Carla Danielle Silva Santos

Mineralização biomimética de hidrogéis quitosana/gelatina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria de Lourdes, por sempre me apoiar nos estudos, pelo amor, carinho, dedicação e amparo.

Ao meu noivo, amigo e eterno namorado, Lucas, pelo companheirismo e incentivo desde o início deste trabalho, que mesmo nos momentos difíceis está sempre ao meu lado.

Às minhas irmãs, Eloísa e Aline, pelo apoio e conselhos.

A todos os meus amigos que compartilharam desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela oportunidade, incentivo e aprendizado.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, por guiar-me neste trabalho, cooperação, pela amizade, apoio e dedicação.

Ao pessoal do CAQI pelas análises realizadas.

Aos amigos do Grupo de Bioquímica e Biomateriais pelos momentos de descontração, à Cíndia, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação do IQSC.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram na elaboração deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

Albert Einstein

RESUMO

SANTOS, Carla Danielle Silva. **Mineralização biomimética de hidrogéis quitosana/gelatina**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Um dos maiores desafios da ortopedia é recuperar o tecido ósseo que tenha sido perdido por motivo de doença ou acidente. Na busca de substitutos para os enxertos, tem-se utilizado comumente biomateriais, para recuperação desse tecido. A quitosana é um polímero biocompatível, biodegradável e juntamente com a gelatina, que é produto da desnaturação do colágeno, possuem uso potencial na área de regeneração de tecidos ósseos. O objetivo deste trabalho é a preparação, caracterização de hidrogéis de quitosana:gelatina mineralizados, em diferentes proporções (1:0,5; 1:1 e 1:2) e estudar a liberação controlada de gentamicina utilizando como suporte o hidrogel mineralizado. A quitosana foi obtida a partir da desacetilação parcial da quitina oriunda de gládios de lula e a gelatina utilizada é a comercial Sigma[®]. Os hidrogéis foram mineralizados pelo método de imersão alternada em soluções de CaCl_2 0,2 mol L⁻¹ pH=7,4 e de Na_2HPO_4 0,12 mol L⁻¹ pH=9,0. A mineralização foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dispersão de raios-X (EDS), difração de raios-X (DRX) e cinética de absorção em PBS. Nas análises de TG e MEV pode-se observar a ocorrência de mineralização homogênea no hidrogel, aproximadamente 60% (m/m) em todas as proporções. Nos espectros de FTIR, EDS e DRX, observou-se que o sal de fosfato de cálcio formado durante o processo de mineralização alternada corresponde à hidroxiapatita. Quanto ao estudo de absorção em PBS, os hidrogéis mineralizados apresentam menor intumescimento que os não-mineralizados. Estudou-se o comportamento da liberação *in vitro* (em PBS, pH 7,4) de gentamicina no hidrogel mineralizado de quitosana/gelatina (1:1) quando se altera a temperatura da liberação (25°C e 37°C). A gentamicina foi incorporada ao hidrogel mineralizado através da imersão em uma solução com concentração de 30 mg ml⁻¹ de gentamicina. O estudo de liberação foi realizado em duas temperaturas 25°C e 37°C. A quantidade de fármaco liberado após 24 horas não é afetada pela alteração na temperatura, mas a velocidade da liberação nas duas primeiras horas é maior a 37°C do que a 25°C. O mecanismo de liberação da gentamicina foi ajustado para o modelo Korsmeyer-Peppas sugerindo que segue a difusão Fickiana.

Palavras-chave: quitosana, gelatina, mineralização, gentamicina, liberação controlada

ABSTRACT

SANTOS, Carla Danielle Silva. **Biomimetic mineralization of chitosan/gelatin hydrogels.** 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The replacement of bone tissue lost due to illness or accident is a great challenge in orthopedic area. Biomaterials have been commonly used to prepare new materials for substitution of lost tissue. Chitosan is a biocompatible and biodegradable polymer and its association with gelatin has potential application in bone tissue regeneration. The objective of this study is to describe the preparation and characterization of mineralized hydrogels of chitosan/gelatin prepared with different ratios (1:0.5, 1:1 and 1:2) and the controlled release of gentamicin using the mineralized hydrogel as a support. Chitosan was obtained from the partial deacetylation of squid pens and gelatin was commercial (Sigma ®). The mineralization process was carried out by the alternate soaking method. Hydrogels were soaked in 0.2 mol L⁻¹ CaCl₂ buffered with 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer (pH 7.4) at 25°C for 30 min, taken out of the Ca²⁺ solution, rinsed with deionized water and then soaked in 0.12 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ solution buffered with 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer (pH 9.0) for 30 min, taken out of the PO₄³⁻ solution and rinsed with deionized water. The alternate soaking cycle was repeated 6 times to obtain the mineralized matrices which were then rinsed with water, frozen and lyophilized. Mineralized hydrogels were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TG), scanning electron microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD) and kinetic absorption in PBS. SEM results showed an homogeneous mineralization, and for all hydrogels a quantity of approximately 60% (w/w) of mineralization was determined by TG. FTIR, EDS and XRD indicated that phosphate calcium deposited during mineralization process was hydroxyapatite. Mineralized hydrogels had lower swelling values in comparison with non-mineralized, as observed by absorption in PBS. Release of gentamicin in mineralized hydrogel was performed at 25°C and 37°C. Gentamicin was incorporated in the mineralized hydrogel by immersion in a gentamicin solution with a concentration of 30 mg ml⁻¹. The change in release temperature showed that the quantity of drug delivery was not affected after 24 hours. However, the release rate in the first hour is higher at 37°C. The release mechanism of gentamicin was adjusted to the Korsmeyer-Peppas model suggesting that drug release is mostly controlled by a diffusion process.

Keywords: chitosan, gelatin, mineralization, gentamicin, drug delivery

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composição do osso em diferentes escalas de tamanho.	20
Figura 2 – Estruturas químicas da (A) quitina e (B) quitosana.	22
Figura 3 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.	26
Figura 4 – Processo de obtenção da gelatina a partir do colágeno.....	27
Figura 5 – Esquema da interação entre as cadeias da quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.....	29
Figura 6 – Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo quitosana; carga negativa do outro polieletrólito: carga positiva da quitosana, +, interação iônica, ; quitosana, — ; polieletrólito adicional, —	30
Figura 7 – Arranjo atômico da hidroxiapatita.	32
Figura 8 – Perfis de diferentes formas de administração de fármacos.....	35
Figura 9 – Esquema da obtenção da quitosana.	37
Figura 10 - Processo de preparo dos hidrogéis para mineralização.	43
Figura 11 – Esquema de mineralização por imersão alternada.	43
Figura 12 - Reação do DNFB com a gentamicina.	48
Figura 13 – Fotografia digital dos gládios de lula (A) inteiro e (B) triturado.....	50
Figura 14 – Fotografia digital da quitosana obtida após o processo de desacetilação da β -quitina.	51
Figura 15 – Curva da titulação condutimétrica para quitosana.....	53
Figura 16 – Curva da viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana.....	54
Figura 17 – Fotografia digital de C_1G_1 , (a) superfície e (b) corte transversal.	55
Figura 18 – Fotografia digital de C_1G_1 mineralizado, (a) superfície e (b) corte transversal.....	56
Figura 19 – Espectro FTIR da quitosana.....	57
Figura 20 – Espectro FTIR da gelatina.....	58
Figura 21 – Espectro FTIR de C_1G_1 não mineralizado.	59
Figura 22 – Espectros FTIR dos hidrogéis mineralizados (A) C_1G_1 , (B) C_2G_1 , (C) C_1G_2 , (D) $C_1G_1/12$ e (E) $C_1G_1/05$	
Figura 23 – Curva termogravimétrica da quitosana (atmosfera de ar sintético, $10^\circ\text{C min}^{-1}$, vazão 90 mL min^{-1}).....	61

Figura 24 – Curva termogravimetrica da gelatina (atmosfera de ar sintético, 10°C min ⁻¹ , vazão 90 mL min ⁻¹).....	62
Figura 25 – Curva termogravimetrica de C ₁ G ₁ não mineralizado hidratado (atmosfera de ar sintético, 10°C min ⁻¹ , vazão 90 mL min ⁻¹).....	63
Figura 26 – Curvas termogravimétricas de (-----) C ₁ G ₁ , (-----), C ₂ G ₁ e (-----) C ₁ G ₂ não mineralizados (atmosfera de ar sintético, 10°C min ⁻¹ , vazão 90 mL min ⁻¹).	64
Figura 27 – A: Curvas termogravimétricas e B: dW/dT de (-----) C ₁ G ₁ , (-----), C ₂ G ₁ , (-----) C ₁ G ₂ , (-----) C ₁ G ₁ /12 e (-----) C ₁ G ₁ /05 mineralizados (atmosfera de ar sintético, 10°C min ⁻¹ , vazão 90 mL min ⁻¹).....	66
Figura 28 – Fotomicrografias dos hidrogéis não mineralizados e liofilizados: C ₁ G ₁ - (A) superfície (100x) e (B) corte transversal (100x), C ₂ G ₁ - (C) superfície (100x) e (D) corte transversal (200x), C ₁ G ₂ - (E) superfície (100x) e (F) corte transversal (200x).	69
Figura 29 – Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₁ G ₁ , (B) C ₂ G ₁ , (C) C ₁ G ₂ , (D) C ₁ G ₁ /12, (E) C ₁ G ₁ /05 (aumento 200x).....	70
Figura 30 – Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₁ G ₁ , (B) C ₂ G ₁ , (C) C ₁ G ₂ , (D) C ₁ G ₁ /12, (E) C ₁ G ₁ /05 (aumento 5000x).....	71
Figura 31 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₁ G ₁ , (B) C ₂ G ₁ , (C) C ₁ G ₂ , (D) C ₁ G ₁ /12, (E) C ₁ G ₁ /05 (aumento 100x).	72
Figura 32 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₁ G ₁ , (B) C ₂ G ₁ , (C) C ₁ G ₂ , (D) C ₁ G ₁ /12, (E) C ₁ G ₁ /05 (aumento 500x).	73
Figura 33 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₂ G ₁ , (B) C ₁ G ₁ /12 e (C) C ₁ G ₁ /05 (aumento 25000x).....	74
Figura 34 – Espectro de EDS obtido na superfície do hidrogel C ₁ G ₁ mineralizado.....	
Figura 35 – Espectros de EDS obtidos na superfície dos hidrogéis mineralizados: (A) C ₂ G ₁ , (B) C ₁ G ₂ , (C) C ₁ G ₁ /12 e (D) C ₁ G ₁ /05.....	
Figura 36 – Difratoograma de raios-X de hidroxiapatita não cristalina (MARTINS et al, 1998).	78
Figura 37 – Difratoogramas de raio-X dos hidrogéis (A) C ₁ G ₁ , (B) C ₂ G ₁ , (C) C ₁ G ₂	79
Figura 38 – Curva de absorção em PBS de (-----) C ₁ G ₁ , (-----), C ₂ G ₁ e (-----) C ₁ G ₂ , não mineralizados.	82
Figura 40 – Curva de calibração da gentamicina (■) pontos experimentais; (-----) melhor reta ajustada.....	84

Figura 41 – Liberação de gentamicina em C1G1 em diferentes temperaturas: 25°C (●) e 37°C (▲).....	84
Figura 42 – Relação de Korsmeyer-Peppas para as diferentes temperaturas: 25°C (●) e 37°C (▲).....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de quitina e carbonato de cálcio em diferentes espécies.	23
Tabela 2 – Principais áreas de aplicações da quitosana.	25
Tabela 3 – Volumes das soluções de gentamicina e PBS adicionados para preparo da curva de calibração.	49
Tabela 4 – Valores de massa e absorbância utilizados para análise por UV.	52
Tabela 5 – Valores dos tempos médios de escoamento e da viscosidade reduzida das diferentes concentrações de quitosana.	54
Tabela 6 – Principais frequências das bandas dos hidrogéis mineralizados.	59
Tabela 7 – Valores de temperatura e perda de massa para os hidrogéis não mineralizados.	64
Tabela 8 – Valores de temperatura e perda de massa para os hidrogéis mineralizados.	65
Tabela 9 – Valores do tamanho médio dos poros dos hidrogéis.	67
Tabela 10 – Valores do tamanho médio dos aglomerados esféricos.	68
Tabela 11 – Razão Ca/P dos sais depositados nos hidrogéis mineralizados.	75
Tabela 12 – Relação dos principais tipos de fosfatos de cálcio.	77
Tabela 13 – Principais valores de d para os hidrogéis mineralizados.	77
Tabela 14 – Estimativas dos tamanhos dos cristais de HA nos hidrogéis mineralizados.	80
Tabela 15 – Valores das porcentagens de PBS absorvidos (α) pelos hidrogéis após 1 hora.	81
Tabela 16 – Valores de n e índice de correlação linear (r).	86

LISTA DE ABREVIATURAS

DRX – Difração de raios-X.

EDS – Espectroscopia de dispersão de raios-X.

FT-IR – Espectroscopia na região do infravermelho.

GA – Grau de acetilação.

HA – Hidroxiapatita.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

PBS – Tampão fosfato-salino, pH 7,4.

RMN – Ressonância magnética nuclear.

TG – Termogravimetria.

UV – Espectroscopia na região do ultravioleta.

C₁G₁ – hidrogel quitosana/gelatina 1:1; 30 min de imersão nas soluções de mineralização (6 ciclos).

C₂G₁ – hidrogel quitosana/gelatina 2:1; 30 min de imersão nas soluções de mineralização (6 ciclos).

C₁G₂ – hidrogel quitosana/gelatina 1:2; 30 min de imersão nas soluções de mineralização (6 ciclos).

C₁G₁/12 – hidrogel quitosana/gelatina 1:1; 12 h de imersão nas soluções de mineralização (6 ciclos).

C₁G₁/05 – hidrogel quitosana/gelatina 1:1; 30 min de imersão nas soluções de mineralização (6 ciclos); metade das concentrações das soluções utilizadas para mineralização.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	2
AGRADECIMENTOS	3
EPÍGRAFE	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
SUMÁRIO.....	12
1 MOTIVAÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	14
3 CONTRIBUIÇÃO E ORIGINALIDADE DO TRABALHO	16
3.1 Contribuições do trabalho	16
3.2 Originalidade do trabalho	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1 Biomateriais	17
4.2 Tecido ósseo e a engenharia de tecido ósseo	19
4.3 Quitina e quitosana	22
4.4 Gelatina.....	25
4.5 Processo de mineralização de hidrogéis e a hidroxiapatita	30
4.6 Sistemas de liberação controlada	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Obtenção da β -quitina e da quitosana	37
5.2 Caracterização da Quitosana.....	39
5.2.1 Determinação do grau de acetilação	39
5.2.2 Determinação da massa molar (MATHEW et al., 2006)	41
5.3 Gelatina.....	42
5.4 Preparo dos hidrogéis	42
5.5 Mineralização dos hidrogéis.....	43
5.6 Caracterização dos materiais.....	44
5.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho	44
5.6.2 Análise termogravimétrica – TG.....	45

5.7.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV	45
5.7.4 Espectroscopia de dispersão de raio-X – EDS	46
5.7.5 Difração de raios-X – DRX.....	46
5.7.6 Estudos de absorção em PBS	47
5.8 Incorporação e liberação de gentamicina	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.1 Obtenção da quitosana	50
6.2 Caracterização da quitosana	51
6.2.1 Determinação do grau de desacetilação.....	51
6.2.2 Determinação da massa molar	53
6.3 Caracterização dos materiais.....	55
6.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)	56
6.3.2 Análise termogravimétrica – TG.....	61
6.6.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV	67
6.6.4 Espectroscopia de dispersão de raio-X – EDS	75
6.6.5 Difração de raios-X – DRX.....	77
6.6.6 Estudos de absorção em PBS	80
6.7 Liberação de gentamicina	83
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 MOTIVAÇÃO

A engenharia de tecido ósseo tem o objetivo de criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem ou melhorem danos relacionados às funções desempenhadas pelo tecido ósseo (KIM, et al., 2005; NAGAHAMA et al., 2009a).

