QS com nano-HA a partir da mistura do pó de HA ao polímero e concluíram que a superfície dos compósitos é porosa, favorecendo adesão e crescimento celular. Eles também demonstraram os dois tipos de interações que ocorrem entre a QS e nano-HA, reproduzidas na Figura 10. A Figura 10 (a) mostra as ligações de hidrogênio entre a QS com as hidroxilas da HA. Já a Figura 10 (b) evidencia as interações entre os átomos de Ca da HA com os grupos amino da QS. Eles também analisaram o potencial citotóxico do material, e concluíram que os compósitos de QS/HA não apresentam qualquer citotoxicidade.

Figura 10. Interações entre as cadeias de quitosana com moléculas de HA. Adaptado de (XIANMIAO et al., 2009).

Fraga e colaboradores (FRAGA et al., 2011) produziram membranas de quitosana e estudaram seu recobrimento com HA através de um processo biomimético para aplicação como biomaterial. A partir de uma solução de silicato de sódio, que age como nucleante para o crescimento de cristais de HA, eles concluem que a camada de HA formada na superfície da membrana de QS apresentou baixa cristalinidade, similar ao tecido ósseo.

Jin (JIN et al., 2008) estudou a formação de compósitos de QS-Alginato com HA através de precipitação *in situ* e concluíram que a formação da HA ocorre no interior dos poros da rede polimérica. Desta forma, quantidades limitadas de HA (cerca de 30% (m/m), como previsto por Teng (TENG et al., 2008)) podem ser formadas por este método sem que a matriz se colapse.

Solís-Moré et. al. (SOLÍS-MORE, 2008) comprovou experimentalmente as vantagens do método de precipitação *in situ* em comparação a outros métodos para obtenção de esferas de quitosana com hidroxiapatita, já que são obtidos sistemas onde os cristais de hidroxiapatita não estequiométrica (deficiente em cálcio) pouco cristalina se encontram homogeneamente dispersos dentro de uma matriz polimérica de quitosana exibindo uma boa interação entre ambas as fases, sendo muito vantajoso para obter uma maior bioatividade e osteocondução do sistema estudado para futuro emprego como substituto ósseo.

Davidenko et. al. (DAVIDENKO, 2010), em continuidade ao trabalho anterior comprovaram que o tamanho nanométrico da apatita formada *in situ* dentro da matriz polimérica e seu controle mediante o conteúdo de quitosana presente no sistema favorece a bioatividade do compósito.

4. Compósitos de G/HA

Além de compósitos formados a partir de QS/HA, a literatura apresenta trabalhos relacionados a materiais à base de G/HA. Assim como nos materiais formados por QS/HA, o uso de G/HA visa unir as principais características de cada componente. No entanto, o método de preparo também influencia na distribuição da HA na matriz de gelatina (BIGI e PANZAVOLTA, 1998).

De acordo com Teng et al. (TENG e CHEN, 2006), os compósitos de G/HA são fortes candidatos para aplicação em engenharia de tecidos, graças a sua biocompatibilidade e osteocondutividade.

Barkoula et al. (BARKOULA et al., 2008) estudaram a formação de *scaffolds* de G/HA reticulados com glutaraldeído, e constataram que a concentração ideal de solução de GTA para formação dos compósitos é de 1% v/v. Ao contrário de polímeros hidrofóbicos sintéticos, a gelatina apresenta elevada miscibilidade com a HA em meios aquosos, facilitando homogeneização na formação de compósitos (KIM; KNOWLES; KIM, 2005b).

Da mesma forma que para materiais à base de QS/HA, a utilização da HA na formação de compósitos de G/HA também ocorre mediante a adição do pó de HA ou da precipitação *in situ* na matriz da gelatina. Kim e colaboradores (KIM; KNOWLES; KIM, 2005a) produziram *scaffolds* de gelatina com adição de hidroxiapatita e obtiveram compósitos de alta porosidade e boa resposta celular. Em outro trabalho (KIM; KNOWLES; KIM, 2005b), produziram *scaffolds* de G/HA através do uso de técnicas de precipitação *in situ* da HA. Eles concluíram que o uso de *scaffolds* obtidos por este método apresentaram maior resposta celular em comparação com materiais obtidos pela adição do pó de HA. Estes resultados são corroborados por (KIM; KIM; SALIH, 2005) que estudaram as respostas celulares em *scaffolds* produzidos com precipitação *in situ* de HA em contraste com os métodos convencionais de adição do pó na formação dos compósitos.

Além da hidroxiapatita, β -TCP também é utilizado para confecção de membranas com gelatina (NORITAKE et al., 2014). Noritake e colaboradores produziram tais compósitos e seus resultados *in vivo* indicam que há formação de ponte óssea em duas semanas após implantação, e após oito semanas, o volume de novo osso formado era maior em comparação com grupos controle não tratados com o compósito.

5. Compósitos de G/QS/HA

Neste contexto, são apresentados na literatura diversos trabalhos utilizando G/QS, G/HA e QS/HA, porém há uma carência de estudos envolvendo o uso dos três materiais em conjunto. Alguns dos trabalhos reportados que contêm estes três materiais envolvem a formação de *scaffolds* (ZHAO et al., 2002; PETER et al., 2010) e filmes (LI et al., 2007, 2009; HUNTER et al; 2013).

Zhao (ZHAO et al., 2002) utilizou pó de HA para formação de *scaffolds* com G/QS e avaliou suas propriedades biomiméticas. Foi utilizado um método de separação de fases, e ele concluiu que houve bom desempenho na adesão, proliferação e expressão de osteoblastos de ratos no compósito. Em um trabalho subsequente (ZHAO et al., 2006), concluíram que a presença de HA na matriz de

G/QS teve impacto positivo na adesão celular, além de promover formação de osteoblastos. Tal efeito foi atribuído à melhor adsorção de proteínas e cálcio no compósito, além dele apresentar menor degradação e formação de sub-produtos *in vivo*.

Outro trabalho visando formação de *scaffolds* foi realizado por Peter et al. (PETER, 2010), em que foi concluído que as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais são influenciadas pela quantidade de HA e pela razão de G/QS. A presença de HA em tamanhos nanométricos teve papel fundamental na melhora dessas propriedades, fato também observado por Li et al (LI et al., 2009). Assim, a adição de HA às blendas de G/QS torna sua utilização promissora como biomaterial para aplicação em engenharia de tecidos.

Em 2013, Hunter et al (HUNTER; MA, 2013) confeccionou membranas de G/QS com adição de HA para uso em RTG. Seus resultados *in vitro* corroboram os obtidos por Zhao (ZHAO et al., 2002) em relação à adesão celular e indução de osteoblastos. Além disso, as membranas formadas apresentaram propriedades estruturais, mecânicas e biológicas desejadas para aplicação como barreiras de RTG.

Li et al. (LI et al., 2007) utilizaram o método de formação *in situ* de HA para recobrir filmes de G/QS reticulados com GTA. Para a formação de HA, eles imergiram os filmes em solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (nitrato de cálcio) por 12h, seguido de imersão em solução contendo Na_3PO_4 (fosfato de sódio tribásico) pelo mesmo período. Eles estabeleceram um mecanismo para formação da fase cerâmica em contato com a fase polimérica. A reação é dependente dos grupos carregados existentes nos filmes de GQS (grupos negativos como carboxila e carbonila e grupos amino, positivos). Assim, a nucleação da HA se inicia com a interação de íons Ca^{2+} com os grupos carboxílicos e carbonílicos, enquanto os íons PO_4^{3-} (fosfato) interagem com os grupos amino das cadeias poliméricas. À medida que a reação progride, os íons fosfato interagem com os íons Ca^{2+} , formando HA. Além disso, eles demonstraram que as quantidades de polímero influenciam no processo de nucleação da HA e constataram que as interações entre a matriz polimérica e a biocerâmica interferem no tamanho das partículas de HA formadas no filme,

indicando que é possível controlar o processo de nucleação da HA ao modificar a proporção de G/QS no material.

Em outro trabalho envolvendo a formação de HA na superfície de filmes de GQS, Li et al (LI et al., 2009) demonstram as interações existentes entre HA e as cadeias de G/QS (Figura 11) Eles diferenciam os tipos de interação em relação com o tamanho das partículas de HA formadas. Quando a HA formada tem tamanho nanométrico (n-HA), ocorrem interações iônicas com a matriz polimérica (Figura 11A). Por outro lado, na Figura 11B estão representadas ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos, carbonílicos e amino, bem como ligações de coordenação com íons cálcio, que ocorrem com HA em tamanho micrométrico (m-HA). Além disso, neste trabalho, eles concluem que os compósitos formados são biocompatíveis, tornando-se promissores para utilização como biomateriais.

