UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa De Pós-Graduação Em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica

Isabela do Nascimento Canhas

HIDROGÉIS MULTIPOLIMÉRICOS CONTENDO NANOHIDROXIAPATITA COM POTENCIAL PRÓ-ANGIOGÊNICO E OSTEOGÊNICO: DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE DE MERCADO E PATENTOMETRIA

> Belo Horizonte 2021

Isabela do Nascimento Canhas

HIDROGÉIS MULTIPOLIMÉRICOS CONTENDO NANOHIDROXIAPATITA COM POTENCIAL PRÓ-ANGIOGÊNICO E OSTEOGÊNICO: DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE DE MERCADO E PATENTOMETRIA

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. María Esperanza Cortés

Ficha Catalográfica

C222h Canhas, Isabela do Nascimento

2021 Hidrogéis multipoliméricos contendo nanohidroxiapatita com T potencial pró-angiogênico e osteogênico [manuscrito] : desenvolvimento, análise de mercado e patentometria / Isabela do Nascimento Canhas. 2021.

196 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: María Esperanza Cortés Segura.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química (Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica). Inclui bibliografia.

1. Inovações tecnológicas – Teses. 2. Quitosana – Teses. 3. Polímeros solúveis em água – Teses. 4. , Hidroxiapatita – Teses. 5. Magnésio – Teses. 6. Propriedade intelectual – Teses. 7. Patentes – Teses. 8. Vitamina D – Teses. 9. Neovascularização – Teses. 10. Ossos – Crescimento – Teses. 11. Biofarmacêutica – Teses. I. Cortés Segura, María Esperanza, Orientadora. II. Título.

CDU 043

Elaborada por Sérgio Ferreira da Silva – CRB6-2719.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS Programa de Pós Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 10^a TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E BIOFARMACÊUTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, DA DISCENTE ISABELA DO NASCIMENTO CANHAS, Nº DE REGISTRO 2016752186.

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de março de 2021, às 14 horas, na plataforma on-line Google Meet, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores: Maria Esperanza Cortés do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG (Orientadora), Adriana Abalen Martins Dias do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG, Carlos Alberto Tagliati do Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG, Paulo Afonso Granjeiro da Universidade Federal de São João del-Rei – Campus Centro Oeste, Ângelo Márcio Leite Denadai da Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, para julgamento da Tese de Doutorado em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica - Área de Concentração: Inovação Biofarmacêutica e Biotecnológica, da discente Nascimento Canhas, Tese intitulada: "Hidrogéis multipoliméricos contendo Isabela do nanohidroxiapatita com potencial pró-angiogênico e osteogênico: desenvolvimento, análise de mercado e patentometria". A Presidente da Banca abriu a sessão e apresentou a Comissão Examinadora bem como esclareceu sobre os procedimentos que regem da defesa pública de tese. Após a exposição oral do trabalho pela discente seguida de arguição pelos membros da Banca Examinadora, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da discente e do público, tendo deliberado unanimemente pela sua APROVAÇÃO. Nada mais havendo para constar, lavrou-se e fez a leitura pública da presente Ata que segue assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora e pelo Coordenador do Programa (via Sistema Eletrônico de Informações - SEI). Belo Horizonte, 26 de março de 2021.

Professora Doutora Maria Esperanza Cortés (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professora Doutora Adriana Abalen Martins Dias (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professor Doutor Carlos Alberto Tagliati

(PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professor Doutor Paulo Afonso Granjeiro

(Universidade Federal de São João del-Rei - Campus Centro Oeste)

Professor Doutor Ângelo Márcio Leite Denadai

(Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares)

Professor Doutor Rubén Dario Sinisterra Millán

Coordenador do PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati**, **Membro**, em 29/03/2021, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto nº 10.543, de</u> <u>13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Abalen Martins Dias**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Esperanza Cortes Segura**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/03/2021, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Ângelo Márcio Leite Denadai**, **Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 22:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Afonso Granjeiro**, **Usuário Externo**, em 08/04/2021, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ruben Dario Sinisterra Millan**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/04/2021, às 08:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?</u> <u>acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador **0641139** e o código CRC **EBAAF2F8**.

Referência: Processo nº 23072.215821/2021-33

SEI nº 0641139



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS Programa de Pós Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG

CERTIDÃO Nº 2/2021/ICEX-QUI-UFMG

"HIDROGÉIS MULTIPOLIMÉRICOS CONTENDO NANOHIDROXIAPATITA COM POTENCIAL PRÓ-ANGIOGÊNICO E OSTEOGÊNICO: DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE DE MERCADO E PATENTOMETRIA".

ISABELA DO NASCIMENTO CANHAS, Nº DE REGISTRO 2016752186

Tese Aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:

Professora Doutora Maria Esperanza Cortés (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professora Doutora Adriana Abalen Martins Dias (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professor Doutor Carlos Alberto Tagliati

(PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professor Doutor Paulo Afonso Granjeiro (Universidade Federal de São João del-Rei – Campus Centro Oeste)

Professor Doutor Ângelo Márcio Leite Denadai (Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares)

Belo Horizonte, 26 de março de 2021.

sei!

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati**, **Membro**, em 29/03/2021, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto nº 10.543, de</u>

eletrônica <u>13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Abalen Martins Dias**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Esperanza Cortes Segura**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/03/2021, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Ângelo Márcio Leite Denadai**, **Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 22:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Afonso Granjeiro**, **Usuário Externo**, em 08/04/2021, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ruben Dario Sinisterra Millan**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/04/2021, às 08:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5° do <u>Decreto n° 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?</u> <u>acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador **0641146** e o código CRC **99C3B671**.

Referência: Processo nº 23072.215821/2021-33

SEI nº 0641146

Dedico este trabalho a minha família. É por ela que busco fazer sempre o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

"Tudo o que fizerem, seja em palavra seja em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai" Colossenses, 3:17

Agradeço a Deus, por sua proteção, seu amor misericordioso e sua bondade infinita. Por me dar força, sabedoria e paciência nos períodos mais difíceis. Por cuidar de cada detalhe e fazer de cada obstáculo uma aprendizagem.

A minha mãe, com sua fé inabalável e seu amor incondicional. Por sua dedicação a nossa família, cuidado, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu pai, que mesmo não estando mais conosco, continua sendo meu exemplo de pessoa dedicada ao trabalho e à família. Tenho certeza de que está orgulhoso por eu ter alcançado o sonho acadêmico que sonhamos juntos.

Aos meus irmãos Camila e Hermes e meu cunhado Igor, pelo amor, admiração, cuidado e paciência. Muito obrigada por todos os momentos juntos.

Aos meus amigos queridos Paula, Cibele, Wendel e Sofia, pelas boas conversas, pelos momentos de descontração e apoio.

À Prof.^a Dr^a Maria Esperanza Cortés, por ter aceitado o desafio de orientar uma aluna de outra área e por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa. Muito obrigada pela confiança, pelo carinho, pela paciência e por me apresentar novos caminhos e conhecimentos.

Ao Prof. Dr Rubén Dario Sinisterra, pelos ensinamentos e apoio. Muito obrigada por me receber em seu grupo de pesquisa e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr Marcelo Gomes Speziali, pelas boas discussões, pela disponibilidade e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais – LEMB e do Laboratório 3103, pelo aprendizado, pelo convívio, pelo trabalho em grupo e pelos bons momentos.

A minha amiga e parceira de bancada, Prof.^a Dr^a Alexa Magalhães Dias, por dividir comigo os bons e os maus momentos do doutorado e tornar tudo um pouco mais leve. Muito obrigada por tudo!

A minha amiga Eni C. Rocha, pelo cuidado, consideração e dedicação sempre.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Química, por esses anos de convívio, pela ajuda e pelas boas conversas.

Ao Departamento de Química, pela infraestrutura e suporte.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de pesquisa.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, pelo auxílio no preparo das amostras e na obtenção das imagens. E ao técnico Breno Barbosa por sua ajuda e atendimento atencioso, inclusive durante o período de quarentena.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

"Dubito, ergo cogito, ergo sum" (René Descartes)

RESUMO

As lesões no tecido ósseo possuem grande prevalência na população mundial. Assim, a busca pelo desenvolvimento de biomateriais com excelentes atividades osteogênicas e angiogênicas são desejáveis para acelerar o reparo ósseo. Propriedades pró-angiogênicas e osteogênicas de biomateriais são fundamentais para o reparo ósseo especialmente em situações clínicas nas quais o aporte sanguíneo é diminuído, tais como alvéolo seco ou em pacientes irradiados com complicações decorrentes da terapia antitumoral. Os hidrogéis têm ganhado destaque na engenharia de tecidos, por possuírem propriedades químicas e físicas que facilitam sua aplicação biológica. Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo no Capítulo 1 analisar o papel dos hidrogéis biomédicos nas fronteiras tecnológicas com base no estudo do mercado, cadeia produtiva e avaliação de patentes. A análise patentométrica permitiu descrever o panorama dos hidrogéis biomédicos nas fronteiras tecnológicas. Um recorte foi feito para análise de patentes de hidrogéis aplicados a feridas. Projeções para 2027 estimam que o mercado do hidrogel atinja US\$ 31,4 bilhões, a uma taxa de crescimento anual (CAGR) de 6,7%. O segmento com maior fatia de mercado é o de tratamento de feridas, com 59,28% e o que gerou maior receita foi o de lentes de contato. Os Estados Unidos têm a maior fatia do mercado, são o principal mercado de interesse e país de origem das tecnologias. A Ásia-Pacífico tem despontado no mercado junto com o segmento de higiene, cuidados pessoais e cosméticos. Projeções indicam que os hidrogéis biomédicos atingiram a maturidade e podem crescer por mais 20 anos. Assim, a análise das patentes traz contribuição ao estabelecimento de plataformas que estimulam o uma empreendedorismo e a inovação incremental e descrevem possibilidades para lidar com as transições tecnológicas atuais e futuras. Em seguida, considerando que os melhores efeitos biológicos são obtidos pelo efeito sinérgico das propriedades de hidrogéis naturais propõe-se, no Capítulo 2, o desenvolvimento de hidrogéis multipoliméricos contendo hidroxiapatitas (HA) substituídas com magnésio e vitamina D, visando a avaliação do potencial pró-angiogênico e osteogênico dessas formulações. Dessa forma, as HA pura e substituídas foram sintetizadas, caracterizadas e avaliadas em sua citotoxicidade, apresentando tamanho nanométrico, estabilidade térmica, estrutura macroporosa e carga superficial negativa ou próxima de zero, e não demonstraram citotoxicidade. Logo, foram preparados os hidrogéis à base de guitosana, carboximetilcelulose, HA e vitamina D, associados à gelatina e álcool polivinílico (PVA). Todos os hidrogéis demonstraram estabilidade térmica e a incorporação dos componentes na formulação. As imagens de MEV mostraram morfologia de superfície irregular e poros entre 22-109 µm de diâmetro. Na presença de FCA, os hidrogéis formaram uma camada de apatita sobre a superfície. Os hidrogéis demostraram pH moderadamente alcalino, perfil de liberação continuada de Ca²⁺ e Mg²⁺ e alta capacidade de swelling. Durante a biodegradação, houve swelling e Gel 3 foi o que sofreu maior degradação. Os hidrogéis demonstraram citocompatibilidade e induziram aderência, proliferação celular e aumento da

expressão do óxido nítrico nos pré-osteoblastos MC3T3-E1 e nas células endoteliais EA.hy926. MC3T3-E1 na presença dos hidrogéis formou nódulos de mineralização e tive aumento na produção da fosfatase alcalina, principalmente com Gel 4. Foi possível identificar estruturas tubulares e formatos poligonais característicos da formação de vasos. Assim, os resultados sugerem que os hidrogéis, principalmente, o contendo HA substituídas com magnésio 10, apresentam alto potencial osteogênico e pró-angiogênico. Além disso, a tecnologia do hidrogel biomédico se mostrou aplicável e eficiente, estando inserida no mercado mundial e movimentando diversos segmentos.

Palavras-chave: hidrogel, inovação, patentometria, quitosana, carboximetilcelulose, hidroxiapatita, magnésio, vitamina D, angiogênese, osteogênese

ABSTRACT

Bone tissue injuries are highly prevalent in the world population. Thus, the search for the development of biomaterials with excellent osteogenic and angiogenic activities is desirable to accelerate bone repair. Pro-angiogenic and osteogenic properties of biomaterials are essential for bone repair, especially in clinical situations in which blood supply is reduced, such as dry alveolus or in patients irradiated with complications resulting from antitumor therapy. Hydrogels have gained prominence in tissue engineering, as they have chemical and physical properties that facilitate their biological application. In this scenario, the present study aimed at Chapter 1 to analyze the role of biomedical hydrogels in technological frontiers based on the study of the market, production chain and patent evaluation. Patentometric analysis allowed us to describe the panorama of biomedical hydrogels at technological frontiers. A cutout was made for the analysis of patents for hydrogels applied to wounds. Projections for 2027 estimate that the hydrogel market will reach US \$ 31.4 billion, at a compound annual growth rate (CAGR) of 6.7%. The segment with the largest market share is wound care, with 59.28% and the one that generated the greatest revenue was contact lenses. The United States has the largest market share and are the main market of interest and country of origin of the technologies. Asia-Pacific have emerged in the market together with the segment of hygiene, personal care and cosmetics. Projections indicate that biomedical hydrogels have reached maturity and can grow for another 20 years. The analysis of patents in this area contributes to the establishment of platforms that encourage entrepreneurship and incremental innovation and describe possibilities to deal with current and future technological transitions. Then, considering that the best biological effects are obtained by the synergistic effect of the properties of natural hydrogels, it is proposed, in the Chapter 2, the development of multipolymerics hydrogels containing hydroxyapatites (HA) substituted with magnesium and vitamin D, aiming the evaluation of the pro-angiogenic and osteogenic potential of these. Pure and substituted HA were synthesized, characterized, and had the cytotoxicity tested. They showed nanometric size, thermal stability, macroporous structure and negative or close to zero surface charge and did not demonstrate cytotoxicity. Then, hydrogels based on chitosan, carboxymethylcellulose, HA and vitamin D, associated with gelatin and polyvinyl alcohol, were prepared. All hydrogels demonstrated the same thermal stability and the incorporation of components in the formulation. SEM images showed irregular surface morphology and pores between 22-109 µm in diameter. In the presence of SBF, hydrogels formed an apatite layer on the surface. It was also demonstrated a moderately alkaline pH, a profile of continuous release of Ca²⁺ and Mg²⁺ and high swelling capacity. During biodegradation, swelling was observed, and Gel 3 was the one that suffered the greatest degradation. The hydrogels demonstrated cytocompatibility and induced cell adhesion and proliferation, and increased nitric oxide expression in pre-osteoblasts MC3T3-E1 and endothelial cells EA.hy926. MC3T3-E1 in the presence of hydrogels formed mineralization nodules and had an increase in the production of alkaline phosphatase, mainly with Gel 4. It was possible

to identify tubular structures and polygonal shapes characteristic of tube formation. Thus, the results suggest that the hydrogels, mainly the one containing HA substituted with magnesium 10% and vitamin D, showed osteogenic and pro-angiogenic potential. In addition, the biomedical hydrogel technology proved to be applicable and efficient, being inserted in the world market and moving several segments.

Keywords: hydrogel, innovation, patentometry, chitosan, carboxymethylcellulose, hydroxyapatite, magnesium, vitamin D, angiogenesis, osteogenesis,

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura conceitual para definir e caracterizar o caminho percorrido no			
desenvolvimento de hidrogéis aplicados à área biomédica29			
FIGURA 2. Representação gráfica da análise patentométrica			
FIGURA 3. Evolução do ciclo de vida da tecnologia do hidrogel			
biomédico			
FIGURA 4. Os 20 principais grupos/subgrupos de IPC (Classificação Internacional de			
Patentes) registrados nas patentes obtidas na busca no lens.org			
FIGURA 5. Estrutura química da quitosana65			
FIGURA 6. Estrutura química da carboximetilcelulose67			
FIGURA 7. Estrutura química da gelatina69			
FIGURA 8. Estrutura cristalina da hidroxiapatita72			
FIGURA 9. Estrutura química das vitaminas D2 e D375			
FIGURA 10. Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita82			
FIGURA 11. Preparação dos hidrogéis83			
FIGURA 12. Micrografias de transmissão das HA sintetizadas98			
FIGURA 13. Histogramas de distribuição de comprimento das nanopartículas de HA			
sintetizadas			
FIGURA 14. Histogramas de distribuição de diâmetro das nanopartículas de HA			
sintetizadas			
FIGURA 15. Micrografias de varredura das nanopartículas de HA sintetizadas101			
FIGURA 16. Espectro de EDS das nanopartículas de HA102			
FIGURA 17. Difratograma de raio-X das nanopartículas de HA105			
FIGURA 18. Espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas de			
HA			
FIGURA 19. Curvas TG das nanopartículas de HA108			
FIGURA 20. Isotermas de adsorção e dessorção das nanopartículas de HA110			
FIGURA 21. Citotoxicidade das HA em contato direto com fibroblastos L929112			
FIGURA 22. Citotoxicidade das HA em contato direto com pré-osteoblastos MC3T3.			
FIGURA 23. Citotoxicidade das HA em contato direto com células endoteliais			
EA.hy926113			
FIGURA 24. Espectros de absorção na região de infravermelho dos hidrogéis116			

FIGURA 25. Espectros de absorção na região de infravermelho da vitamina D e dos polímeros: quitosana, carboximetilcelulose, gelatina e álcool polivinílico......117 FIGURA 26. Curvas TG dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D. FIGURA 27. Morfologia dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D. FIGURA 28. Espectros de EDS dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D......122 FIGURA 29. Formação de apatita sobre hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D124 FIGURA 30. Espectros de EDS da formação de apatita sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.125 FIGURA 31. Variação do pH dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina FIGURA 32. Variação do pH dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina FIGURA 33. Liberação de íons Ca²⁺ após imersão dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em água deionizada......129 FIGURA 34. Liberação de íons Mg²⁺ após imersão dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em água deionizada......129 FIGURA 35. Porcentagem de swelling dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D131 FIGURA 36. Perfil de degradação dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4).132 FIGURA 37. Perfil de degradação dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em solução enzimática (PBS/colagenase)132 FIGURA 38. Citotoxicidade indireta dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e FIGURA 39. Citotoxicidade indireta dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em células pré-osteoblásticas MC3T3......135 FIGURA 40. Citotoxicidade indireta dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em células endoteliais EA.hy926.....136 FIGURA 41. Aderência in vitro de células pré-osteoblásticas MC3T3 aos hidrogéis

FIGURA 42. Aderência in vitro de células endoteliais EA.hy926 aos hidrogéis
multipoliméricos contendo HA e vitamina D138
FIGURA 43. Aderência das células MC3T3 sobre os hidrogéis multipoliméricos
contendo HA e vitamina D140
FIGURA 44. Áreas em destaque nas micrografias de aderência das células MC3T3
sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D
FIGURA 45. Aderência das células EA.hy926 sobre os hidrogéis multipoliméricos
contendo HA e vitamina D142
FIGURA 46. Áreas em destaque nas micrografias de aderência das células EA.hy926
sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D
FIGURA 47. Proliferação celular de pré-osteoblastos MC3T3 sobre os hidrogéis
multipoliméricos contendo HA e vitamina D145
FIGURA 48. Proliferação celular de células endoteliais EA.hy926 sobre os hidrogéis
multipoliméricos contendo HA e vitamina D145
FIGURA 49. Atividade da enzima fosfatase alcalina148
FIGURA 50. Estruturas mineralizadas coradas pelo método de Von Kossa150
FIGURA 51. Concentração de óxido nítrico produzida por MC3T3152
FIGURA 52. Concentração do óxido nítrico produzida por EA.hy926152
FIGURA 53. Formação de tubos das células endoteliais EA.hy926 com os hidrogéis
multipoliméricos contendo HA e vitamina D, após 6 horas155
FIGURA 54. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 1, após 24
horas156
FIGURA 55. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 2, após 24
horas157
FIGURA 56. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 3, após 24
horas158
FIGURA 57. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 4, após 24
horas159
FIGURA 58. Distribuição do número de tubos formados pelas células endoteliais
EA.hy926 em contato com eluato dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e
vitamina D159