Os tratamentos convencionais (autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos) utilizados na reconstrução do tecido ósseo apresentam algumas desvantagens, como a incidência de inflamações e limitações quanto à quantidade, assim busca-se uma maneira de superar essas desvantagens, com a produção de substitutos ósseos que apresentem tolerância imunológica, o que possibilita a implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (KIM et al., 2005).

A aplicação de biomateriais na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não causam reações adversas aos tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, são biodegradáveis e permitem e estimulam a formação óssea (WANG et al., 2006; STAYTON et al., 2005). Estes materiais devem manter a força mecânica adequada e degradar a uma taxa controlada para proporcionar espaço para a formação de novo osso.

Neste trabalho foi estudada a mineralização de hidrogéis de quitosana/gelatina e a possibilidade desses hidrogéis serem utilizados para a liberação controlada de gentamicina, pois, tanto a quitosana quanto a gelatina são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que possuem potencial para aplicação na área de regeneração óssea (MATHEW, 2010).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrogéis de quitosana/gelatina mineralizados, visando obter matrizes que possam ser aplicadas como suporte para liberação de fármaco. Para isso é necessário o desenvolvimento de um material que apresente mineralização homogênea, tanto interna quanto externamente e que o fosfato de cálcio depositado sobre o hidrogel mineralizado seja, preferencialmente, a hidroxiapatita, forma na qual o cálcio e o fósforo estão presentes nos ossos.

3 CONTRIBUIÇÃO E ORIGINALIDADE DO TRABALHO

3.1 Contribuições do trabalho

Contribuir na pesquisa relacionada à biopolímeros, neste caso, quitosana e gelatina e obter informações através do estudo das propriedades e características da mineralização de hidrogéis para reconstrução óssea.

Estudar as propriedades a respeito de diversas propriedades deste material (térmicas, estruturais, capacidade de mineralização, absorção em PBS e capacidade para ser utilizado como um sistema de liberação de fármaco).

Mostrar como as alterações nas proporções utilizadas de quitosana e gelatina influenciam no resultado da mineralização. Mostrar também as variações que ocorrem quanto se altera o tempo de imersão nas soluções utilizadas para o processo de mineralização.

3.2 Originalidade do trabalho

Existe vasta pesquisa sobre quitosana na literatura, porém foram encontrados poucos registros de pesquisas relacionadas a quitosana/gelatina para a finalidade de reconstrução óssea e os poucos trabalhos encontrados trabalham com quitosana derivada de α -quitina, sendo que, neste trabalho utilizou-se a quitosana derivada de β -quitina.

Este trabalho busca o desenvolvimento de materiais para recuperação ou melhora de um tecido ósseo que foi perdido. Os materiais utilizados para este fim têm sua capacidade limitada pela grande incidência de infecções locais na área receptora, dificuldade na adaptação e fixação do enxerto ao leito receptor e índices imprevisíveis de reabsorção do enxerto.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Biomateriais

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (PARK e LAKES, 2007).

Para saber qual material pode ser utilizado como biomaterial deve-se observar uma série de requisitos, como (TABATA, 2009):

- O fato de serem bioinertes para não provocarem reações de corpo estranho com o organismo;
- A biocompatibilidade, onde se analisa o efeito do ambiente orgânico no material e o efeito do material no organismo;
- A biodegradabilidade, que é um fenômeno onde o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo ao longo do tempo do local onde foi implantado e a velocidade de degradação do material;
- Se os materiais são capazes de estimular respostas celulares específicas no nível molecular (HENCH et al., 2002).

Essas características dão origem a interação do biomaterial com o organismo onde será implantado, desde que:

- O tempo de degradação permita a ocorrência do processo de regeneração ou cura do local comprometido;
- Apresente propriedades mecânicas adequadas à aplicação para que foi indicado e que qualquer variação das propriedades mecânicas decorrente da sua degradação *in vivo* seja compatível com o processo de regeneração ou restabelecimento do local de implantação;
- A degradação não gere produtos tóxicos e que sejam facilmente metabolizados e liberados do corpo (CAO et al., 2009).

A natureza química de um biomaterial é uma característica que o classifica em duas grandes categorias:

- Naturais: celulose, colágeno, quitosana, xantana, amido, dentre outros polissacarídeos;

- Sintéticos: cerâmicas, polímeros sintéticos, metais e ligas metálicas.

Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, já os polímeros naturais são degradados enzimaticamente. Ambos, polímeros naturais e sintéticos, tem sido utilizados pela engenharia de tecidos para o desenvolvimento de moldes (*scaffolds*) tridimensionais (TABATA, 2009).

O desenvolvimento desses biomateriais está baseado nos mecanismos controladores da função que se pretende substituir e na relação estrutural do material com a propriedade desejada. As pesquisas e utilização desses materiais na área médica têm conseguido grandes avanços nos últimos anos, graças a um melhor entendimento dos mecanismos de interação do material com os tecidos do corpo. O maior objetivo dos profissionais é produzir materiais que sejam compatíveis, duráveis e funcionais quando em interação com sistemas biológicos. A grande vantagem da utilização de biomateriais está relacionada com seu fornecimento ilimitado, porém eles não substituem por completo a função de um órgão ou tecido perdido (PARK et al., 2003).

O uso dos biomateriais tem implicado em uma melhora na qualidade de milhões de vidas e aumenta a cada ano, já que tem a finalidade de melhorar ou substituir de forma completa ou parcial as funções biológicas (PARK e LAKES, 2007). Além disso, como nenhum biomaterial abrange todas as aplicações e novas delas surgem com os avanços da medicina, o campo continua a ser rico na área da pesquisa e desenvolvimento (KUHN, 2012).

A seguir estão listadas algumas aplicações dos biomateriais (MACIEL, 2010):

- Pele: como pontos de suturas em cirurgias;
- Cartilagens artificiais para substituir tecidos danificados;
- Ossos: próteses para substituições e/ou regeneração óssea;
- Coração: marcapasso e válvulas cardíacas artificiais;
- Seios: silicone para fins estéticos;
- Boca: implante dentário;
- Rosto: preenchimento facial;
- Olhos: lentes de contato;
- Crânio: placas e parafusos para cirurgias.

Os biomateriais utilizados na regeneração óssea, independentemente de serem permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, necessitam ser

biocompatíveis e idealmente osteoindutivos, osteocondutivos, porosos e compatíveis com o osso nativo (EL-GHANNAM, 2005).

4.2 Tecido ósseo e a engenharia de tecido ósseo

O osso é um tecido de sustentação que apresenta como principais características rigidez e dureza. Algumas das funções desempenhadas por ele são: apoio mecânico, possibilita a locomoção, protege e age como reservatório metabólico de sais minerais (TUZLAKOGLU et al., 2007; ROSCHGER, 2008).

O tecido ósseo é constituído por fibras de colágeno reforçadas por partículas minerais. Cerca de 70% da massa do tecido ósseo está sob a forma de hidroxiapatita (HA) depositada sobre as fibras colagênicas (Figura 1). Os 30% referentes à parte orgânica são quase que exclusivamente compostos por uma única proteína, o colágeno tipo I, que participa de forma importante no processo de mineralização óssea (HABRAKEN et al., 2007).

Quando ocorrem lesões no tecido ósseo desencadeia-se uma reação vascular provocada pela ruptura de vasos. Fluídos, proteínas e componentes celulares sanguíneos são lançados na área onde ocorreu o trauma e, como consequência, inicia-se um processo vascular com o objetivo de sinalizar a liberação de oxigênio e nutrientes para a área lesada, processo conhecido como angiogênese, que é fundamental para o reparo tecidual ósseo. Entretanto, nem sempre esse processo ocorre em totalidade, nos deparamos com condições nas quais a perda tecidual é excessiva e a capacidade de regeneração óssea, limitada (SAADEH, 2001; MIGUEL, 2003). Quando essa dificuldade acontece, esses defeitos são chamados de críticos. Segundo Schimitz e Hollinger (1986), defeitos ósseos são definidos como críticos quanto apresentam características morfológicas de extensão e largura que impedem a regeneração óssea espontânea.

Assim, o principal objetivo da engenharia de tecido ósseo é desenvolver materiais biodegradáveis que possam ser usados como enxerto para preenchimento de defeitos ósseos. Estes materiais devem degradar a uma taxa controlada para proporcionar espaço para a formação de novo osso (MATHEW et al., 2010).

Figura 1 – Composição do osso em diferentes escalas de tamanho.

Adaptado de MEYERS et al., 2008.

O uso de biomateriais para substituição de perda óssea tem sido explorado há décadas (CHOW, 2009). No começo, a fim de restituir perdas ósseas eram utilizados os autoenxertos, que eram considerados ideais, pois representavam material do próprio indivíduo. Entretanto, observou-se algumas desvantagens nesse

tipo de enxerto, como alta incidência de inflamações no local onde era retirado o enxerto e limitação no tamanho do material que podia ser retirado para utilização, que na maioria das vezes é insuficiente (OLIVEIRA et al., 2009). Observando as dificuldades do autoenxerto, surgiram os aloenxertos, que designa-se como materiais de outro indivíduo da mesma espécie e os xenoenxertos, que são materiais obtidos de outra espécie, porém estes tipos de enxertos também apresentaram limitações, como risco de rejeição ou transmissão de doenças (PRECHEUR, 2007).

Com isso, surgiu a necessidade de outros tipos de enxertos, dando origem aos enxertos aloplásticos, que correspondem aos enxertos da classe dos biomateriais (OLIVEIRA et al., 2009). Atualmente, existem diversos biomateriais para essa finalidade e eles variam não somente em relação à sua origem e composição química, mas também quanto à sua ação mecânica e configuração espacial como blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e hidrogéis (GIANNOUDIS et al., 2005; ABUKAWA et al., 2006).

Os estudos a respeito desses materiais para uso em engenharia de tecidos são considerados promissores para reparar ou regenerar tecidos danificados com o uso de matrizes capazes de restaurar as funções durante a regeneração e integração com o tecido ósseo existente. Uma atenção significativa tem sido dada para o estudo de matrizes tridimensionais de polímeros para regeneração de tecido ósseo (SHEN et al., 2008; VACANTI et al., 1999). Uma matriz ideal deve imitar o ambiente extracelular natural do tecido a ser regenerado (MATHEW et al., 2010).

A vantagem desta classe de enxertos é o de promover uma invasão capilar, manutenção da atividade celular e de fenótipo adequado, induzir diferenciação das células progenitoras em osteoblastos (ABUKAWA et al., 2006). Assim, direcionam a adesão, migração e proliferação celular, além de controlar a sua taxa de degradação, ao alterar suas características físicas e químicas (FURTH et al., 2007).

Porém, mesmo existindo grande variedade de polímeros utilizados na área de biomateriais, poucos são usados na área de engenharia de tecido ósseo por não satisfazerem as características acima. Dentre os mais estudados, de origem natural, tem-se a quitosana (AZEVEDO et al., 2013; DINIZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2009.), o colágeno (DENG et al., 2010; AHN et al., 2013) e a gelatina (LIU e WANG, 2013; BERTUSO et al., 2012).

4.3 Quitina e quitosana

A quitina e a quitosana são consideradas polímeros atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, que são produzidos a partir de fontes naturais renováveis. Tanto a estrutura da quitina quanto a estrutura da quitosana são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, porém os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades. Na estrutura da quitina predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, enquanto a quitosana é predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (AZEVEDO et al, 2007).

A Figura 2 representa as estruturas químicas da quitina e quitosana.

Figura 2 – Estruturas químicas da (A) quitina e (B) quitosana.

Fonte: Adaptado de AZEVEDO et al., 2007.

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação parcial quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceo e que representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (SPIN NETO et al, 2008) . A quitosana pode ser produzida a partir de várias fontes com características diferentes, como mostra a Tabela 1. Comparando a cutícula de caranguejo com o gládio de lula, ambos apresentam alto teor de quitina em sua composição (20-40%), porém o gládio de lula apresenta quantidade de carbonato de cálcio desprezível e é classificado como β -quitina (KURITA, 2006).

Há relatos que a quitina pode ocorrer em três formas cristalinas, sendo que as principais são a α e β quitina. Na estrutura α -cristalográfica, os segmentos de cadeia são antiparalelos dentro da folha do polímero, enquanto os segmentos da cadeia de β -quitina são paralelos e não existe ligação de hidrogênio entre dois segmentos sucessivos de cadeia. Por isso, a β -quitina possui melhor reatividade e solubilidade em um maior número de solventes que a α -quitina. Apesar das fontes de β -quitina ser menos abundantes do que as fontes de α -quitina, a facilidade do processo de isolamento a partir dos gládios de lulas e a afinidade por alguns solventes, tornam a β -quitina interessante para pesquisas (LAMARQUE et al, 2005).

Tabela 1 - Teores de quitina e carbonato de cálcio em diferentes espécies.

Fonte	Quitina (%)	CaCO ₃ (%)
Caranguejo (cutícula)	15-30	40-50
Camarão (cutícula)	30-40	20-30
Krill (cutícula)	20-30	20-25
Lula (gládios)	20-40	Insignificante
Moluscos (concha)	3-6	85-90
Insetos (cutícula)	5-25	Insignificante
Fungos (parede celular)	10-25	Insignificante

Fonte: Adaptado de KURITA, 2006.

A hidrólise dos grupos acetamida da quitina pode ser alcançada em meio ácido ou alcalino, mas o meio ácido não é empregado devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. E, mesmo quando realizada em meio alcalino,

a desacetilação da quitina raramente é completa, pois a quitosana é obtida quando a extensão da reação atinge cerca de 50% ou mais (DENKBAS et al, 2002).

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopirranose, pode-se obter quitosana com diferentes propriedades, assim, variam-se suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (KUBOTA et al., 2000). O GA pode ser determinado por vários métodos, como a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia no ultravioleta, dicroísmo circular, espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , cromatografia de permeação em gel, titulação condutimétrica, análise elementar e cromatografia gasosa (SHIGEMASA et al, 1996).

É difícil obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (SINGLA et al., 2000). As propriedades da quitosana não dependem apenas do seu grau de desacetilação, mas, também da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além do seu peso molecular (THARANATHAN et al., 2007).

A quitosana é insolúvel em soluções neutras e alcalinas, mas é solúvel em ácidos diluídos como ácido acético, clorídrico, nítrico e perclórico onde os grupos amino são protonados (AZEVEDO et al., 2013).

Este polímero é estudado como biomaterial e possui uma variedade de campos para aplicações (Tabela 2), tais como matrizes de liberação de fármacos, fios cirúrgicos e materiais de cicatrização de feridas, devido às suas propriedades hemostáticas e também pode ser utilizada ajudando a regeneração de tecidos e regeneração óssea (SIONKOWSKA et al., 2004), uma vez que é um polímero não tóxico, que estimula a proliferação celular, reduz o tempo de cicatrização e possui atividade antimicrobiana (JAYAKUMAR et al., 2011).

Tabela 2 - Principais áreas de aplicações da quitosana.