Figura 11. Interações entre cristais de HA com matriz polimérica de G/QS. (a) Formação de HA nanométrica e (b) HA micrométrica. Adaptado de (LI et al., 2009).

Além dos métodos de formação de compósitos de HA com polímeros, vistos nas seções anteriores, novos métodos de preparo de HA têm sido estudados, e os que envolvem precipitação *in situ* têm se mostrado extremamente interessantes, pois a HA formada apresenta elevada similaridade com as apatitas presentes no tecido vivo. A principal vantagem desta via de preparação de compósitos consiste na obtenção de biomateriais em que os cristais de hidroxiapatita se encontrem dispersos dentro da matriz polimérica o mais homogeneamente possível para evitar inflamações. Tais inflamações são consequências intrínsecas dos materiais microscopicamente não-homogêneos (MANO, 2004, YAMAGUCHI, 2001).

Desta forma, o estudo da formação de compósitos à base de G/QS/HA torna-se interessante do ponto de vista científico, devido às excelentes características dos três materiais, que possibilitam seu uso em RTG. Ademais, a baixa quantidade de estudos realizados na literatura envolvendo G/QS/HA reforça a importância da pesquisa nesta área.

3. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver membranas de G/QS/HA pelo método de co-precipitação in situ e estudar suas propriedades físico-químicas e citotóxicas.

3.1 Objetivos Específicos

- Obter membranas de G/QS/HA utilizando diferentes proporções de gelatina/quitosana (50/50, 20/80 e 80/20 v/v);
- Avaliar o processo de reticulação por imersão em soluções de glutaraldeído e tripolifosfato de sódio, bem como por vapor de GTA;
- Verificar a viabilidade celular das membranas confeccionadas antes e após os processos de reticulação.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

- Gelatina do tipo suína, com granulometria de 40 Mesh, bloom de 270, obtida comercialmente da empresa Gelnex Indústria e Comércio;
- Quitosana extraída do caranguejo (mínimo de 85% de desacetilação), obtida comercialmente da empresa Polymar Ciência e Nutrição;
- Reagentes ácido fosfórico (H_3PO_4), hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio (KH_2PO_4), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), ácido acético glacial (CH_3COOH), glutaraldeído ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) 25% v/v em H_2O , tripolifosfato de sódio (TPP) ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) e glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) de grau analítico (PA);
- Para os ensaios de citotoxicidade, utilizou-se reagentes da Gibco e Vermelho Neutro da Sigma Aldrich.

4.2. Obtenção das membranas de gelatina/quitosana (G/QS)

As membranas de G/QS foram preparadas mediante a solubilização da gelatina em água destilada a 40°C, com quantidade de gelatina suficiente para formação de uma solução 4% (m/v). Em seguida, uma solução aquosa de QS previamente preparada e filtrada com ácido acético 1% (v/v) e 2% (m/v) de QS foi adicionada à gelatina. Por fim, foram adicionados 0,5% (v/v) de glicerina à mistura de G/QS, como plastificante.

Depois de preparadas e secas, todas as membranas passaram por uma etapa de neutralização mediante imersão em solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH em etanol por 30 minutos à temperatura ambiente.

A Figura 12 ilustra o procedimento descrito:

Figura 12. Método de preparo das membranas contendo gelatina, quitosana e glicerina.

Para a formação das membranas, foram vertidas alíquotas de 25 mL de cada solução em placas de Petri, que por sua vez foram secas em estufa de recirculação de ar a 30°C por 48h. A Tabela 3 indica as nomenclaturas das membranas contendo gelatina, quitosana e glicerina:

Tabela 3. Nomenclatura das membranas de G/QS.

G QS GQS 50/50	Gelatina Quitosana Gelatina 2% / Quitosana 1%
---	---

A membrana GQS 50/50 foi confeccionada a partir da mistura de volumes iguais das soluções de gelatina e quitosana.

4.3. Obtenção das membranas de gelatina/quitosana/hidroxiapatita (G/QS/HA)

As membranas de G/QS/HA foram confeccionadas com 0,3 M de HA com proporções diferentes de G e QS, com finalidade de verificar a influência dos teores de G e QS nas membranas formadas.

Após a solubilização da gelatina 4% (m/v) a 40°C, foram adicionados os precursores da HA ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4). O pó de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi adicionado diretamente à solução de gelatina e uma solução de H_3PO_4 foi gotejada à mistura, conforme ilustrado na Figura 13. As quantidades de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 são equivalentes para formação de uma mistura com $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de HA. Esta quantidade foi escolhida após estudos anteriores do grupo. Após a adição, a mistura foi envelhecida por 6h sob agitação constante e a 40°C. Após este período, foram adicionados 0,5% (v/v) de glicerina, como descrito anteriormente. A quitosana foi, então, adicionada conforme o método de preparo descrito na seção anterior.

Uma vez que a HA foi formada em solução de gelatina, a adição de diferentes quantidades de QS altera a concentração final de HA nas membranas, conforme descrito na Tabela 4, a seguir:

Tabela 4. Quantidades de HA presentes em cada membrana.

GHA	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$
GQSHA 50/50	$0,15 \text{ mol.L}^{-1}$
GQSHA 20/80	$0,06 \text{ mol.L}^{-1}$
GQSHA 80/20	$0,24 \text{ mol.L}^{-1}$

Figura 13. Método de preparo para membranas contendo gelatina, quitosana, glicerina e hidroxiapatita.

Após a etapa de precipitação as seguintes membranas foram preparadas e suas nomenclaturas são apresentadas na Tabela 5:

Tabela 5. Nomenclatura das membranas contendo G/QS/HA.

GHA	Gelatina / Hidroxiapatita
GQSHA 50/50	Gelatina 50% v/v / Quitosana 50% v/v / HA 0,15 mol.L ⁻¹
GQSHA 20/80	Gelatina 20% v/v / Quitosana 80% v/v / HA 0,06 mol.L ⁻¹
GQSHA 80/20	Gelatina 80% v/v / Quitosana 20%v/v / HA 0,24 mol.L ⁻¹

A etapa de neutralização das membranas foram realizadas conforme procedimento descrito na seção 4.2.

4.4. Reticulação

Após confecção, neutralização e secagem, as membranas foram submetidas a etapas de reticulação por diferentes métodos, conforme descrito na

Figura 14:

Figura 14. Métodos de reticulação utilizados e amostras resultantes.

4.4.1. Reticulação por vapor de GTA

Uma solução aquosa de glutaraldeído (GTA) com 10% (v/v) foi colocada no fundo de um dessecador, as membranas em placas de Petri foram colocadas sobre a placa porosa. Em seguida, com auxílio de uma bomba de vácuo, o ar foi retirado, permitindo a evaporação do GTA no interior do dessecador, promovendo a reação de reticulação. As membranas foram deixadas no dessecador por períodos de 1, 5 e 10 dias, a Figura 15 ilustra o procedimento.

Figura 15. Esquema para reticulação por vapor de GTA. Fonte própria.

4.4.2. Reticulação por imersão

As membranas contendo gelatina, quitosana e glicerina também foram reticuladas por imersão, seguindo metodologia adotada por Oliveira (PAULA; OLIVEIRA, 2013).

4.4.2.1. Imersão em TPP

As membranas foram imersas em soluções aquosas de TPP em diferentes concentrações 1%, 5% e 10% (m/v) por 30min e após esse período foram secas em temperatura ambiente.

4.4.2.2. Imersão em GTA

A partir dos resultados de (PAULA; OLIVEIRA, 2013), a concentração de 1% (v/v) foi escolhida para este trabalho e o procedimento foi realizado seguindo a mesma metodologia: as membranas foram imersas em solução 1% (v/v) de GTA por 30 min e em seguida secas em temperatura ambiente.

4.5. Caracterizações

As membranas secas foram caracterizadas por ensaios físico-químicos e in vitro. As caracterizações físico-químicas foram realizadas utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de energia dispersiva (EDS), análise termo gravimétrica (ATG) e ensaio de intumescimento. O ensaio in vitro foi realizado de acordo com a Norma ISO 10.993-5 para avaliação da citotoxicidade utilizando cultura de células.