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais empresas atuantes no mercado do hidrogel e seus produtos
comerciais e aplicações26
TABELA 2. Escalas TRL (Nível de Maturidade Tecnológica) simplificadas usadas para
avaliação de tecnologias biomédicas40
TABELA 3. Tecnologias de hidrogel biomédico aplicado ao tratamento, cuidado e
cicatrização de feridas42
TABELA 4. Classificação dos hidrogéis baseada em suas características63
TABELA 5. Abreviação das HA sintetizadas82
TABELA 6. Composição dos hidrogéis preparados84
TABELA 7. Relação Ca / P e relação (Ca + dopante) / P calculada a partir dos dados
fornecidos pelo EDS102
TABELA 8. Substituição teórica e experimental de acordo com os dados fornecidos
por absorção atômica103
TABELA 9. Parâmetros da rede das amostras de HA, incluindo os parâmetros de rede
a, c, volume da célula unitária (V), tamanho médio do cristalito (D) e grau de
cristalinidade (Xc)105
TABELA 10. Perda de massa das HA observada em curvas TG108
TABELA 11. Valores de carga superficial das HA109
TABELA 12. Área superficial das HA obtida pelo método de BET111
TABELA 13. Perda de massa dos hidrogéis observadas nas curvas TG119
TABELA 13. Melhores resultados em cada experimento 162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAGR Taxa de crescimento anual composta
- CMC Carboximetilcelulose
- DMEM Meio de cultura Dulbecco's Modificado Eagle Medium
- EA.hy926 Célula endotelial da linhagem da veia umbilical humana
- EDS Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
- EUA Estados Unidos da América
- FCA Fluido Corporal Artificial
- FTIR Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
- HA Hidroxiapatita
- IPC Classificação Internacional de Patentes
- Mg Magnésio
- MET Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- PBS Solução Tampão de Fosfato
- PCL Poli (ɛ-caprolactona)
- PCT Tratado de Cooperação de Patentes
- PEG Polietilenoglicol
- PVA Álcool Polivinílico
- PVP Polivinilpirrolidona
- TRL Nível de Maturidade Tecnológica
- SBF Soro Fetal Bovino
- TG Termogravimetria
- VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1.	INTRO	DUÇÃO	19
2.	CAPÍTI	JLO 1 – Hidrogéis biomédicos: mercado, cadeia produtiva e pater	ntometria
			22
2	2.1. Introd	lução	22
2	2.2. O me	rcado para produtos à base de hidrogel biomédico	23
2	2.3. Cade	ia produtiva do hidrogel	27
2	2.4. Patei	ntometria	32
	2.4.1.	Origem das tecnologias	32
	2.4.2.	Mercado de interesse	34
	2.4.3.	Análise da série temporal e previsão tecnológica	35
	2.4.4.	Áreas de concentração tecnológica	40
	2.4.5.	Patentes: Hidrogéis para tratamento, cuidado e cicatrização d	le feridas
			41
2	2.5. Disc	ussão	46
2	2.6. Conc	lusão	48
2	2.7. Refe	rências bibliográficas	50
3.	CAPÍTI	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos	contendo
3. hid	CAPÍTU Iroxiapati	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-anç	contendo giogênico
3. hid e c	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co	contendo giogênico 61
3. hid e c	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral	contendo giogênico 61 61
3. hid e c 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral ivos específicos	contendo giogênico 61 61 61
3. hid e c 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co tivo Geral tivos específicos ão da literatura	contendo giogênico 61 61 61
3. hid e c	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral ivos específicos ão da literatura Hidrogel	contendo giogênico 61 61 61 62 62
3. hid 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral. ivos específicos. ão da literatura Hidrogel Quitosana	contendo giogênico 61 61 61 62 62 62
3. hid e c : : :	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.2. 3.3.3.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral. ivos específicos. ão da literatura Hidrogel Quitosana Carboximetilcelulose.	contendo giogênico 61 61 61 62 62 64 64
3. hid e c 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.2. 3.3.3. 3.3.4.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral. ivos específicos. ão da literatura Hidrogel Quitosana Carboximetilcelulose. Gelatina	contendo giogênico 61 61 62 62 62 64 64 68
3. hid 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.2. 3.3.4. 3.3.5.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral ivos específicos ão da literatura Hidrogel Quitosana Carboximetilcelulose Gelatina Álcool polivinílico	contendo giogênico 61 61 62 62 62 64 64 68 68 70
3. hid 3 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.2. 3.3.4. 3.3.4. 3.3.5. 3.3.6.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral ivos específicos ão da literatura Hidrogel Quitosana Gelatina Álcool polivinílico Hidroxiapatita	contendo giogênico 61 61 62 62 62 64 64 64 64 64 61
3. hid 3 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. 3.3.4. 3.3.5. 3.3.6. 3.3.7.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos e ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co ivo Geral ivos específicos	contendo giogênico 61 61 62 62 62 64 64 64 64 64 70 71 73
3. hid 3 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. 3.3.4. 3.3.5. 3.3.6. 3.3.7. 3.3.8.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co 	contendo giogênico 61 61 62 62 62 62 64 64 64 64 64 70 71 73 74
3. hid 3 3 3 3	CAPÍTU Iroxiapati osteogêni 3.1. Objet 3.2. Objet 3.3.Revis 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. 3.3.4. 3.3.5. 3.3.6. 3.3.7. 3.3.8. 3.3.9.	JLO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos d ta substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-ang co civo Geral tivos específicos	contendo giogênico 61 61 62 62 62 62 64 64 64 64 70 71 71 73 74 76

3.4. Materiais e métodos	80
3.4.1. Materiais	80
3.4.2. Métodos	81
3.4.2.1. Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita pelo método o	la co-
precipitação	81
3.4.2.2. Preparação do hidrogel	83
3.4.2.3. Caracterização físico-química das hidroxiapatitas e dos hidroge	éis.85
3.4.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	85
3.4.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	85
3.4.2.3.3. Espectroscopia de absorção atômica	86
3.4.2.3.4. Difração de raio-X (DRX)	86
3.4.2.3.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelh	o por
transformada de Fourier (FT-IR)	87
3.4.2.3.6. Análise Térmica	88
3.4.2.3.7. Isoterma de adsorção e área superficial	88
3.4.2.3.8. Espalhamento de luz eletroforético	88
3.4.2.3.9. Medida de pH	89
3.4.2.3.10. Teste de liberação de íons	89
3.4.2.3.11. Teste de <i>Swelling</i>	90
3.4.2.3.12. Biodegradação <i>in vitro</i>	90
3.4.2.3.13 Capacidade de formação da apatita	91
3.4.2.4. Estudos <i>in vitro</i>	91
3.4.2.4.1. Cultivo de células	91
3.4.2.4.2. Citotoxicidade	91
3.4.2.4.3. Teste de adesão e morfologia celular	93
3.4.2.4.4. Teste de proliferação	93
3.4.2.4.5. Teste de fosfatase alcalina	94
3.4.2.4.6. Ensaio da produção de nódulos de mineralização por colo	vração
pelo método Von Kossa	95
3.4.2.4.7. Concentração do óxido nítrico	95
3.4.2.4.8. Teste de formação de vasos	96
3.4.2.4.9. Análises estatísticas dos dados	96
3.5. Resultados e Discussão	97
3.5.1. Caracterização físico-química das hidroxiapatitas	97

3.5.1.1. Morfologia e distribuição de tamanho das partículas	97		
3.5.1.2. Morfologia da superfície e análise suplementar			
3.5.1.3. Difração de raio-X	104		
3.5.1.4. Espectroscopia de absorção na região do in	ıfravermelho com		
transformada de Fourier (FT-IR)	106		
3.5.1.5. Análise térmica	107		
3.5.1.6. Potencial Zeta	109		
3.5.1.7. Isoterma de adsorção e área superficial	110		
3.5.2. Citotoxicidade das hidroxiapatitas	111		
3.5.3. Caracterização físico-química dos hidrogéis	115		
3.5.3.1. Espectroscopia de absorção na região do in	nfravermelho com		
transformada de Fourier (FT-IR)	115		
3.5.3.2. Análise térmica	118		
3.5.3.3. Morfologia dos hidrogéis	120		
3.5.3.4. Formação de apatita	123		
3.5.3.5. Teste de pH	126		
3.5.3.6. Liberação de íons	128		
3.5.3.7. Swelling	130		
3.5.3.8. Biodegradação <i>in vitro</i>	132		
3.5.4. Testes biológicos <i>in vitro</i> dos hidrogéis	134		
3.5.4.1. Citotoxicidade dos hidrogéis	134		
3.5.4.2. Aderência celular	137		
3.5.4.3. Proliferação celular	144		
3.5.4.4. Atividade da fosfatase alcalina	147		
3.5.4.5. Mineralização pelo método Von Kossa	149		
3.5.4.6. Expressão do óxido nítrico	151		
3.5.4.7. Formação de vasos	154		
3.6. Resumo dos resultados	161		
3.7. Conclusão e Perspectivas futuras	163		
3.8. Referências bibliográficas164			

1. INTRODUÇÃO

A população mundial vivencia uma transição no perfil demográfico com o aumento da expectativa de vida da população e a redução das taxas de mortalidade e natalidade (WHO, 2016). Com o aumento da longevidade da população aumenta a prevalência de morbidades em idosos. Este cenário resulta em impacto significativo no setor de saúde (KERNKAMP *et al.*, 2016). A demanda por biomateriais que auxiliem nos tratamentos e cuidados com a saúde movimenta o mercado do setor.

Os biomateriais podem ser naturais ou sintéticos e são usados em aplicações médicas para apoiar, melhorar ou substituir o tecido danificado ou uma função biológica (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). O mercado mundial de biomateriais está projetado para alcançar 250 bilhões de dólares até 2026, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 14% entre 2020 e 2026 (MI, 2020). Em vista dos números mundiais, o mercado brasileiro encontra-se mais aquecido e em crescente demanda. Estima-se que em 2016 movimentou mais de 1,89 bilhões de dólares e deverá atingir acima de 5,18 bilhões dólares em 2022. Um crescimento de mais de 18% entre 2017 e 2022 (ZMR, 2017).

A necessidade de produtos cada vez mais bioinertes, biocompatíveis e bioativos tem ampliado as oportunidades de pesquisa e mercado. Neste sentido, os biomateriais cerâmicos e poliméricos vêm mostrando bons resultados em engenharia de tecidos e medicina regenerativa (BOSE *et al.*, 2013; DENRY; KUHN, 2016; THORPE *et al.*, 2016). A pesquisa de biomateriais está progredindo em direção a biomateriais inteligentes e seu mimetismo dos ambientes biológicos naturais está melhorando continuamente (SERBAN, 2016).

Em medicina regenerativa, os hidrogéis têm se destacado devido à composição e semelhanças estruturais à matriz extracelular e sua extensa estrutura para proliferação e sobrevivência celular (SLAUGHTER *et al.*, 2009). Na engenharia de tecido ósseo, os hidrogéis têm mostrado resultados promissores (TRIPATHI *et al.*, 2012), principalmente quando há a associação de polímeros, cerâmicas e moléculas bioativas que auxiliam no reparo tecidual (DUMONT *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2013; LAURENCIN; KHAN; EL-AMIN, 2006; PETER *et al.*, 2010). Dentre eles destacam-se os hidrogéis contendo quitosana, carboximetilcelulose (CMC), gelatina e álcool

polivinílico (PVA), que possuem propriedades biológicas de grande interesse na indústria e para aplicações em regeneração tecidual.

Os biomateriais desenvolvidos e melhorados por nanotecnologia são centrados em um grande número de nanoestruturas com propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas aperfeiçoadas (YANG, 2015). Dentre os quais destacamos os fosfatos de cálcio como as hidroxiapatitas (HA) (Ca₁₀(PO₄)₆OH₂), que possuem a capacidade de mimetizar a composição mineral da dentina e dos ossos estimulando a regeneração, ao passo que podem também servir como carreadoras de fármacos (RAMÍREZ-AGUDELO *et al.*, 2018).

O reparo de grandes defeitos ósseos é um desafio aos profissionais da traumatologia (FINKEMEIER, 2002), uma vez que a reparação óssea natural é limitada a pequenos defeitos e, portanto, nos casos em que grandes secções de osso precisam ser reparadas ou substituídas, implantes são necessários para auxiliar o processo natural de mineralização óssea (LAURENCIN; KHAN; EL-AMIN, 2006). Entretanto para que o reparo aconteça, a formação óssea depende de adequado suprimento vascular com os osteoblastos exercendo suas atividades nas regiões adjacentes aos vasos sanguíneos, onde a elaboração de tecido ósseo altamente organizado requer uma superfície mecanicamente estável (LI *et al.*, 2016). Com isso percebe-se que a angiogênese é um componente fundamental do reparo ósseo.

Angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas (DAMICO, 2007). Carano e Filvaroff (2003) afirmam que a osteogênese e a angiogênese são intimamente conectadas e demonstram que os fatores que estimulam a osteogênese também estimulam a angiogênese, de forma direta e indireta.

Portanto, este trabalho tem como proposição a utilização da nanotecnologia para o desenvolvimento de matrizes poliméricas híbridas que funcionem sinergicamente associadas à biocerâmica hidroxiapatita e vitamina D, resultando em hidrogéis bioativos com melhores propriedades mecânicas e biológicas que possam estimular a regeneração óssea e a revascularização em distúrbios ósseos e odontológicos patológicos.

Contudo, acredita-se que, para que a produção de biomateriais chegue ao mercado, contribuindo para a geração de renda, é necessário da compreensão do desenvolvimento da tecnologia e do produto, envolvendo principalmente as demandas

do mercado, a viabilidade econômica e o valor agregado aos pacientes (BAYON *et al.*, 2015). Um maior número de estudos de mercado e prospecção de produtos com biomateriais clínicos devem ser conduzidas para ampliar às perspectivas clínicas e científicas. O caminho da inovação percorre desde a matéria-prima até produto final, sendo carregado de etapas e grandes desafios: custos, propriedade intelectual, acordos legais, implicações regulatórias, desenho de estudos clínicos, validação dos protótipos, produção e mercado (BAYON *et al.*, 2015; SERBAN, 2016).

O direcionamento da inovação para o mercado deve se basear na criatividade acadêmica e na disciplina de desenvolvimento de produto específico da indústria. Mais importante ainda, além do foco no sucesso comercial, a ênfase do desenvolvimento do produto, especificamente para a terapêutica, deve estar no avanço de produtos seguros e eficazes para o paciente (SERBAN, 2016).

Tendo em vista essa visão ampla da produção, mercado e grau de maturidade da tecnologia de hidrogéis com potencial pró-angiogênico e osteogênico para o reparo ósseo, a presente tese é apresentada em dois capítulos. No Capítulo 1, relata-se uma análise do papel dos hidrogéis biomédicos nas fronteiras tecnológicas com base no estudo do mercado, da cadeia produtiva e de patentes para conhecer o ambiente de mercado no qual está inserido, bem como as perspectivas de mercado e desenvolvimento, e no Capítulo 2, hidrogéis multipoliméricos associados a nanopartículas de hidroxiapatita com magnésio e vitamina D foram desenvolvidos e testados.

CAPÍTULO 1 – Hidrogéis biomédicos: mercado, cadeia produtiva e patentometria

2.1. Introdução

Inovações associadas a polímeros com o propósito de aplicação biomédica permitiram o desenvolvimento de importantes usos ao longo dos anos [1]. Os polímeros estão presentes em quase todas as coisas que usamos e seu uso tem se destacado neste sentido e sido alvo de inúmeros estudos [2–6]. Alguns polímeros são denominados como inteligentes pela capacidade de responder a estímulos externos como temperatura, luz e pH. A inclusão de materiais inteligentes confere propriedades multifuncionais aos hidrogéis e faz com que seu desenvolvimento e design inovador ditem novas tendências no campo de pesquisa de biomateriais [7]. A composição dos hidrogéis e estrutura mimetizadora da matriz extracelular estimulam seu uso nas pesquisas, visto que propiciam a proliferação e sobrevivência celular [8], resultando em melhor harmonia entre material e tecido vivo.

No mercado atual, dispositivos que utilizam a tecnologia do hidrogel como base ou parte do produto incluem géis de tratamento cutâneo e ocular, lentes de contato, medicamentos via oral, aplicações cosméticas, dentre outros [9]. O crescente conhecimento sobre os componentes dos hidrogéis, suas interações e propriedades faz com que eles sejam cuidadosamente projetados para atender às demandas industriais e clínicas. Aliado a isso, as formas de abordagens (injetáveis, nanoparticuladas, tridimensionais (3D), em filme, rede dupla e impressão 3D) agregam diferentes formas de utilização adequando o produto para cada necessidade [7].

Assim como qualquer outra tecnologia, os hidrogéis também apresentam limitações, principalmente em suas propriedades mecânicas, que podem restringir seu uso prático [10]. Mas dentre as tecnologias atuais na área biomédica, os hidrogéis têm um espaço insubstituível por causa de suas características singulares, que mimetizam propriedades de tecidos do corpo. O hidrogel tem ganhado cada vez mais espaço, abrangendo um mercado extenso. Para suprir essa crescente demanda, as pesquisas sobre hidrogéis para aplicação biomédica têm progredido em direção a biomateriais inteligentes, eficientes e cada vez mais inovadores [11].

22

A inovação em hidrogéis compreende tanto o desenvolvimento de soluções de materiais de alta tecnologia para aplicações técnicas, quanto o de materiais bioativos para aplicações médicas [12]. De maneira geral, o que torna possível um processo de inovação é o desenvolvimento de uma imagem integrada de todas as suas etapas [13]. Mas para que a inovação seja bem-sucedida, tais inovações não devem ser vistas apenas por uma perspectiva clínica ou científica. O processo deve ter como objetivo a proposta de valor para o consumidor final, seja ele um médico/hospital ou o próprio paciente [14].

Este capítulo tem como objetivo analisar o papel dos hidrogéis aplicados à área biomédica nas fronteiras tecnológicas com base no estudo do mercado, cadeia produtiva e avaliação retrospectiva dos depósitos de patentes nos últimos anos. Foi obtida uma fotografia panorâmica do campo tecnológico envolvendo hidrogéis biomédicos através da análise patentométrica.

2.2. O mercado para produtos à base de hidrogel biomédico

O hidrogel tem ganhado cada vez mais espaço em terapias e tratamentos, abrangendo um mercado extenso com força significativa. Dentre as principais áreas de aplicação biomédica estão cuidado/tratamento de feridas, sistemas de liberação de drogas, lentes de contato e aplicações oftalmológicas, engenharia de tecidos e, cuidados pessoais e higiene.

O mercado global do hidrogel está em expansão e foi estimado em US\$ 15,6 bilhões em 2016 e US\$ 16,5 bilhões entre 2017 e 2022, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,3%, sendo o consumo de produtos de higiene e cuidados pessoais um dos fatores mais significativos que impulsionam o crescimento do mercado neste período [15]. Projeções para 2027 estimam que o mercado atinja US\$ 31,4 bilhões, a uma CAGR de 6,7% [16].