Área	Usos
Agricultura	Mecanismos defensivos Adubo para plantas
Tratamento de água	Floculante para clarificação Remoção de íons metálicos Polímero ecológico Redução de odores
Indústria alimentícia	Fibras dietéticas Redutor de colesterol Conservante para molhos Fungicida e bactericida Recobrimento de frutas
Indústria de cosméticos	Esfoliante para a pele Tratamento de acne Hidratante capilar Creme dental
Biofarmacêutica	Imunológico Antitumoral Hemostático Anticoagulante
Biomédica	Suturas cirúrgicas Implantes dentários Reconstituição óssea Lentes de contato Liberação controlada de fármacos Encapsulamento de materiais

Adaptado de AZEVEDO et al., 2007.

4.4 Gelatina

O colágeno representa aproximadamente 30 % de toda proteína do corpo de vertebrados e é classificado como a principal proteína estrutural. Atualmente são conhecidos 29 tipos de colágeno que apresentam estruturas e composições

diferentes (SÖDERHALL et al.; 2007). O mais comumente encontrado e conhecido química e estruturalmente é o colágeno do tipo I, o qual é formado por duas cadeias idênticas chamadas $\alpha 1$, possuindo cerca de 1.055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente $\alpha 2$, possuindo cerca de 1.029 resíduos. O colágeno tipo I é predominante em animais de ordem superior, especialmente na pele, tendões e ossos (PATINO et al., 2002).

O arranjo dos aminoácidos nas cadeias α consiste de tripletes em que o terceiro resíduo é a glicina. A forma mais comum, correspondente a um terço das estruturas é o tipo $-(\text{Gly-X-Y})_n-$, com X sendo prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp). No restante das cadeias, X e Y correspondem a outros aminoácidos essenciais para a organização do colágeno em fibras. Estas cadeias enrolam-se umas nas outras (Figura 3) formando uma hélice tripla, através da formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam esta estrutura (FRIESS, 1998).

Figura 3 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.

Fonte: SIONKOWSKA, 2006.

O aumento da temperatura resulta em alterações na estrutura do colágeno, acarretando mudanças nas suas propriedades físicas. Isso porque, a partir de uma determinada temperatura ocorre a destruição da estrutura tridimensional da hélice tripla do tropocolágeno, provocando a sua desnaturação e produzindo uma estrutura desorganizada conhecida como gelatina (Figura 4).

O colágeno é conhecido por possuir capacidade de atuar como um antígeno, estimulando a formação de anticorpos, em contraste, a gelatina tem antigenicidade relativamente baixa quando comparado com o seu precursor, no entanto, ainda retém algumas características do colágeno, como por exemplo, a capacidade de promover a adesão celular, diferenciação e proliferação (LIEN et al., 2009).

Figura 4 – Processo de obtenção da gelatina a partir do colágeno.

Fonte: Adaptado de NITTA GELATIN INC., 2010.

A gelatina é utilizada na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica e de biomateriais, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos, o que justifica o interesse em seu uso. Além disso, possui propriedades

multifuncionais, como a habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (ROMAN et al., 2009). É uma proteína biocompatível e biodegradável e apresenta um nível de absorção pelo organismo muito elevado (HUANG et al., 2012).

Hidrogéis que contêm gelatina em sua composição são promissores para o tratamento de feridas e para gerar matrizes de aplicações na engenharia de tecido e regeneração óssea, já que suportou a fixação e crescimento de uma grande variedade de células humanas, incluindo fibroblastos, células endoteliais, células gliais, osteoblastos e células epiteliais (VLIERBERGHE et al., 2011).

4.5 Complexo Polieletrólítico quitosana:gelatina

Os complexos poliméricos são obtidos pela reação entre dois ou mais polímeros e suas propriedades macromoleculares dependem dos polímeros utilizados e das condições de preparação. As ligações entre os diferentes polímeros são produzidas por interações intermoleculares como: forças de Coulomb (iônicas); ligação de hidrogênio; transferência de carga e forças de Wan der Waals. Essas ligações produzem diferentes tipos de complexos, respectivamente, complexos polieletrólíticos; complexos por ligação de hidrogênio; complexos por transferência de carga e estereocomplexos. Os complexos polieletrólíticos são macromoléculas formadas pela interação de um polímero catiônico com um polímero aniônico, como o que acontece no presente estudo, quitosana:gelatina. A formação desses complexos ocorre sem a necessidade de catalisadores ou moléculas inibidores e ocorrem em soluções aquosas (BERGER et al., 2004).

A quitosana é um polímero catiônico que interage com outros polímeros que possuem cargas negativas (poliânions), como por exemplo, a carboximetilcelulose, o álcool polivinílico, a dextrana sulfato, o ácido hialurônico, a carboximetildextrana, a xantana, o colágeno e a gelatina, por isso é um dos polissacarídeos mais utilizados para a formação de complexos polieletrólíticos. Complexos formados com quitosana são biodegradáveis e biocompatíveis, pois a quitosana é metabolizada por enzimas, como as lisoenzimas, também possuem capacidade de intumescimento (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Esses complexos possuem diversas aplicações, como: membranas, em sistemas para imobilização de enzimas, em sensores ambientais, e também na preparação de matrizes utilizadas em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Na complexação polieletrólítica a atração eletrostática entre os grupos catiônicos de um polication, como a quitosana, e os grupos aniônicos de um poliânion, como a gelatina, é a principal interação que leva a formação de um complexo insolúvel (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da interação entre as cadeias da quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.

Fonte: Adaptado de BERGER et al., 2004.

Pelo fato de os complexos serem formados por interações aniônicas, suas propriedades físico-químicas são sensíveis a variação de pH, temperatura e campo elétrico (KIM et al., 2005). A Figura 6 mostra o efeito do pH nas cadeias dos complexos polieletrólíticos, nota-se que em pH básico um número maior de cargas negativas devido à desprotonação de grupamentos iônicos do polieletrólito aniônico (gelatina), enquanto que em pH ácido ocorre a protonação de grupamentos iônico do polieletrólito catiônico (quitosana). Assim, dependendo da estabilidade do polímero aniônico em meio ácido pode ocorrer dissolução do complexo devido à alta solubilidade da quitosana em meio ácido (BERGER et al, 2004)

Figura 6 – Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo quitosana; carga negativa do outro polieletrólito: carga positiva da quitosana, +, interação iônica, ○ ; quitosana, — ; polieletrólito adicional, — .

Fonte: Adaptado de BERGER et al., 2004.

4.6 Processo de mineralização de hidrogéis e a hidroxiapatita

Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais contendo elevada quantidade de água. São materiais, normalmente, obtidos a partir da copolimerização entre monômeros ou polímeros hidrofílicos com monômeros polifuncionais, que promovem ligações cruzadas. A presença destas ligações confere aos mesmos a capacidade de absorver grande quantidade de água sem se dissolverem (VILLANOVA et al., 2010). Os hidrogéis mostram-se semelhantes ao tecido natural quando comparados a outra classe de biomateriais sintéticos. Contém poros para que células vivas possam penetrar e proliferar. Têm a vantagem de

incorporar na membrana celular, estimulando a adesão, disseminação e crescimento de células no interior da matriz do hidrogel, porém apresenta baixa resistência mecânica, dificultando o manuseio, e problemas de esterilização (HOFFMAN, 2002). São usados como lentes de contato, membranas de biossensores, revestimento para corações artificiais, materiais para a pele artificial, dispositivos de liberação de fármacos e matrizes para recuperação óssea, quando submetidos a processos de mineralização (PEPPAS et al., 2000).

As estruturas ósseas dos organismos servem como sustento e/ou proteção física, por exemplo, o esqueleto em mamíferos, o exoesqueleto em insetos e as conchas nos moluscos. Estas estruturas são caracterizadas por sua resistência, leveza, capacidade de se adaptar a estímulos externos cada vez mais variáveis e capacidade de remodelação e auto-reparação após trauma moderado, existem casos que os traumas não são recuperados espontaneamente e necessitam da ajuda de tratamentos que ajudem na regeneração óssea (TAMPIERI, 2011).

Existem alguns fatores presentes nos organismos que devem ser seguidos quando se deseja obter uma matriz para regeneração óssea, os quais têm a função de regular a formação e organização da fase mineral destes organismos, como:

- O fator químico, que consiste na precipitação dos íons Ca^{2+} e PO_3^{4-} presente nos organismos, esta precipitação é mediada por fatores metabólicos, que orientam a formação dos cristais e nucleação das fases minerais.

- O fator espacial, que consiste na delimitação no espaço para crescimento dos cristais.

- O fator estrutural, onde a ocorre a orientação para a formação dos cristais, a direção de crescimento é induzida pela presença de determinados grupos funcionais químicos presentes.

- O fator morfológico (morfogênese), onde a fase mineral assume uma arquitetura complexa, provenientes das combinações dos fatores acima descritos (TAMPIERI, 2011).

A formação de depósitos de cálcio em diferentes matrizes pode ser denominada como mineralização, que é um processo de múltiplos parâmetros (SOUZA et al., 2004).

No presente estudo utilizou o método de mineralização denominado mineralização por imersão alternada, que consiste na imersão do hidrogel em solução de CaCl_2 em por um período de tempo, após retira-se desta solução e lava-

se o hidrogel com água desionizada, após lavagem imerge em solução de Na_2HPO_4 por um período de tempo e lava-se novamente o hidrogel com água desionizada. Esse ciclo de imersão alternado é repetido algumas vezes para obtenção da matriz mineralizada. (NASCIMENTO et al, 2012).

Os experimentos de mineralização *in vitro* apresentam algumas vantagens, em comparação com experimentos *in vivo*. Além de ser um método mais barato e mais rápido, não utiliza equipamento especial ou temperaturas de processamento extremamente altas. Além disso, os resultados de calcificação *in vitro* são mais reprodutíveis, devido ao menor efeito da variabilidade de condições experimentais observadas em testes com organismos vivos (OLIVEIRA et al., 2009).

A hidroxiapatita, formada no processo de mineralização, é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005). Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de fármacos anticancerígenos no tratamento de tumores ósseos (MAYROPOULOS, 1999).

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos (SILVA, 2008). Seu arranjo atômico está representado na Figura 7.

Figura 7 – Arranjo atômico da hidroxiapatita.

Fonte: Adaptado de SILVA, 2014.

Infelizmente, não é possível usar diretamente a hidroxiapatita na forma de pó para a finalidade de recuperação óssea, pois resulta no deslocamento do material pelo tecido. Para eliminar esta mobilidade indesejada, a hidroxiapatita é incorporada ou misturada ao colágeno (SIONKOWSKA, 2000), à gelatina (VIIDIK et al., 1980; MATHEW et al., 2010) ou a outros materiais (SZPALSKI et al., 2012).

Várias formas de preparação de compósitos de quitosana/hidroxiapatita têm sido descritas, tais como misturas de hidroxiapatita na forma de pó em soluções de quitosana, formando um cimento, ou filmes de quitosana revestidos de hidroxiapatita. Porém, estes compósitos são macroscopicamente heterogêneos e frequentemente causam rejeição quando implantados (HARRISON et al., 2014).

Para controlar os problemas encontrados com os compósitos heterogêneos, Yamaguchi (2001) propôs o método de co-precipitação, no qual a solução de quitosana contendo ácido fosfórico foi adicionada a uma suspensão de hidróxido de cálcio. Outros autores utilizaram quitosana na forma sólida em solução de fluido biológico simulado (SBF) (DAVIDENKO et al., 2010). Outro método foi utilizado por Hu (2004), no qual o hidrogel de quitosana foi mineralizado pelo controle *in situ* do processo de difusão iônica.

Os biomateriais compósitos de quitosana e hidroxiapatita têm sido estudados para regeneração óssea, liberação controlada de fármacos, matrizes para engenharia de tecidos, pois é esperado que esses compósitos sejam osteocondutivos e com biodegradação e força mecânica adequados para uso ortopédico e/ou odontológico (CHESNUTT et al., 2009).

Estudos relatam que hidrogéis feitos com mistura quitosana e gelatina apresentaram adesão celular. Assim, conclui-se que esses hidrógeis são bioativos e podem ser usados para a adesão/fixação celular sugerindo que estes podem ser usados para aplicações de engenharia de tecidos, tais como no processo de substituição de tecido ósseo (NAGAHAMA et al., 2009b, EL KADY et al., 2009; MATHEW et al., 2010) e liberação de fármacos (SAHOO et al., 2013).

Existem alguns trabalhos utilizando matrizes de quitosana/colágeno mineralizados, quitosana proveniente de α -quitina, para aplicação na engenharia de tecido ósseo (DENG et al., 2010; AZI et al., 2010; WANG et al., 2006), onde dentro desse campo existem várias linhas de pesquisa como a formação de compósitos com outros polímeros (NGIAN et al., 2009), estudo dos mecanismos da mineralização (DESHPANDE e DENIASH, 2008; PRICE et al., 2009) e o uso de

outras proteínas (KALAMAJSKI et al., 2009) para promover uma maior eficiência no processo de mineralização. Não foram encontrados na literatura estudos sobre hidrogéis de quitosana/gelatina mineralizados.

4.7 Sistemas de liberação controlada

Os sistemas de liberação controlada de fármacos surgiram nos anos de 1980 e tornaram-se uma tecnologia importante. A liberação controlada de uma substância ou fármaco estabelece um ambiente terapêutico desejável com ótima resposta, efeitos colaterais mínimos e eficácia prolongada (PARK, 2000). Estes sistemas possuem vantagens quando comparado com as formas de dosagens convencionais, que inclui uma melhor eficácia, uma melhor aceitação do paciente e toxicidade reduzida (DESAI et al., 2005).

Sistemas de liberação controlada regulam a taxa de liberação de fármacos e reduzem a frequência de tratamento com medicamentos pelo fato de manter a concentração terapêutica efetiva (faixa terapêutica) do medicamento por um maior período, sendo uma das grandes vantagens deste sistema sobre os métodos convencionais (TANAKA et al., 2006) (Figura 8).

Uma ampla variedade de sistemas, com a finalidade de controlar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação da indústria farmacêutica. Entre estes sistemas estão incluídos lipossomas, micelas, emulsões e sistemas poliméricos, que vêm demonstrando ser bastante promissores para a liberação controlada de fármacos (BALMAYOR et al., 2012).

Nos sistemas de liberação poliméricos, o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica ou dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície. Durante a liberação do fármaco estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, difusão do fármaco pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos (REGO et al., 2003).

Figura 8 – Perfis de diferentes formas de administração de fármacos.

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 2006.

Matrizes preparadas com polissacarídeos, como a quitosana, são biocompatíveis e biodegradáveis, o que é uma característica essencial para materiais a serem usados em sistemas de liberação de fármacos (LIU et al., 2007). Vários estudos têm mostrado que a hidroxiapatita poderia também ser utilizada como um sistema de liberação de fármacos, como por exemplo, antibióticos, fármacos anticancerígenos e anti-inflamatórios (SHEN et al., 2008).

A gentamicina é um dos antibióticos mais consumidos devido ao seu baixo custo, seu largo espectro de ação antibacteriana, possui baixa taxa de patógenos resistentes, e principalmente, baixo índice de alergia, boa estabilidade, e solubilidade em água (VIRTO et al., 2003). Pode ser usada no tratamento de muitos tipos de infecções bacterianas, eliminando bactérias que causam infecções no pulmão, pele, osso, articulações, sangue, estômago e infecções urinárias. No entanto, a gentamicina não é absorvida pela parede do intestino, sendo necessária sua administração por injeção ou infusão (NEUT et al., 2003, CHANGEZ et al., 2003).

A matriz polimérica incorporada com gentamicina pode ser usada no momento de uma cirurgia, durante a fixação de uma prótese, com o intuito de diminuir o risco de possíveis infecções que o paciente recém-implantado possa ter (PASSUTI e GOUIN, 2003; HENDRIKS et al., 2004).

A literatura apresenta trabalhos referentes à liberação controlada de gentamicina. Azi et al., (2010) estudou a liberação da gentamicina em PBS quando misturada a HA formando um cimento o qual foi utilizado como matriz, a maior parte da gentamicina foi liberada nas primeiras 24 horas e após 28 dias não havia nenhum vestígio do antibiótico na matriz estudada.