4.5.1. Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica utilizada para identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares, tais como O₂, N₂ e Cl₂, todas as espécies moleculares absorvem radiação infravermelha. A energia da radiação infravermelha pode excitar transições vibracionais e rotacionais, mas não transições eletrônicas. As variações

nos níveis rotacionais podem dar origem a uma série de picos para cada estado vibracional (estiramentos lineares e angulares, por exemplo (DONALD PAVIA; LAMPMAN; KRIS, 2001).

Uma molécula pode vibrar de vários modos, de acordo com o número de átomos (e ligações) que possui. Assim, mesmo as moléculas mais simples podem dar origem a espectros de absorção extremamente complexos. A absorção no infravermelho não ocorre somente em moléculas orgânicas, mas também em complexos metálicos e moléculas inorgânicas. Desta forma, os estudos espectrofotométricos na região do infravermelho têm fornecido muitas informações úteis sobre os mais variados tipos de moléculas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

Neste trabalho foi utilizado o espectrômetro Spectrum One da Perkin Elmer, localizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/ZEA) utilizando as técnicas de Reflectância Total Atenuada (ATR) e Transmitância direta com pastilhas de KBr. Na análise por ATR para cada amostra foram realizadas 32 varreduras entre 4000 a 650 cm^{-1} e 4000 a 450 cm^{-1} para Transmitância..

4.5.2. Difração de Raios X

Esta técnica permite identificar a estrutura cristalina de uma amostra por meio de efeitos de interferência causados pelo espalhamento de radiações eletromagnéticas de pequeno comprimento de onda, os chamados raios X. A amostra, na forma de pó, é submetida a um feixe monocromático de raios X, que interage com os elétrons da rede cristalina, provocando várias difrações e também interferências construtivas e destrutivas, Figura 16.

Figura 16. Difração de raios X entre dois planos de átomos. Adaptado de (CALLISTER; RETHWISCH, 2007).

A condição para interferência construtiva demonstrada na Figura 16 ocorre quando a distância percorrida pelo feixe incidente no plano B-B' ($\overline{SQ} + \overline{QT}$) é igual a um múltiplo do comprimento de onda do feixe incidente ($n\lambda$).

Assim, podemos escrever que:

$$\begin{aligned} n\lambda &= d_{hkl} \sin\theta + d_{hkl} \sin\theta \\ &= 2d_{hkl} \sin\theta \end{aligned} \quad \text{Equação (2)}$$

A Equação (2) é definida como Lei de Bragg, e permite relacionar as distâncias dos planos cristalinos e o comprimento de onda do feixe incidente com o ângulo formado com o feixe difratado.

As amostras foram analisadas em um difratômetro Miniflex 600 da Rigaku com ângulos (2θ) de 10° a 60° e velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$ localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat/ZEB).

4.5.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)*

A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite visualizar a superfície de amostras através da incidência de um feixe de elétrons que “varre” a amostra. Os elétrons refletidos são detectados e formam uma imagem que corresponde à superfície do material analisado. Através desta análise podem ser identificados tamanho de partícula, topografia, morfologia e defeitos de superfície. Como as imagens são formadas a partir de elétrons refletidos (ou emitidos pela amostra), esta técnica possui capacidade de ampliação e resolução maiores que a microscopia ótica.

Ao MEV pode-se acoplar um detector de energia dispersiva (EDS), que possibilita uma análise qualitativa dos elementos que compõem a amostra. O ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizado em um microscópio Hitachi TM3000 com energia de 5kV e aumento de 1000x (15kV para as análises de EDS), localizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FZEA.

4.5.4. *Análise Termogravimétrica*

Em uma análise termogravimétrica (ATG), a massa de uma amostra, em atmosfera controlada, é registrada continuamente como uma função da temperatura ou tempo conforme a temperatura da amostra é aumentada (normalmente este aumento de temperatura se dá de forma linear com o tempo). A curva resultante da massa ou sua porcentagem em função do tempo é chamada de *termograma* ou *curva de decomposição térmica* (SKOOG, 2007).

Uma vez que a ATG monitora a massa de um analito em função da temperatura, os resultados são quantitativos, mas limitados às reações de decomposição e oxidação e aos processos de vaporização, sublimação e

dessorção. Dentre as principais aplicações da ATG temos a análise de composição e perfis de decomposição de sistemas com mais de um componente (PASZTOR, 1997).

Em estudos com polímeros, os termogramas fornecem informação sobre os mecanismos de decomposição para várias formulações poliméricas. Além disso, os perfis de decomposição são característicos para cada tipo de polímero e podem ser utilizados para identificação dos mesmos. Por ser uma técnica quantitativa, a ATG é também utilizada para determinação de níveis de umidade, com limites de detecção de até 0,5% da massa do material (SKOOG, 2007).

Os ensaios de termogravimetria foram realizados em um Analisador Térmico Simultâneo STA449 F3 Jupiter da Marca NETZSCH, localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat/ZEB) da FZEA. As amostras foram colocadas em uma panela de alumina (Al_2O_3) e aquecidas de 25°C a 600°C com taxa de aquecimento de 10°C/min. Um fluxo de nitrogênio (N_2) de 20mL/min foi utilizado durante a análise para manter a atmosfera inerte.

4.5.5. Ensaio de intumescimento

O ensaio de intumescimento tem por objetivo analisar o comportamento das membranas em meio aquoso, verificando o grau de intumescimento mediante sua imersão em uma solução de PBS (*Phosphate Buffer Saline*), um tampão à base de fosfato e outros sais. O grau de intumescimento é obtido de acordo com a equação 1 a partir dos valores das massas das membranas conforme elas permanecem imersas na solução de PBS.

O PBS foi preparado de acordo com protocolo da *Cold Spring Harbor Protocols*. A equação abaixo foi utilizada para calcular o grau de intumescimento, GI (LIU et al., 2005)

$$GI = 100 \left(\frac{M_u - M_s}{M_s} \right) \text{ Equação (1)}$$

Onde GI é o grau de intumescimento, M_u e M_s correspondem à massa em gramas das membranas úmidas das membranas secas, respectivamente.

As membranas foram imersas em PBS e colocadas em estufa incubadora a 37°C. As massas foram medidas antes da imersão e em períodos de tempo subsequentes. Os dados foram tratados com o software Microcal Origin 9.

4.5.6. Ensaio *in vitro* – cultura de células

Os ensaios de citotoxicidade têm como objetivo identificar o grau de toxicidade do material analisado utilizando um meio de cultura celular. Estes testes são regidos pela Norma ISO 10.993 – 5 (*Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*). Dentre os ensaios, o teste que utiliza o reagente Vermelho Neutro é um procedimento amplamente utilizado para determinar citotoxicidade, com inúmeras aplicações biomédicas e ambientais (BORENFREUND, 1984). Os ensaios de cultura *in vitro* utilizando o Vermelho Neutro foram desenvolvidos para averiguar citopatogenicidade e imunotoxicidade e também para detecção de compostos tóxicos. Este teste é baseado na habilidade que células viáveis têm de incorporar e ligar o corante Vermelho Neutro. Esta substância tem a capacidade de penetrar as membranas celulares por difusão e se alocarem nos lisossomos. O corante pode então ser extraído das células com a utilização de uma solução acidificada de etanol, e a absorbância do corante solubilizado é quantificada por espectrofotometria a 540 nm (REPETTO, 2008).

Para este ensaio, foram utilizadas células de ovário de hamster chinês linhagem CHO-k1 cedidas pela Profa. Dra. Olga Z. Higa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Centro de Biotecnologia, e a viabilidade celular foi medida por contato indireto: alíquotas de 0,05g de amostra por 1,0 mL de solução do meio de cultura foram utilizadas para formação dos extratos que entraram em contato com as células em placas de 96 poços. Cada amostra teve seus extratos diluídos quatro vezes, formando poços com concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6.25%. Além disso, foram utilizados solução 0,2% (v/v) de fenol como

controle positivo e pastilhas de alumina (Al_2O_3) como controle negativo. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Biomateriais e Biossensores (BioLab) da FZEA, e a partir dos valores de absorbância obtidos em 540nm em um Espectrofotômetro de UV, pode-se calcular a viabilidade celular de acordo com a Equação 1:

$$VC = \frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde VC é a viabilidade celular, $DO_{amostra}$ a densidade ótica da amostra e $DO_{controle}$ a densidade ótica do branco (poços contendo somente células). Assim, um gráfico é projetado em função da VC pela concentração do extrato de cada amostra.