O mercado de hidrogéis é estudado por segmentos que são baseados por tipo de matéria-prima, composição, forma, aplicação e região [16–18]. As projeções mostram que hidrogéis que utilizam como matéria-prima os polímeros sintéticos tais como polietilenoglicol (PEG), poli (hidroxi-metil metacrilato), poliacrilato e poli (ε-caprolactona) (PCL), geram maior valor agregado em relação aos hidrogéis de polímeros naturais como ágar, sulfato de condroitina e quitina, por exemplo

[16,17,19,20]. Os hidrogéis de polímeros sintéticos normalmente apresentam estruturas bem definidas e estáveis que auxiliam em sua degradabilidade e flexibilidade [21], sendo estes comumente usados em uma série de aplicações biomédicas, incluindo matrizes para liberação controlada de biomoléculas e scaffolds para medicina regenerativa. Hidrogéis de polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA) em sua composição se destacam por terem boas propriedades mecânicas, elasticidade, aplicação versátil e baixo custo de produção [16,19,22,23].

Ainda dentro das propriedades físico-químicas dos hidrogéis, os hidrogéis de estrutura semicristalina são os que mais se destacam e devem manter sua liderança no mercado global, com crescimento estimado em mais de 50% até 2027 [16]. Os hidrogéis semicristalinos possuem regiões amorfas e cristalinas que proporcionam estruturas mecanicamente fortes e altamente elásticas com capacidade superabsorvente, propriedade extremamente útil na indústria de curativos para úlceras causadas por pressão, úlceras venosas de perna e feridas pós-operatórias, além de produtos para higiene [16,24].

Em 2016, os hidrogéis usados em curativos representaram 59,28% do mercado de hidrogéis biomédicos, abrangendo curativos para feridas, úlceras, lesões, queimaduras etc [25]. Muito usado em curativos, o segmento de hidrogéis em filmes e matrizes vem liderando o mercado [16,26]. Os filmes de hidrogel são usados como membranas ou revestimentos e podem compor dispositivos biológicos, normalmente aplicados na cicatrização de feridas, administração de drogas, membranas antiadesivas, reconstrução de tecidos moles e cultura de células [21].

De modo geral, são os setores de saúde e farmacêutico que mais têm movimentado o mercado do hidrogel, sobressaindo às indústrias alimentícia, química, têxtil e agricultura [15,16]. O aumento da renda disponível dos consumidores e o aumento da aplicabilidade dos hidrogéis no setor de saúde são fatores que influenciaram o crescimento do mercado de hidrogel. Dentre os produtos de hidrogel, o mais consumido e com maior receita no ano de 2019 foram as lentes de contato, cujas vendas totalizaram USD \$16 bilhões [16,27]. Desenvolvidas na década de 1960, a partir do polímero poli (2-hidroxietil metacrilato), as lentes de contato foram aperfeiçoadas, adequando os usos e necessidades aos produtos: novos polímeros, sistemas de liberação de drogas para tratamento de condições oftalmológicas, uso

cosmético/estético, alta transparência, permeabilidade à água e oxigênio, maleabilidade e conforto ao usar [28].

As projeções mostram que o segmento de higiene, cuidados pessoais e cosméticos vêm crescendo continuamente desde 2017, tendo sido responsável pelo crescimento do mercado de hidrogel em países emergentes como China, Índia, Brasil e África do Sul [17,29,30]. O segmento de higiene, cuidados pessoais e cosméticos representa uma grande força no motor da indústria mundial. É esperado que o mercado cresça 3,5% ao ano e que o segmento domine o mercado de hidrogel até 2024 [30].

Os Estados Unidos são o principal mercado do hidrogel, entretanto, com o rápido crescimento dos países da Ásia-Pacífico (China, Japão, Coreia do Sul e Índia), é esperado que eles apresentem uma CAGR maior que a prevista para o mercado mundial e, possivelmente, passem a liderar o mercado [16,17,30]. Na Ásia-Pacífico, a China é o principal mercado do hidrogel. Um número crescente de fabricantes de cosméticos nacionais e internacionais tem impulsionado significativamente o setor [30].

O mercado global do hidrogel é liderado por grandes indústrias nos setores de saúde e produtos químicos/farmacêuticos. As principais empresas atuantes em hidrogéis biomédicos, assim como seus produtos comerciais e áreas de aplicação estão listadas na Tabela 1. Muitas destas empresas conseguiram identificar espaço e oportunidade para crescimento e se destacam como grandes inovadoras no ramo da biotecnologia.

Os dados da tabela traduzem em parte o mercado do hidrogel biomédico. Dentre as 30 principais empresas atuantes, mais de 50% são originárias dos Estados Unidos, país com a maior fatia do mercado. Algumas empresas são europeias e as empresas asiáticas estão adentrando ao mercado. A maior parte dos produtos que estão no mercado são voltados para cuidados de feridas e os produtos de higiene, cuidados pessoais e cosméticos aos poucos vem ganhando espaço. Produtos de sucesso como as lentes de contato Dailies Total1 da Alcon e Acuvue da Jonhson & Jonhson's, por exemplo, representam grande parte do mercado [27], e aparecem dentre os principais produtos de hidrogéis biomédicos.

		e aplicações.	,
Empresa	País de Origem	Produtos	Areas de aplicação do hidrogel
3M Health Care	US	Tegaderm™	Tratamento de feridas
Johnson & Johnson	US	ACUVUE®Brand Contact Lenses Neutrogena MaskiD™ Neutrogena® Hydro Boost Hydrogel Mask Evolence®	Lentes de contatos – Cuidados com visão Cuidados com pele Liberação de drogas Cosméticos
ConvaTec Group	UK	DuoDerm®Gel Hidroactive SAF Gel® Granugel ®	Tratamento de feridas Produtos de higiene
Derma Sciences	US	Medihoney® Hydrogel	Tratamento de feridas Cuidados com pele
Smith & Nephew United	UK	Intrasite™ Gel	Tratamento de feridas Cuidados com pele substitutos Curativos cirúrgicos
Hollister, Inc.	US	Restore® Hydrogel	Curativos para feridas
Axelgaard Manufacturing Co	US	AmGel®	Tratamento de feridas Cuidados com pele Curativos cirúrgicos Dispositivos médicos Monitoramento de saúde
Coloplast	Denmark	Purilon® Woun'Dres®	Curativos para feridas
Hartmann Group	Germany	Hydrosorb®	Curativos para feridas
Medtronic (Covidien)	US	Veriset [™] PolyHesive [™] II hydrogel Parietene [™] Duatene [™] ProGrip [™] Parietex [™] Simbotex [™] Versatex [™] Activent® Microgel®	Tratamento de feridas Cuidados com pele (substitutos) Monitoramento de saúde
Molnlycke Health Care	Sweden	Mepilex® Normlgel® Ag Mepore®	Tratamento de feridas
Ocular Therapeutix, Inc	US	Dextenza® ReSure® Sealant	Liberação controlada Liberação de drogas Implante ocular cirúrgico
Ambu S/A	Denmark	Ambu® Neuroline	Monitoramento de saúde
Medline Industries Inc.	US	Ultrasorbs™ AP	Produtos de higiene Cuidados pessoais
Cardinal Health, Inc	US	Cardinal Health™ Hydrogel Kendall™	Tratamento de feridas Curativos para feridas
B. Braun Melsungen	Germany	Askina® Transorbent®	Curativos para feridas
Royal DSM	Netherlands	VitroStealth®	Lentes de contato – Cuidados com visão

TABELA 1. Principais empresas atuantes no mercado do hidrogel e seus produtos comerciais e aplicações.

Empresa	País de Origem	Produtos	Áreas de aplicação do hidrogel
Dow Corning Co	US	DOWSIL™	Cuidados pessoais e com beleza
Kinetic Concepts, Inc - KCI™ (3M- Acelity)	US	NuGel® NuDerm®	Tratamento de feridas
Coopervision Inc.	US	Avaira® Biofinity® MyDay® clariti® 1 day	Lentes de contato
MPM Medical	US	SilverMed Antimicrobial Hydrogel CoolMagic Hydrogel Excel-Gel Hydrogel GelPad®Hydrogel Regenecare®	Tratamento de feridas Curativos para feridas
Ноуа	Japan	Hoya Hard Hoya MultiView Pleno	Lentes de contato
Zhuhai Guojia Nwe Material Co	China	Eye and facial mask Gel Patch Cooling Gel Patch Fever Reducing	Cuidados com pele – Cosméticos Alívio da dor
Wuhan Huawei Technology Co	China	Infrared Pain Relief Patch Wound dressing	Tratamento de feridas Tratamento de queimaduras Alívio da dor
Ganzhou Yafo Bio-Medical Material Co	China	Yafor Hydrophilic Cooling Gel Patch Cooling Gel Patch Fever Reducing Patch	Alívio da dor
Integra Lifescience	US	DuraSeal® Exact Spine Sealant System MediHoney® Wound & Burn Dressing	Curativos para feridas Curativos para queimaduras Engenharia de tecidos
GlaxoSmithKline	UK	Voltaren Gel® Voltadol®	Liberação de drogas
ThermoFisher Scientific	US	AlgiMatrix®	Engenharia de tecidos
Skin Republic	KR	Collagen Hydrogel Mask	Liberação de drogas Cuidados com pele
Alcon	US	Dailies Total1 Air Optix® Aqua	Lentes de contato Cuidados com visão Cirurgia

Fonte: A autora, 2020

2.3. Cadeia produtiva do hidrogel

O caminho para se colocar um hidrogel no mercado, da ideia conceitual ao produto final, é carregado de etapas e grandes desafios que perpassam questões financeiras, legais e regulatórias [14].

A Figura 1 apresenta o caminho percorrido no desenvolvimento de hidrogéis e ressalta as duas grandes fases envolvidas no processo de inovação na área biomédica. A primeira se divide em duas etapas: (1) pré-invenção, onde se enquadram pesquisa básica e propriedade intelectual; e (2) pós-invenção, na qual se desenvolvem pesquisa avançada, relações corporativas, processos regulatórios, mercado e produto final. A segunda é mais detalhada e analítica, e se divide em três etapas: (1) avaliação das necessidades e desenvolvimento de conceitos, onde há a identificação das demandas do mercado e a seleção das ideias; (2) criação de valor, onde pesquisa e desenvolvimento avançam com estudos pré-clínicos e primeiros protótipos testados, e onde o conceito corporativo/industrial se estabelece; (3) lançamento do produto no mercado, com finalização dos testes clínicos e produto final aprovado pelas agências regulatórias. Na segunda fase, as análises estratégicas, que incluem propriedade intelectual, aprovação das agências regulamentares e análises de mercado, estão presentes em todas as etapas.

Os processos observados no caminho da inovação para hidrogéis biomédicos são comuns a todos os produtos e tecnologias relacionados à saúde. Mas a cadeia produtiva de cada biomaterial vai diferir desde os tipos de instalações necessárias, equipamentos, logística, mão de obra, obtenção de matéria-prima, etapas da produção até o produto.

Analisando especificamente a cadeia de produção de hidrogéis, pontos básicos precisam ser ressaltados. Hidrogéis à base de polímeros naturais, por exemplo, seguem rotas diferentes daqueles à base de polímeros sintéticos. Os polímeros naturais podem ser derivados de algas, vegetais, animais e fungos, e precisam ser extraídos, processados e depois aplicados ao material. Polímeros sintéticos, como o próprio nome diz, são sintetizados pela indústria, e após processamento são aplicados ao material [19,23,31,32]. A partir desse ponto, a cadeia de produção pode ser seguir rotas até similares para a formação dos hidrogéis, processos de controle de qualidade e testes.



FIGURA 1. Estrutura conceitual para definir e caracterizar o caminho percorrido no desenvolvimento de hidrogéis aplicados à área biomédica.

Para elucidar o processo, serão apresentados alguns pontos da cadeia de produção de hidrogéis dos polímeros naturais quitina e quitosana.

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante da natureza [33]. Ela pode ser extraída da parede celular de fungos e do exoesqueleto de insetos e crustáceos, e baseado numa análise de todas as suas potenciais fontes, estima-se que os recursos disponíveis desse polímero sejam de 100 bilhões de toneladas por ano [33,34]. Devido à sua insolubilidade, a quitina tem uma limitação em suas aplicações, então a partir dela obtém-se a quitosana, polímero bioativo com várias propriedades físico-químicas e biológicas com ampla aplicação em alimentos, agricultura, medicina, farmácia, tratamento de água [35–37].

A cadeia produtora de quitina/quitosana tem usado cada vez mais os exoesqueletos de frutos do mar para extração dos polímeros, como forma de aproveitamento dos resíduos da cadeia de produção de alimentos. É uma forma de aplicar os princípios sustentáveis da química verde, gerando menos impacto ambiental [32,38]. Para extração inicial da quitina, a partir de crustáceos, segue-se os processos de limpeza e pulverização das cascas, desmineralização, desproteinização

e descolorização. Quando a quitina é obtida faz-se a desacetilação para chegar até a quitosana [32,35,36].

Os estudos de mercado de quitina/quitosana mostram que a demanda global por quitina em 2015 era de 60.000 toneladas, enquanto que a produção global era de apenas 28.000 toneladas [36,39]. Japão, Estados Unidos da América (EUA) e China são os maiores produtores, consumidores e pesquisadores de quitina/quitosana, mas os polímeros também são produzidos, ainda que em menor escala, na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil [40]. O mercado de quitina/quitosana é bastante atrativo e estima-se que o mercado global da quitosana atinja USD \$4,7 bilhões em 2027, com uma CAGR de 14,5%. A Ásia-Pacífico tem a maior fatia do mercado de quitina/quitosana, e com o rápido crescimento industrial de China e Índia, espera-se um aumento correspondente na CAGR [39].

O preço da quitina e de seus derivados pode variar entre 1-1000 USD / kg de produto. Em média, o preço da quitina é em torno de 3-6 USD / kg. O preço da quitosana depende da qualidade do produto, dado principalmente pelo seu grau de desacetilação, solubilidade em água, viscosidade, peso molecular e pigmento residual, mineral e proteína. Sendo o preço médio da quitosana de alta qualidade 35-100 USD / kg [41,42]. Goméz-Río, Barreza-Zapata e Ríos-Estepa (2017) avaliaram custos de processos de produção de quitosana envolvendo a produção de quitina como primeira parte do processo. Levando em consideração custos com: materiais, embalagens, mão de obra, energia elétrica e serviços públicos, custo total de produção e custo operacional total, por quilo de quitosana produzida são gastos entre USD 18.000-20.000.

Muñoz *et al.* (2018) fizeram um levantamento das cadeias de produção da quitosana. Nesta avaliação do ciclo de vida da produção da quitosana, eles apresentaram dados reais de empresas produtoras. Uma das empresas, a indiana Mahtani, é produtora de quitosana para aplicação geral, com produção anual de cerca de 50 toneladas/ano [35]. A matéria-prima usada são cascas de camarão, retiradas diretamente do mar Arábico e transportadas para a empresa, onde ocorre a extração da quitina e da quitosana. Os processos utilizam ácido clorídrico (HCI) e hidróxido de sódio (NaOH), e geram resíduos, que são tratados e descartados. Outros resíduos como as proteínas são reciclados como fertilizantes, e os sais de cálcio são usados como preenchimento de asfalto [35]. Para todos esses processos, são contabilizadas

as quantidades, os usos, a influência em outras cadeias produtivas e os impactos econômicos e ambientais gerados.

As cadeias produtivas de quitina e quitosana usadas para aplicação biomédica são potencialmente mais complexas, uma vez que demandam produtos de alta qualidade e altíssimo rigor nos controles de qualidade. Além disso, sua produção gera mais impactos no meio ambiente, resultando em alto consumo de água, alta produção de resíduos e em alterações climáticas [35].

Após extração e processamento, os polímeros estão prontos para serem utilizados nos hidrogéis. Os hidrogéis de quitosana são aplicados em diversas áreas da medicina como, por exemplo, angiogênese [43], engenharia de tecidos [44], regeneração óssea e de cartilagem [45,46], liberação de drogas [5] e tratamento de ferida [47].

As metodologias de preparo de hidrogéis à base de quitina e quitosana são inúmeras e variam de acordo com a finalidade do gel. Os hidrogéis podem seguir dois tipos de rotas de síntese: química, que estabelece ligações covalentes entre as cadeias poliméricas intermediadas por agente químico; ou física, que estabelece interações físicas não covalentes [32,48]. A maior parte dessas metodologias utilizam agentes reticulantes e solventes tóxicos, que não são ambientalmente amigáveis ou saudáveis, principalmente na aplicação médico-farmacêutica. Algumas alternativas sustentáveis sugerem preparações de hidrogéis nos quais sejam reciclados produtos dos processos de extração tanto da quitina quanto da quitosana, uso de ecosubstitutos, fontes alternativas de calor e uso de agentes reticulantes naturais [32].

Martínez-Ruano *et al.* (2019) simularam o processo de produção de um hidrogel biomédico à base de quitosana em larga escala. Para isso, utilizaram um software de simulação, tendo como base a metodologia do hidrogel desenvolvido por Li *et al.* (2017). A simulação foi realizada a partir de custos de capital e custos operacionais nas condições do país de origem dos autores, Colômbia. Assim, os valores que mais impactaram a produção foram os das matérias-primas quitosana (12,00 USD / kg) e nitrato de prata (350,00 USD / kg) que representaram 92% dos custos, e houve alto consumo de água durante o processo [48]. Os custos finais da produção de hidrogel biomédico de quitosana foram de 3,024 USD / kg. A simulação mostra os gastos da produção industrial seriam de mais de 307 milhões USD por ano, com previsão de retorno positivo do investimento inicial após o sexto ano.
2.4. Patentometria

A patentometria permite avaliar as tendências e oportunidades tecnológicas e geográficas e o impacto das inovações nas movimentações econômicas, financeiras e mercadológicas das tecnologias. Visto isso e com intuito de determinar a importância econômica e social das inovações realizadas e descrever o grau de maturidade tecnológica dos hidrogéis aplicados à área biomédica, foi realizado um estudo patentométrico usando como ferramenta o sítio lens.org[™]. O lens.org[™] foi escolhido por ser um sítio eletrônico com amplo banco de dados gratuito e atualizado com acesso às principais bases de dados mundiais de patentes (USPTO, WIPO, Espacenet, Australian Patent Database).

Como estratégia de busca um código IPC (Classificação Internacional de Patentes) foi escolhido e usado em combinação com uma palavra-chave. Assim, para contemplar a área de hidrogéis biomédicos, a palavra-chave *hydrogel* foi usada em combinação com o código IPC A61K9/00, cuja descrição segue abaixo.

A – Human necessities

A61 – Medical or veterinary science; hygiene.

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

A61K09/00 – Medicinal preparations characterized by special physical form

A busca foi realizada em 07 de junho de 2020 e resultou em 19440 depósitos de patentes, representando 7939 famílias de patentes. Os dados obtidos de todas as patentes foram exportados do lens.org para o MS Excel®. Os dados obtidos sobre país de origem, jurisdição, depositantes, primeira data de prioridade e código IPC foram utilizados nas análises.