Ji et al., (2011) estudou a liberação de gentamicina em PBS utilizando como suporte nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato. As amostras mostraram liberação inicial rápida e obedece ao modelo de difusão Fickiana.

Sezer et al., (2012) e Budiatin et al., (2014) estudaram a liberação do fármaco *in vitro* e *in vivo*, usando matriz polimérica composta de gelatina/HA/gentamicina reticulada com glutaraldeído. Com base nos estudos *in vitro*, observaram que 86% da concentração inicial de gentamicina são gradativamente liberados no período de 28 dias, enquanto que na liberação realizada *in vivo* (testes feitos em coelhos) ocorreu a liberação de aproximadamente 26% da concentração inicial da gentamicina. A matriz utilizada para esse estudo mostrou-se promissora como suporte para recuperação óssea, pois após o período de 28 dias preencheu o defeito ósseo existente no animal.

Trabalhos utilizando matrizes mineralizadas de quitosana/gelatina para serem usadas como suporte de liberação de gentamicina não foram encontrados na literatura.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção da β -quitina e da quitosana

A quitosana utilizada no presente trabalho foi obtida a partir da β -quitina extraída do gládio de lula da espécie *Loligo sp.* Os gládios foram cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia – SP). Inicialmente, os gládios foram lavados em água corrente para remoção de sais e materiais orgânicos, secos em estufa à 40°C, triturados e separados por peneiração obtendo-se partículas com diâmetro entre 0,149-0,250 mm.

A figura 9 representa o esquema de extração da β -quitina a partir dos gládios de lula e a preparação da quitosana, que consiste de três etapas: desmineralização, desproteinização e desacetilação (HORN et al., 2009).

Figura 9 – Esquema da obtenção da quitosana.

Fonte: Adaptado de HORN et al, 2009.

Desmineralização

Este processo foi utilizado como primeiro passo para isolar a β -quitina a partir do gládio de lula. Para o procedimento, foi utilizada uma solução de HCl $0,55 \text{ mol L}^{-1}$, preparada em quantidade suficiente para desmineralização dos gládios triturados e peneirados.

A quantidade de gládio de lula utilizada foi de 40,33 g e, para que ocorresse a desmineralização, foi mantida a proporção de 1 g de gládio de lula para 15 mL de ácido clorídrico.

O processo de desmineralização dos gládios moídos com HCl $0,55 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado em temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação mecânica constante, sendo repetido uma vez para garantir maior eficiência.

Em seguida, a solução foi lavada com água destilada por cerca de 5 dias, nos quais as trocas de água foram feitas a cada duas horas, até alcançar a neutralidade. Todo o processo de lavagem foi feito sob agitação mecânica constante. O sólido obtido foi seco em estufa a 40°C por 48 horas.

Desproteínização

A desproteínização consistiu em um tratamento alcalino do sólido obtido no processo de desmineralização. Para esse processo, foi preparada uma solução de NaOH $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se a proporção de 1 g de gládio de lula desmineralizado para 10 mL de solução de NaOH.

O material desmineralizado, juntamente com o NaOH, foi colocado em um balão de três bocas sob agitação mecânica e temperatura constante de 80°C , por 1 hora. Esse processo foi repetido uma vez para maior eficiência.

O sólido obtido (β -quitina) foi lavado até a neutralidade, levando cerca de 5 dias. Em seguida, o material foi seco em estufa à 40°C por 48 horas.

Desacetilação

Para obter a quitosana a partir da β -quitina foi realizado um tratamento alcalino com NaOH 40% (massa/massa). Para que ocorresse a desacetilação foi mantida a proporção de 1 g de β -quitina para 20 mL de NaOH 40%.

Em um balão de três bocas, foi colocada a massa de β -quitina obtida e a solução de NaOH 40%, sob agitação mecânica constante à temperatura de 80°C em atmosfera de N₂. Esse sistema foi mantido por 3 horas. O processo foi repetido uma vez para maior eficiência.

O material obtido foi lavado, assim como nas etapas anteriores, até a neutralidade e seco em estufa por 48 horas. Após seco, o material obtido (quitosana) foi macerado em almofariz de ágata e armazenado em um recipiente de vidro âmbar, protegido da luz e umidade.

5.2 Caracterização da Quitosana

5.2.1 Determinação do grau de acetilação

Na literatura são encontrados vários trabalhos referentes a métodos para determinação do grau de acetilação da quitosana, como, por exemplo, RMN ¹H (ALVARENGA et al., 2010), espectroscopia na região do infravermelho (SHIGEMASA et al., 1996) espectroscopia na região do ultravioleta (LIU et al., 2006) e titulação condutimétrica (TORRES et al., 2005). Neste trabalho, a determinação deste parâmetro foi realizada por dois métodos: espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e titulação condutimétrica, que são métodos simples, não destrutivo e de baixo custo e que fornecem valores próximos aos obtidos pela técnica de RMN ¹H (ALVARENGA et al., 2010).

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV) (LIU et al., 2006)

A quitosana é composta por dois grupos cromóforos, N-acetilglicosamina (GlcNAc) e a glicosamina (GlcN). Não se tem evidências da interação entre os monômeros, podendo assim contribuir para a determinação simples do material em um determinado comprimento de onda.

Pesou-se cerca de 7,0 mg de quitosana, dissolveu-se em 50 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ e manteve-se sob agitação magnética até dissolução completa do material. Após, foi feita a leitura da absorbância da solução de quitosana em $\lambda_{\text{máx}} = 201 \text{ nm}$ e o grau de acetilação foi calculado pela Equação 1:

$$GA = \frac{(161,1 \times A \times V) - (0,0218 \times m)}{(3,3615 \times m) - (42,1 \times A \times V)} \quad (1)$$

Sendo:

A - absorbância

161,1 - massa molar média da unidade repetitiva da quitosana (g mol^{-1})

V - volume da solução (L)

m - massa (mg) de quitosana

O aparelho de UV utilizado foi um espectrômetro HITACHI U-3000, em um intervalo de 150-220 nm, com cela de 1 cm de largura e fenda de 0,5 nm. As leituras foram feitas em triplicata.

Titulação condutimétrica (TORRES et al., 2005)

A quitosana utilizada para a titulação condutimétrica foi previamente seca em estufa à 60°C por 12 horas. Em seguida, pesou-se uma amostra de 0,250 g de quitosana que foram dissolvidas em 50 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹, mantendo sob agitação magnética por 12 horas. A mistura obtida foi diluída para 250 mL com água deionizada. Retirou-se 4 alíquotas de 50 mL da solução resultante e titulou-se com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, padronizada com ácido oxálico. O ponto de viragem foi acompanhado através das medidas de condutividade feitas com um condutivímetro Digimed modelo DM-31, equipado com célula condutimétrica Digimed (DM-31). Todas as titulações foram feitas em temperatura ambiente.

O grau de acetilação médio foi determinado pela Equação 2:

$$GA(\%) = \left(1 - \frac{161 \cdot (v_2 - v_1) \cdot [NaOH]}{m}\right) \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

GA (%) - grau de acetilação médio da quitosana

161 - massa molar média da unidade repetitiva da quitosana (g mol^{-1})

(v₂ - v₁) - volume de hidróxido de sódio necessário para neutralizar a quitosana (L)

[NaOH] - concentração de hidróxido de sódio (mol L⁻¹)

m - massa de quitosana presente na alíquota (g)

5.2.2 Determinação da massa molar (MATHEW et al., 2006)

A massa molar da quitosana foi determinada utilizando o método viscosimétrico. Para determinar a viscosidade intrínseca 20 mg de quitosana, previamente seca em estufa à 60°C por 12 horas, foi adicionada em 25 mL de solução de ácido acético 0,6 mol L⁻¹ sob agitação magnética constante por 12 horas. Em seguida, adicionou-se 25 mL de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹ sob agitação magnética constante por mais 12 horas.

Preparou-se o tampão acetato 0,3 mol L⁻¹ ácido acético/0,2 mol L⁻¹ acetato de sódio, com valor de pH = 4,5, sob agitação magnética por 1 hora. Esse tampão foi empregado para as diluições e como padrão de tempo de escoamento, assegurando a força iônica constante das soluções.

Amostras de 10 mL da solução tampão e da amostra de quitosana em ácido acético e acetato de sódio, em concentrações variando de 1,5 a 4,0 mg L⁻¹ foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro tipo Ubblohde e mediu-se o tempo de escoamento com o auxílio de um cronômetro digital. Esse procedimento foi realizado em temperatura ambiente. Cada medida foi feita 10 vezes, sendo utilizada a média dos valores obtidos.

Com a média dos valores de tempo obtidos e a concentração das soluções, determinou-se a viscosidade reduzida das soluções de quitosana, por meio da Equação 3:

$$\eta_{red} = \frac{t_{quit} - t_{solv}}{c * t_{solv}} \quad (3)$$

Sendo:

η_{red} - viscosidade reduzida das soluções de quitosana

t_{quit} - tempo médio de escoamento de cada uma das soluções (s)

t_{solv} - tempo médio de escoamento do solvente (s)

c - concentração (g mL⁻¹)

Utilizando-se os dados de viscosidade reduzida e a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 4), determinou-se a massa molar média da quitosana.

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (4)$$

Sendo:

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca (mL g^{-1}) da quitosana (obtida pela extrapolação da viscosidade reduzida para uma concentração nula de soluto)

K (mL g^{-1}) e α - constantes dependentes do grau de acetilação da quitosana, temperatura e solvente utilizado (RINAUDO, 2006).

5.3 Gelatina

A gelatina utilizada (SIGMA®, grau de pureza para eletroforese, reagente Tipo A, em forma de pó) é oriunda de pele porcina e foi utilizada sem purificação prévia.

5.4 Preparo dos hidrogéis

Para o estudo foram preparados hidrogéis em diferentes proporções quitosana:gelatina, 1:1; 2:1 e 1:2 (m/m). Para tal, preparou-se uma solução de quitosana 1% em ácido acético 1% (em massa), sob agitação mecânica por 12 horas, para completa dissolução. Os hidrogéis foram preparados pela adição de 1 g de gelatina a 99 g de solução de quitosana em ácido acético, para a proporção quitosana:gelatina 1:1. As demais proporções seguiram o mesmo procedimento. A homogeneização e gelatinização foram realizadas por agitação mecânica à temperatura de 60°C durante 30 minutos e depois o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, formando uma solução homogênea. Pesou-se aproximadamente 1 g dessa mistura em formas de Teflon®, levou-se a geladeira por 2 horas e depois ao freezer por 24 horas. Após esse período, os hidrogéis foram mineralizados.

Os hidrogéis obtidos foram nomeados como:

C_1G_1 = hidrogel de quitosana:gelatina 1:1

C_2G_1 = hidrogel de quitosana:gelatina 2:1

C_1G_2 = hidrogel de quitosana:gelatina 1:2

A Figura 10 mostra o esquema de preparo dos hidrogéis obtidos.

Figura 10 - Processo de preparo dos hidrogéis para mineralização.

5.5 Mineralização dos hidrogéis

Para o processo de mineralização *in vitro* foi escolhido o método de mineralização alternada, que consiste, basicamente, na imersão do material em uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em tampão Tris-HCl por um tempo determinado e depois a imersão em $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em tampão Tris-HCl por um tempo determinado. O processo é feito trocando-se as solução a cada 30 minutos por 6 vezes, lavando-se os hidrogéis a cada troca com água deionizada, como mostrado na Figura 11.

O número determinado para as trocas das soluções, seis vezes, foi escolhido com base nos resultados obtidos através de estudos realizados no grupo de pesquisa onde este número apresentou os melhores resultados.

Figura 11 – Esquema de mineralização por imersão alternada.

Foram feitas alterações no processo de mineralização para o C₁G₁ para ver o efeito da variação de concentrações e de tempo de imersão.

As metodologias realizadas nos processos de mineralização foram as seguintes:

1 – Mineralização trocando a solução de 30 em 30 minutos, por um período total de 6 horas. Processo realizado para todas as proporções estudadas (C₁G₁, C₂G₁ e C₁G₂). Para o processo foram preparadas duas soluções. Uma de CaCl₂.2H₂O 0,2 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 7,4 e outra de Na₂HPO₄.7H₂O 0,12 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 9,0. O processo foi feito trocando-se a solução a cada 30 minutos por 6 vezes, lavando-se os hidrogéis a cada troca com água deionizada.

2 – Mineralização fazendo a troca das soluções de CaCl₂.2H₂O 0,2 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 7,4 e de Na₂HPO₄.7H₂O 0,12 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 9,0 a cada 12 horas por um período de 6 dias. Processo realizado apenas com C₁G₁, o hidrogel foi nomeado como C₁G₁/12 após mineralização.

3 – Mineralização utilizando as soluções com metade das concentrações iniciais, CaCl₂.2H₂O 0,1 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 7,4 e outra de Na₂HPO₄.7H₂O 0,06 mol L⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH = 9,0, trocando-se a solução a cada 30 minutos por 6 vezes. Processo realizado apenas com C₁G₁. O hidrogel foi nomeado como C₁G₁/05 após mineralização.

Todos estes processos foram realizados em temperatura ambiente. Após a mineralização, os hidrogéis foram lavados abundantemente com água deionizada e condicionados em uma placa de Teflon®, onde foram congelados e liofilizados.

5.6 Caracterização dos materiais

5.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Para a caracterização por FT-IR da quitosana obtida, foi preparada uma solução de quitosana 0,3% (massa/massa) em ácido acético 1% (v/v), e gotejou em uma placa de silício, a qual foi deixada por 24 horas sob fluxo de ar e, posteriormente, por 48 horas em dessecador sob vácuo contendo pastilhas de hidróxido de sódio, para garantir a remoção completa do solvente.

Para a caracterização da gelatina foi preparada uma pastilha, por prensagem, de KBr e gelatina na forma de pó, a qual foi deixada por 48 horas em dessecador sob vácuo contendo pastilhas de hidróxido de sódio, para garantir a remoção completa da água existente na gelatina.

Após mineralização dos hidrogéis, a FT-IR foi aplicada para observar se houve a formação de bandas características ao íon PO_4^{3-} e à hidroxiapatita. Como os hidrogéis eram muito rígidos foram feitos cortes para obter pequenas porções dos hidrogéis e macerou-se junto com KBr para confecção das pastilhas necessárias para a análise.

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, modelo Bomem/MB-102. Foram realizados 64 scans por espectro, com resolução de 4 cm^{-1} e a faixa de medição foi de 4000 a 400 cm^{-1} .

5.6.2 Análise termogravimétrica – TG

Para a realização da análise termogravimétrica da quitosana e da gelatina, foram utilizados cerca de 10 mg de cada material, na forma de pó.

Para a caracterização dos hidrogéis mineralizados, a termogravimetria teve como principal função observar se ocorreu formação de minerais no hidrogel e a quantidade de material inorgânico residual na amostra. Para a análise dos hidrogéis foram utilizados cerca de 10 mg de cada hidrogel mineralizado.

Ambos os materiais foram colocados no porta amostra de alumina sob atmosfera de ar sintético, com razão do aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, entre 25 e 800°C em um equipamento da TA Instruments modelo TGA-2050.

Para os materiais mineralizados, o resíduo obtido em 750°C foi considerado o teor de material inorgânico depositado sobre a matriz.