5. Resultados e discussões

Após confeccionadas e neutralizadas, as membranas foram submetidas aos processos de reticulação, e em seguida caracterizadas físico-quimicamente.

1.1. Amostras Neutralizadas

As membranas neutralizadas por imersão em solução 0,1 M de NaOH em etanol foram caracterizadas por IV e DRX submetidas a ensaios de intumescimento

1.1.1. Espectroscopia no Infravermelho

Na Figura 17 estão representados os espectros de infravermelho para as amostras QS, G e GQS. No espectro de QS, encontram-se as bandas características desse polímero, como estiramento da ligação N-H em 3353 cm^{-1} (que se encontra na mesma região de absorções de ligações –OH) e picos de amida I e II em 1648 e 1558 cm^{-1} , respectivamente. Estes picos são característicos de ligações – $\text{CH}_3\text{-C=O}$, típicas de grupos acetil, presentes na quitosana. Além disso, picos referentes a estiramentos de ligações – CH_2 e – CH_3 foram encontrados em 2919 e 2875 cm^{-1} , respectivamente. O pico presente em 1411 cm^{-1} corresponde à deformação simétrica dos grupos – CH_3 . Por fim, os picos em 1152 , 1027 e 1076 cm^{-1} são característicos das ligações glicosídicas C-O-C, que unem as unidades de quitosana. Já o espectro da gelatina também apresenta as bandas características, como ligações –NH em 3291 cm^{-1} , –C=O em 1630 cm^{-1} , amida II em 1539 cm^{-1} e torção da ligação –C=N em 1238 cm^{-1} .

Figura 17. Espectros de IV das amostras QS, G e GQS.

O espectro da amostra GQS apresenta picos similares aos de seus componentes. No entanto, alguns picos foram deslocados para diferentes números de onda, como evidenciado na Tabela 6, nota-se que as bandas dos grupos amino e carboxil (-C=O) apresentam valores intermediários quando comparados com as amostras puras. O mesmo ocorre para os picos das ligações amida II. De acordo com Thein-Han e colaboradores (THEIN-HAN et al., 2009), estes deslocamentos dos números de onda indicam que ocorrem interações químicas entre as cadeias de quitosana e gelatina, como interações provenientes dos polieletrólitos formados e ligações de hidrogênio, sem alterar significativamente suas propriedades químicas, comprovando a formação de uma blenda entre os dois polímeros.

Tabela 6. Picos característicos das amostras QS, G e GQS.

Bandas (cm⁻¹)	Quitosana	Gelatina	GQS
3400-3200	-NH (3353)	-NH (3291)	-NH
1650-1630	-C=O (1648)	-C=O (1630)	-C=O (1637)
1558-1539	Amida II (1558)	Amida II (1539)	Amida II (1549)

Como estes espectros foram obtidos através da técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR), a varredura tem alcance de até 650cm^{-1} . De acordo com resultados da literatura (REHMAN; BONFIELD, 1997), os grupos fosfato constituintes da HA apresentam vibrações abaixo desse valor. Desta forma, a amostra GQSHA 50/50 foi queimada para obtenção do pó de HA, e seu espectro de IV foi obtido através de transmitância direta com pastilhas de KBr, que permite varreduras até 450cm^{-1} .

Na Figura 18 encontram-se os espectros de IV da amostra de HA obtida através da queima da membrana GQSHA 50/50 (HA_{Memb}) e também de duas amostras de HA obtidas em laboratório a partir da precipitação dos seus precursores (H_3PO_4 em solução aquosa contendo $\text{Ca}(\text{OH})_2$): uma não calcinada ($\text{HA}_{\text{s/calc}}$) e outra calcinada (HA_{calc}). Desta forma, é possível comparar a HA_{Memb} com a $\text{HA}_{\text{s/calc}}$ e esta última com uma amostra calcinada. Esta comparação é importante, pois como as membranas foram queimadas a 600°C é necessário evidenciar se a HA_{Memb} apresenta semelhanças com uma amostra de HA sem tratamento térmico.

Figura 18. Espectros de IV para as amostras de HA.

Além das bandas típicas do grupo $-\text{OH}$ na região de 3500cm^{-1} , está presente um pico acentuado em 3571cm^{-1} para a amostra HA_{calc} , referente ao estiramento de grupos $-\text{OH}$ livres, que não formam ligações de hidrogênio. Este pico está presente nas outras amostras, porém com menor intensidade, devido à sobreposição de

grupos -OH que formam ligações de hidrogênio. A amostra de HA_{calc} também apresenta outro pico referente à torção deste mesmo grupo em 632cm^{-1} , conforme observado por Peter e colaboradores (PETER et al., 2010). Outros picos característicos da HA foram encontrados, referentes às vibrações dos grupos fosfato (PO_4^{3-}): 474cm^{-1} , 566cm^{-1} , 602cm^{-1} , 962cm^{-1} e 1034cm^{-1} . Estes resultados são corroborados por trabalhos da literatura (PETER et al., 2010; REHMAN; BONFIELD, 1997; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007), indicando que o processo de precipitação utilizado é eficaz para produção de HA tanto isoladamente quanto in situ na produção das membranas, o que as torna interessantes do ponto de vista de regeneração óssea e RTG, uma vez que a presença de fosfatos de cálcio, como HA, auxilia formação de novo osso (BOTTINO et al., 2012).

Além disso, nota-se que as bandas dos grupos

As membranas contendo hidroxiapatita (Figura 19) exibem as bandas discutidas anteriormente referentes aos polímeros; no entanto a região de 1000cm^{-1} apresenta uma banda característica de grupos fosfato (PO_4^{3-}) conforme indicado por Rigo e Carbonari (RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007). Esta banda se mistura à banda da ligação glicosídica da quitosana (C-O-C). Além disso, a banda na região de 870cm^{-1} , é mais intensa para as amostras GQSHA 80/20 e GHA, indicando presença de íons carbonato (CO_3^{2-}). Rigo e Carbonari (RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007) atribuem esta banda a substituições iônicas na hidroxiapatita, formando HA carbonatada.

Figura 19. Espectros de IV para as amostras neutralizadas contendo HA.

1.1.2. Difração de Raios X (DRX)

A Figura 20 apresenta os difratogramas de raios X das amostras QS, G e GQS. A região em torno de $2\theta = 20^\circ$ corresponde à área amorfa dos polímeros, no entanto a presença de glicerol como plastificante pode influenciar na cristalização das cadeias poliméricas, como elucidado por Epure e colaboradores (EPURE et al., 2011). Segundo eles, a maior mobilidade entre as cadeias poliméricas devido a presença de plastificante influencia na formação de áreas cristalinas nos materiais formados.

Figura 20. Difratomogramas de raios X das amostras neutralizadas QS, G e GQS.

Na Figura 21 estão apresentados os difratogramas das amostras contendo HA em sua formulação, bem como o difratograma da HA obtida após queima da amostra GQSHA 50/50 (HA_{Memb}). Além da região referente aos polímeros em torno de $2\theta = 20^\circ$, observam-se picos característicos de fosfatos de cálcio: os picos em 26° (deslocado para $25,5^\circ$ na amostra com polímero), 32° , 34° e $39,7^\circ$ (deslocado para $39,1^\circ$ na amostra com polímero) são referentes à fase HA e em $27,9^\circ$, 31° e $32,8^\circ$ referentes à fase β -TCP. Esses resultados estão de acordo com as fichas 9-432 e 9-169 do JCPDS e dados da literatura (REHMAN; BONFIELD, 1997; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007).

A formação de HA na presença de gelatina está descrita por Chang e colaboradores (CHANG; KO; DOUGLAS, 2003). A adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em solução contendo G favorece a interação dos íons Ca^{2+} com os grupos carboxil do polímero, que, em $\text{pH} > 7$ se encontram na forma iônica, COO^- . Conforme ocorre adição de H_3PO_4 , os grupos PO_4^{3-} interagem com os íons Ca^{2+} , promovendo nucleação de cristais de hidroxiapatita. Desta forma, a formação de HA ocorre de forma homogênea na matriz polimérica, o que pode reduzir o risco de inflamações e rejeição do material quando aplicado em RTG (LEGEROS, 2001).

Figura 21. Difrátogramas de raios X das amostras neutralizadas contendo HA.