2.4.1. Origem das tecnologias

A origem de uma tecnologia é o local/país onde ela foi desenvolvida e normalmente onde foi feito o primeiro pedido de prioridade. Assim, para a análise da origem das tecnologias foi considerado o número de famílias de patentes. Dentro das 7939 famílias de patentes, 51 países apareceram como país de origem das tecnologias de hidrogel de uso biomédico. Nesta contagem, a Europa também é listada, uma vez que o depositante pode escolher proteger sua tecnologia através do

escritório do continente europeu. Como mostrado na Figura 2A, os principais países criadores de tecnologia de hidrogel para aplicação biomédica são: EUA, países europeus (que inclui Grã-Bretanha e Alemanha), Japão, China, Coreia do Sul e Austrália.

Dentro da origem das tecnologias, pode-se fazer também um levantamento sobre os diferentes depositantes. Nos dados obtidos foram relacionadas 589 depositantes diferentes. Uma seleção com os 10 principais depositantes está relacionada na Figura 2B. São 6 universidades americanas – Universidade da California, Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT), Universidade John Hopkins, Instituto de Tecnologia de Nova Jersey, Universidade do Colorado e Universidade Leland Stanford Jr –, uma fundação de pesquisa ligada à Universidade de Utah, a Universidade de Hong Kong, uma empresa americana (Incept LLC) e a Agência de Ciência, Pesquisa e Tecnologia de Singapura.

Surpreendentemente, quem mais depositou patentes tem apenas 12 tecnologias patenteadas e as principais empresas que movimentam o mercado de hidrogéis biomédicos, mencionadas na Tabela 1, não estão entre as principais depositantes de patentes. Isto associado ao fato de que 7 entre os 10 principais depositantes são universidades pode sugerir que o foco no desenvolvimento das tecnologias de hidrogel com aplicação biomédica está na academia, que licenciam ou vendem suas tecnologias para as empresas especializadas da área. Estas, por sua vez, focam seus esforços e investimentos no desenvolvimento, produção e comercialização de produtos. Além disso, é preciso ressaltar que essa análise foi feita baseada apenas no depósito de patentes, desconsiderando outras formas de proteção intelectual como o segredo industrial [50].



FIGURA 2. Representação gráfica da análise patentométrica.

(A) Principais países produtores de tecnologias de hidrogel aplicadas à área biomédica. (B) Principais depositantes de patentes de hidrogel aplicado à área biomédica. (C) Principais mercados de interesse. *EP é a sigla usada pelo lens.org para o continente europeu. Fonte: A autora, 2021.

2.4.2. Mercado de interesse

O mercado de interesse é representado pelos demais países, além do país de origem, em que o criador/desenvolvedor da tecnologia deseja proteger seu invento. A proteção da invenção em outros países traz vantagem competitiva no mercado e maior garantia de retorno financeiro dos investimentos na tecnologia desenvolvida. Para análise dos mercados de interesse, as jurisdições de todas as 19.440 patentes foram avaliadas, uma vez que numa família de patentes o mesmo invento pode ser depositado em diferentes localidades. Dessa forma, 68 países apareceram como

mercados de interesse dos inventores/depositantes. A Figura 2C apresenta os principais países mercados de interesse para tecnologias de hidrogel de aplicação biomédica. Dentre as os resultados aparecem as patentes depositadas através do PCT (Tratado de Cooperação de Patentes), representados pela sigla WO. Como através do PCT não há como determinar os países onde a tecnologia será protegida, esses dados, apesar de serem apresentados, não podem ser levados em consideração nessa análise. Portanto, os principais mercados de interesse são EUA, Austrália, países europeus, Canadá, China, Coreia do Sul e Japão.

Comparando os dados apresentados nas Figuras 2A e 2C, fica evidente que a grande maioria dos países geradores das tecnologias coincidem com os mercados de interesse para estas mesmas tecnologias. Essas observações corroboram com os principais relatórios de mercado que citam EUA, Europa e países da Ásia-Pacífico como os maiores e mais importantes atores do mercado de hidrogéis, polímeros em gel e biomateriais [16,51,52]. Os dados mostram que o país líder no mercado de hidrogéis biomédicos é os EUA. O país é detentor de duas das principais empresas atuantes no mercado de hidrogel biomédico, 3M Company e Johnson & Johnson, que investem tanto em inovações quanto no aumento de suas capacidades de produção e na divulgação dos benefícios do produto em relação aos produtos tradicionais [26]. Entretanto, estima-se que entre os anos de 2020 e 2025, os países asiáticos assumam essa liderança, especialmente nos setores de cuidados pessoais, cuidados com saúde e beleza, onde se espera um crescimento robusto de China, Índia e Japão [30].

2.4.3. Análise da série temporal e previsão tecnológica

Para avaliar a evolução das tecnologias de hidrogéis biomédicos foram analisadas as datas do primeiro pedido de prioridade das famílias de patentes com intuito de obter uma série temporal de depósitos de patentes e uma série cumulativa desses depósitos. A Figura 3 traz ambos os gráficos das séries temporal e cumulativa.

A Figura 3A mostra o gráfico da série temporal de depósitos. Entre 1977 e 1993 pode-se perceber três ondas discretas com oscilações de crescimento, seguido de um crescimento constante entre 1993 e 2003. Novamente nota-se uma variação entre 2004 e 2017, com três picos de crescimento em 2008, 2013 e 2016. É importante ressaltar que as consideráveis quedas apresentadas nos números de depósitos a

partir de 2018 possivelmente estão relacionadas ao período de sigilo dos documentos. Mas mesmo com estas variações, verifica-se que há um aumento não linear nos depósitos de patentes envolvendo as tecnologias de hidrogel biomédico. Analisando o padrão de crescimento apresentado no gráfico, pode-se inclusive sugerir a possibilidade de repetição com crescimento constante no número de depósitos entre 2018 e 2028, e oscilações de crescimento entre 2028 e 2043.

A Figura 3B mostra a série cumulativa de depósitos de patentes, construída a partir dos dados apresentados na Figura 3A. Além da série cumulativa, está representada no gráfico a curva de projeção matemática do ciclo de vida da tecnologia de hidrogel biomédico feita no software OriginLab 7.0, ajustada segundo modelo sigmoidal de Boltzmann utilizando a seguinte equação:

$$y = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}}$$
(Eq.1)

onde:

 $R^{2}= 0.99947$ $A_{1} = -107.17603 \pm 29.3264$ $A_{2} = 19226.93938 \pm 127.7903$ $x_{0} = 2019.91124 \pm 0.20786$ $d_{x} = 8.54 \pm 0.14816$

FIGURA 3. Evolução do ciclo de vida da tecnologia do hidrogel biomédico



(A) Série temporal de depósitos de patentes de hidrogel para uso biomédico. (B) Dados cumulativos das patentes ajustados em curva S. Fonte: A autora, 2020

Os hidrogéis de aplicação biomédica foram introduzidos na década de 1960, mas iniciaram o crescimento em meados da década de 1970 e veio acelerando até 2019 quando, atingiu seu ponto de inflexão. Desde então, a tecnologia se encontra em seu estágio de maturidade, que deve durar até 2043, segundo a projeção. A partir do ponto de inflexão, as taxas de crescimento começam a diminuir, mas o impacto competitivo permanece alto como na fase de crescimento, as tecnologias estão bem integradas ao produto e aos processos, há grande demanda e o mercado está aderido à tecnologia. É importante ressaltar que isso é um modelo matemático e de acordo com ele, as projeções sugerem que a tecnologia de hidrogel aplicado à área biomédica ainda tem mais de 20 anos até entrar na fase de declínio e ser possivelmente substituída por outra tecnologia.

O gráfico apresentado pela projeção corresponde a uma curva S. A curva S é uma predição matemática usada para analisar sua evolução e seu ciclo de vida, uma vez que as tecnologias seguem este padrão de crescimento [53–55]. O progresso de um campo tecnológico pode ser dividido em 4 fases: emergente, crescimento, maturidade e declínio [53,56], como vemos na Figura 4B. Quando a tecnologia está emergindo, o crescimento é lento, o produto ainda está em fase prototípica e seu impacto competitivo é baixo. Uma vez que o produto esteja estabelecido, há um período de rápido crescimento, seguido por um ponto de inflexão e crescimento mais lento conforme o mercado e a inovação entram em um período de maturidade, e eventualmente, a tecnologia e o mercado entram em declínio. [53,54].

Muitas empresas, para evitar o declínio da tecnologia, investem em inovação incremental e desenvolvem sua tecnologia substituindo continuamente os componentes tecnológicos existentes por tecnologias emergentes de maior desempenho. Neste caso, o ciclo de vida da tecnologia fica mais bem representado por estrutura fractal composta de várias curvas S em cascata [55].

Além disso, é importante ressaltar que para biotecnologias, como as de hidrogéis biomédicos, as curvas S de produtos introduzidos no mercado e das receitas geradas pode ser diferente da curva S das patentes depositadas [57]. Os produtos biotecnológicos por precisarem de aprovação dos órgãos regulamentadores demoram um pouco mais para serem introduzidos no mercado, e, consequentemente, apresentam crescimento mais lento, e fase de declínio mais tardia. Com todo esse processo, os retornos financeiros demoram mais para acontecer, podendo levar alguns anos até que a receita gerada pelo produto inicie seu crescimento. Quando a curva cumulativa das receitas geradas atinge seu pico, a tecnologia já está em declínio e o produto já se estabilizou no mercado.

38

Avaliando a maturidade das tecnologias, é possível fazer um comparativo entre a curva S e as escalas TRL (nível de maturidade tecnológica). As análises da curva S se referem ao grau de maturidade de todo um campo tecnológico [58], permitindo a avaliação da evolução daquele setor desde seu surgimento até seu declínio. As TRL podem ser usadas para avaliar a maturidade de uma determinada tecnologia e para comparar a maturidade entre diferentes tipos de tecnologia [59,60]. As escalas TRL possuem nove níveis e originalmente foram desenvolvidas pela NASA para processos de avaliação de riscos, mas frequentemente eram usadas para avaliação da maturidade de tecnologias [60]. Atualmente, as TRL já foram customizadas para uso em diferentes domínios incluindo as tecnologias biomédicas.

Para a avaliação de maturidade de uma tecnologia, sua etapa de desenvolvimento é comparada aos níveis de TRL. Com base no andamento do projeto, uma classificação TRL é atribuída. O TRL 1 tem a maturidade mais baixa, enquanto o TRL 9 tem a maturidade mais alta [60,61]. A Tabela 2 apresenta as escalas TRL para área biomédica de forma simplificada. Em tecnologias biomédicas, as TRLs 1-3 são níveis para geração de novos conceitos e tecnologias emergentes, TRLs 4-5 são níveis de pesquisa aplicada, TRL 5-8 são níveis de maturação dos protótipos e demonstração dos produtos e TRL 9 é a fase de produção e distribuição [61]. É importante dizer que as escalas TRL não identificam riscos no desenvolvimento de tecnologia, como a dificuldade de fazer a tecnologia avançar para o próximo nível, o potencial impacto ou benefício da tecnologia e mercado de uma tecnologia.

Interessantemente, os níveis das TRL para tecnologias biomédicas seguem etapas similares ao caminho da inovação percorrido no desenvolvimento de biotecnologias, como demonstramos na Figura 1. Sendo as escalas TRL uma forma de identificar as próximas etapas para o desenvolvimento de um projeto, elas certamente podem ser usadas como guia estrutural para todo o processo.

TABELA 2	. Escalas T	RL (Nível de	Maturidade	Tecnológica)	simplificadas	usadas para
		avaliação	o de tecnolog	jias biomédic	as	

TRL	TRL Biomédica
TRL 1	Revisão de literatura; Pesquisa de mercado; Definição do problema
TRL 2	Geração de Hipóteses; Planejamento e desenvolvimento de protocolos de pesquisa;
TRL 3	Pesquisa básica; Coleta e análises de dados; Início da prova de conceito
TRL 4	Prova de conceito; Teste de validação; Testes de segurança em laboratório e em modelo animal
TRL 5	Testes pré-clínicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
TRL 6	Fase 1 dos testes cínicos completa; Fase 2 em andamento
TRL 7	Fase 2 dos testes clínicos completa; Fase 3 aprovada para começar
TRL 8	Fase 3 dos testes clínicos completa; Aprovação das agências regulatórias
TRL 9	Fase 4 Farmacovigilância; Estudos pós-marketing e vigilância

Fonte: Adaptado de Basu; Ghosh (2017)

2.4.4. Áreas de concentração tecnológica

Na avaliação das áreas de concentração das tecnologias toma-se por base os códigos IPC. O IPC é um sistema de classificação hierárquico de patentes universalmente utilizado, cuja organização permite uma busca técnica por patentes depositadas em determinada área [62]. Como o IPC possibilita uma busca precisa e refinada, e serve como base para uma investigação do estado da arte aprofundada dentro das áreas tecnológicas [63], nossa busca de patentes usou como base um código IPC associado a uma palavra-chave.

A Figura 4 apresenta os 20 principais códigos IPC. Nas análises dos dados no MS Excel, 7 das 8 categorias gerais de IPC foram encontradas entre as famílias de patentes. A seção E (Fixed Constructions) não apareceu entre os resultados. O destaque foi para a seção A (Human necessites), que representou 89% dos IPC encontrados, seguida da seção C (Chemistry; Metallurgy), que representou 8,8% dos IPC. Além disso, 68 classes, 160 subclasses e 3745 grupos/subgrupos diferentes de IPC foram obtidos. Informações detalhadas sobre todos os IPC podem ser encontradas no website wipo.int/classifications/ipc/en.

O código A61K9/00 foi utilizado na estratégia de busca e aparece em todas as patentes, por isso foi ele não foi contabilizado. Excluindo este código, os principais grupos e subgrupos estão dentro de 3 subclasses: A61K, A61L e A61P, que de acordo com suas descrições, correspondem de maneira geral a materiais, métodos,

preparações e composições para uso médico, odontológico, higiênico, para tratamentos, para cuidados pessoais, cuidado e tratamento de lesões e artigos cirúrgicos. Comparando essas descrições com o mercado de hidrogéis aplicados à área biomédica, vemos uma sincronia, uma vez que as áreas que mais movimentam o mercado consumidor e que impulsionam a economia do setor de hidrogéis são de produtos de higiene e cuidados pessoais, lentes de contato, liberação de drogas, tratamento e cuidados de lesões e engenharia de tecidos [16,17,26,64].





2.4.5. Patentes: Hidrogéis para tratamento, cuidado e cicatrização de feridas

Nos últimos anos, a área de cuidados e tratamentos de feridas foi a que mais sobressaiu, com grande impacto econômico e importância social. Calcula-se que esse segmento compreende aproximadamente 60% do mercado de hidrogéis aplicados à saúde [25]. Isso pode ser devido ao aumento da vida da população mundial, aumento de consumo de produtos de higiene e cuidados e maior difusão do conhecimento relacionado aos benefícios apresentados pelas inovações. Contudo há também um

crescimento das propostas tecnológicas que visam a produção local para atender as demandas internas.

Visto isso, foi realizada uma seleção, dentre as patentes encontradas na busca patentométrica. Destas, 45 tecnologias mais recentes que envolvem hidrogéis para cuidado, tratamento e cicatrização de feridas, cujo período de depósito ocorreu entre 2013 e 2018, foram selecionadas. Estas patentes estão apresentadas na Tabela 3.

Número	Título	Principais ativos da	Aplicação	Referência
US 2019/0008907 A1	Compositions for management of wounds, skin diseases, dehydration, chronic diseases, and respiratory diseases	sulfadiazina de prata, óxido de zinco, lidocaína, bacitracina, neomicina, polimixina B, vitamina E e Coenzima Q10	feridas crônicas na pele, úlceras diabéticas, úlceras causadas por pressão e infecções fúngicas	[65]
US 2018/0289831 A1	Supramolecular hydrogels containing angiotensin receptor blockers for targeted treatment of diabetic wounds	valsartan, hidrocarboneto modificado e peptídeo	feridas cutâneas crônicas e diabéticas	[66]
US 2017/0100345 A1	Wound healing using BRAF inhibitors	inibidor de BRAF	lesões causadas pelo melanoma	[67]
WO 2019/180194 A1	Means and methods for wound healing	ácido glicirrízico, antibiótico e anti-inflamatório	lesões crônicas, regeneração de tecidos	[68]
US 2016/0303141 A1	Corteloxone 17-alpha- propionate for use in the treatment of skin wounds and/or atrophic skin disorders	cortexolona 17α-propionato	feridas crônicas, abertas, queimaduras e doenças atróficas de pele	[69]
US 9962360 B2	Compositions and methods for enhancing hair growth, promoting skin regeneration, and wound healing	maleato de trimebutina	crescimento de cabelo e regeneração cutânea	[70]
US 2019/0105260 A1	Compositions and methods to promote wound healing	antidepressivo em combinação com um antagonista do receptor beta adrenérgico e células da linhagem mesenquimal em matriz de colágeno	feridas no tecido epitelial	[71]
US 2019/0117834 A1	A method to enhance wound healing using silk- derived protein	fragmentos de proteínas derivadas de seda (SDP)	fechamento das feridas e intensificação da cicatrização, feridas oculares, feridas na pele, incisões cirúrgicas, queimaduras e úlceras da pele	[72]

TABELA 3. Tecnologias de hidrogel biomédico aplicado ao tratamento, cuidado e cicatrização de feridas

Número	Título	Principais ativos da composição	Aplicação	Referência
US 2018/0264051 A1	A novel pharmaceutical wound healing composition	sericina de seda, soforolipídeo, alginato de sódio e excipientes	cicatrização das feridas e diminuição de cicatrizes	[73]
WO 2019/227034 A1	Therapeutic composition for enhanced healing of wounds and scars	<i>Aloe vera</i> , poli-hidroxibutirato (PHB), glicolipídios e fosfolipídios de origem fúngica	Minimização de cicatrizes	[74]
US 9327029 B2	Antimicrobial silver hydrogel composition for the treatment of burns and wounds	sal de prata, estabilizantes, celulose e <i>Aloe vera</i>	antimicrobiana, rápida cicatrização, alívio de dor	[75]
US 2019/0008907 A1	Compositions for management of wounds, skin diseases, dehydration, chronic diseases, and respiratory diseases	mel, curcumina e própolis	feridas, infecções, diabetes, doenças da pele, doenças renais, desidratação, desnutrição, hipertensão, entre outras	[76]
WO 2019/040185	Buckwheat honey and povidone-iodine wound- healing dressing	mel de trigo sarraceno e povidona-iodada	feridas crônicas e agudas e doenças de pele	[77]
WO 2019/078931	Buckwheat honey and bacitracin wound-healing dressing	mel de trigo sarraceno e bacitracina	feridas crônicas e agudas e doenças de pele	[78]
US 10500235 B2	Wound healing compositions comprising buckwheat honey and methylglyoxal and methods of use	mel de trigo sarraceno e metilglioxal	tratamento de feridas	[79]
US 9486420 B1	Wound gel containing antimicrobial composition	PEG, cloreto de benzalcônio, poliácido, ácido acético, ácido cítrico.	redução da colonização bacteriana dentro ou ao redor da ferida	[80]
US 10568966 B2	Formulation for topical wound treatment	polihexametileno biguanida (PHMB), poloxâmero 188 e hidroxietilcelulose e umectante	tratamento tópico de pele e feridas oromucosas.	[81]
WO 2017/037655	Topical erytropoietin formulations and methods for improving wound healing with and cosmetic use of the formulations.	5% de eritropoetina e 30% de fibronectina.	úlceras do pé diabético, tratamento cosmético e cicatrização da superfície da pele	[82]
US 2016/0346315	Methods for promoting wound healing	gel injetável, contendo 0,5% - 4% de hidroxietilcelulose (HEC), 0,11% de metilparabeno e 0,22% de proprilparabeno	úlceras diabéticas, cicatrização de escaras e lesão cutânea por radiação	[83]
US 2019/0134154 A1	GPNMB compositions for treatment of skin wounds	polímero biodegradável e fragmentos da glicoproteína transmembrana NMB (GPNMB)	úlceras diabéticas e feridas por pressão	[84]
US 2017/0296625 A1	Therapeutic angiogenesis for wound healing	fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1), antibiótico e anti-inflamatório	angiogênese em tecidos superficiais, úlcera de pele, úlcera de compressão, úlcera de pé diabético, local de queimadura	[85]
WO 2019/079710 A1	Topical composition for improved healing of open wounds	insulina e o hidrogel mucoadesivo MucoLox™	úlceras diabéticas	[86]