5.7.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

As fotomicrografias foram feitas para observar a morfologia dos hidrogéis antes e após a mineralização, interna e externamente. Os materiais foram congelados em nitrogênio líquido e quebrados ao meio para que não houvesse alterações na estrutura do hidrogel. As fotomicrografias foram obtidas a partir de dois cortes dos hidrogéis, superficial e lateral. As amostras foram cortadas com estilete,

colocadas em *stubs* por fita condutora de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Para medir o tamanho dos poros dos hidrogéis foi utilizado o *software* UTHSCSA Image Tool versão 3.0. Foram feitas 25 determinações para cada hidrogel com a imagem ampliada 200 vezes.

5.7.4 Espectroscopia de dispersão de raio-X – EDS

A técnica permite a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras, a partir de emissão de raios X característicos. Nesse estudo a análise foi utilizada para observar a relação entre as quantidades de Ca e P na amostra. Esta relação foi obtida a partir de uma média dos valores de relação em quatro pontos diferentes da amostra.

A análise de Energia Dispersiva (EDS) foi realizada em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um microscópio eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Utilizou-se padrão de cobalto para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, “dead time” de 30 %, corrente de 2,82 A e I “probe” de 950 pA. As análises foram feitas utilizando-se hidrogéis mineralizados e liofilizados na forma de pastilhas que foram prensadas com 5 toneladas e recobertas com carbono. Para a análise semi-quantitativa foi utilizado o ISIS software 3.1.

5.7.5 Difração de raios-X – DRX

A difração de raios-X foi aplicada sobre as matrizes para observar a estrutura cristalográfica do sal de fosfato de cálcio formado nos hidrogéis. Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro automático Rigaku-Rotaflex Ru-200B, com

radiação monocromática de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) com potência de 50 kV, 100 mA e comparados com o difratograma da hidroxiapatita sintética [HA, JCPDS 9-0432].

5.7.6 Estudos de absorção em PBS

Para o estudo da absorção em PBS dos hidrogéis não calcificados e liofilizados, foram utilizadas 3 amostras de cada proporção estudada, de tal maneira que todas tivessem aproximadamente a mesma massa (entre 15 – 20 mg). Após a pesagem estas foram colocadas em recipientes separados, com 5 mL de PBS. O tempo de absorção foi determinado no intervalos de 30 segundos até 60 minutos estabelecidos após testes realizados. Após esse tempo as amostras eram retiradas do recipiente, colocadas em cima de papel filtro para eliminar o excesso de PBS e pesadas. O procedimento foi repetido por três vezes e realizado à 37°C.

Para o estudo da absorção em PBS do hidrogel calcificado e liofilizado foi utilizado o hidrogel inteiro, com massa entre 40-50 mg. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente com os mesmos intervalos pré-estabelecidos para pesagem das amostras. A cada intervalo de tempo a amostra era retirada do PBS, levemente seca em papel filtro de tamanho 5x5 cm por 5 segundos e então pesada. O procedimento foi feito sempre a 37°C.

O cálculo da % de PBS absorvido foi feita pela Equação 5.

$$\% \text{ abs} = \frac{(\text{peso do hidrogel hidratado}) - (\text{peso do hidrogel liofilizado})}{(\text{peso do hidrogel liofilizado})} \times 100 \quad (5)$$

5.8 Incorporação e liberação de gentamicina

Para a incorporação da gentamicina no hidrogel mineralizado preparou-se uma solução de 150 mg de sulfato de gentamicina em 5 ml de água deionizada e submergiu-se o hidrogel mineralizado nesta solução. O hidrogel foi retirado da solução após um período de 24 horas e liofilizado.

O cálculo da quantidade de gentamicina incorporada no hidrogel foi feito analisando por UV a concentração de gentamicina que restou na solução na qual o hidrogel foi submerso e pela diferença da concentração inicial e final desta solução calculou-se o quanto de gentamicina foi incorporada ao hidrogel.

Calculou-se a eficiência de incorporação (ϵ) utilizando-se a Equação 6.

$$\epsilon = \frac{\text{massa incorporada de gentamicina}}{\text{massa inicial de gentamicina}} \times 100 \quad (6)$$

A análise da quantidade de gentamicina incorporada no hidrogel foi medida através da interpolação na uma curva de calibração e para confecção desta curva foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de gentamicina com concentração $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS (pH = 7,4).
- Solução de NaHCO_3 2% em água deionizada.
- Solução de HCl 1 mol L^{-1} em água deionizada.
- Solução de 2,4-dinitrofluorbenzeno 0,25% (DNFB) em etanol 95%.

O DNFB é usado para formar produtos que absorvem na região do ultravioleta com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, o DNFB reage com a amina terminal da gentamicina (RYANG, 1984). A reação do cromóforo formado com a gentamicina está representada na Figura 12.

Figura 12 - Reação do DNFB com a gentamicina.

A solução de gentamicina preparada foi colocada em tubos de ensaios com tampa, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Volumes das soluções de gentamicina e PBS adicionados para preparo da curva de calibração.

n° do tubo	Volume solução de gentamicina (mL)	Volume PBS (mL)
0	0	1,0
1	0,2	0,8
2	0,4	0,6
3	0,5	0,5
4	0,6	0,4
5	0,7	0,3
6	0,8	0,2
7	1,0	1,0

A cada tubo adicionou-se 1 mL de solução de NaHCO_3 2% e 2 mL de solução de DNFB 0,25%, agitou-se e, após 30 minutos em repouso para a reação, adicionou-se 0,5 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹. Fez-se a leitura da absorbância em 380 nm (RYANG, 1984) utilizando um espectrofotômetro de UV (modelo HITACHI U-1100) e foi feita a curva de calibração.

O estudo de liberação foi feito através da imersão do hidrogel mineralizado em uma célula de acrílico contendo 100 ml de solução tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4, com a agitação de 100 rpm e variando a temperatura entre os estudos (25°C e 37°C). Foram retiradas alíquotas de 1,0 ml em intervalos de tempo apropriados e substituídos por 1,0 ml de solução tampão para manter o volume fixo. As amostras retiradas foram analisadas quanto ao teor de gentamicina.

Para a análise do teor de gentamicina presente nas alíquotas retiradas nos diferentes tempos durante a liberação, também foi seguido o procedimento descrito para a curva de calibração e calculou-se a concentração pela interpolação na curva de calibração da gentamicina. Os estudos de liberação foram feitos em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção da quitosana

Os gládios de lula cedidos (Figura 13-A) passaram por um processo de moagem, obtendo-se um material com aspecto de flocos, o qual foi utilizado para obtenção da quitosana (Figura 13-B).

Figura 13 – Fotografia digital dos gládios de lula (A) inteiro e (B) triturado.

A quitosana foi obtida através de processos de desmineralização, desproteinização e desacetilação, conforme descrito na parte experimental.

Na desmineralização fez-se a retirada de materiais inorgânicos presentes nos gládios de lula. Após feito esse processo o material foi seco em estufa e a massa obtida foi de 32,67g, o que representa um rendimento de 81,01% nesta etapa do processo.

Já na etapa de desproteinização ocorre a clivagem das cadeias proteicas contidas entre as cadeias poliméricas da quitina, quebrando-as em peptídeos e até mesmo em aminoácidos livres que são removidos por esse processo. Depois desta etapa a β -quitina obtida apresentou um aspecto de grânulos com coloração branca, esse material foi seco em estufa e a massa obtida foi de 14,80g, o que representa um rendimento de 36,70% nesta etapa do preparo da quitosana. Segundo Kurita (2006) os gládios de lula são constituídos por quitina, que representa um valor entre 20 a 40% e o restante são proteínas, que condiz com o valor encontrado neste trabalho.

Na etapa final, obteve-se a quitosana através da desacetilação parcial dos grupos acetamida. A quitosana obtida apresentou aspecto de flocos brancos duros (Figura 14), após seca em estufa a massa obtida foi de 10,91g, referente a um rendimento de 27,05% em relação à massa inicial do gládio de lula e um rendimento de 73,72% em relação à massa de β -quitina obtida na etapa de desproteínização, sendo este um valor de acordo com a literatura, pois segundo Kurita et al., 2006, a quantidade de quitosana obtida de duas desacetilações consecutivas, está em torno de 80,0% em relação à massa de β -quitina.

Figura 14 – Fotografia digital da quitosana obtida após o processo de desacetilação da β -quitina.

6.2 Caracterização da quitosana

6.2.1 Determinação do grau de desacetilação

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

A solução de quitosana pura apresenta resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e glicosamina (GlcN), absorvendo energia na região do ultravioleta. O valor da absorbância dividido pela concentração molar total dos resíduos (A/c_t) é linearmente relacionado com o grau de acetilação, conforme descrito na Equação 1

(LIU et al., 2006). Os valores obtidos para a leitura em $\lambda_{\text{max}}=201$ nm estão relacionados a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de massa e absorbância utilizados para análise por UV.

Medida	Massa (mg)	Absorbância (%)
1	6,9	0,1934
2	7,2	0,2202
3	7,3	0,2306

Substituindo os valores das medidas na Equação 1, com volume utilizado de 0,05 L, tem-se um valor de $6,7\% \pm 0,02$. Sendo assim, o grau de desacetilação é de aproximadamente 93,0%.

Titulação condutimétrica

Outro método para determinar o grau de acetilação da quitosana é através da titulação condutimétrica, com a curva obtida mostrada na Figura 15. Esse método é de baixo custo, não destrutivo e fornece valores próximos aos obtidos pela técnica de RMN ^1H (ALVARENGA et al., 2010).

Analizando a curva, tem-se o resultado de uma titulação de uma mistura de ácido forte com ácido fraco com uma base forte como titulante. No início da titulação ocorre uma brusca redução na condutividade da solução devido a substituição dos íons H^+ do ácido forte por íons Na^+ , neutralizando a amostra, sendo o fim dessa neutralização em v_1 . Após, dá-se início ao processo de desprotonação dos grupos aminos da quitosana pelo aumento de base adicionada, mostrando um pequeno aumento na condutividade de solução. A completa neutralização do ácido fraco se dá em v_2 . Assim, a diferença entre v_1 e v_2 é o volume de base necessário para neutralizar a quitosana. Após a neutralização do ácido fraco, começa a haver um excesso de base no meio, ou seja, de íons OH^- , contribuindo para o aumento brusco da condutividade (CARDOSO, 2008).

Figura 15 – Curva da titulação condutimétrica para quitosana.

Neste estudo, o valor médio do volume de NaOH utilizado para a neutralização da quitosana ($v_2 - v_1$) foi de $3,14\ mL \pm 0,05\ mL$. Utilizando a Equação 2, calculou-se que o grau de acetilação médio da quitosana é de $6,81\% \pm 0,32\%$, ou seja, grau de desacetilação de aproximadamente 93%, o qual está próximo ao valor encontrado através da análise por UV. Esta é uma característica estrutural importante, visto que apresenta influência sobre a viscosidade, biodegradabilidade, solubilidade e propriedade mecânicas da quitosana (RINAUDO, 2006).

6.2.2 Determinação da massa molar

As medidas dos tempos de escoamento das diferentes concentrações de soluções de quitosana preparadas e o valor da viscosidade reduzida, calculada com base na Equação 3, são informadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores dos tempos médios de escoamento e da viscosidade reduzida das diferentes concentrações de quitosana.

Concentração (10^{-4} g mL $^{-1}$)	Tempo médio (s)	Desvio (s)	Viscosidade reduzida (mL g $^{-1}$)
Solvente	515,6	3,8	-
1,5	651,2	2,5	1753,3
1,8	686,4	3,1	1840,4
2,0	711,6	2,9	1900,7
2,5	782,6	4,2	2071,4
3,0	850,4	3,9	2164,5
3,5	932,7	3,7	2311,3
4,0	1024,5	4,3	2467,5

Com os dados da Tabela 3, construiu-se um gráfico de viscosidade reduzida versus concentração das soluções de quitosana em tampão acetato de sódio/ácido acético (NaAc/HAc), o qual é apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Curva da viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana.

A equação que melhor descreve esta reta é dada pela Equação 7, que apresentou índice de correlação linear de 0,99597:

$$\eta_{red} = 1344,72 + 2,78 \cdot 10^6 \cdot [\text{quitosana}] \quad (7)$$

A viscosidade intrínseca da quitosana foi determinada pela extrapolação a concentração zero da reta obtida (Figura 6) utilizando a Equação 6, obtendo-se um valor de $1344,72 \text{ mL g}^{-1}$.

Com o valor da viscosidade intrínseca e a equação de Mark-Houwink (Equação 4), é possível determinar a massa molar média da quitosana, sabendo-se que para um grau de acetilação de 6,81%, K vale $0,074 \text{ mL g}^{-1}$ e α equivale a 0,80 (RINAUDO, 2006). Assim, tem-se que o valor calculado da massa molar média da quitosana é de $2,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Esse valor condiz com valores encontrados na literatura utilizando a quitosana derivada de β -quitina (METHACANON et al., 2003).

6.3 Caracterização dos materiais

Os hidrogéis preparados para o estudo apresentaram aspecto gelatinoso, coloração opaca e maleabilidade, a qual facilita a manipulação dos mesmos (Figura 17). Essas características são as mesmas em todas as proporções estudadas (C_1G_1 , C_2G_1 e C_1G_2).

Figura 17 – Fotografia digital de C_1G_1 , (a) superfície e (b) corte transversal.

Depois de mineralizados, os hidrogéis apresentaram coloração branca, rigidez, fácil manipulação e foi possível observar que toda a superfície e interior dos

hidrogéis estavam recobertos pelo sal de fosfato de cálcio formado (Figura 18) para as três proporções de quitosana:gelatina estudadas (C_1G_1 , C_2G_1 e C_1G_2), observou-se também que variando-se o tempo de imersão ($C_1G_1/12$) ou variando-se a concentrações das soluções utilizadas para mineralização ($C_1G_1/05$), visualmente as características permanecem as mesmas, não percebeu diferenças de cor, maleabilidade e rigidez.

Figura 18 – Fotografia digital de C_1G_1 mineralizado, (a) superfície e (b) corte transversal.

6.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

A caracterização por FT-IR permite a determinação dos grupos funcionais presentes nos materiais, pois cada grupo absorve uma frequência característica de radiação na região infravermelha.

A quitosana obtida foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 19). As principais bandas encontradas para o espectro da

quitosana foram: 1643 cm^{-1} , correspondente à amida I atribuída à vibração da ligação C=O das unidades acetiladas; 1587 cm^{-1} , correspondente à amida II; próximo a 3420 cm^{-1} , estiramento O–H. Esta banda é intensa devido a sobreposição com a banda de N–H (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010), e 1325 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo –CO–N–. A banda intensa entre 800 e 1200 cm^{-1} relaciona-se com os anéis piranosídicos (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Figura 19 – Espectro FTIR da quitosana.

A gelatina utilizada no estudo foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 20). As principais bandas encontradas no espectro foram: 1658 cm^{-1} , correspondente à amida I devido à deformação axial da ligação C=O; 1556 cm^{-1} , correspondente à amida II está relacionada com a deformação angular N–H e ao estiramento da ligação C–N; 1240 cm^{-1} , correspondente à amida III onde o pico é um sistema complexo, associados principalmente a grupos residuais CH_2 da glicina e prolina (URIARTE-MONTOYA et al., 2010), a banda referente a amida A da gelatina é encontrada na região de $3315\text{--}3330\text{ cm}^{-1}$, porém não foi possível observar devido a umidade contida no material.

A localização exata das bandas depende da ligação de hidrogênio e conformação da estrutura da proteína. Nesse estudo, o pico da amida I foi observado a 1658 cm^{-1} que apresenta um desvio em relação aos dados relatados por Yakimets et al. (2005), que afirmou absorção em 1648 cm^{-1} . A diferença detectada no espectro pode ser devido à desnaturação do colágeno em gelatina, que por sua vez provoca uma mudança na estrutura secundária do colágeno. A extensão dessas alterações parece ser influenciada pelas condições de extração de gelatina, do número de ligações cruzadas nativas na estrutura do colágeno, e da quantidade de tecidos de colágeno a partir da qual é extraída a gelatina (URIARTE-MONTOYA et al., 2011).