Além disso, nota-se que o teor de gelatina favorece a formação de HA: as amostras GHA e GQSHA 80/20 apresentam maior similaridade com a amostra HA_{Memb} do que as amostras GQSHA 50/50 e GQSHA 20/80. Este resultado também foi encontrado por Li e colaboradores (LI et al., 2007).

1.1.3. Intumescimento

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos a partir dos ensaios de intumescimento das amostras. Pode-se observar que a membrana de gelatina apresenta maior intumescimento quando comparada à membrana de quitosana, e o teor de gelatina influencia no intumescimento das amostras contendo os dois polímeros, isso ocorre porque a gelatina é um material capaz de absorver elevada quantidade de água. A incorporação de HA também altera o comportamento das membranas em meio aquoso: observa-se que a presença de cristais de HA na rede polimérica diminui o intumescimento, pois provavelmente há interação dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} da HA com os grupos $-COOH$ e NH_2 da GQS, reduzindo a afinidade por água dos polímeros. Além disso, como esses grupos estão ligados à HA, não há possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água em solução, conforme também observado por Nagahama e colaboradores (PETER et al., 2010).

Nota-se também que a durabilidade das amostras em meio aquoso é baixa, apresentando degradação em até 2h após imersão, com exceção da amostra de QS, que se mostrou mais resistente. De acordo com Yang (YANG et al., 2007) quitosana com grau de acetilação inferior a 15% apresenta baixa degradabilidade em meio aquoso. Além disso, o processo de neutralização bem como o pH da solução de PBS (7,4) contribuem para menor solubilidade da quitosana.

As amostras GHA e GQSHA 80/20 não estão apresentadas, pois ambas foram decompostas no período de 15min em contato com a solução de PBS. O maior teor de gelatina torna as membranas mais suscetíveis a degradação em meio aquoso.

Figura 22. Ensaios de intumescimento das amostras neutralizadas.

Embora o grau de intumescimento seja importante para aplicação de polímeros como biomateriais, por facilitar adesão celular e permitir melhor permeabilidade a fluidos corporais (PAULA; OLIVEIRA, 2013; PETER et al., 2010), a durabilidade das amostras para aplicação em RTG é de maior importância. Processos de reticulação são utilizados para melhorar tais propriedades e estender a vida útil desses materiais em meios biológicos.

1.2. Amostras Reticuladas

As membranas obtidas foram reticuladas por diferentes métodos: Imersão em GTA e TPP e por vapor de GTA. Após estas etapas, elas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho e intumescimento. As membranas com melhores resultados foram então caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, análises termogravimétricas e ensaios de viabilidade celular.

1.2.1. Vapor de GTA

As amostras reticuladas por vapor utilizando solução 10% (v/v) de GTA, se tornaram mais escuras após o processo, devido à presença de ligações imina (base de *Schiff*) resultantes da reação com GTA, indicando que houve reticulação através do método por vapor (PAULA; OLIVEIRA, 2013; WANG et al., 2016).

1.1.1. Espectroscopia no Infravermelho

Serão apresentados os resultados de infravermelho para as amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50, para fins de comparação entre membranas sem e com HA. Os espectros das demais amostras encontram-se no Anexo I, pois não apresentaram diferenças significativas entre si.

A Figura 23 apresenta os espectros de IV da amostra GQS 50/50 neutralizada e reticulada por vapor de GTA 10% (v/v) no período de 1, 5 e 10 dias. A região pontilhada está detalhada na Figura 24. Além das bandas discutidas para as amostras neutralizadas Figura 17, observa-se o aumento da intensidade das bandas em 2925cm^{-1} e 2832cm^{-1} , referentes às ligações C-H e O=C-H de aldeídos, caracterizando a presença de GTA. Além disso, estes picos ficam mais evidentes com o aumento do tempo de reticulação (DESTAYE; LIN; LEE, 2013).

Figura 23. Espectros de IV da amostra GQS 50/50 reticulada por vapor de GTA.

Na Figura 24 encontra-se uma ampliação da região entre 1800 a 800cm^{-1} dos espectros da Figura 23, onde é possível notar bandas menos intensas entre 1700 - 1750cm^{-1} referentes a ligações $\text{C}=\text{O}$ de aldeídos não reagidos nas amostras reticuladas por 5 e 10 dias. Além disso, nessas amostras estão presentes bandas mais definidas em 1630 - 1650cm^{-1} , indicando presença de ligações imina ($\text{C}=\text{N}$), características da base de *Shiff* formada em decorrência da reação com GTA com grupos amina (NH_2) da gelatina e quitosana. Esta banda encontra-se na mesma região da amida I dos polímeros, podendo ser identificado somente nas amostras reticuladas por 5 e 10 dias, sugerindo que o processo de reticulação na amostra GTA10%1d não foi completo (SCHIFFMAN; SCHAUER, 2007). A presença de ligações NH_2 terminais e amida II na região de 1560cm^{-1} corrobora com a ideia de que nem todos os grupos amino reagiram com GTA. Farris e colaboradores (FARRIS; HUANG; SONG, 2010) sugeriram um mecanismo de reação de GTA com grupos OH dos aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina da gelatina, levando a formação de acetais (caracterizadas por ligações do tipo $\text{O}-\text{C}-\text{O}$), que podem ser identificados pela intensidade dos picos encontrados em 1030cm^{-1} . Tais picos ficam evidentes na Figura 24.

Figura 24. Detalhe do espectro de IV da amostra GQS 50/50.

Nas amostras contendo HA, Figura 25, notam-se as mesmas bandas discutidas para as amostras neutralizadas Figura 17 e também a presença das bandas referentes ao processo de reticulação como visto na Figura 23. É importante salientar que as bandas características da reação com GTA estão presentes na sua totalidade a partir das amostras reticuladas por 5 dias.

Figura 25. Espectros de IV da amostra GQSHA 50/50 reticulada por vapor de GTA.

1.1.1.1. Intumescimento

Na Figura 26 encontram-se os ensaios de intumescimento das amostras GQS 50/50 neutralizadas e reticuladas. A amostra neutralizada apresenta porcentagem de intumescimento maior que as demais, como esperado e discutido na seção 1.1.3.. As amostras reticuladas tiveram aumento de massa na faixa de 30 a 40%, e a amostra reticulada por 1 dia sofreu degradação após 2h de imersão em PBS. Isso confirma os resultados encontrados pelas análises de IV, indicando que o processo de reticulação não foi completo.

Para os resultados de intumescimento para as amostras reticuladas não são apresentados os desvios padrão, pois certas amostras de cada membrana partiram ou rasgaram no decorrer do ensaio, impossibilitando o cálculo do desvio.

A partir dos ensaios de intumescimento das amostras reticuladas, fica evidente que o processo de reticulação influencia na quantidade de água que pode ser absorvida pelas amostras, visto que as amostras neutralizadas apresentam aumento de massa bem maior quando comparadas às amostras reticuladas.

As amostras reticuladas por 5 e 10 dias suportaram o meio aquoso por mais tempo, resistindo até 15 e 20 dias respectivamente, indicando maior grau de reticulação. No entanto, a amostra reticulada por 10 dias apresenta perda de massa a partir de 2 dias do ensaio.

Como o ensaio foi realizado em triplicata, algumas amostras perderam massa ou quebraram (devido à rigidez das membranas reticuladas), causando diferenças nas médias obtidas através do ensaio. Isso ocorreu com a amostra reticulada por 5 dias, explicando a oscilação dos valores de intumescimento.

Figura 26. Ensaio de intumescimento da amostra GQS 50/50 reticulada por vapor de GTA.

As amostras contendo HA (Figura 27) apresentaram porcentagem de intumescimento menor que as anteriores, na faixa de 20 a 35%, devido à presença da fase cerâmica nos compósitos, conforme explicado na seção 1.1.3.. Assim como nas amostras sem HA, o processo de reticulação torna as membranas mais duráveis em meio aquoso. Assim como na membrana GQS 50/50 (Figura 26), a amostra GQSHA 50/50 para alguns períodos de reticulação quebraram e, portanto houve oscilações nos resultados de intumescimento.

A amostra reticulada por 1 dia apresenta intumescimento similar às outras amostras, com um aumento da % de intumescimento a partir de 15 dias, embora , sua duração em meio aquoso tenha aumentado.

Figura 27. Ensaio de intumescimento da amostra GQSHA 50/50 reticulada por vapor de GTA.