Número	Título	Principais ativos da composição	Aplicação	Referência
US 2018/0303941 A1	Wound healing through Sirt1 overexpression	poli (polietilenoglicol co-ácido cítrico-co-N isopropilacrilamida) (PPCN), e vetor com a sequência do gene Sirt-1	metabolização do açúcar em excesso na lesão e aceleração da cicatrização	[87]
US 2019/0030045 A1	Topical treatment of wounds with statins and cholesterol for scar reduction	estatinas e colesterol em uma microemulsão composta de monoacilglicerol e um solvente	cicatrização	[88]
US 2020/0085914 A1	Compositions and methods for wound healing	células secretoras de insulina e células estaminais microencapuladas	re-epitelização e cicatrização de feridas e escaras diabéticas	[89]
EP 2958602 B1	Composition for the accelerated wound healing of damaged tissue	ácidos graxos do óleo de linhaça	induzem a migração acelerada de células e cicatrização	[90]
US 2019/0314449 A1	Cyclic dipeptides and wound healing	ciclo-dipeptídeos (Cyclo-His- Pro, Cyclo-Leu-Pro, Cyclo- Phe-Pro), quitosana, óxido de zinco e arginina.	neovascularização, antimicrobiana, re- epitelização, anti- inflamatória.	[91]
US 9156896 B2	Wound healing compositions and treatments	pluronic-127, alginato, derivados de celulose e oligonucleotídeo anti-conexin 43	úlcera venosa de perna	[92]
US 10086041 B2	Syndecan-4 proteoliposomes for enhanced cutaneous wound healing and minimized inflammatory immune response	alginato, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- BB) e proteovesículas de Syndecan-4, em microcápsulas biodegradáveis	cicatrização de feridas cutâneas crônicas	[93]
WO 2014/081630	Drug eluting silicone gel sheeting for wound healing and scar reduction	silicone em folha	cicatrização de feridas e a redução ou prevenção de escaras.	[94]
US 10098929 B2	Method of reducing scar formation in healing of dermal wounds by administrating interleukin-10 and hyaluronan	PEG, colágeno Tipo-1, ácido hialurônico, heparana, e interleucina 10 (IL-10)	liberada de forma controlada no local da ferida ou incisão para reduzir queloides.	[95]
US 10272096 B2	Methods and systems of treating wounds	Kit: dispositivo emissor de luz fototerapêutica de baixo nível Composição: nitrosil- cobinamida, óxido nitroso modificado e vitamina B12	tratamento de feridas	[96]
US 10058455 B2	Nano-enhanced wound dressing	nanopartículas metálicas de prata e zinco, antimicrobiano e polímero biodegradável	cicatrização e prevenção de infecções	[97]
US 2018/0200340 A1	Wound treatment	hidrogel em folha contendo colágeno, decorina e fibrina	lesões ou infecções oftalmológicas	[98]
US 9211256 B2	Wound healing compositions comprising biocompatible cellulose hydrogel membranes	celulose bacteriana e agentes bioativos encapsulados	cicatrização de feridas, redução ou alívio a dor, prevenção ou tratamento de infecções e na reparação ou regeneração	[99]

Número	Título	Principais ativos da composição	Aplicação	Referência
	and methods of use thereof		de tecidos; aplicação oftalmológica	
US 9867868 B2	Pharmaceutical composition for treating or preventing corneal wound comprising thymosin β4 and citric acid	timosina β4 e ácido cítrico em um transportador	tratamento e prevenção de lesões na córnea	[100]
WO 2019/222710 A1	Methods of wound healing with Serp-1 polypeptides	fragmentos ativos do Serp-1 derivado de Myxoma-virus	tratamento e cicatrização de feridas crônicas	[101]
US 2018/0221356 A1	Method of wound healing	aza-adamantano	tratamento e cicatrização de feridas crônicas	[102]
US 9782381 B2	Molecular targets for healing or treating wounds	estibogluconato	tratamento e cicatrização de feridas crônicas	[103]
US 2017/0274013 A1	Wound fluid elevated protease enzyme inhibition through camelid blood products	produtos derivados de sangue de camelídeos	tratamento e cicatrização de feridas crônicas	[104]
US 2016/0331735 A1	Novel formulations for treatment of pain, neuropathy, wounds and ulcers	nifedipina, lidocaína, cetamina, diclofenaco, baclofen, bupivacaina, ibuprofeno, cetil miristoleato	anestésica, analgésica, anti-inflamatória e lubrificante, importantes no processo cicatrizante.	[105]
US 9295636 B2	Wound healing using topical systems and methods	óxido nítrico, hormônio liberador de tireotrofina, lecitina e ácido linoleico	tratamento de feridas, cortes, queimaduras, abrasões, fissuras anais, traumas, cirurgias, queimaduras de sol ou lacerações	[106]
US 2018/0296643 A1	SDF-1 for anal and sphincter wound healing	fator-1 derivado de célula estromal (SDF1)	lesões anais ou esfincteriana	[107]
US 2019/0030140 A1	Debriding Composition for treating wounds	bromelaína, ananaína e um hidrogel polimérico	retirada de pele morta da lesão	[108]
US 99188937 B2	Pharmaceutical composition for protecting wounds, providing hemostasis, or preventing adhesion in the gastrointestinal tract	fator de crescimento epidérmico, hidroxietilcelulose, croscarmelose sódica, glicolato de amido sódico, cloreto de cálcio.	proteção do trato gastrointestinal feita através de intervenção médica usando endoscópio	[109]

Fonte: A autora, 2020

A maior parte das patentes encontradas neste refinamento, quase 50%, está relacionada às feridas e lesões cutâneas e/ou crônicas. O cuidado e tratamento das feridas cutâneas oscila muito e depende, principalmente, de como o processo de cicatrização evolui [110]. Os recursos disponíveis e as particularidades dos pacientes são aspectos a serem considerados no momento da escolha do tipo de curativo, que devem ser adequados à natureza, à localização e ao tamanho da ferida. Para atender

às demandas nos cuidados de saúde, diferentes formulações e métodos empregando hidrogéis têm sido desenvolvidos. Dentre os que aparecem neste levantamento podemos citar: compostos para aplicação em feridas diabéticas, compostos de aplicação na dermatologia clínica e cosmética, compostos para tratamento de lesões oculares, uso de compostos naturais e derivados, compostos com atividades antimicrobianas, novos usos e aplicações para compostos já estabelecidos, compostos para a promoção da revascularização em regiões de ferimentos, métodos de re-epitelização, sistemas de liberação controlada.

Os cuidados com feridas são delicados e exigem muitas vezes procedimentos básicos e tradicionais dentro da área médica [111]. A inovação no desenvolvimento das novas tecnologias permite novas abordagens, materiais mais biocompatíveis e dispositivos avançados para oferecer tratamentos eficientes que atendam as demandas de cada paciente. O desafio é desenvolver uma nova tecnologia com boa aplicabilidade clínica, de baixo custo e boa aceitação de mercado.

2.5. Discussão

Os hidrogéis são chamados de materiais do futuro por suas propriedades físicoquímicas e biológicas. Um material para aplicação biomédica precisa cumprir os requisitos de biocompatibilidade, biodegradabilidade, viscoelasticidade, porosidade, potencial de aprisionamento e liberação de moléculas biologicamente ativas e boa funcionalidade clínica [20]. Por atender esses requisitos, os hidrogéis são os principais biomateriais no campo biomédico [28]. Seu alto teor de água, maleabilidade e versatilidade favorecem sua adaptação e uso nas diferentes áreas.

O mercado tem buscado hidrogéis cada dia mais inovadores com diferentes polímeros, diferentes métodos, novos compostos, novos usos, múltiplas atividades. Três gerações de hidrogéis já foram desenvolvidas ao longo dos anos e sua ampla aplicação pela indústria biomédica e farmacêutica fez o mercado do hidrogel expandir. Projeções para 2027 estimam que o mercado atinja US\$ 31,4 bilhões, a uma CAGR de 6,7% [16]. O segmento com a maior fatia do mercado é o de tratamento e cuidados de feridas, principalmente aqueles associados a outras comorbidades. Mas o segmento que deve ser o principal motor para inovação e mercado até 2027 é o de higiene, cuidados pessoais e cosméticos. O crescimento do PIB nas maiores

economias mundiais e o aumento do poder aquisitivo do consumidor têm sido primordiais para o segmento (ABIHPEC, 2018). A mesma situação pode ser observada em relação aos países. O Estados Unidos detém a maior fatia do mercado, mas o crescimento da Ásia-Pacífico com a indústria higiene, cuidados pessoais e cosméticos tem superado as projeções.

O segmento de tratamento e cuidado de feridas é um dos mais significativos. Ele movimenta grande parte do mercado de hidrogéis, polímeros e biomateriais [16,51]. O campo do tratamento de feridas é um dos mais pesquisados e, também, um dos mais desafiadores na medicina. Além da ferida, os materiais e métodos de tratamento devem levar em consideração outras comorbidades dos pacientes, o controle de infecções, o estado vascular, e quaisquer preocupações biomecânicas [111]. Ao analisar as tecnologias mais recentes desenvolvidas atualmente no segmento, as patentes de hidrogéis biomédicos para feridas crônicas e associadas ao tratamento de úlceras diabéticas se destacaram. As úlceras diabéticas são complicações comuns quando a doença está descontrolada, e elas podem levar a mais complicações como infecções diversas, abscessos, sepse, gangrena, isquemia [112]. Por isso, um tratamento apropriado das feridas é necessário e novas alternativas mais eficientes estão sendo sempre buscadas. Os sistemas de liberação controlada de bioativos apareceram como método estratégico para o tratamento de feridas. Os polímeros biodegradáveis têm sido usados na distribuição controlada de bioativos por muitos anos como um meio de prolongar a ação de agentes terapêuticos no corpo. O uso de polímeros e moléculas bioativas naturais também se sobressaiu, com destaque para a celulose, contrastando com dados de mercado. O uso do biopolímero celulose é bastante vantajoso, ele é o mais abundante no mundo, é obtido e comercializado a baixo custo e apresenta boas propriedades físico-químicas. Atualmente, hidrogéis de celulose são as principais matrizes usadas em engenharia de tecido [58,113], mas a aplicação dele se dá em toda a área biomédica.

As patentes têm requisitos estritos de novidade e intenção comercial, tornandoas bons sinais de inovação nas indústrias de tecnologia. Por isso as informações contidas em patentes podem ser muito importantes num planejamento estratégico de tecnologias [114], principalmente, para uma perspectiva do cenário futuro do mercado [115]. As análises das patentes no estudo de patentometria trouxeram dados extremamente relevantes, principalmente se trabalhadas com dados mercadológicos. A tecnologia de hidrogéis biomédicos atingiu o ponto de inflexão e pode ser considerada madura, com grandes expectativas de crescimento para os próximos anos. Os dados são de projeções matemáticas, mas conhecendo o ciclo de vida da tecnologia, já auxiliam de forma estratégica pesquisa, desenvolvimento e inovação.

2.6. Conclusão

Os hidrogéis biomédicos contribuem com avanços significativos no campo tecnológico. Como biomateriais inteligentes e inovadores, os hidrogéis biomédicos vem dominando o mercado global de polímeros e hidrogéis. Os Estados Unidos são o país que domina este mercado, mas novos mercados vêm se destacando como é o caso dos países da Ásia-Pacífico, principalmente no segmento de cuidados pessoais.

Atualmente, o mercado de hidrogéis biomédicos está direcionado para tecnologias aplicadas a feridas crônicas, com destaque para as desenvolvidas para o tratamento de úlceras causadas pela diabetes. Os principais métodos e formulações são para aplicação tópica, seja através da administração da formulação diretamente no local da ferida ou com uso de curativos, o que facilita para produtos de uso contínuo e doméstico. Entre as formas de atuação das formulações, o uso de sistemas de liberação controlada se mostrou um tipo de tratamento efetivo, seguro e econômico.

O estudo das cadeias produtivas na área biomédica proporcionou a rastreabilidade desde a matéria bruta até o produto. Assim, o conhecimento da cadeia produtiva deve ser gerenciado e utilizado como recurso que agrega valor, compreendendo os elos mais fracos e as oportunidades de aprimoramento, minimizando desperdício e maximizando qualidade e segurança para aplicação clínica.

O estudo patentométrico descreveu o cenário atual e avaliou o ciclo de vida da tecnologia de hidrogel biomédico, trazendo uma visão estratégica de mercado e maturidade da tecnologia. Foi demonstrado que os hidrogéis biomédicos atingiram a maturidade e têm perspectiva de crescimento nos próximos 20 anos. Entender o estado de maturidade das tecnologias representa um aumento de benefícios e minimiza o risco potencial o que permite uma tomada de decisão mais acertada sobre o futuro das tecnologias.

48

Além disso, os dados obtidos na análise patentária auxiliaram a desenhar plataformas preditivas que podem ampliar a visualização de novas oportunidades, criação de novos produtos e novas empresas resultando em crescimento do mercado e suporte às transições tecnológicas atuais e futuras.

2.7. Referências bibliográficas

- [1] Wichterle O, Lím D. Hydrophilic Gels for Biological Use. Nature [Internet].
 1960;185:117–118. Available from: http://www.nature.com/articles/185117a0.
- [2] Moreira CDF, Carvalho SM, Mansur HS, et al. Thermogelling chitosancollagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. Mater Sci Eng C [Internet]. 2016;58:1207–1216. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.075.
- [3] Sowjanya JA, Singh J, Mohita T, et al. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2013;109:294–300. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.006.
- [4] Qu X, Wirsén A, Albertsson AC. Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid. J Appl Polym Sci. 1999;74:3186–3192.
- [5] Zhou HY, Chen XG, Kong M, et al. Preparation of chitosan-based thermosensitive hydrogels for drug delivery. J Appl Polym Sci [Internet].
 2009;112:1509–1515. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/app.29721.
- [6] Zhou HY, Jiang LJ, Cao PP, et al. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. Carbohydr Polym [Internet]. 2015;117:524–536. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.094.
- [7] Li X, Su X. Multifunctional smart hydrogels: potential in tissue engineering and cancer therapy. J Mater Chem B [Internet]. 2018;6:4714–4730. Available from: http://xlink.rsc.org/?DOI=C8TB01078A.
- [8] Slaughter B V., Khurshid SS, Fisher OZ, et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. Adv Mater [Internet]. 2009;21:3307–3329. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200802106.
- [9] Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. Eur Polym J. 2015;65:252–267.
- [10] Nanjundswamy NG, Dasankoppa FS, Sholapur HN. A Review on Hydrogels and Its Use in In Situ Ocular Drug Delivery. Indian J Nov Drug Deliv [Internet]. 2009;1:11–17. Available from: http://www.ijndd.com/oct-dec2009/Review

Article_IJNDD Oct-Dec 2009_11-17.pdf.

- [11] Serban MA. Translational biomaterials the journey from the bench to the market - think "product." Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2016;40:31–34.
 Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.009.
- [12] Weinsmann H-P. Biomaterial innovation for medicine and technology [Internet].2019. Available from: https://www.ipfdd.de/mbc/biomaterial_innovation.html.
- [13] Lakemond N, Johansson G, Magnusson T, et al. Interfaces between technology development, product development and production: Critical factors and a conceptual model. Int J Technol Intell Plan. 2007;3:317–330.
- [14] Bayon Y, Bohner M, Eglin D, et al. Progressing innovation in biomaterials.From the bench to the bed of patients. J Mater Sci Mater Med. 2015;26.
- [15] BCC. Hydrogels: Applications and Global Markets to 2022 [Internet]. 2017. Available from: https://www.bccresearch.com/market-research/advancedmaterials/hydrogels-applications-and-global-markets-report.html.
- [16] Mohite, S; Prasad E. Hydrogel Market Report [Internet]. 2020. Available from: https://www.alliedmarketresearch.com/hydrogel-market.
- [17] M&M. Hydrogel Market [Internet]. 2017. Available from: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hydrogel-market-181614457.html.
- [18] PMR. Hydrogels for Medical Application-Global Market Status and Trend Report 2015-2026 [Internet]. Windeck, Germany; 2020. Available from: https://www.precisionmarketreports.com/report/life-sciences/hydrogels-formedical-application-global-market-status-and-trend-report-2015-2026/3325.
- [19] Elsayed MM. Hydrogel Preparation Technologies: Relevance Kinetics, Thermodynamics and Scaling up Aspects. J Polym Environ [Internet].
 2019;27:871–891. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s10924-019-01376-4.
- [20] Samal SK, Dash M, Dubruel P, et al. Smart polymer hydrogels: properties, synthesis and applications. In: Aguilar, M. R.; Román JS, editor. Smart Polym their Appl [Internet]. Elsevier; 2014. p. 237–270. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709695150008X.
- [21] Huang Q, Zou Y, Arno MC, et al. Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. Chem Soc Rev. 2017;46:6255–6275.

- [22] Gibas I, Janik H. Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. Chem Chem Technol [Internet]. 2010;4:297–304. Available from: http://science2016.lp.edu.ua/sites/default/files/Full_text_of_ papers/full_text_338.pdf.
- [23] Prabaharan M, Mano JF, Samal SK, et al. Smart polymer hydrogels: properties, synthesis and applications. Aguilar, M. R.; Román JS, editor. Smart Polym their Appl [Internet]. 2014;6:237–270. Available from: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
- [24] Okay O. Semicrystalline physical hydrogels with shape-memory and selfhealing properties. J Mater Chem B. 2019;7:1581–1596.
- [25] MSR. Global Medical Grade Hydrogel Market Growth 2019-2024 [Internet]. 2019. Available from: https://www.marketstudyreport.com/reports/globalmedical-grade-hydrogel-market-growth-2019-2024.
- [26] Singh V. U.S. Hydrogel Dressing Market [Internet]. 2016. Available from: https://www.alliedmarketresearch.com/US-hydrogel-dressing-market.
- [27] Vilcinskas K. Hydrogels: Emerging materials and novel applications [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 9]. Available from: https://www.prescouter.com/2020/07/hydrogels-emerging-materials-and-novelapplications/.
- [28] Aswathy SH, Narendrakumar U, Manjubala I. Commercial hydrogels for biomedical applications. Heliyon [Internet]. 2020;6:e03719. Available from: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
- [29] ABIHPEC;, Sebrae; Caderno de Tendências 2019 2020 [Internet]. São Paulo; 2018. Available from: https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/.
- [30] MI. Hydrogel Market Growth, Trends, and Forecast (2020 2025) [Internet]. India; 2019. Available from: https://www.mordorintelligence.com/industryreports/hydrogel-market.
- [31] Feldman D. Polymer history. Des Monomers Polym. 2008;11:1–15.
- [32] Maddaloni M, Vassalini I. Green Routes for the Development of Chitin / Chitosan Sustainable Hydrogels. Sustain Chem. 2020;325–344.
- [33] Hahn T, Tafi E, Paul A, et al. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. J Chem Technol Biotechnol. 2020;95:2775–2795.