Figura 20 – Espectro FTIR da gelatina.

No espectro de FT-IR para o C₁G₁ não mineralizado (Figura 21) pode observar que as bandas referentes à amida I, amida II e amida III não sofreram grandes deslocamentos após a mistura da quitosana com gelatina, comparados com seus precursores (Figuras 7 e 8). Sendo: 1674 cm^{-1} correspondente à amida I, 1548 cm^{-1} correspondente à amida II, 1243 cm^{-1} correspondente à amida III e 3431 cm^{-1} correspondente ao estiramento O–H.

Figura 21 – Espectro FTIR de C₁G₁ não mineralizado.

Os espectros de FT-IR para os hidrogéis mineralizados (Figura 22) mostram que independente da proporção quitosana/gelatina, tempo de mineralização ou concentração das soluções utilizadas para mineralização houve a formação de fosfato de cálcio, confirmando pela presença de bandas características de íons PO_4^{3-} , $\nu_3 - 1036 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_4 - 563$ e 600 cm^{-1} e na região de 870 cm^{-1} que podem ser atribuídas aos íons CO_3^{2-} (ZHANG et al., 2004). As principais regiões de absorção de energia identificadas são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Principais frequências das bandas dos hidrogéis mineralizados.

Amostra	Frequência (cm^{-1})					
	Amida I	Amida II	$\nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$	$\nu_4 \text{ PO}_4^{3-}$		CO_3^{2-}
C ₁ G ₁	1656	1550	1035	604	563	869
C ₂ G ₁	1651	1566	1032	599	561	873
C ₁ G ₂	1664	1558	1030	601	561	866
C ₁ G ₁ /12	1662	1552	1034	601	563	895
C ₁ G ₁ /05	1647	1560	1030	600	559	889

Figura 22 – Espectros FTIR dos hidrogéis mineralizados (A) C₁G₁, (B) C₂G₁, (C) C₁G₂, (D) C₁G₁/12 e (E) C₁G₁/05.

Em relação às bandas de amida I e amida II identificadas, não ocorreram mudanças nas frequências comparando com as bandas do hidrogel não mineralizado (Figura 21).

6.3.2 Análise termogravimétrica – TG

Na análise termogravimétrica é possível obter a medida quantitativa das variações de massa, tanto da quitosana como da gelatina, em função da temperatura. As variações de massa são resultados da ruptura ou da formação de diferentes ligações, as quais liberam produtos voláteis.

A curva termogravimétrica da quitosana (Figura 23) mostrou que a decomposição ocorreu em três etapas, sendo a primeira na faixa de 25-200°C (13,4%), que pode ser atribuída à perda de água presente no material. A segunda etapa, entre 200 e 400°C (51,7%), com T_{onset} em 235,5°C, ocorre devido ao início da degradação das cadeias poliméricas e a terceira, entre 400 e 750°C (34,9%), ocorre a degradação total do material orgânico (HONG et al., 2007).

Figura 23 – Curva termogravimétrica da quitosana (atmosfera de ar sintético, 10°C min⁻¹, vazão 90 mL min⁻¹).

A curva termogravimétrica da gelatina (Figura 24) também mostra sua decomposição em três etapas, sendo a primeira na faixa de 25-160°C (8,1%), referente à perda de água estrutural. A segunda etapa na faixa de 160-360°C (47,6%), com T_{onset} em 279,8°C, é relativo à degradação térmica das cadeias

poliméricas da gelatina e a terceira, entre 360-750°C (43,7%), ocorre a degradação total do material orgânico. Em 750°C tem-se o resíduo do material, quem neste caso representa 0,7% da massa inicial.

Figura 24 – Curva termogravimétrica da gelatina (atmosfera de ar sintético, 10°C min⁻¹, vazão 90 mL min⁻¹).

Para melhor entendimento da decomposição térmica do hidrogel, realizou-se as análises termogravimétricas no hidrogel liofilizado, pois a grande quantidade de água contida prejudicava a visualização da decomposição. Nota-se através da curva que 87% do material hidratado C1G1 é composto por água e apenas 13% por material polimérico (Figura 25).

Figura 25 – Curva termogravimétrica de C₁G₁ não mineralizado hidratado (atmosfera de ar sintético, 10°C min⁻¹, vazão 90 mL min⁻¹).

As curvas termogravimétricas dos hidrogéis não mineralizados (Figura 26) nos mostram que a degradação ocorre em três etapas, 25-200°C que é atribuída à perda de água presente no material, 200-400°C que ocorre devido ao início da degradação das cadeias poliméricas e 400-750°C onde ocorre a degradação total do material orgânico, mesmo perfil observado nas curvas da quitosana e semelhante ao perfil da curva da gelatina. A quantidade de resíduos é mínima, inferior a 1% em todas as proporções.

Nota-se que mesmo variando-se as proporções quitosana/gelatina ou a concentração das soluções utilizadas para mineralização não ocorre mudança no perfil das curvas, porém observa-se, através da análise da T_{onset} (200-400°C), que quanto maior a quantidade de quitosana no hidrogel menos estável ele se torna, ocorrendo degradação em temperaturas menores, esses valores estão de acordo com o dos materiais precursores, onde a T_{onset} da quitosana (235,5°C) é menor do que o da gelatina (279,8°C). Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de temperatura e perda de massa para os hidrogéis não mineralizados.

Amostra	% Perda de massa				
	25-200°C	200-400°C	400-750°C	Resíduo (750°C)	T _{onset}
C ₁ G ₁	10,6	49,6	39,1	0,7	249,6
C ₂ G ₁	9,3	55,9	34,1	0,7	236,8
C ₁ G ₂	10,4	42,1	47,1	0,4	256,8

Figura 26 – Curvas termogravimétricas de (-----) C₁G₁, (---) C₂G₁ e (---) C₁G₂ não mineralizados (atmosfera de ar sintético, 10°C min⁻¹, vazão 90 mL min⁻¹).

As curvas termogravimétricas mostraram-se similares tanto para o hidrogel sem mineralizar quanto para o mineralizado (Figura 27) com exceção a quantidade de resíduo. Observou-se que ocorreu diminuição da quantidade de água presente nos hidrogéis, esta pode estar relacionada a presença dos sais formados.

A decomposição ocorreu no mesmo número de etapas e nos mesmos intervalos de temperatura. Observa-se a presença de resíduo em 750°C, em todos os casos maior que nas curvas dos hidrogéis não mineralizados (Figura 26). O resíduo para os materiais mineralizados corresponde ao fosfato de cálcio formado no processo de mineralização, durante as imersões alternadas do hidrogel nas soluções

utilizadas para mineralização, provavelmente hidroxiapatita, que é estável na faixa de temperatura de análise (BATISTA et al., 2009). Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de temperatura e perda de massa para os hidrogéis mineralizados.

Amostra	% Perda de massa				
	25-200°C	200-400°C	400-750°C	Resíduo (750°C)	T _{onset}
C ₁ G ₁	9,5	20,0	10,1	60,4	246,8
C ₂ G ₁	9,5	22,5	9,7	58,3	229,0
C ₁ G ₂	9,2	22,1	12,2	56,5	249,0
C ₁ G ₁ /12	7,8	21,9	11,4	58,9	248,5
C ₁ G ₁ /05	15,3	24,8	19,1	40,8	220,5

Observa-se que o perfil das curvas termogravimétricas permanece o mesmo quando se varia a proporção quitosana/gelatina, o tempo de imersão dos hidrogéis nas soluções utilizadas para mineralização ou a concentração das soluções utilizadas para mineralização. Os valores dos resíduos obtidos para os hidrogéis mineralizados também foram próximos em todas as proporções de quitosana/gelatina estudadas, somente para o C1G1/05 ocorreu variação desse valor, diminuindo a concentração das soluções pela metade da utilizada inicialmente, ocorre diminuição na deposição do sal sobre o hidrogel em aproximadamente 30%. Após o processo de mineralização observa-se que estabilidade térmica do hidrogel diminui (T_{onset} 200-400°C), independente do teor de sal presente, porém com a termogravimetria não é possível dizer se ocorreu a mineralização de maneira homogênea nos hidrogéis.

Figura 27 – A: Curvas termogravimétricas e B: dW/dT de (-----) C_1G_1 , (---) C_2G_1 , (---) C_1G_2 , (---) $C_1G_1/12$ e (---) $C_1G_1/05$ mineralizados (atmosfera de ar sintético, $10^\circ\text{C min}^{-1}$, vazão 90 mL min^{-1}).

6.6.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

As fotomicrografias dos hidrogéis não mineralizados mostraram que são constituídos por uma estrutura de arranjos na forma de redes. Esta rede tridimensional é capaz de armazenar grande quantidade de água no interior do hidrogel, como observado nos estudos de absorção realizados e discutidos posteriormente.

A morfologia de um molde é tão importante quanto à composição química do material. Materiais utilizados para osteogênese devem mimetizar a função, estrutura e morfologia do osso, para melhorar as interações com os tecidos adjacentes. A presença de poros faz-se necessária para a formação do tecido ósseo, permitindo a vascularização, migração e proliferação celular (MESKINFAM et al, 2011). De acordo com a porosidade, um sistema pode ser classificado como: macroposo, micropososo e não poroso.

Observa-se que tanto nas micrografias de superfície (Figura 28-A, C e E) quanto nas micrografias do corte transversal do hidrogel (Figura 28-B, D e F) existe a presença de poros, os quais foram medidos e os resultados estão na Tabela 9. Observa-se que quanto maior a proporção de gelatina no hidrogel maior o tamanho dos poros.

O tamanho dos poros tem influência na formação óssea. Inicialmente foi estabelecido um tamanho mínimo de poro entre 100 e 150 μm como critério para um crescimento continuado do osso no interior dos poros, devido ao tamanho das células, necessidades de migração e transporte, porém Aparecida et al. (2008) mostraram crescimento ósseo dentro de poros com tamanhos de 50 a 125 μm . Assim pode-se dizer, com base nos tamanhos dos poros, que os hidrogéis estudados neste trabalho possuem potencial para ser usado como substituto ósseo.

Tabela 9 – Valores do tamanho médio dos poros dos hidrogéis.

Amostras	Tamanho dos poros (μm)	
	Superfície	Corte transversal
C ₁ G ₁	110,46 $\pm$ 36,66	65,84 $\pm$ 23,49
C ₂ G ₁	82,35 $\pm$ 23,49	63,23 $\pm$ 21,89
C ₁ G ₂	123,85 $\pm$ 37,42	87,42 $\pm$ 25,64

Os hidrogéis mineralizados são mostrados nas Figuras 29 – 32. Nota-se que todos os hidrogéis contêm grande quantidade de sal de fosfato de cálcio.

A deposição do sal nas superfícies dos hidrogéis ocorreu de maneira uniforme, como pode ser observado na Figura 29, em todas as proporções, nos diferentes tempos de mineralização e diferentes concentrações estudadas. Apenas no C₁G₁/05 nota-se que houve menor deposição do sal sobre a superfície.

As micrografias das superfícies dos hidrogéis com aumento de 5000x são mostradas na Figura 30, observa-se que a deposição do sal de fosfato de cálcio ocorreu na forma aglomerados esféricos de diferentes tamanhos. Estes aglomerados foram medidos e são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores do tamanho médio dos aglomerados esféricos.

Amostras	Tamanho dos aglomerados (μm)
C ₁ G ₁	2,49 ± 0,63
C ₂ G ₁	5,42 ± 1,26
C ₁ G ₂	2,05 ± 0,51
C ₁ G ₁ /12	1,82 ± 0,34
C ₁ G ₁ /05	3,18 ± 0,79

Ocorre distribuição uniforme da deposição dos aglomerados e quanto maior a concentração de gelatina presente no hidrogel menor o tamanho dos aglomerados esféricos, este fato deve-se a interações entre OH⁻, RCOO⁻, C=O e grupos aminos dos biopolímeros com o Ca²⁺ presente na solução e com a superfície das partículas de HA (MESKINFAM et al, 2011).

Foram feitos cortes transversais nos hidrogéis mineralizados (Figura 31), a fim de verificar a deposição de sais de fosfato de cálcio na parte interna. Constatou-se que ocorreu mineralização interna em todos os hidrogéis estudados.

As micrografias das secções transversais dos hidrogéis com aumento de 500x são mostradas na Figura 32, observa-se que em C₁G₁/12 a mineralização na parte interna ocorreu em menor proporção que os demais, apesar dos aglomerados de sal em alguns pontos.

Em um aumento de 25000x (Figura 33), observa-se que a morfologia dos cristais de fosfato de cálcio é no formato de placas que estão agrupadas em

agregados esféricos, morfologia essa que é típica de hidroxiapatita, conforme registros encontrados na literatura (MOHAMED et al, 2008; WANG et al, 2006).

Figura 28 – Fotomicrografias dos hidrogéis não mineralizados e liofilizados: C₁G₁ - (A) superfície (100x) e (B) corte transversal (100x), C₂G₁ - (C) superfície (100x) e (D) corte transversal (200x), C₁G₂ - (E) superfície (100x) e (F) corte transversal (200x).

Figura 29 – Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis mineralizados: (A) C₁G₁, (B) C₂G₁, (C) C₁G₂, (D) C₁G₁/12, (E) C₁G₁/05 (aumento 200x).

Figura 30 – Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis mineralizados: (A) C₁G₁, (B) C₂G₁, (C) C₁G₂, (D) C₁G₁/12, (E) C₁G₁/05 (aumento 5000x).

Figura 31 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados: (A) C₁G₁, (B) C₂G₁, (C) C₁G₂, (D) C₁G₁/12, (E) C₁G₁/05 (aumento 100x).

Figura 32 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados:
(A) C₁G₁, (B) C₂G₁, (C) C₁G₂, (D) C₁G₁/12, (E) C₁G₁/05 (aumento 500x).

Figura 33 – Fotomicrografias das secções transversais dos hidrogéis mineralizados: (A) C₂G₁, (B) C₁G₁/12 e (C) C₁G₁/05 (aumento 25000x).

6.6.4 Espectroscopia de dispersão de raio-X – DRX

Para analisar a relação cálcio e fósforo (Ca/P) nos hidrogéis mineralizados foi feita a análise por espectroscopia de dispersão de raio-X, o espectro para o hidrogel C₁G₁ mineralizado é mostrado na Figura 34, os espectros para os demais hidrogéis são semelhantes ao do C₁G₁ (Figura 35). Observa-se que os principais elementos do sal depositados no hidrogel foram: o carbono (0,2 keV), o oxigênio (0,5 keV), o cálcio (3,7 keV e 4,0 keV) e o fósforo (2,0 keV).

Figura 34 – Espectro de EDS obtido na superfície do hidrogel C₁G₁ mineralizado.

A relação Ca/P foi obtida através da média dos teores de cálcio e fósforo presentes nos hidrogéis em três áreas diferentes (Tabela 11).

Tabela 11 – Razão Ca/P dos sais depositados nos hidrogéis mineralizados.

Amostra	Ca/P
C ₁ G ₁	1,68 ± 0,01
C ₂ G ₁	1,69 ± 0,03
C ₁ G ₂	1,71 ± 0,01
C ₁ G ₁ /12	1,86 ± 0,02
C ₁ G ₁ /05	1,68 ± 0,02

Figura 35 – Espectros de EDS obtidos na superfície dos hidrogéis mineralizados: (A) C_2G_1 , (B) C_1G_2 , (C) $C_1G_1/12$ e (D) $C_1G_1/05$.