O processo de reticulação por vapor mostrou-se dependente do tempo de permanência das amostras no dessecador. A amostra GQS 50/50 no vapor de GTA por 1 dia (Figura 26) apresentou durabilidade de apenas 2h em meio aquoso. A amostra GQSHA 50/50 (Figura 26), mesmo com uma porcentagem de intumescimento maior comparada com a GQS 50/50 (Figura 27), indicando que o processo de reticulação não ocorreu completamente, porém essas membranas

atingiram tempos de 15 a 35 dias em imersão, indicando maior durabilidade. Wang et al (WANG et al., 2016) utilizaram o processo de reticulação por vapor de GTA em fibras de amido, e obtiveram resultados similares: amostras reticuladas por até um dia não resistiram ao meio aquoso, ao passo que o maior tempo de reticulação (acima de um dia) melhora esta propriedade .

As amostras reticuladas por 10 dias também mostraram influência do tempo de reticulação, em decorrência do maior tempo de contato com vapor de água presente na solução 10% de GTA. Com isso, intumescem ao mesmo tempo em que o processo de reticulação ocorre. De modo similar, Destaye e colaboradores (DESTAYE; LIN; LEE, 2013) utilizaram vapor de GTA para reticular fibras de álcool polivinílico (PVA) por 6, 12, 24 e 48h e embora o tempo de reticulação tenha influenciado positivamente no processo, as fibras apresentaram sinais de intumescimento ao passo que o processo ocorria.

Apesar das diferenças encontradas para o intumescimento das amostras reticuladas por vapor de GTA, os tempos em que as amostras apresentam degradação não são satisfatórios o suficiente para aplicação em RTG, que requerem membranas com durabilidade superior a 4 semanas (RODELLA; FAVERO; LABANCA, 2011).

Dessa forma, as amostras reticuladas por 5 dias foram selecionadas para continuidade da pesquisa, por apresentarem um meio termo nas suas características entre os tempos estudados.

1.1.2. Reticulação por imersão em TPP

1.1.2.1. Espectroscopia no Infravermelho

Nas Figura 28 e Figura 29 estão representados os espectros de IV das amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50, respectivamente, reticuladas nas soluções 1%, 5% e 10% (m/v) de TPP em água. Para a amostra GQS 50/50 (Figura 28), observa-se que além das bandas características dos materiais poliméricos já discutidos anteriormente, são encontradas bandas dos grupos fosfato: em 895cm^{-1} surgem bandas dos estiramentos das ligações P-OH e intensificação do sinal em

1155cm^{-1} devido às ligações $\text{P}=\text{O}$, embora mascarado pelas ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ do grupo sacarídeo da quitosana. Além disso, as bandas em 1545cm^{-1} e 1635cm^{-1} também tiveram sua intensidade aumentada, devido às interações entre os grupos $-\text{O}-\text{P}=\text{O}$ com os grupos $-\text{NH}_3^+$ dos polímeros. Tais resultados são corroborados por Bhumkar (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006), Odimegwu (ODIMEGWU, 2011) e Ma (MA et al., 2014). Bhumkar e Pokharkar (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006) estudaram a reticulação de amostras de QS com TPP e através de análises de Espectroscopia no Infravermelho, notaram mudanças na intensidade desses picos, atribuindo interações dos grupos fosfato do TPP com os íons amônio presentes na QS.

Figura 28. Espectros de IV da amostra GQS 50/50 reticulada por TPP.

Na Figura 29 encontram-se os espectros de IV da amostra GQSHA 50/50 reticulada pelas diferentes soluções de TPP. Da mesma forma que para as membranas GQS 50/50 (Figura 28), há surgimento de bandas na região de 870cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação $\text{P}-\text{OH}$, deslocada provavelmente pela presença de HA no material. As bandas em 705cm^{-1} , 765cm^{-1} e 1210cm^{-1} para as amostras reticuladas com TPP5% e TPP10% indicam presença de TPP não reagido.

Através dos picos na região de 1535cm^{-1} e 1645cm^{-1} pode-se concluir que a partir da amostra reticulada por TPP 5%, não há interações entre os grupos fosfato e $-\text{NH}_3^+$, possivelmente atribuído às interações destes grupos com a HA presente. Este fato associado à presença e bandas de TPP não reagido sugerem que o processo de reticulação para concentrações maiores de TPP não ocorreu em sua totalidade, quando comparados com a solução TPP 1%, que apresenta os picos em 1535cm^{-1} e 1645cm^{-1} , da interação entre grupos fosfato com $-\text{NH}_3^+$ dos polímeros.

Figura 29. Espectros de IV da amostra GQSHA 50/50 reticulada por TPP.

1.1.2.2. Intumescimento

Nas Figura 30 e Figura 31 são apresentados os resultados do ensaio de intumescimento das amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50 respectivamente, reticuladas nas soluções 1%, 5% e 10% de TPP em água. Nota-se que o aumento da concentração da solução de TPP leva a menores valores de intumescimento, indicando que o processo de reticulação é influenciado pela concentração da solução. No entanto, a durabilidade das amostras frente ao meio aquoso não varia conforme o esperado. Como a interação do TPP com as cadeias poliméricas é iônica, o processo de reticulação não impede a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e grupos OH e NH_3 das amostras, o que leva ao maior

intumescimento quando comparado com processos de reticulação iônica. O mesmo é observado para a amostra GQSHA 50/50 (Figura 31).

Figura 30. Ensaios de Intumescimento da amostra GQS 50/50 reticulada por TPP.

Figura 31. Ensaios de Intumescimento da amostra GQSHA 50/50 reticulada por TPP.

Embora as amostras reticuladas pela solução de TPP 1% apresentem maior intumescimento, sua durabilidade em água é similar às demais amostras. Isso associado à presença de TPP não reagido nas outras amostras (conforme confirmado por IV) sugere que a concentração de 1% é ideal para comparações com as demais amostras reticuladas.

1.1.3. Reticulação por imersão em GTA 1%

As amostras reticuladas por imersão em GTA apresentaram características semelhantes ao método de vapor. Sua coloração tornou-se amarelada, com elevada rigidez, dificultando manuseio.

1.1.3.1. Espectroscopia no Infravermelho

Nas Figura 32 e Figura 33 são apresentados os espectros de IV das amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50 respectivamente, neutralizadas e reticuladas por imersão em solução de GTA 1% em água. Os resultados de IV são similares aos obtidos para as amostras reticuladas por vapor, como o aumento das bandas em 2934cm^{-1} e 2878cm^{-1} , referentes às ligações C-H e O=C-H de aldeídos, indicando a presença de GTA e a definição dos picos em $1630\text{-}1650\text{cm}^{-1}$, referentes às ligações imina (C=N). Além disso, também estão presentes bandas de NH_2 terminais e amida II na região de 1560cm^{-1} indicando que nem todos os grupos amino reagiram com o GTA.

Figura 32. Espectros de IV da amostra GQS 50/50 reticulada por GTA 1%.

Figura 33. Espectros de IV da amostra GQSHA 50/50 reticulada por GTA1%.

1.1.3.2. Intumescimento

Através dos ensaios de intumescimento das amostras reticuladas por GTA 1% (Figura 34 e Figura 35) nota-se que o processo não obteve o mesmo

desempenho das amostras reticuladas por vapor, provavelmente devido à baixa concentração da solução de GTA e pouco tempo de imersão das membranas, levando a um processo de reticulação incompleto.

Ambas as amostras se tornaram frágeis, quebradiças e se degradaram após pouco tempo de imersão em solução aquosa. O processo de reticulação pode ter sido influenciado pelo método de imersão, pois a solução de GTA possui pH ácido (em torno de 3 a 4), o que torna a QS solúvel (MIGNEAULT et al., 2004). Isso se reflete no maior intumescimento das amostras reticuladas quando comparadas com as amostras neutralizadas.

Figura 34. Ensaio de Intumescimento da amostra GQS 50/50 reticulada com GTA 1%.

Figura 35. Ensaio de Intumescimento da amostra GQSHA 50/50 reticulada com GTA 1%.

Mesmo com resultados insatisfatórios de intumescimento, estas amostras foram submetidas a ensaios de viabilidade celular para comparação com os outros processos.

1.2. Comparação entre os processos de reticulação

A partir das amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50 neutralizadas e reticuladas por vapor de GTA 10% por 5 dias, imersão em TPP 1% ou por imersão em GTA 1%, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), termogravimetria (TG) e ensaios de viabilidade celular.