- [34] Roberts GAF. Chitin Chemistry [Internet]. 1st ed. London: Macmillan Education UK; 1992. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-349-11545-7.
- [35] Muñoz I, Rodríguez C, Gillet D, et al. Life cycle assessment of chitosan production in India and Europe. Int J Life Cycle Assess. 2018;23:1151–1160.
- [36] Oyatogun GM, Esan TA, Akpan EI, et al. Chitin, chitosan, marine to market.Handb. Chitin Chitosan. 2020.
- [37] Roy JC, Salaün F, Giraud S, et al. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. Solubility of Polysaccharides [Internet]. InTech; 2017. p. 13. Available from: https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/livenessdetection-in-biometrics.
- [38] Ruiz-Mercado GJ, Carvalho A, Cabezas H. Using Green Chemistry and Engineering Principles To Design, Assess, and Retrofit Chemical Processes for Sustainability. ACS Sustain Chem Eng. 2016;4:6208–6221.
- [39] Mandon PPE. Chitosan Market Outlook 2027 [Internet]. 2020. Available from: https://www.alliedmarketresearch.com/chitosan-market.
- [40] Campana-Filho SP, De Britto D, Curti E, et al. Extração, estruturas e propriedades de α- e β-quitina. Quim Nova. 2007;30:644–650.
- [41] Ensymm. Chitosan Production Line Offer [Internet]. Duesseldorf; 2019.
 Available from: http://ensymm.com/wpcontent/uploads/2019/01/ensymm_chitosan_production_abstract.pdf.
- [42] Gómez-Ríos D, Barrera-Zapata R, Ríos-Estepa R. Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus ®. Food Bioprod Process [Internet]. 2017;103:49–57. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308517300329.
- [43] Modaresifar K, Hadjizadeh A, Niknejad H. Design and fabrication of GelMA/chitosan nanoparticles composite hydrogel for angiogenic growth factor delivery. Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol [Internet]. 2018;46:1799–1808. Available from: https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1392970.
- [44] Wang L, Wang P, Weir MD, et al. Hydrogel fibers encapsulating human stem cells in an injectable calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. Biomed Mater. 2016;11.

- [45] Dong J, Cui G, Bi L, et al. The mechanical and biological studies of calcium phosphate cement-fibrin glue for bone reconstruction of rabbit femoral defects. Int J Nanomedicine. 2013;8:1317–1324.
- [46] Liu M, Zeng X, Ma C, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Bone Res. 2017;5.
- [47] Baghaie S, Khorasani MT, Zarrabi A, et al. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. J Biomater Sci Polym Ed [Internet]. 2017;28:2220– 2241. Available from: http://doi.org/10.1080/09205063.2017.1390383.
- [48] Martínez-Ruano JA, Taimbu de la Cruz CA, Orrego Alzate CE, et al. Techno– Economic Analysis of Chitosan-Based Hydrogels Production. In: Modal IH, editor. Cellul Superabsorbent Hydrogels [Internet]. 1st ed. Springer International Publishing; 2019. p. 1769–1790. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-77830-3_58.
- [49] Li P, Zhao J, Chen Y, et al. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. Carbohydr Polym [Internet]. 2017;157:1383–1392. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.016.
- [50] Mattos LHS, Speziali MG. Patent landscape: Technology development behind science in the flavor and fragrances (F&F) area. World Pat Inf [Internet].
 2017;51:57–65. Available from: https://doi.org/10.1016/j.wpi.2017.11.006.
- [51] Tatkare D. Biomaterials Market [Internet]. India; 2019. Available from: https://www.alliedmarketresearch.com/biomaterials-market.
- [52] Pulidindi, K.; Pandey H. Polymer Gel Market [Internet]. 2015. Available from: https://www.gminsights.com/industry-analysis/polymer-gel-market.
- [53] Porter AL, Cunningham SW, Banks J, et al. Forecasting and Management of Technology. 2011.
- [54] Zartha Sossa JW, Palop Marro F, Arango Alzate B, et al. S-Curve analysis and technology life cycle. Application in series of data of articles and patents.
 Espacios [Internet]. 2016;37. Available from: https://www.revistaespacios.com/a16v37n07/16370719.html.
- [55] Priestley M, Sluckin TJ, Tiropanis T. Innovation on the web: the end of the Scurve? Internet Hist [Internet]. 2020;0:1–23. Available from:

https://doi.org/10.1080/24701475.2020.1747261.

- [56] Taylor M, Taylor A. The technology life cycle: Conceptualization and managerial implications. Int J Prod Econ [Internet]. 2012;140:541–553.
 Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpe.2012.07.006.
- [57] Fernald KDS, Weenen TC, Sibley KJ, et al. Limits of Biotechnological Innovation. Technol Invest. 2013;04:168–178.
- [58] Speziali MG. Cellulose technologies applied to biomedical purposes from the patentometric point of view. Cellulose [Internet]. 2020;0123456789. Available from: https://doi.org/10.1007/s10570-020-03477-z.
- [59] Armstrong K. Emerging Industrial Applications. In: Styring, Peter; Quadrelli, Elsje Alessandra; Armstrong K, editor. Carbon Dioxide Util Closing Carbon Cycle [Internet]. 1st ed. Elsevier B.V.; 2015. p. 237–251. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62746-9.00013-X.
- [60] Basu B, Ghosh S. Assessment of Technology and Manufacturing ReadinessLevels. Biomater Musculoskelet Regen. Springer Singapore; 2017. p. 235–246.
- [61] DoD USA. Technology Readiness Assessment (TRA) Deskbook. Technology
 [Internet]. 2009;1-H1. Available from: http://www.dod.mil/ddre/doc/DoD TRA July 2009 Read Version.pdf.
- [62] WIPO. International Patent Classification (IPC) [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct7]. Available from: https://www.wipo.int/classifications/ipc/en/.
- [63] Eisinger D, Tsatsaronis G, Bundschus M, et al. Automated Patent Categorization and Guided Patent Search using IPC as Inspired by MeSH and PubMed. J Biomed Semantics [Internet]. 2013;4:S3. Available from: http://www.jbiomedsem.com/content/4/S1/S3.
- [64] CMI. Medical Grade Hydrogel Market Analysis [Internet]. 2020. Available from: https://www.coherentmarketinsights.com/ongoing-insight/medical-gradehydrogel-market-1906.
- [65] Chacon, E.; Saenz XJ. Topical compositions and methods for treating wounds [Internet]. El Paso, TX, United States; 2017. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/098-621-616-333-952/fulltext.
- [66] Cui H., Walston J, Abadir P, et al. Supramolecular hydrogels containing angiotensin receptor blockers for taget treatment of diabetic wounds [Internet].
 United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/116-025-

589-180-515.

- [67] Ribas, A; Escuin-Ordinas H. Wound Healing Using BRAF Inhibitors [Internet].
 United States; 2017. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/052-437-076-300-287/fulltext.
- [68] Hoste E., Mees M., Thielemans W. Means and methods for wound healing [Internet]. Belgic; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/102-001-386-486-958/fulltext.
- [69] Moro L., Longo LM., Celasco G. Corteloxone 17-alpha-propionate for use in the treatment of skin wounds and/or atrophic skin disorders [Internet]. 2016. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/186-543-816-198-360/fulltext.
- [70] Miller FD., Kaplan DR., Naska S., et al. Compositions and metthods for enhancing hair growth, promoting skin regeneration, and wound healing [Internet]. Canada; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/049-390-788-879-801/fulltext.
- [71] Isseroff RR., Tartar DM., Nguyen CM., et al. Compositions and methods to promote wound healing [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/125-598-393-351-305/fulltext.
- [72] Abdel-Naby W., Rosenblatt M., Lawrence BD., et al. A method to enhance wound healing using silk-derived protein [Internet]. United States; 2019.
 Available from: https://www.lens.org/lens/patent/017-058-822-189-957/fulltext.
- [73] Prabhune AA., More SV., Agawane SB. A novel pharmaceutical wound healing composition [Internet]. India; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/178-933-648-690-21X.
- [74] Farmer S., Alibek K., Tskhay A. Therapeutic composition for enhanced healing of wounds and scars [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/005-783-771-195-893.
- [75] Yates KM, Proctor CA, Atchley H. Antimicrobial silver hydrogel composition for the treatment of burns and wounds [Internet]. United States; 2016. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/058-815-458-651-924.
- [76] Al-Waili N. Compositions for management of wounds, skin diseases, dehydration, chronic diseases, and respiratory diseases [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/009-938-343-486-968/fulltext.

- [77] Sabacinski, K. A.; Kaufman JL. Buckwheat honey and povidone-iodine woundhealinh dressing [Internet]. United States; 2019. Available from: https://patentscope.wipo.int/search/de/detail.jsf?docId=WO2019040185.
- [78] Sabacinski, K. A.; Kaufman JL. Buckwheat honey and bacitracin woundhealing dressing [Internet]. United States; 2019. Available from: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019078931.
- [79] Wardell MR. Wound healing compositions comprising buckwheat honey and methylglyoxal and methods of use [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/112-149-895-369-657/fulltext.
- [80] Myntti MF. Wound Gel Containing antimicrobial composition [Internet]. United States; 2016. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/128-633-405-918-613/fulltext.
- [81] Kilic, A.; Cicec H. Formulation for topical wound treatment [Internet]. 2020.Available from: https://www.lens.org/lens/patent/053-457-995-048-021/fulltext.
- [82] Hamed S. Topical erytropoietin formulations and meethods for improving wound healing with and cosmetic use of the formulations. United States; 2017.
- [83] Rodgers KE., Dizerega GS. Methods for promoting wound healing [Internet].
 United States; 2015. Available from: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015123383.
- [84] Kim M-H., Safadi F., Yu B. GPNMB Compositions for Treatment of Skin Wounds [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/088-053-866-834-842.
- [85] Gardner V., Thomas K., Jacobs J., et al. Therapeutic angiogenesis for wound healing [Internet]. United States; 2017. p. 58. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/076-779-450-771-582.
- [86] Buice ME., Sailors DM., Wood JL., et al. Topical composition for improved healing of open wounds [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/060-610-157-845-947/fulltext.
- [87] Ameer GA., Jen M. Wound Healing through Sirt1 overexpression [Internet]. United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/159-725-273-680-350/fulltext.
- [88] Mustoe TA., Galiano RD., Hong SJ., et al. Topical Treatment Of Wounds With Statins And Cholesterol For Scar Reduction [Internet]. United States; 2019.

Available from: https://www.lens.org/lens/patent/060-564-712-372-452.

- [89] Olabisi, R.; Aijaz A. Compositions and methods for wound healing [Internet]. United States; 2020. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/036-944-685-229-179/fulltext.
- [90] Smola H. Composition for the accelerated wound healing of demaged tissue [Internet]. Germany; 2014. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/163-438-300-341-390.
- [91] Prasad A. Cyclic Dipeptides and Wound Healing [Internet]. United States;
 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/170-529-413-122-044/fulltext.
- [92] Phillips A., Eisenbud D., Bannan S., et al. Wound healing compositions and treatments [Internet]. United States; 2015. p. 26. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/001-995-068-765-427.
- [93] Baker, A. B.; Das S. Syndecan-4 proteoliposomes for enhanced cutaneos wound healing and minimized inflammatory immune response [Internet]. United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/155-849-464-591-798/fulltext.
- [94] Thompson J, Goraltchouk A. Drug eluting silicone gel sheeting for wound healing and scar reduction [Internet]. United States; 2016. Available from: https://patents.google.com/patent/US20140148506%0Ahttps://www.google.co m/patents/US20160120821.
- [95] Keswani SG., Boll PL., Balaji S., et al. Method of reducing scar formation in heraling of dermal wounds by administrating interleukin-10 and hyaluronan [Internet]. United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/153-216-512-326-33X.
- [96] Berns MW., Spitler RM., Boss G. Methods and Systems of treating wounds
 [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/110-778-359-459-834/fulltext.
- [97] VanDelden J. Nano-enhanced Wound Dressing [Internet]. United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/078-212-982-713-215/fulltext.
- [98] Grover L, Logan A, De Cogan F, et al. Wound treatment [Internet]. Great Britain; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/030-091-921-187-16X.

- [99] Trexler MM., Graham JL., Breidenich JL., et al. Wound healing compositions comprising biocompatible cellulose hydrogel membranes and methods of use thereof [Internet]. United States; 2015. p. 51. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/036-480-224-935-799.
- [100] Kang SW., Kim K., Sung JH. Pharmaceutical composition for treating or preventing corneal wound comprising thymosin β4 and citric acid [Internet]. Korea; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/119-165-518-380-660.
- [101] Lucas A., Zhang L., Yaron J., et al. Methods Of Wound Healing With Serp-1 Polypeptides [Internet]. United States; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/194-002-503-799-032/fulltext.
- [102] Jagannath MR., Venkataranganna MV., Baggavalli S., et al. Method of wound healing [Internet]. India; 2018. p. 21. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/073-281-506-968-863/fulltext.
- [103] Jiang W, Harding K. Molecular targets for healing or treating wounds [Internet]. Great Britain; 2017. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/012-389-879-559-570/fulltext.
- [104] Prendergast PT. Wound fluid elevated protease enzyme inhibition through camelid blood products [Internet]. Australia; 2017. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/152-165-258-663-600.
- [105] Latif A. Novel formulations for treatment of pain, neuropathy, wounds and ulcers [Internet]. United States; 2016. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/005-179-226-678-899.
- [106] Perricone N V. Wound healing using topical systems and methods [Internet]. United States; 2016. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/095-583-622-941-811/fulltext.
- [107] Zutshi M. SDF-1 for anal and sphincter wound healing [Internet]. United States; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/056-526-996-911-267.
- [108] Asculai E., Geblinger D., Kleyman M., et al. Debriding Composition for trating wounds [Internet]. Israel; 2019. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/143-201-983-653-826.
- [109] Kim I-A., Kim S-H., Jung J-H., et al. Pharmaceutical composition for protecting wounds, providing hemostasis, or preventing adhesion in the gastrointestinal

tract [Internet]. Korea; 2018. Available from: https://www.lens.org/lens/patent/091-592-866-324-667.

- [110] Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. Rev Col Bras Cir. 2008;35:203–206.
- [111] Garwood CS, Steinberg JS. What's new in wound treatment: a critical appraisal. Diabetes Metab Res Rev [Internet]. 2016;32:268–274. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.2747.
- [112] Packer CF, Ali SA, Manna B. Diabetic Ulcer. StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2020. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499887/.
- [113] Valle LJ d;, Díaz A., Puiggalí J. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives. Gels [Internet].
 2017;3:27. Available from: http://www.mdpi.com/2310-2861/3/3/27.
- [114] Ernst H. Patent information for strategic technology management. World Pat Inf. 2003;25:233–242.
- [115] Ernst H, Legler S, Lichtenthaler U. Determinants of patent value: Insights from a simulation analysis. Technol Forecast Soc Change [Internet]. 2010;77:1–19. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.techfore.2009.06.009.

 CAPÍTULO 2 – Síntese e caracterização de hidrogéis multipoliméricos contendo hidroxiapatita substituída com magnésio e vitamina D com potencial pró-angiogênico e osteogênico

3.1. Objetivo Geral

Esta etapa do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de hidrogéis multipoliméricos contendo nanopartículas de hidroxiapatita substituídas com magnésio e vitamina D que apresente potencial de osteogênico e pró-angiogênico.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita pura (HAp) e hidroxiapatita substituída com magnésio (HAMg), nas porcentagens de 2,5; 5 e 10;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas de hidroxiapatita;
- Obter hidrogéis híbridos a partir de quitosana e CMC contendo HA e vitamina D;
- Caracterizar físico-quimicamente os hidrogéis;
- Avaliar as alterações de pH, a capacidade de *swelling* e a biodegradação dos hidrogéis;
- Avaliar o perfil de liberação de íons dos hidrogéis;
- Avaliar a capacidade de formação de apatita sobre a superfície dos hidrogéis;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das HA e dos hidrogéis em cultura celular de fibroblastos de camundongo (L929), pré-osteoblastos de camundongo (MC3T3) e célula endotelial humana (EA.hy926);
- Avaliar a aderência e proliferação das MC3T3 e EAhy.926 sobre os hidrogéis;
- Avaliar a capacidade osteogênica *in vitro* dos hidrogéis pela formação de nódulos de mineralização, produção de fosfatase alcalina e óxido nítrico pela MC3T3;
- Avaliar o efeito pró-angiogênico *in vitro* dos hidrogéis pela análise da formação de tubos e produção de óxido nítrico pela EA.hy926.

3.3. Revisão da literatura

3.3.1. Hidrogel

Os hidrogéis foram os primeiros biomateriais desenvolvidos para uso no corpo humano e em 1960. Wichterle e Lím (1960) desenvolveram um hidrogel de polihidroxietilmetacrilato (PHEMA) biocompatível, que foi usado para lentes de contato.

Nas últimas décadas, os hidrogéis representaram grandes avanços na pesquisa biomédica. Devido as suas propriedades e semelhanças à matriz extracelular, os hidrogéis podem ser usados para aplicações que incluem liberação controlada de fármacos, bioengenharia, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, indústria farmacêutica, lentes de contato, curativos, diagnósticos e biossensores (AHMED, 2015; KORAH; ANILKUMAR; THOMAS, 2018; PRABAHARAN; MANO, 2006; RATNER *et al.*, 2004).

Historicamente, os hidrogéis foram divididos em 3 gerações. A primeira geração era composta de hidrogéis de redes poliméricas simples de origem sintética para aplicação oftalmológica e sistema de liberação de drogas. A segunda geração é composta pelos hidrogéis compostos por polímeros inteligentes com capacidade de responder a estímulos externos como luz, pH e temperatura. A terceira geração é baseada no tipo de reticulação (*crosslinking*) que ocorre nos hidrogéis. Atualmente, uma quarta geração de hidrogéis tem sido sugerida. Aplicando nanotecnologia e química de polímeros, novos hidrogéis estão sendo desenvolvidos "sob medida" para apresentar as propriedades de interesse, o que significa que podem ser usados de forma mais direcionada e precisa (CASCONE; LAMBERTI, 2020; YUE *et al.*, 2020).

A formação de hidrogéis envolve um processo de reticulação (*crosslinking*) de cadeias poliméricas, processo também conhecido como gelificação. As cadeias poliméricas podem ser interligadas por ligações covalentes, sendo conhecidos como hidrogéis químicos ou permanentes, ou por interações físicas como ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals ou interações eletrostáticas, chamados de hidrogéis físicos (MADDALONI; VASSALINI, 2020). Além da reticulação, outras características são importantes para determinar as propriedades dos hidrogéis. As principais estão dispostas na Tabela 4. É importante ressaltar que as classificações fonte/natureza, composição polimérica e conformação estrutural presentes na tabela

são importantes segmentos do mercado do hidrogel, e são considerados nas projeções e estudos de mercado (MOHITE, S; PRASAD, 2020).

Hidrogel	Fonte/Natureza	Natural
		Sintética
		Híbrida
	Composição polimérica	Homopoimérica
		Copolimérica
		Interpenetrante
	Conformação estrutural	Amorfa
		Semicristalina
		Cristalina
		Agregados hidrocoloidais
	Cross-linking	Interações físicas
		Químico
	Carga iônica	Aniônica
		Catiônica
		Não iônica
	Degradabilidade	Degradável
		Biodegradável
		Não degradável
	Swelling	Baixo
		Médio
		Alto
		Superabsorvente
	Porosidade	Nanoporoso
		Microporoso
		Mesoporoso
		Macroporoso

TABELA 4. Classificação dos hidrogéis baseada em suas características.