Na Tabela 12 estão apresentados os valores para os principais tipos de fosfato de cálcio encontrados na literatura (HABRAKEN et al., 2007). Os valores das relações Ca/P encontrados nos diferentes tipos de amostras são próximos aos encontrados na literatura como sendo hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), com exceção ao $C_1G_1/12$ que apresentou valor de 1,86.

Tabela 12 – Relação dos principais tipos de fosfatos de cálcio.

Tipos de Fosfato de Cálcio	Fórmula	Relação Ca/P
Apatita carbonatada	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3$	1,67
HÁ deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	$1,50 < x < 1,67$
Monolita	CaHPO_4	1,00
Brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00
Hidroxiapatita	$\text{C}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato β tri cálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Octafosfato de cálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33

6.6.5 Difração de raios-X – DRX

Para a análise da estrutura cristalográfica do sal de fosfato de cálcio obtido no processo de mineralização utilizou-se a difração de raios-X. Os valores das relações Ca/P para todas as amostras estudadas foram próximos ao da hidroxiapatita (1,67), assim escolhemos fazer a análise por difração de raios-X dos hidrogéis mineralizados com diferentes proporções de quitosana/gelatina. Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e Figura 36, para as amostras analisadas e são similares aos da hidroxiapatita sintética quando comparados com a ficha padrão da HA [JCPDS 9-0432].

Tabela 13 – Principais valores de d para os hidrogéis mineralizados.

Amostras	Principais valores de d (Å)			
C_1G_1	2,77	2,64	3,44	1,84
C_2G_1	2,79	2,64	3,44	1,84
C_1G_2	2,79	2,64	3,44	1,84
JCPDS (9-0432)	2,81	2,72	3,43	1,84

Dois grupos de picos de reflexão podem ser usados para avaliar a formação da hidroxiapatita, um deles em torno de 26° (2θ) e o outro que varia de 32° a 40° (2θ) (CIOBANU et al, 2011).

As curvas na Figura 34 mostram picos intensos em torno de 26 e 32° (2θ) e picos de baixa intensidade em 26 , 40 e 47 (2θ). Os picos mais dilatados são devido a baixa cristalinidade da hidroxiapatita formada pelo processo de mineralização,

porém são semelhantes ao da hidroxiapatita presente na fase mineral dos ossos (WANG e CHUNZHONG, 2007).

Os difratogramas obtidos para os hidrogéis mineralizados quando comparados ao da hidroxiapatita não cristalina obtida por Martins et al. (1998) (Figura 37) são semelhantes, porém apresentam picos mais largos em relação aos padrões de difração da hidroxiapatita sintética cristalina.

Figura 36 – Difratograma de raios-X de hidroxiapatita não cristalina (MARTINS et al, 1998).

O alargamento do pico de difração de raios- X pode ser utilizado para estimar o tamanho dos cristais na direção perpendicular ao plano cristalográfico com base na Equação de Scherrer (Equação 8) (MONSHI et al, 2012).

$$L_{002} = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (8)$$

Sendo,

L - tamanho médio dos cristais (nm)

K - constante relacionada com a forma dos cristais (aproximadamente 1)

λ - comprimento de onda da radiação de raios-X ($\lambda=0,154056$ nm para CuK α)

β - alargamento do pico de difração (002) à meia altura de sua intensidade máxima (rad)

θ - ângulo de difração de Bragg (°)

Figura 37 – Difratomogramas de raio-X dos hidrogéis (A) C_1G_1 , (B) C_2G_1 , (C) C_1G_2 .

As estimativas dos tamanhos dos cristais de hidroxiapatita estão na Tabela 14. Observa-se que o tamanho dos cristais obtidos nos hidrogéis pelo processo de mineralização alternada são próximos entre si e inferiores ao estimado para a hidroxiapatita sintética, sintetizada por Martins et al, 1998, essa diferença pode estar relacionada ao fato que os cristais de hidroxiapatita são formados diretamente nos hidrogéis pelo processo de imersão nas soluções utilizadas para mineralização e no trabalho descrito por Martins (1998), faz-se a reação direta misturando-se as soluções de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em atmosfera sem CO_2 . Os valores são semelhantes aos cristais de hidroxiapatita oriundos de osso cortical, que têm aproximadamente o tamanho de 50 nm (SATO, 2007).

Tabela 14 – Estimativas dos tamanhos dos cristais de HA nos hidrogéis mineralizados.

Amostra	Tamanho (nm)
C ₁ G ₁	35,7 ± 1,34
C ₂ G ₁	36,7 ± 1,85
C ₁ G ₂	35,9 ± 1,67
HA sintética*	40,2 ± 1,56

*Calculado a partir do difratograma de raios-X de hidroxiapatita não cristalina (MARTINS et al, 1998).

6.6.6 Estudos de absorção em PBS

O estudo de absorção em PBS é fundamental para a utilização do biomaterial. Com esse, é possível conhecer o comportamento de um hidrogel liofilizado na sua reidratação, analisar se o hidrogel é recomposto neste processo, em qual tempo e o quanto é capaz de absorver cada biomaterial estudado.

O processo de absorção ocorre devido a várias interações. Quando as primeiras moléculas começam a entrar na matriz do hidrogel, estas hidratam os grupos hidrofílicos e polares, e assim o hidrogel começa a se expandir. Dessa forma, os grupos apolares ficam expostos interagindo também com outras moléculas que continuam a entrar na matriz. Depois preenche o espaço entre as cadeias poliméricas e os poros do hidrogel que ainda estavam vazios, entrando na pelo efeito da força osmótica. Este é contraposto pela força das ligações cruzadas do material que tem um comportamento elástico. Assim, o hidrogel encontra o seu

ponto de equilíbrio de absorção. Se a expansão prosseguir, as ligações tanto cruzadas poderão romper, e o hidrogel se degradar (HOFFMAN, 2002).

O estudo de absorção em PBS mostrou que o intumescimento nos hidrogéis é bastante rápido nos primeiros 5 minutos, tanto para os hidrogéis não mineralizados quanto para os hidrogéis mineralizados (Figuras 38 e 39).

Os valores de absorção em PBS foram obtidos através da Equação 5, substituindo os valores das massas do hidrogel liofilizado e reidratado. Os valores das porcentagens de PBS absorvidos pelos hidrogéis mineralizado e não mineralizado, após o período de 60 minutos, estão listados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores das porcentagens de PBS absorvidos (α) pelos hidrogéis após 1 hora.

Amostra	α (%)
C ₁ G ₁	759,20 $\pm$ 64,91
C ₂ G ₁	1086,17 $\pm$ 6,73
C ₁ G ₂	296,87 $\pm$ 8,25
C ₁ G ₁ mineralizado	344,53 $\pm$ 4,22
C ₂ G ₁ mineralizado	444,63 $\pm$ 11,61
C ₁ G ₂ mineralizado	331,13 $\pm$ 17,49
C ₁ G ₁ /12 mineralizado	270,99 $\pm$ 17,97
C ₁ G ₁ /05 mineralizado	499,99 $\pm$ 22,72

Os resultados mostram que os hidrogéis, tanto os mineralizados como os não mineralizados, possuem grande capacidade de reter PBS em sua estrutura após liofilização. Esse grande intumescimento pode confirmar a formação de uma rede tridimensional que caracteriza a estrutura dos hidrogéis, visto que estas redes são compostas por grandes cadeias poliméricas capazes de reter PBS. Não ocorreu danos aos hidrogéis depois do período imerso em PBS, o hidrogel foi capaz de resistir a um longo tempo sem que se rompesse, apesar da grande porcentagem de PBS absorvido.

Figura 38 – Curva de absorção em PBS de (-----) C_1G_1 , (---) C_2G_1 e (---) C_1G_2 , não mineralizados.

Figura 39 – Curva de absorção em PBS de (-----) C_1G_1 , (---) C_2G_1 , (---) C_1G_2 , (---) $C_1G_1/12$ e (---) $C_1G_1/05$, mineralizados.

Comparando-se as porcentagens de PBS absorvidas pelos hidrogéis não mineralizados, nota-se que quanto maior a proporção de quitosana em sua composição, maior é a absorção de PBS. Já para os hidrogéis mineralizados essa diferença não está tão evidente, quando a proporção de quitosana é maior o intumescimento continua sendo maior, porém em menor escala. Dentre os mineralizados, no hidrogel que contém menor quantidade de sal de fosfato de cálcio depositado sobre ele, C₁G₁/05, como já foi observado por TG, acontece a maior porcentagem de absorção (499,99%), este fato pode estar relacionado ao menor depósito de sal nos interstícios dos poros, fazendo com que aumente a área de absorção no hidrogel.

6.7 Liberação de gentamicina

O valor foi calculado pela interpolação na curva de calibração (Figura 40), obtendo-se o resultado de $25,7 \pm 0,9$ mg na solução, assim tem-se que a quantidade de gentamicina incorporada foi de $124,3 \pm 0,9$ mg, ou seja, com eficiência calculada de $82,9 \pm 1,1$ %.

Os estudos de liberação de gentamicina foram feitos no hidrogel mineralizado C₁G₁, em banho termostático em duas diferentes temperaturas, à 25°C e à 37°C em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. A análise das alíquotas retiradas durante a liberação foi feita por espectroscopia de ultravioleta e a quantificação da gentamicina foi calculada por interpolação na curva de calibração, para a confecção da curva foi seguido o procedimento descrito em 5.8, e esta é observada na Figura 38.

A reta que melhor se ajusta aos resultados experimentais é dada pela Equação 9, com índice de correlação linear, r , igual a 0,98117.

$$abs = 0,00477 + 0,00197[gentamicina] \quad (9)$$

A liberação de antibióticos em um local específico é um desafio para o desenvolvimento de uma matriz de suporte que seja eficiente. Neste estudo, a gentamicina foi adicionada ao hidrogel mineralizado como um modelo de fármaco e seu comportamento de liberação em duas diferentes temperaturas é mostrado na Figura 41.

Figura 40 – Curva de calibração da gentamicina (■) pontos experimentais; (---) melhor reta ajustada.

Figura 41 – Liberação de gentamicina em C1G1 em diferentes temperaturas: 25°C (●) e 37°C (▲).

A liberação inicial da gentamicina a partir do hidrogel mineralizado C₁G₁ foi rápida, liberando aproximadamente 85% do total a temperatura de 25°C e 95% para a temperatura de 37°C nas primeiras 2 horas, tornando interessante a aplicação para infecções que necessitam de uma elevada dose inicial do fármaco. Observa-se que aumentando a temperatura também aumenta a velocidade da liberação, que pode ser relacionado ao fato de que a gentamicina é solúvel em solução aquosa e essa solubilidade aumenta com o aumento da temperatura.

O comportamento de liberação constante observado após 2 horas quando a temperatura é de 37°C, deve-se ao fato que praticamente todo o fármaco já foi liberado. Já na temperatura de 25°C a liberação dos 15% restante do fármaco ocorre gradativamente, que pode ser atribuído à gentamicina presa no interior do hidrogel, demorando mais para se difundir pelo hidrogel. O fato de a liberação inicial do fármaco ser elevada é desejável, pois no caso de antibióticos é necessária uma elevada dose inicial para combater infecções de maneira eficaz.

Observa-se que para a temperatura de 25°C ocorre a liberação de 98,5% do total do fármaco contido no hidrogel, e para a temperatura de 37°C ocorre a liberação de 99,6% do total do fármaco, após 24 horas.

Com o objetivo de explicar o mecanismo de liberação também foi estudada a cinética de liberação utilizando a relação de Korsmeyer-Peppas (Equação 10):

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (10)$$

Sendo:

M_t - quantidade liberada do fármaco no tempo t

M_∞ - quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, a qual deverá corresponder à quantidade total de fármaco incorporado ao sistema polimérico no tempo $t=0$

K - constante cinética de Korsmeyer-Peppas, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo

n - expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco

Esta equação é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano, e outro,

consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento do hidrogel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semirrígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II. Nesta equação tem-se em conta não só a difusão do fármaco, mas também o relaxamento do hidrogel como processos determinantes na liberação do fármaco.

Quando n é igual a 0,45, o mecanismo principal, que controla a liberação do fármaco no sistema é a difusão pura (difusão Fickiana clássica, quando n assume o valor 0,89, a equação corresponde à cinética de liberação de ordem zero, sendo a liberação controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento do polímero (relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão). Outros valores de n ($0,45 < n < 0,89$) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II (LOPES et al, 2005).

O gráfico da relação de Korsmeyer-Peppas está representado na Figura 42. Observando-se linearidade para ambas as temperaturas estudadas, visto que o coeficiente de correlação se aproxima de 1.

Nota-se que o mecanismo de liberação para as duas temperaturas se aproximam do comportamento Fickiano ($n=0,45$). Em matrizes macroporosas ou microporosas a difusão ocorre essencialmente através dos poros e em matrizes não porosas a liberação ocorre por difusão no meio “sólido”, no presente trabalho as matrizes apresentam características macroporosas.

Os valores de n , bem como o índice de correlação linear estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores de n e índice de correlação linear (r).

Temperatura de liberação	n	r
25°C	0,439	0,999
37°C	0,395	0,989

Figura 42 – Relação de Korsmeyer-Peppas para as diferentes temperaturas: 25°C (●) e 37°C (▲).

7 CONCLUSÕES

Foi possível a preparação e obtenção de hidrogéis mineralizados compostos de quitosana/gelatina, em diferentes proporções, diferentes tempos de mineralização e em diferentes concentrações das soluções usadas para mineralização.

A análise por TG indica que a variação da proporção quitosana/gelatina não altera de forma significativa a mineralização dos hidrogéis, pois quase todas as proporções apresentaram alto valor de resíduo, aproximadamente 60%, apenas quando se altera a concentração das soluções usadas para mineralização que a quantidade de sal depositado diminuiu para aproximadamente 40%.

As micrografias obtidas por MEV mostraram que a deposição do sal ocorreu homogeneamente tanto interna quanto externamente aos hidrogéis durante o processo de mineralização por imersão alternada.

Nos resultados obtidos por absorvância na região do infravermelho (FTIR), observaram-se modos de vibração de PO_4^{3-} em $\nu_3 - 1036 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_4 - 563$ e 600 cm^{-1} . Os dados referentes as análises de EDS confirmaram relações Ca/P com valores próximos ao da hidroxiapatita, 1,67.

Os difratogramas de raios-X (DRX), comprovaram que o fosfato de cálcio formado corresponde a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Também foi possível estimar o tamanho médio dos cristais depositados sobre os hidrogéis mineralizados, aproximadamente 36 nm para todas as proporções, que são valores próximos ao da hidroxiapatita sintética, 40 nm.

Quanto ao estudo de liberação, apesar de o hidrogel apresentar uma elevada liberação inicial de gentamicina, o sistema estudado para a liberação da gentamicina não é viável para ser utilizado como um sistema de liberação controlada, visto que a concentração do fármaco após as primeiras horas da aplicação se reduz a 15% a 25°C e 5% a 37°C. Novos estudos deverão ser feitos, variando-se a concentração de gentamicina e/ou reticulando-se o hidrogel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA, H. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, p. 205-216, 2006.

AHN, J.; KUFFOVA, L.; MERRETT, K.; MITRA, D.; FORRESTER, J. V.; LI, F.; GRIFFITH, M. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: Effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7796–7805, 2013.

ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 1155-1160, 2010.

APARECIDA, A. H.; GUASTALDI, A. C.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento e caracterização de suportes porosos de polietileno de alto peso molecular (PEUAPM) para utilização como biomaterial para reposição e regeneração óssea. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 4, p. 227-280, 2008.

AZEVEDO, A. S.; SÁ, M. J. C.; FOOK, M. V. L.; NOBREGA NETO, P. I.; SOUSA, O. B.; AZEVEDO, S. S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1265-1270, 2013.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.