1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (MEV - EDS)

As micrografias das amostras GQS 50/50 e GQSHA 50/50 neutralizadas e reticuladas nas condições descritas anteriormente são apresentadas na Figura 36.

Pode-se observar uma diferença na morfologia da amostra GQS em relação às demais, provavelmente devido à ausência da fase HA. Além disso, não são observados aglomerados de HA na superfície das membranas contendo HA: possivelmente ocorre boa dispersão da fase cerâmica na matriz polimérica, conforme desejado a partir da técnica de precipitação *in situ*.

As análises de EDS (Tabela 7) indicam presença de átomos de cálcio e fósforo em todas as amostras com HA, com razão média de Ca:P de 1,66, com exceção da amostra reticulada com TPP, que apresenta razão de 0,82 devido à presença de íons fosfatos provenientes do agente reticulante.

Tabela 7. Teores de C, O, P e Ca obtidos pela análise de EDS.

	Carbono	Oxigênio	Fósforo	Cálcio
1. GQS	61,25	37,22		
2. GQSHA	38,48	39,05	8,41	13,37
3. GQSHA GTA1%	45,15	35,16	7,28	11,82
4. GQSHA TPP1%	59,91	31,91	3,99	3,30
5. GQSHA GTA10%	32,59	36,01	10,74	19,16

Figura 36. Imagens de MEV das amostras (1) GQS, (2), GQSHA, (3) GQSHA GTA 1%, (4) GQSHA TPP 1% e (5) GQSHA GTA 10%.

1.2.2. Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram inicialmente realizadas para identificar a temperatura de decomposição da fase polimérica para obtenção do pó de HA

presente nas amostras, para sua utilização em análises de IV e DRX (Figura 18 e Figura 21).

A Figura 37 indica os perfis de degradação das amostras. Na Figura 38 são encontradas as derivadas primeiras das curvas obtidas, e seus picos indicam os pontos de inflexão das curvas da Figura 37, apontando as temperaturas em que há maior perda de massa nas amostras.

Há perda de massa em torno de 100°C devido à presença de água nas amostras (BIGI et al., 2001; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). Nota-se através da Figura 38 que a amostra GQS apresentou maior perda água em comparação com as amostras contendo HA, o que corrobora os ensaios de intumescimento, que indicaram menor capacidade de absorção de água para as amostras contendo a fase cerâmica.

Além disso, identifica-se fase cerâmica nas amostras, visto que a amostra GQS resulta em apenas 30% da massa original após decomposição térmica em cerca de 320°C, enquanto que as amostras com HA apresentam massas residuais maiores, provenientes dos grupos cálcio e fósforo, que não se decompõem nessa temperatura. A amostra reticulada por TPP 1% tem maior massa residual após a decomposição, devido à incorporação de íons fosfato provenientes do TPP, conforme indicado pela técnica de Espectroscopia no Infravermelho (Figura 29).

Figura 37. Perfis de degradação térmica das amostras.

A partir da Figura 38 nota-se que houve maior perda de água para a amostra de GQS, confirmando os resultados de intumescimento, em que as amostras com HA apresentam menor capacidade de absorção de água. Além disso, essa amostra apresenta um pico em torno de 250°C, correspondente ao início da decomposição da gelatina, conforme corroborado por Gautam e colaboradores (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013). A presença HA e a realização dos processos de reticulação aumentam a temperatura de decomposição das membranas de 300°C para cerca de 350°C conforme encontrado por Bigi e Martínez (BIGI et al., 2001; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010).

Figura 38. Derivada primeira (DTG) dos termogramas obtidos.

1.2.3. Ensaios de viabilidade celular

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular in vitro são apresentados na Figura 39. A linha tracejada corresponde à IC_{50} , ou seja, a concentração do extrato em que ocorre morte de 50% das células.

As amostras GQS e GQSHA TPP1% apresentam viabilidade celular (acompanhando o controle negativo, Al_2O_3) superior a 60% para os extratos

concentrados, enquanto que as amostras GQSHA e GQSHA GTA1% apresentaram citotoxicidade em concentrações de extrato a partir de 50 e 25% respectivamente. Por fim, a amostra GQSHA GTA10% mostrou-se menos citotóxica em comparação ao processo de reticulação por imersão com GTA, mas ainda assim apresentou resultados de viabilidade celular abaixo do esperado, com viabilidade celular abaixo de 50% para concentração de 100% de extrato.

Figura 39. Ensaio de viabilidade celular.

6. Conclusões

O método de precipitação in situ proposto foi eficaz para preparação de membranas de gelatina/quitosana e hidroxiapatita.

Pelas técnicas de IV e DRX verificou-se a interação entre os polímeros G e QS, bem como a presença da fase HA.

A fase cerâmica encontra-se dispersa na matriz polimérica, como observado pelas imagens de MEV.

As amostras neutralizadas apresentaram maior intumescimento e menor durabilidade em meio aquoso quando comparadas com as amostras reticuladas.

As amostras tornaram-se mais rígidas após os processos de reticulação, que foram identificados nos espectros de IV pela presença de bandas características das ligações formadas.

A reticulação por vapor de glutaraldeído diminui a capacidade de absorção de água das membranas e as torna mais rígidas, entretanto o ensaio de citotoxicidade mostrou baixa viabilidade celular. Já as membranas reticuladas por imersão em GTA 1% não apresentaram boas características físicas, além de se mostrarem altamente citotóxicas. Desta forma, o uso de GTA como agente para reticulação não é ideal para aplicação em RTG.

As amostras reticuladas por TPP 1%, apresentaram propriedades físicas não satisfatórias em meio aquoso, porém foram as membranas com o melhor resultado de viabilidade celular.

Desta forma, a técnica de precipitação in situ foi alcançada, mas os processos de reticulação precisam ser melhor estudados a fim de encontrar as condições ideais para utilização em RTG.

7. Referências Bibliográficas

ALBANDAR, J. M. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, p. 517–532, 2005.

ALJEHANI, Y. A. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. **International journal of dentistry**, v. 2014, p. 182513, 2014.

ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014.

ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 4, p. 371–382, 1998.

BABENSEE, J. et al. Host response to tissue engineered devices, **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 33, p. 111–139, 1998.

BARKOULA, N. M. et al. Glutaraldehyde Crosslinked Gelatin/hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold, Engineered via Compound Techniques. **Polymers and Polymer Composites**, v. 16, n. 2, p. 101–113, 2008.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E50, 2006.

BIGI, A. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763–768, 2001.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675–5680, 2004.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, n. SUPPL. 4, 2000.

BOTTINO, M. C. et al. Recent advances in the development of GTR / GBR membranes for periodontal regeneration — A materials perspective. **Dental Materials**, v. 28, n. 7, p. 703–721, 2012.

BOTTINO, M. C.; THOMAS, V.; JANOWSKI, G. M. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 216–224, 2011.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **The Journal of periodontology**, v. 72, n. 2, p. 215–229, 2001.

CALLISTER, W.; RETHWISCH, D. **Materials science and engineering: an introduction**. [s.l: s.n.]. v. 94

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Processos Químicos**, v. 1, n. 2, p. 9–20, 2007.

CHANG, M. C.; KO, C. C.; DOUGLAS, W. H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2853–2862, 2003.

CHENG, M. et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2871–2880, 2003.

CHONG, E. J. et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 3 SPEC. ISS., p. 321–330, 2007.

CLEMENTINI, M. et al. Success rate of dental implants inserted in horizontal and vertical guided bone regenerated areas: A systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 7, p. 847–852, 2012.

DENTINO, A. R.; KASSAB, M. M.; RENNER, E. J. Prevention of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 3 SPEC. ISS., p. 573–594, 2005.

DESTAYE, A. G.; LIN, C. K.; LEE, C. K. Glutaraldehyde vapor cross-linked nanofibrous PVA mat with in situ formed silver nanoparticles. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 11, p. 4745–4752, 2013.

DI GIOIA, L.; GUILBERT, S. Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1254–1261, 1999.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983–5990, 2005.

DING, C. C.; TENG, S. H.; PAN, H. In-situ generation of chitosan/hydroxyapatite composite microspheres for biomedical application. **Materials Letters**, v. 79, p. 72–74, 2012.