Para aplicação biomédica algumas propriedades são consideradas importantes no desenvolvimento de um hidrogel: alta capacidade de s*welling* ou intumescimento, boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e flexibilidade (DHIVYA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2019; TENG; LUO; WANG, 2013; VISHNU PRIYA *et al.*, 2016).

Uma variedade de polímeros naturais e sintéticos pode ser usada para formar hidrogéis e serem aplicados na engenharia de tecido. São alguns exemplos: álcool polivinílico (PVA), carboximetilcelulose, colágeno, alginato, quitosana, gelatina e ácido

FONTE: A autora, 2020

hialurônico (DRURY; MOONEY, 2003). Ademais, modificações nas estruturas poliméricas, combinação de polímeros e associações com outros componentes podem trazer melhorias nas propriedades dos hidrogéis, permitindo melhores aplicações clínicas.

Uma das aplicações dos hidrogéis é na área de engenharia de tecidos. Neste segmento, os hidrogéis podem ser aplicados como agentes de preenchimento, como veículos de liberação de drogas de substâncias bioativas ou como estruturas tridimensionais que ancoram as células e servem de estímulos para garantir o desenvolvimento de um tecido necessário (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015). Cascone e Lamberti (2020) relatam que as novas tecnologias têm sido mais direcionadas para regeneração de tecidos cardíacos, cartilagem, osso e músculo. Yasuda et al. (2017) desenvolveram um hidrogel injetável multipolimérico para regeneração de tecido cartilaginoso danificado. O hidrogel é aplicado através de uma inserção e usado como preenchimento do local lesionado. Uma outra tecnologia à base de hidrogel foi desenvolvida para reparo do tecido cardíaco. O hidrogel contendo tropoelastina, proteína da matriz extracelular e precursora da elastina, para reparo da parede de artérias (ELASTAGEN; HARVARD, 2017). Gibson et al. (2013) desenvolveram um sistema de enxerto ósseo que compreende um hidrogel contendo hidroxiapatita substituída com sílico. O biomaterial promove liberação de íons de silício e a cicatrização óssea.

3.3.2. Quitosana

A quitosana é um polímero termossensível natural derivado do processo de desacetilação alcalina de ligações N-acetil presentes na quitina. Ela existe em diferentes pesos moleculares e graus de acetilação e, segundo a literatura, há uma correlação de proporcionalidade entre o aumento na desacetilação da quitosana e aumento da biocompatibilidade e biodegradabilidade do polímero (AHMADI *et al.*, 2015). A estrutura da química da quitosana está representada a seguir (Figura 5).

FIGURA 5. Estrutura química da quitosana



Representação esquemática da estrutura do biopolímero quitosana, obtido a partir da desacetilação da quitina. Fórmula molecular: (C₆H₁₁O₄N)n. FONTE: (ASSIS; SILVA, 2003)

A quitosana é um polímero insolúvel em pH neutro, mas se dissolve facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado (SILVA, 2012). Uma das principais vantagens da quitosana é possibilidade de preparo em diferentes formatos como flocos, microesferas, membranas, nanopartículas e fibras (LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009), e seu uso na composição de hidrogéis, filmes, cimentos, fibras ou esponjas. Devido a sua versatilidade, a quitosana é aplicada na agricultura, tratamento de águas, indústria alimentar, cosmética e biofarmacêutica. No entanto, a sua maior aplicação é na área biomédica (TAVARIA *et al.*, 2013).

Dentre as características que tornam a quitosana apropriada para o uso na biomedicina estão atoxicidade, afinidade com proteínas, atividade antibacteriana, cicatrização de feridas, caráter bioadesivo e sistemas de imobilização de células em gel (COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011; D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

Diversos estudos demonstram a aplicabilidade biomédica da quitosana. Algumas das aplicações seriam em implantes (ortopédicos e odontológicos), reconstituição de tecidos e liberação controlada de drogas, uso como cicatrizante e biocompatível entre tecidos, onde ficou comprovado o uso promissor desse material (KHOR *et al.*, 2009). O uso de *scaffolds* à base puramente de quitosana também mostrou atividade osteocondutora e com capacidade de aumentar a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. Sua superfície hidrofílica que promove a aderência, proliferação e diferenciação celular de osteoblastos e evoca uma reação mínima de corpo estranho na implantação (LI *et al.*, 2005; MUZZARELLI *et al.*, 1994). Seu uso associado à

hidroxiapatita, em implantes de tíbia de ratos, também apresentou boas propriedades de osteocondução e a biodegradação foi praticamente completa (POGORELOV; SIKORA; BUMEYSTER, 2011). O uso de *scaffolds* puramente à base de quitosana não apresentam atividade angiogênica, mas, quando associada a outros componentes como fosfato de cálcio bifásico e células de linhagem estaminal, os *scaffolds* de quitosana podem apresentar atividade angiogênica terapêutica (AHMADI; BURNS; DE BRUIJN, 2009).

Hidrogéis compostos de quitosana têm a capacidade de adsorver tanto moléculas aniônicas quanto catiônicas se as ligações de hidrogênio puderem ser estabelecidas. Esse recurso confere a estes hidrogéis um grande potencial em áreas que abrangem desde a purificação de água ao encapsulamento de proteínas (BOARDMAN *et al.*, 2017). Para *scaffolds* usados em engenharia de tecidos, a porosidade de hidrogéis à base de quitosana apresenta um enorme impacto em propriedades como inchaço, aderência celular e taxa de proliferação celular que são importantes no crescimento dos tecidos (DHIVYA *et al.*, 2015).

A maioria dos hidrogéis injetáveis para aplicações biomédicas é baseada na quitosana (VALLE; DÍAZ; PUIGGALÍ, 2017), sendo possível modificar a composição para que a reticulação do gel aconteça através da irradiação UV ou do aumento da temperatura e até de alterações no pH (CAO *et al.*, 2014; YASMEEN *et al.*, 2014). As misturas de quitosana com outros polímeros sintéticos ou naturais também já foi demonstrada com aumentos significativos no desempenho geral e na capacidade de atingir o estado de equilíbrio de intumescimento ou *Swelling* (DEL VALLE, *et al.*, 2017).

3.3.3. Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um derivado da celulose, o polímero mais abundante da natureza (HAHN *et al.*, 2020). Ela contém grupos carboximetil que são gerados pela reação da celulose e o ácido monocloroacético na presença de hidróxido de amônio (THOMAS; SOLOMAN; REJINI, 2016). É o grupo carboximetil que dá ao polímero sua solubilidade e devido à sua natureza altamente higroscópica, ela se hidrata rapidamente. A carboximetilcelulose sódica é o sal de sódio da carboximetilcelulose, um derivado aniônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas orais, oftálmicas, injetáveis e tópicas (AYATULLAH HOSNE ASIF *et al.*, 2019).

A CMC é um polímero de arranjo linear, cuja estrutura está apresentada na Figura 6. Quando solubilizado em água, a CMC forma um gel transparente. Ela é solúvel em solução alcalina leve com excelente dispersão e forças de ligação. As propriedades físico-químicas e aplicações da CMC dependem, essencialmente do grau médio de substituição, grau médio de polimerização, uniformidade da substituição e pureza do produto (NÓBREGA; AMORIM, 2015).

FIGURA6. Estrutura química da carboximetilcelulose



Representação esquemática da estrutura do biopolímero carboximetilcelulose, formado exclusivamente de moléculas de β-glicose, ligadas por ligações β-1,4-o-glucosídicas. Formula molecular: (C₆H₁₀O₅)n. FONTE: (COMMS, 2018)

O uso de CMC já foi relatado em aplicações farmacêuticas, liberação de drogas, cicatrização de feridas e engenharia de tecidos (BUHUS *et al.*, 2009; COATHUP; CAMPION; BLUNN, 2020; LONG; LUYEN, 1996). A aplicação da CMC em engenharia de tecido ósseo vem sendo estudada e seu potencial osteoindutivo e osteogênico já foi demostrado (COATHUP; CAMPION; BLUNN, 2020; PRIYA *et al.*, 2021).

Hidrogéis à base de celulose e derivados são bem conhecidos pela baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e microestrutura porosa e ajustável. Mas apesar de suas boas propriedades, as aplicações de derivados de celulose podem ser aprimoradas pela associação com outros componentes (KO; SFEIR; KUMTA, 2010;
VALLE; DÍAZ; PUIGGALÍ, 2017). A associação de CMC e polivinilpirrolidona (PVP) resultou em melhor resistência mecânica, alta capacidade de absorção de água e aumento da biodegradação (AKRAM; HUSSAIN, 2017). A associação da CMC, quitosana e hidroxiapatita demonstrou uma perspectiva promissora para biomateriais usados em regeneração óssea e dentária devido à boa propriedade mecânica, taxa de biodegradação ajustável, estabilidade, citocompatibilidade, bioatividade, aumento da aderência e proliferação celular em células osteogênicas e potencial para vascularização (ARAVAMUDHAN *et al.*, 2014; LIUYUN *et al.*, 2008; MALIK *et al.*, 2020; PASQUI *et al.*, 2014; PRIYA *et al.*, 2021)

3.3.4. Gelatina

A gelatina é um polímero natural proteico biocompatível e biodegradável (Figura 7), derivado da hidrólise do colágeno, o principal componente da matriz extracelular (CHIRANI *et al.*, 2015; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). A presença de tripeptídicos Arg-Gly-Asp em sua estrutura proporcionam uma interação com as células e promovem a aderência, proliferação e diferenciação celular (THANGPRASERT *et al.*, 2019). Por ser solúvel, não apresentar imunogenicidade e exibir comportamento anfotérico, a gelatina tem sido aplicada em hidrogéis para a fabricação de lentes de contato, matriz para engenharia de tecidos e sistemas de liberação de drogas (BUHUS *et al.*, 2009).

Por sua estrutura semelhante ao colágeno, a gelatina tem sido muito usada em *scaffolds* para engenharia de cartilagem e tecido ósseo (LIEN; KO; HUANG, 2009; LUO *et al.*, 2015). Entretanto, sua baixa rigidez biomecânica e rápida biodegradação trazem desvantagens para o material. Por isso, a gelatina tem sido aplicada em compósitos numa estratégia promissora para gerar novos biomateriais com qualidades aprimoradas, combinando diferentes materiais e suas propriedades intrínsecas (LUO *et al.*, 2015). Sua associação com quitosana, alginato, PVA e partículas de fosfato de cálcio já foram relatadas na literatura (JAIPAN; NGUYEN; NARAYAN, 2017; MARRELLA *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2011).

FIGURA 7. Estrutura química da gelatina



Representação esquemática da estrutura do biopolímero gelatina. A gelatina é uma mistura de poli e oligopeptídeos resultante da desnaturação do colágeno. FONTE: (ALIHOSSEINI, 2016)

Para obter um bom ambiente que permite o preenchimento e o reparo de defeitos ósseos, Raucci et al. (2018) produziram hidrogéis de gelatina e hidroxiapatita, ambos mimetizando o ambiente ósseo cortical. Com isso, foram observadas citocompatibilidade e osteocondutividade. Luo et al. (2015) demonstraram um método de fabricação de scaffolds tridimensionais à base de gelatina, alginato e hidroxiapatita com potencial para reparo de defeitos complexos em tecidos osteocondrais e periodontais. Os resultados mostraram materiais com força mecânica adequada e suporte para aderência e proliferação celular. Re et al. (2019) demonstraram que os hidrogéis sintetizados à base de gelatina e quitosana são biocompatíveis e biorreabsorvíveis e suas propriedades químicas, morfológicas e mecânicas são adequadas para apoiar o crescimento, osteodiferenciação e mineralização das células e sua aplicação potencial para regeneração óssea. Já os hidrogéis produzidos por Thangprasert et al. (2019), demonstraram que o crosslinking físico e químico entre gelatina e PVA conseguiu mimetizar a fibrilação que ocorre entre colágeno e ácido hialurônico na formação do tecido cartilaginoso. E apesar de não demonstrar as propriedades mecânicas adequadas para suportar a interface do osso subcondral, os hidrogéis tiveram excelente comportamento de intumescimento, taxa de degradação, tamanho de poro e propriedades biológicas.

A gelatina também tem sido aplicada em processos de angiogênese terapêutica, principalmente compondo *scaffolds* e carreando fatores de crescimento. Montero *et al.* (2012) desenvolveram um *scaffold* contendo gelatina, citocina e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), no qual foram observados aderência, proliferação, migração e formação de tubos em células endoteliais. Del Gaudio *et al.* (2013) apresentaram um *scaffold* de gelatina carreando fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O material demonstrou citocompatibilidade, indução de diferenciação celular e formação de novos vasos.

3.3.5. Álcool polivinílico

O álcool polivinílico, PVA, é um polímero sintético produzido pela polimerização do acetato de vinila seguida de reação de hidrólise do acetato de polivinila em álcool polivinílico (COSTA; MANSUR, 2008). Ele é solúvel, biocompatível, bioinerte, biodegradável, de consistência macia, aparência transparente, alto grau de intumescimento, estável quimicamente e com excelentes propriedades mecânicas elásticas e compressivas (LIU *et al.*, 2020; MARRELLA *et al.*, 2018; THANGPRASERT *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2004).

Por suas propriedades, o PVA tem sido o polímero de escolha para compor hidrogéis usados na substituição de cartilagem. Quando presente num hidrogel, o PVA tende a formar poros com menores diâmetros, o que aumenta sua capacidade de armazenar grandes quantidades de água. Esta característica permite que um hidrogel de PVA atue como um lubrificante semelhante à superfície da cartilagem (LI; WANG; WANG, 2016).

Thangprasert *et al.* (2019) mencionam a semelhança funcional do hidrogel de PVA hidrofílico ao ácido hialurônico no tecido cartilaginoso e, por isso, o PVA foi selecionado para ser a matriz de base dos *scaffolds* desenvolvidos no trabalho, sendo associado à gelatina. Asran, Henning e Michler (2010) fabricaram uma estrutura óssea à base de nanofibras. Os resultados mostram que tanto a resistência à tração quanto o módulo de elasticidade dos hidrogéis de PVA e HA são maiores do que os dos hidrogéis de PVA puro.

Apesar de suas qualidades mecânicas e de sua biocompatibilidade, os hidrogéis de PVA geralmente carecem de funcionalidades para aderência celular (LIU

et al., 2009; MARRELLA *et al.*, 2018). Por isso, normalmente o PVA é usado em combinação com outros polímeros que possa suprir essa função. Naghavi Alhosseini *et al.* (2012) demonstraram que a proliferação de células em estruturas de PVA e quitosana foi maior do que em estruturas de PVA, indicando que a quitosana pode ter acelerado a taxa de proliferação de células nervosas PC12. Lan *et al.* (2019) desenvolveram um *scaffold* para engenharia de tecido ósseo contendo PVA e nanotubos de carbono, e para melhorar as propriedades de fixação celular dos hidrogéis adicionaram fosfato de cálcio bifásico.

3.3.6. Hidroxiapatita

Entre as diferentes formas de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita bioativa tem sido investigada de forma mais extensa devido às suas excelentes respostas biológicas ao meio fisiológico (KALITA; BHATT, 2007). A hidroxiapatita constitui um modelo para o processo de mineralização ósseo e é base de materiais para uso em enxertos, cimentos, recobrimentos bioativos ou arcabouços para terapia celular (LEGEROS, 2002). Esta tem sido estudada tanto na forma micro como nanoparticulada, após ter demonstrado potencial biocompatível (SANOSH *et al.*, 2009), além de servir como matriz guia para regeneração óssea, preenchendo os prérequisitos de ser osteoindutor e osteocondutor (TRIPATHI *et al.*, 2012). Outra característica da hidroxiapatita é sua capacidade de adsorção, fazendo com que células e outras substâncias se fixem sobre sua superfície, essa propriedade confere à hidroxiapatita a possibilidade de carrear fármacos, liberando-os de forma controlada (ROSSI *et al.*, 2000).

A hidroxiapatita estequiométrica possui a proporção de cálcio e fósforo (Ca/P) igual a 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável em temperaturas normais e pH entre 4 e 12 (KOUTSOPOULOS, 2002). A estrutura da hidroxiapatita pura está representada na Figura 8. Do ponto de vista químico, a composição das hidroxiapatitas biológica e sintetizada apresenta grandes diferenças da hidroxiapatita estequiométrica devido às substituições iônicas (CAMARGO *et al.*, 2007; WEBSTER *et al.*, 2001). O osso humano é composto por nanocristais de apatita não estequiométrica com estruturas imperfeitas devido às cossubstituições iônicas essenciais (LIN, K; CHANG, 2015).

71

FIGURA 8. Estrutura cristalina da hidroxiapatita



A hidroxiapatita é o constituinte principal da fase mineral de ossos e dentes humanos. Sua estrutura pertence ao sistema hexagonal, grupo espacial P6₃/m, com dimensões de célula cristalina de a = 9,423 Å e c = 6,875 Å, valores válidos para a hidroxiapatita estequiométrica. Fórmula molecular: [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]. FONTE: (PRAMATAROVA, L; PECHEVA, 2006)

As hidroxiapatitas sintetizadas pelo método da precipitação utilizando baixas temperaturas possuem elevados teores de carbonato e baixa cristalinidade. Assim, o desempenho clínico das hidroxiapatitas é dependente dessas modificações, daí a importância do controle desses parâmetros para que suas diversas propriedades, tais como cristalinidade, trocas iônicas, anisotropia, tamanho de cristalito e microdeformação de rede sejam bem determinados de modo que seja assegurado o comportamento adequado do material *in vivo* (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

A substituição da hidroxiapatita é um processo pelo qual se introduzem íons metálicos na rede cristalina substituindo os íons de cálcio e trazendo características diferenciadas a ela. A adição de traços metálicos à hidroxiapatita é considerada benéfica, uma vez que estes elementos estão naturalmente presentes no mineral ósseo e são essenciais para o crescimento celular (KALITA *et al.*, 2004).

A estrutura dos fosfatos cerâmicos permite que seus constituintes sejam substituídos facilmente por uma grande variedade de complexos e metais, como chumbo (Pb⁺²), cádmio (Cd⁺²), cobre (Cu⁺²), zinco (Zn⁺²), estrôncio (Sr⁺²), cobalto

(Co⁺²), ferro (Fe⁺²), flúor (F⁻), cloro (Cl⁻), bem como grupos carbonatos (CO₃) e vanadatos (VO₄) (ROSSI *et al.*, 2000).

Os minerais inorgânicos desempenham papéis versáteis e importantes. Na substituição óssea, o lítio (Li⁻), dentre os elementos metálicos monovalentes testados, foi o único que demonstrou resultados relevantes (LEHMANN; LEE, 2013). Muitos dos bivalentes demonstraram efeitos benéficos para aplicação em engenharia de tecido ósseo: zinco (Zn⁺²), magnésio (Mg⁺²), estrôncio (Sr⁺²), cobre (Cu⁺²) e cobalto (Co⁺²), e atividade osteogênica e/ou angiogênica foi constatada (BOSE *et al.*, 2013). Tri e tetravalentes (Mn⁺³; Bi⁺³; Si⁺⁴), assim como a adição combinada de bivalentes (Zn⁺² e Mg⁺²; Sr⁺² e Mg⁺²), também apresentaram resultados desejáveis (XUE *et al.*, 2008).

Como muitos dos elementos inorgânicos metálicos já são incorporados no corpo através da dieta e participam de importantes processos biológicos, os órgãos regulatórios fiscalizadores consideram seu uso como aditivo em cerâmicas de fosfato de cálcio mais seguro do que a adição de fármacos e fatores de crescimento (BOSE *et al.*, 2013). De toda forma, a adição de traços metálicos aumenta naturalmente a produção de importantes fatores de crescimento como a proteína morfogenética óssea – 2 (BMP-2) e o VEGF (GAO *et al.*, 2001; HANAI *et al.*, 2006).