AZI, M. L.; KFURI JR., M.; MARTINEZ, R.; PACCOLA, C. A. J. Bone cement and gentamicin in the treatment of bone infection, back ground and *in vitro* study. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18(1), p. 31-34, 2010.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95(3), p. 945–949, 2009.

BALMAYOR, E. R.; BARAN, E. T.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Injectable biodegradable starch/chitosan delivery system for the sustained release of gentamicin to treat bone infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 32-39, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BERTUSO, P. C.; WODEWOTZLC, T. I.; SUAZO, C. A. T.; BRITT, D.; ASSIS, O. B. G. Avaliação das propriedades físico-químicas de blendas de quitosana, gelatina e β -glicerol fosfato, para emprego como substrato de crescimento de células-tronco mesenquimais adultas. In: JORNADA CIENTÍFICA, 4., 2012, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Instrumentação e Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. p. 30.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

BUDIATIN, A. S.; ZAINUDDIN, M.; KHOTIB, J. Biocompatible composite as gentamicin delivery system for osteomyelitis and bone regeneration. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 223-226, 2014.

CAO, Y.; WANG, B. Biodegradation of silk biomaterials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 1514-1524, 2009.

CHANGEZ, M.; BURUGAPALLI, K.; KOUL, V.; CHOUDHARY, V. The effect of composition of poly(acrylic acid)-gelatin hydrogel on gentamicin sulphate release: in vitro. **Biomaterials**, v. 24, p. 527-536, 2003.

CHESNUTT, B. M.; YUAN, Y.; BUDDINGTON, K.; HAGGARD, W. O.; BUMGARDNER, J. D. Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts *in vitro* and support bone formation *in vivo*. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 9, p. 2571-2579, 2009.

CHOW, L. C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dental Materials - Journal**, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2009.

CIOBANU, C. S.; ANDRONESCU, E.; PREDO, D. BET and XRD studies on the hydroxyapatite and europium doped hydroxyapatite. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 13, n. 7, p. 821-824, 2011.

DAVIDENKO, N.; CARRODEGUAS, R. G.; PENICHE, C.; SOLÍS, Y.; CAMERON, R. E. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 466-476, 2010.

DENG, C.; ZANG, P.; VULESEVIC, B.; KURAITIS, D.; LI, F.; YANG, A. F.; GRIFFITH, M.; RUEL, M.; SUURONEN, E. J. A collagen/chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. **Tissue Engineering: Part A**, v. 16, n. 10, p. 3099-3109, 2010.

DENKBAS, E. B.; KILIC, E.; BIRLIKSEVEN, C.; OZTURK, E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. **Reactive & Functional Polymers**, v. 50, p. 225–232, 2002.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation and characterization of drug loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. **Drug Development & Delivery**, v. 64, p. 114-128, 2005.

DESHPANDE, A. S.; BENIASH, E. Bioinspired synthesis of mineralized collagen fibrils. **Crystal Growth and Design**, v.8, p. 3084-3090, 2008.

DINIZ, N. K. S.; LEAH, R. G.; BRAGA, C. R. R.; SILVA, S. M. L. Estudo das propriedades morfológicas, térmicas e mecânicas de biofilmes de gelatina/quitosana/montmorilonita visando aplicação como biomaterial. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 12., 2013, Florianópolis. **Anais...** Disponível em: <http://www.eventweb.com.br/cbpol/specific-files/manuscripts/index.php?file=cbpol/17197_1367889082.pdf> .Acesso em: 27 jun. 2014.

EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Review of Medical Devices**, v. 2, n. 1, p. 87-101, 2005.

EL KADY, A. M.; MOHAMED, K. R.; EL-BASSYOUNI. Fabrication, characterization and bioactivity evaluation of calcium pyrophosphate/polymeric biocomposites. **Ceramics International**, v. 35, p. 2933–2942, 2009.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VÁSQUEZ-TORRES, H.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 541-546, 2010.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 45, p. 113–136, 1998.

FURTH, M. E.; ATALA, A.; VAN DYKE, M. E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 28, p. 5068-5073, 2007.

GEORGE, M.; ABRAHAM, E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, v. 36, supl.3, p. 20-27, 2005.

HARRISON, R. H.; ST-PIERRE, J. P.; STEVENS, M. M. Tissue engineering and regenerative medicine: A year in review. **Tissue Engineering: Part B**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2014.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 234-248, 2007.

HENCH, L.; POLAK, J. Third generation biomedical materials. **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HENDRIKS, J.; VAN HORN, H.; VAN DER MEI, H.; BUSSCHER, H. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthetic related infection. **Biomaterials**, v. 25(1), p. 545-556, 2004.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advances Drug Delivery Reviews**, vol. 43, p. 3 – 12, 2002.

HONG, P. Z.; LI, S. D.; OU, C. Y.; LI, C. P.; YANG, L.; ZHANG, C. H. Thermogravimetric analysis of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, p. 547-551, 2007.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 239–243, 2009.

HU, Q. L.; LI, B. Q.; WANG, M.; SHEN, J. C.; Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 779-785, 2004.

HUANG, C. H.; CHI, C. Y.; CHEN, Y. S.; CHEN, K. Y.; CHEN, P. L.; YAO, C. H. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. **Materials Science and Engineering**, v. 32, p. 2476–2483, 2012.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 322-337, 2011.

JI, J.; HAOA, S.; WUA, D.; HUANGB, R.; XUA, Y. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 803-808, 2011.

KALAMAJSKI, S.; ASPBERG, A.; LINDBLOM, K.; HEINEGÅRD, D.; OLDBERG, A. Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium, and promotes collagen mineralization. **Journal Biochemicals**, 2009. In press.

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, p. 5221–5230, 2005.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 268-274, 2000.

KUHN, L. T. Biomaterials. In: ENDERLE, J.D.; BRONZINO, J. D. (Ed.). **Introduction to biomedical engineering**. 3.ed. Burlington: Elsevier, 2012. p. 220-269.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.

LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze–pump out–thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1380-1388, 2005.

LIEN, S. M.; KO, L. Y.; HUANG, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 670–679, 2009.

LIU, C. S.; DESAI, K. G. H.; MENG, X. H.; CHEN, X. G. Sweet potato starch microparticles as controlled drug release carriers: preparation and in vitro drug release. **Drying Technology**, v. 25, p. 689-693, 2007.

LIU, D.; WEI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782-785, 2006.

LIU, Y. L.; WANG, Y. Crosslinked collagen–gelatin–hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 196–201, 2013.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MACIEL, C. **Osteologia**, 2010. Disponível em:
<http://cleamaciel.blogspot.com.br/p/osteologia_01.html> Acesso em: 02 jun. 2014.

MARTINS, V. C. A.; GOISSES, G.; RIBEIRO, A. C.; MARCANTÔNIO JUNIOR., E.; BET, M. The controlled release of an antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. **Artificial Organs**, v. 22, p. 215-221, 1998.

MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. M. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal and swelling properties of starch-chitosan blends films. **Biopolymers**, v. 82, p. 176-187, 2006.

MATHEW, P.; NITYA, G.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80 p. 687–694, 2010.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. 105 f. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Rio de Janeiro, 1999.

MESKINFAM, M.; SADJADI, M. S.; JAZDARREH, H. Biomimetic preparation of nano-hydroxyapatite in gelatin-starch matrix. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 5, p. 352-355, 2011.

METHACANON, P.; PRASITSLIP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 119-123, 2003.

MEYERS, M. A.; CHEN, P. Y.; LIN, A. Y. M.; SEKI, Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. **Progress in Materials Science**, v. 53, p. 1-206, 2008.

MIGUEL, F. B. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 17, p. 256-270, 2006.

MOHAMED, K. R.; MOSTAFA, A. A. Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite-titania/chitosan-gelatin polymeric biocomposites. **Materials Science & Engineering**, v. 28, p. 1087-1099, 2008.

MONSHI, A.; FOROUGHI, M. R.; MONSHI, M. R. Modified scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 2, p. 154-160, 2012.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Crystallographic study of hydroxyapatite bioceramics derived from various sources. **Crystal Growth & Design**, v. 5, p. 111-112, 2005.

NAGAHAMA, H.; DIVYA RANI, V. V.; SHALUMON, K. T.; JAYAJUMAR, R.; NAIR, S. V.; KOIWA, S. Preparation, characterization, bioactive and cell attachment studies of a chitin/gelatin composite membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 333-337, 2009a.

NAGAHAMA, H.; MAEDA, H.; KASHIKI, T.; JAYAKUMAR, R.; FURUIKE, F.; TAMURA, H. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 255-260, 2009b.

NASCIMENTO, D. L.; VULCANI, V. A. S.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Mineralização de matriz derivada de cartilagem auricular. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 163., 2012, Natal. **Anais...** Disponível em: < www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos.../01-163.doc>. Acesso em: 27 jun. 2012.

NEUT, D.; VAN DEL BELT, H.; VAN HORN, J.; VAN DER MEI, H.; BUSSCHER, H. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. **Biomaterials**, v. 24, p. 1829-1831, 2003.

NGIAM, M.; LIAO, S.; PATIL, A. J.; CHENG, Z.; CHAN, C. K.; RAMAKRISHNA, S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v. 45, p. 4-16, 2009.

NITTA GELATIN. Company Profile. Business Activities. **Collagen material business**, 2010. Disponível em: <<http://www.nitta-gelatin.co.jp/english/company/business.html>> Acesso em: 16 abr. 2014.

OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: *in vivo* studies. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2009.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials: principles and applications**. Boca Raton: CRC, 2003. 250 p.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction**. New York: Springer, 2007. 564 p.

PARK, K.; MRSNY, R. J. Designing technologies for the future. **Controlled Drug Delivery**, v. 2, p. 752, 2000.

PASSUTI, N.; GOUIN, F. Antibiotic-loaded bone cement in orthopaedic surgery. **Journal Bone Spine**, v. 70, n. 1, p. 169-74, 2003.

PATINO, M. G.; NEIDERS, M. E.; ANDREANA, S.; NOBLE, B.; COHEN, R. E. Collagen: an overview. **Implant Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 280-285, 2002.

PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **Dental Clinics of North America**, v. 51, p. 729-746, 2007.

PRICE, P. A.; TOROIAN, D.; LIM, J. E. Mineralization by inhibitor exclusion: the calcification of collagen with fetuin. **Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 17092-17101, 2009.

REGO, M.G.B.; LIGORIO, S.F.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C. Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROMAN, J. A.; MENDONÇA, S. N. T. G.; SGARBIERI, V. C. Avaliação Físico-química, microbiológica, sensorial e atitude do consumidor de gelatina de elevado valor nutricional. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 41-51, 2009.

ROSCHGER, P. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**, v. 42, p. 456-466, 2008.

RYANG, J. A. Colorimetric determination of gentamicin, kanamycin, tobramycin, and amikacin aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1301-1302, 1984.

SAADEH, P. B. Repair of critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 12, n. 6, p. 573-579, 2001.

SAHOO, R.; SAHOO, S.; NAYAK, P. L. Syntesis and characterization of gelatin-chitosan nanocomposite to explore the possible use as drug delivery vehicle. **European Scientific Journal**, v. 9, n. 18, p. 135-141, 2013.

SATO, K. Mechanism of hydroxyapatite mineralization in biological systems. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 115, n. 2, p. 124-130, 2007.

SCHIMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulobacial nonunions. **Clinical Orthopaedics**, v. 225, p. 229-308, 1986.

SEZER, U. A.; AKSOY, E. A.; DURUCAN, C.; HASIRCI, N. Gentamicin loaded β -tricalcium phosphate/gelatin composite microspheres as biodegradable bone fillers. **Polymer Composites**, v. 33, n. 9, p. 1644-1651, 2012.

SHEN, Y.; ZHAN, Y.; TANG, J.; XU, P.; JOHNSON, P. A.; RADOSZ, M. Multifunctioning pH-responsive nanoparticle from hierarchical self-assembly of polymer brush for cancer drug delivery. **AIChE Journal**, v. 54, p. 2979–2989, 2008.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIAMOTO, H. Evaluation of diferente absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of desacetylation in chitin. **Biological Macromolecules**, v. 18, p. 237-242, 1996.

SILVA, M. H. P. **Apostila de biomateriais**. Disponível em: <http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2014.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Review nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects-DAn update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p. 467-486, 2000.

SIONKOWSKA, A. Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 147-151, 2000.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2006.

SÖDERHÄLL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T.; RUSCHENDORF, F.; ESPARZAGORDILLO, J.; GRUBER, C.; MAYR, G.; ALBRECHT, M.; ROHDE, K.; SCHULZ, H.; WAHN, U.; HUMBNER, N.; LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL296A1) are associated with Atopic Dermatitis. **PLoS Biology**, v. 5, n. 9, p. 1952-1961, 2007.

SOUZA, V. N. M.; ALMEIDA, V. M.; SILVA, D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante flúor quinolona. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, p. 13-18, 2004.

SPIN NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO JR., E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

STAYTON, P. S. "Smart" delivery systems for biomolecular therapeutics. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, p. 219-225, 2005.

SZPALSKI, C.; WETTERAU, M.; BARR, J.; WARREN, S. M. Bone tissue engineering: current strategies and techniques – Part 1: Scaffolds. **Tissue Engineering: Part B**, v. 18, n. 4, p. 246-257, 2012.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 311-324, 2009.

TAMPIERI, A.; SPRIO, S.; SANDRI, M.; VALENTINI, F. Mimicking natural bio-mineralization processes: A new tool for osteochondral scaffold development. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 526-535, 2011.

TANAKA, N.; IMAI, K.; OKIMOTO, K.; UEDA, S.; TOKUNAGA, Y. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): In vivo evaluation. **Journal Control Release**, v.112, p. 51-56, 2006.

THARANATHAN, R. N.; PRASHANTH, K. V. H. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.

TOLAIMATE, A.; DESBRIÈDES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VICENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of desacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TUZLAKOGLU, T.; REIS, R. L. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by biomimetic spraying process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 1279-1286, 2007.

URIARTE-MONTOYA, M. H.; ARIAS-MOSCOSO, J. L.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; ROUZAUD-SÁNCHEZ, O.; CARDENAS-LOPEZ, J. L.; et al. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4212–4219, 2010.

URIARTE-MONTOYA, M. H.; SANTACRUZ-HORTEGA, H.; CINCO-MOROYOQUI, F. J.; ROUZAUD-SÁNCHEZ, O.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; EZQUERRA-BRAUER, J. M. Giant squid skin gelatin: Chemical composition and biophysical characterization. **Food Research International**, v. 44, p. 3243-3249, 2011.

VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **Lancet**, v. 354, p. 32–34, 1999.

VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London: Academic Press, 1980. v. 1, p. 113-373.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VIRTO, M.; FRUTOS, P.; TORRADO, S.; FRUTOS, G. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. **Biomaterials**, v. 24, p. 79-87, 2003.

VLIERBERGHE, S. V.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1387–1408, 2011.

WANG, L.; CHUNZHONG, L. Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 740-745, 2007.

WANG, Y.; YANG, C. Biomimetic formation of hydroxyapatite/collagen matrix composite. **Advanced Engineering Materials**, v. 8, p. 97-100, 2006.

YAMAGUCHI, I.; TOKUCHI, K.; FUKUZAKI, H.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; MONMA, H. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. **Journal Biomedical of Materials Research**, v. 55, n. 1, p. 20-27, 2001.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAT, I.; MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, p. 12577–12585, 2005.

ZHANG, L. J.; FENG, X. S.; LIU, H. G.; QIAN, D. J.; ZHANG, L.; YU, X. L.; CUI, F. Z. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. **Materials Letter**, v. 58, p. 719-722, 2004.