DONALD PAVIA; LAMPMAN, G. M.; KRIS, G. S. **Introduction to spectroscopy Donald L pavia.pdf**. 3rd. ed. [s.l.] Thomson Learning, 2001.

EPURE, V. et al. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 947–952, 2011.

FERNANDES, N. A. et al. Prevalence of periodontal disease in dogs and

owners' level of awareness - a prospective clinical trial. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 446–451, 2012.

FRAGA, A. F. et al. Synthesis of chitosan/hydroxyapatite membranes coated with hydroxycarbonate apatite for guided tissue regeneration purposes. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p. 3888–3892, 2011.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1228–1235, 2013.

GONSALVES, A. D. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Collagen-vs. Gelatin-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. **Biomaterials Applications for Nanomedicine**, p. 17–51, 2011.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705–1728, 1998.

HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7616–7627, 2005.

HUNTER, K. T.; MA, T. In vitro evaluation of hydroxyapatite-chitosan-gelatin composite membrane in guided tissue regeneration. **J Biomed Mater Res Part A**, v. 101, p. 1–10, 2013.

JĂTARIU, A. N. et al. Covalent and ionic co-cross-linking-An original way to prepare chitosan-gelatin hydrogels for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 98 A, n. 3, p. 342–350, 2011.

JI, J. et al. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 803–808, 2011.

JIN, H. et al. In-situ formation of the hydroxyapatite / chitosan-alginate composite scaffolds. v. 62, p. 1630–1633, 2008.

KASAJ, A. et al. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head & face medicine**, v. 4, n. 1, p. 22, 2008.

KAVYA, K. C. et al. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 255–263, 2013.

KHOR, E.; YONG, L. Implantable applications of chitin and chitosan. v. 24, p. 2339–2349, 2003.

KIM, H. W. H. E.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. W. H. E. Hydroxyapatite and

gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 72, n. 2, p. 136–145, 2005a.

KIM, H. W.; KIM, H. E.; SALIH, V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5221–5230, 2005.

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

KIM, S.-H. et al. Preparation of High Flexible Composite Film of Hydroxyapatite and Chitosan. **Polymer Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 111–118, 2008.

LAURELL, L.; GOTTLOW, J. Guided tissue regeneration update. n. 1 998, p. 386–398, 1998.

LI, J. et al. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 781–790, 2007.

LI, J. et al. Surface characterization and biocompatibility of micro- and nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin network films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 4, p. 1207–1215, 2009.

LIU, X.; MA, P. X. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4094–4103, 2009.

LIU, Y. L. et al. Crosslinked organic-inorganic hybrid chitosan membranes for pervaporation dehydration of isopropanol-water mixtures with a long-term stability. **Journal of Membrane Science**, v. 251, n. 1-2, p. 233–238, 2005.

LJUBLJANA, D.; GORGIEVA, SELESTINA; KOKOL, V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives. p. 1–36, 2011.

LYNN, A. K.; YANNAS, I. V.; BONFIELD, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71B, n. 2, p. 343–354, 2004.

MA, S. et al. Guided bone regeneration with tripolyphosphate cross-linked asymmetric chitosan membrane. **Journal of dentistry**, v. 42, n. 12, p. 1603–12, 2014.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305–315, 2010.

MARTINS, E.; JANJACOMO, L. Regeneração tecidual guiada, uma solução atual para o tratamento de lesões de furca grau II. **Revista da FOL**, p. 17–25, 2001.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MIRZAEI B., E. et al. Studies on Glutaraldehyde Crosslinked Chitosan Hydrogel Properties for Drug Delivery Systems. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 62, n. 11, p. 605–611, 2013.

MURPHY, K. G.; GUNSOLLEY, J. C. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. **Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology**, v. 8, n. 1, p. 266–302, 2003.

NAGAHAMA, H. et al. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 255–260, 2009.

NGUYEN, T.-H. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 03, n. 12, p. 1117–1124, 2010.

NIKPOUR, M. R.; RABIEE, S. M.; JAHANSHAH, M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications. **Composites Part B: Engineering**, v. 43, n. 4, p. 1881–1886, 2012.

NORITAKE, K. et al. Use of a gelatin hydrogel membrane containing β -tricalcium phosphate for guided bone regeneration enhances rapid bone formation. **Dental Materials Journal**, v. 33, n. 5, p. 674–680, 2014.

ODIMEGWU, D. C. Ionically Cross-Linked Chitosan/Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine, an Antiprotozoal. **Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 77–88, 2011.

PAULA, A. N. A.; OLIVEIRA, R. D. E. **Desenvolvimento de Membranas de Gelatina/Quitosana e o Estudo do Processo de Reticulação**. [s.l: s.n.].

PETER, M. et al. Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 687–694, 2010.

PIGHINELLI, L.; KUCHARSKA, M. Chitosan-hydroxyapatite composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 256–262, 2013.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 1997.

RIGO, E. C. DA S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental**

Press Periodontia Implantologia, v. 1, n. 3, p. 39–50, 2007.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 531–539, 2009.

RODELLA, L. F.; FAVERO, G.; LABANCA, M. Biomaterials in maxillofacial surgery: Membranes and grafts. **International Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 2, p. 81–88, 2011.

ROSE, J. B. et al. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 3106–3135, 2014.

RYAN, M. E. Nonsurgical Approaches for the Treatment of Periodontal Diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 611–636, 2005.

SCHIFFMAN, J. D.; SCHAUER, C. L. Cross-linking chitosan nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 2, p. 594–601, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Química electroanalítica Principios de Análisis Instrumental**, 2001.

STARIN, W. A. The Antigenic Properties of Gelatin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 139–158, 1918.

SUYATMA, N. E. et al. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films. **Differences**, p. 3950–3957, 2005.

SYDNEY, B. Y.; HOPKINS, J.; WORMALL, D. A. XCVII . PHENYL ISOCYANATE PROTEIN COMPOUNDS AND THEIR IMMUNOLOGICAL PROPERTIES . 1933.

TENG, S. et al. Chitosan / nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. 2008.

THEIN-HAN, W. W. et al. 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 Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3453–3466, 2009.

TIRRELL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M. The role of surface science in bioengineered materials. **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, p. 61–83, 2002.

TIWARY, A.; RANA, V. Cross-linked chitosan films: effect of cross-linking density on swelling parameters. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 4, p. 443–448, 2010.

TORRECILLAS, R. et al. Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p. 1–7, 2009.

TSESIS, I. et al. Effect of guided tissue regeneration on the outcome of surgical endodontic treatment: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1039–1045, 2011.

VALLET-REGÍ, M. Ceramics for medical applications. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 2, p. 97–108, 2001.

VAZ, G. J. DE O. **Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética**. [s.l: s.n.].

WAGONER JOHNSON, A. J.; HERSCHLER, B. A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 16–30, 2011.

WANG, H. et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 22, p. 3338–3348, 2007.

WANG, H.-L.; COOKE, J. Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. **Dental clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 637–59, vii, 2005.

WANG, W. et al. Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 356–361, 2016.

WHU, S. W. et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 33, n. 5, p. 2855–63, 2013.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

XIANMIAO, C. et al. Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 1, p. 29–35, 2009.

XU, C. et al. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100 B, n. 5, p. 1435–1443, 2012.

XUE, J. et al. Fabrication of drug-loaded anti-infective guided tissue regeneration membrane with adjustable biodegradation property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 846–854, 2014.

YANG, Y. M. et al. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. p. 2117–2121, 2007.

YIN, Y. et al. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering.

Journal of biomedical materials research. Part A, v. 67, n. 3, p. 844–855, 2003.

ZAMANI, M. et al. Controlled release of metronidazole benzoate from poly ϵ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 179–185, 2010.

ZHANG, Y. et al. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 72, n. 1, p. 156–165, 2005.

ZHANG, Y. et al. Membranes for guided tissue and bone regeneration. **Annals of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2013.

ZHAO, F. et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3227–3234, 2002.

ZHAO, F. et al. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1859–1867, 2006.

Anexo I

Figura 40. Espectro de Infravermelho da amostra GQS reticulada por vapor de GTA.

Figura 41. Espectro de Infravermelho da amostra G reticulada por vapor de GTA.

Figura 42. Espectro de Infravermelho da amostra GHA reticulada por vapor de GTA.

Figura 43. Espectro de Infravermelho da amostra GQSHA 20/80 reticulada por vapor de GTA.

Figura 44. Espectro de Infravermelho da amostra GQSHA 80/20 reticulada por vapor de GTA.