A incorporação de magnésio à hidroxiapatita tem sido muito estudada, principalmente por melhorar sua bioatividade (GOMES *et al.*, 2009; LANDI *et al.*, 2006, 2008). A literatura menciona que a quantidade ideal de magnésio a ser incorporada na estrutura da hidroxiapatita está entre 5 e 10% (LANDI *et al.*, 2000, 2008; LAURENCIN *et al.*, 2011; SERRE *et al.*, 1998). Nos estudos de Cox *et al.* (2014), diferentes substituições foram feitas na rede cristalina da hidroxiapatita, inclusive com uma substituição de 10% com magnésio, e os resultados *in vitro* demonstraram viabilidade celular promissora após 7 dias, e os testes *in vivo* demonstraram potencial bioatividade após 28 dias. Nos resultados de Pereira, R. F. (2017), as substituições de diferentes fosfatos de cálcio com magnésio foram bem-sucedidas e não apresentaram citotoxicidade quando testadas *in vitro*.

3.3.7. Magnésio

Depois do cálcio, o magnésio é o elemento mais abundante do osso e parte do magnésio da superfície óssea fica disponível como reserva para manter os níveis intra

e extracelular (MELLIS *et al.*, 2011; O'BRIEN; NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2013). O magnésio é necessário para a síntese de DNA, RNA e proteínas, e participa de diversos processos bioquímicos atuando como cofator para centenas de reações enzimáticas (WOLF; CITTADINI, 1999).

A presença do magnésio também desempenha um papel no remodelamento ósseo, com sua concentração sendo maior no início do remodelamento e diminuindo com o aumento da calcificação (BIGI *et al.*, 1993). Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que o magnésio, em quantidades adequadas, ele induz os osteoblastos e inibe os osteoclastos, levando ao aumento da reabsorção óssea (MAMMOLI *et al.*, 2019). Por isso, dietas com deficiência de magnésio podem levar a distúrbios de remodelação óssea, aumento da atividade osteoclástica e risco de osteoporose (RUDE *et al.*, 2005). Além disso, o magnésio também auxilia na deposição de cálcio no osso por meio da interação com a vitamina D3 (MAMMOLI *et al.*, 2019).

O uso do magnésio *in vitro* também já foi associado a respostas que sugerem um envolvimento direto e vital na manutenção da função vascular, induzindo angiogênese (MAIER *et al.*, 2004; SHAMOSI *et al.*, 2015; VISHNU PRIYA *et al.*, 2016). Baixos níveis de magnésio estão relacionados a inflamações, reações exageradas do sistema imune e disfunções endoteliais (MAIER *et al.*, 2004).

3.3.8. Vitamina D

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel conhecida nas suas duas formas comuns, vitamina D3 (colecalciferol) e vitamina D2 (ergocalciferol). A Figura 9 mostra a estrutura química das vitaminas D2 e D3. A vitamina D3 é feita na pele em resposta à exposição à luz UVB e ambas as formas de vitamina D também podem ser obtidas a partir da dieta. Uma vez no corpo, a vitamina D3 é metabolizada pelo fígado em sua forma circulante, 25-hidroxivitamina D3 (25(OH)D3) (BARRAL, 2007) e requer uma hidroxilação adicional no rim para atuar no metabolismo do cálcio, tornando-se 1,25 (OH)₂D3.

A vitamina D é o maior regulador da homeostase de cálcio no organismo e protege contra a deficiência de cálcio atuando especialmente no intestino, rim, glândula paratireoide e osso (VAN DRIEL; POLS; VAN LEEUWEN, 2005). No osso, a 1,25(OH)₂D3 é importante para a mineralização, por meio do controle da absorção de cálcio no intestino e reabsorção no rim. Segundo Holick (1996), a vitamina D atua na mineralização mantendo quantidades adequadas de cálcio e fósforo na circulação e no fluido extracelular.



Representação esquemática da estrutura da vitamina D em duas formas: ergocalciferol (vitamina D2) e colecalciferol (vitamina D3), ambas ainda em suas formas inativas. A ativação no fígado ou no rim acontece com a adição de grupos OH, resultando nas formas hormonais da vitamina. FONTE: (PEIXOTO *et al.*, 2012)

A 1,25(OH)₂D3 regula o metabolismo ósseo e, também, é responsável por estimular a produção de proteínas da matriz óssea (colágeno, osteopontina e osteocalcina) e a atividade da fosfatase alcalina envolvidos na mineralização (FRETZ *et al.*, 2008). A presença do receptor da vitamina D nos osteoblastos permite efeitos diretos de 1,25(OH)₂D3 nos osteoblastos, mas a magnitude dos efeitos está sujeita à presença de muitos outros fatores. A vitamina D afeta a proliferação dos osteoblastos, bem como a diferenciação e mineralização, mas esses efeitos variam com o tempo de tratamento, dosagem e origem dos osteoblastos (VAN DRIEL; VAN LEEUWEN, 2014). A deficiência e insuficiência da vitamina D pode causar uma série de doenças ósseas, incluindo raquitismo, osteoporose e hipocalcemia.

Nas últimas décadas, estudos indicam que a vitamina D também desempenha um importante papel regulador na função imune, inflamação, angiogênese e pode proteger contra o processo de envelhecimento (JAMALI; SORENSON; SHEIBANI, 2018; OZEKI; AOKI; FUKUI, 2008).

Já foi reportado que a vitamina D modula as funções das células endoteliais e que células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) são capazes de produzir

vitamina D (ZEHNDER *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que vitamina D é capaz de estimular a proliferação de células endoteliais e inibir a apoptose, aumentando a produção de óxido nítrico em um modelo murino (PITTARELLA *et al.*, 2015).

A forma hormonal e biologicamente ativa 1,25(OH)₂D regula a função da artéria coronária, da aorta e das células musculares lisas vasculares, sendo que nestas últimas aumenta a produção de VEGF. A 1,25(OH)₂D3 sintetizada por condrócitos ajuda a regular a diferenciação dessas células, angiogênese e osteoclastogênese (JAMALI; SORENSON; SHEIBANI, 2018; OZEKI; AOKI; FUKUI, 2008).

No trabalho de Wong *et al.* (2014), o tratamento com vitamina D3 restaurou completamente a resposta angiogênica normal em camundongos com disfunções vasculares, podendo reverter estes quadros. Ainda neste trabalho, é sugerido que a vitamina D3 é um forte candidato para restaurar a angiogênese no diabetes mellitus.

A insuficiência ou deficiência da vitamina D está associada a infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e estenose aórtica calcificada, que pode levar à calcificação vascular maciça observada na doença renal crônica (ZITTERMANN; KOERFER, 2008).

3.3.9. Osteogênese

A osteogênese é o processo de formação óssea (SETIAWATI; RAHARDJO, 2018). Ela acontece através pela proliferação, crescimento e maturação de células osteoprogenitoras (YUE *et al.*, 2020). O processo de formação óssea é chamado de ossificação endocondral quando o tecido mesenquimal se diferencia em cartilagem e posteriormente é substituída por osso. Quando as células mesenquimais se diferenciam diretamente em tecido ósseo, o processo é chamado de ossificação intramembranosa (GILBERT, 2000). Este processo ocorre principalmente nos ossos do crânio e, também, no reparo ósseo (SETIAWATI; RAHARDJO, 2018).

Os osteoblastos participam da ossificação intramembranosa e são consideradas as principais células funcionais da formação óssea, responsáveis pela síntese, secreção e mineralização da matriz óssea (BAI *et al.*, 2018). Além dos osteoblastos existem os osteoclastos. Os osteoclastos são derivados de células-tronco hematopoiéticas e são os principais responsáveis pela reabsorção óssea. As

interações coordenadas entre osteoblastos e osteoclastos mantêm a massa óssea normal e auxiliam na remodelação óssea final (BUENO; GLOWACKI, 2009).

No processo de consolidação óssea e formação de novo tecido ósseo, diferentes tipos de moléculas estão envolvidos, incluindo fatores osteogênicos pertencentes principalmente à superfamília do fator de crescimento transformador-β (TGF-β), como proteína morfogenética óssea (BMP), e fatores angiogênicos, como fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

O osso natural é composto basicamente de hidroxiapatita, íons e colágeno. Qualquer material artificial usado para aplicação em reconstrução óssea deve mimetizar as funções naturais do osso (MOHAMMAD; AL-LOHEDAN, 2017). Atualmente, para a utilização como substitutos do tecido ósseo, existem diversos biomateriais disponíveis. Eles variam não somente em relação à sua origem (natural ou sintético) e composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos), mas também quanto à sua ação mecânica e conFiguração espacial (blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e hidrogéis) (ABUKAWA *et al.*, 2006; BAI *et al.*, 2018; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

Idealmente, os materiais para aplicação em tecido ósseo devem atender aos seguintes requisitos: biocompatibilidade, não imunogenicidade, não toxicidade, biodegradação, boas propriedades mecânicas, boa porosidade e estrutura tridimensional, com uma grande proporção de volume de superfície para aderência e proliferação celular (YUE *et al.*, 2020). Além disso, espera-se também que o biomaterial para tecido ósseo apresente capacidades adicionais como a capacidade de entregar moléculas bioativas de forma controlada e previna patologias (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009). O uso da tecnologia de hidrogéis pode trazer todas essas vantagens. Com a escolha das matérias-primas adequadas e a facilidade de adaptação para a geometria desejada, seja ela implantação ou injeção, é possível alcançar um hidrogel com potencial clínico promissor.

3.3.10. Angiogênese

O osso é uma estrutura altamente vascularizada. Durante o processo de reparo de lesão nos ossos, a formação de novos vasos sanguíneos é essencial para a formação do novo tecido (ARNOLD; WEST, 1991), principalmente para que ocorra o transporte de oxigênio, nutrientes e componentes da mineralização óssea (STEGEN; VAN GASTEL; CARMELIET, 2015). Uma resposta angiogênica efetiva e estruturada é fundamental para o reparo ósseo bem-sucedido (DICKSON; KATZMAN; PAIEMENT, 1995). Por consequência, a angiogênese é a chave para o reparo ósseo (HANKENSON *et al.*, 2011).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em um processo envolvendo migração e proliferação de células endoteliais já existentes (SCHAMS; BERISHA, 2004).

O processo da angiogênese é um processo regulado que envolve uma série de estimuladores como o FGF, o VEGF, angiopoietinas e ativadores de integrina. Inibidores como trombospondina, angiostatina e endostatina também participam do processo (DAVIS *et al.*, 1996; ELICEIRI; CHERESH, 1999; NUGENT; IOZZO, 2000; O'REILLY *et al.*, 1994, 1997; PETROVA; MAKINEN; ALITALO, 1999).

A angiogênese acontece regularmente no corpo quando há necessidade, sendo requerida para a cura e reperfusão do tecido. Quando o corpo perde o controle desse processo, pode ocorrer aumento ou diminuição do número de novos vasos. O excesso de atividade angiogênica alimenta os tecidos doentes, como é o caso de câncer, artrite reumatoide e psoríase (ISNER; ASAHARA, 1999; ZICHE; DONNINI; MORBIDELLI, 2005). A angiogênese insuficiente ocorre em doenças como doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e cicatrização tardia de feridas (ISNER; ASAHARA, 1999), onde os vasos sanguíneos não crescem adequadamente e a circulação não é restaurada corretamente, podendo levar à morte tissular.

A angiogênese insuficiente ocorre quando o tecido não pode produzir quantidades adequadas de fatores de crescimento angiogênicos. Portanto, a angiogênese terapêutica destinada a estimular o crescimento de novos vasos sanguíneos com fatores de crescimento e preservar a integridade dos tecidos que sofreram isquemia, está sendo desenvolvida para tratar essas condições (ZICHE; DONNINI; MORBIDELLI, 2005).

Muitos estudos relatam a adição de componentes que auxiliam revascularização do tecido. A adição de metais tem trazido benefícios ao processo. O cobre é conhecido por induzir a angiogênese em células endoteliais e sua associação a fatores de crescimento pode gerar efeitos sinérgicos que são extremamente

importantes para a engenharia de tecidos (principalmente tecido ósseo) e biomateriais (GÉRARD *et al.*, 2010). O estrôncio, embora frequentemente considerado um promotor da osteogênese, tem sido associado ao aumento de fatores proangiogênicos em osteoblastos (FU *et al.*, 2015). O magnésio é capaz de induzir a produção de óxido nítrico nas células endoteliais, que é essencialmente o mesmo mecanismo que o VEGF utiliza para induzir a angiogênese (MAIER *et al.*, 2004).

No estudo de Augustine *et al.* (2014) foi demonstrado que membranas do polímero policaprolactona (PCL) contendo nanopartículas de óxido de zinco são proangiogênicas. E foi demonstrado que nanoflores de óxido de zinco podem induzir a proliferação e migração de células endoteliais e aumentar o número de novos vasos (AYAN *et al.*, 2012).

Yu *et al.* (2017b) então desenvolveram um design de hidroxiapatita com mesoporos que permite a penetração de células, bem como o fluxo de fluido em todo o material, promovendo a aplicação efetiva da regeneração óssea através da combinação de autoajuste *in situ*, plasticidade, angiogênese e osteocondutividade. E assim como as hidroxiapatitas, os hidrogéis são usados na engenharia de tecidos com atividade angiogênica. Vishnu Priya *et al.* (2016) produziram um sistema de hidrogel com 2% de *bioglass* dopado com magnésio e nanopartículas de fibrina, que apresentou potencial angiogênico e osteogênico. Este hidrogel pode ser potencialmente utilizado para regeneração efetiva de defeitos ósseos irregulares.

Cao *et al.* (2014) desenvolveram uma nanopartícula de quitosana associada à BMP e esponjas de gelatina. O material foi testado *in vivo* e *in vitro* e demonstrou promissora atividade angiogênica e osteogênica. Nos estudos de Li, X. *et al.* (2019) foi desenvolvido um compósito biodegradável injetável composto de hidrogel de ácido hialurônico com fibras de poli (ε -caprolactona), que mimetiza a microarquitetura e as propriedades mecânicas da matriz extracelular de tecido mole. O composto injetável demonstrou atividade angiogênica e aumentou as respostas regenerativas dos tecidos nativos (*in vivo*), permitindo assim resultados duradouros da restauração dos tecidos moles.

No mercado também já existem patentes de processos que induzem a revascularização de tecidos. A invenção de Eggink e Hoober (2013) traz o uso de peptídeos na regulação da liberação de um padrão específico de citocinas que promovem a angiogênese e / ou podem ser usados para modular o sistema imune. O

sistema *delivery* patenteado por McKay (2014) compreende uma forma revestimento polimérico utilizado como biomaterial para implantação em locais onde haja defeitos ósseos. Junto a estes revestimentos são adicionados agentes terapêuticos que em certas formas de utilização proporcionam ação angiogênica. Em área semelhante, Drapeau e Wei (2013) desenvolveram revestimento para delivery de agentes terapêuticos em cirurgias; em algumas formas de utilização do sistema há a utilização de agentes angiogênicos e podem ser incluídos em biomateriais ósseos como hidroxiapatitas.

3.4. Materiais e métodos

3.4.1. Materiais

Reagentes: Nitrato de cálcio tetra-hidratado (236,15 g.mol⁻¹ Synth, Brasil); Cloreto de magnésio hexa-hidratado (203,3 g.mol⁻¹, Synth, Brasil); Fosfato de Amônio Monobásico (115,03 g.mol⁻¹, Merck, Alemanha); Solução de Hidróxido de Amônio a 25% (35,04 g.mol⁻¹ Merck, Alemanha); Quitosana de baixa massa molecular, desacetilação > 75% (50-190 g.mol⁻¹, Sigma Aldrich, EUA); Ácido acético glacial (60,05 g.mol⁻¹, Vetec, Brasil); Cloreto de sódio (58,44 g.mol⁻¹, Neon, Brasil), Cloreto de potássio (74,55 g.mol⁻¹, Synth, Brasil); Fosfato de sódio dibásico anidro (141,96 g.mol⁻ ¹, Química Moderna, Brasil); Fosfato de potássio monobásico (136,0855 g.mol⁻¹, Vetec, Brasil); Hidróxido de Sódio (40,0 g.mol⁻¹, Êxodo Científica, Brasil); Bicarbonato de sódio (84,01 g.mol⁻¹, Nuclear, Brasil); Ácido clorídrico (36,46 g.mol⁻¹, Química Moderna, Brasil); Cloreto de cálcio (110,98 g.mol⁻¹,Vetec, Brasil); Sulfato de sódio (142,04 g.mol⁻¹, Synth, Brasil); Tris-hidroximetil aminometano (121,14 g.mol⁻¹, Êxodo Científica, Brasil); Nitrito de sódio (68,99 g.mol⁻¹, Meta Química, Brasil); Ácido Cítrico; Triton X-100 (647 g.mol⁻¹, Chem-Impex, EUA); Gelatina de pele bovina tipo B (Sigma, EUA); Álcool polivinílico hidrolisado 80% (9-10 g.mol⁻¹, Sigma, EUA); Carboximetilcelulose sal sódico (9x10⁴ g.mol⁻¹, Synth, Brasil); Vitamina D em pó (384,64 g.mol⁻¹, Araújo, Brasil).

Meios e Kits: Meio essencial mínimo com modificação de Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA); Meio essencial mínimo com modificação Alfa (αMEM) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA); Meio essencial mínimo com modificação de Dulbecco (DMEM) sem vermelho de fenol (Life Technologies); Meio para células endoteliais humanas sem soro e Soro bovino fetal (SFB) (Gibco, Thermo Fischer Scientific, EUA); Solução antibiótica (10.000 unidades.mL⁻¹ de penicilina, 10mg.mL⁻¹ de estreptomicina); brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA); Dodecil Sulfato de Sódio (LGC Biotecnologia, Brasil); Tripsina-EDTA (0,25%) (Sigma-Aldrich, EUA), Geltrex (Thermo Fisher Scientific, EUA); Kit Fosfatase alcalina (Labtest, Brasil); Assay BCA Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA); Griess Reagent Kit (para quantificação de Nitrito) (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para os testes de cultura celular foram utilizadas linhagens de células fibroblásticas de camundongo L929, adquiridas no Banco do Rio de Janeiro (Brasil). As células endoteliais da linhagem de veia umbilical humana EA.hy926 foram gentilmente doadas pela Professora Dr^a Luciana Andrade, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e as células pré-osteoblásticas de camundongo MC3T3 gentilmente doadas pela Professora Dr^a Adriana Abalen, também do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.4.2. Métodos

3.4.2.1. Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita pelo método da co-precipitação

A síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (HA) foi feita utilizando metodologia adaptada de Cox *et al.* (2014).

O preparo da primeira solução foi feito com 40 mmol de fosfato de amônio monobásico [(NH₄) H₂PO₄] em 150 mL de água deionizada, ajustando o pH para 11 com a adição de hidróxido de amônio (NH₄OH) 25%. A segunda solução foi preparada usando-se 66,7 mmol de nitrato de cálcio tetraidratado [Ca(NO₃)₂]4H₂O em 100 mL de água deionizada sob agitação até a homogeneização.

Em seguida, verteu-se cuidadosamente, gota a gota, a primeira solução (fosfato de amônio) sobre a segunda solução (nitrato de cálcio). Este processo foi feito mantendo agitação vigorosa e temperatura à 100 °C por 24 horas. Nesta etapa, a

solução final foi filtrada e lavada com água deionizada até atingir pH 7,0. O precipitado retido foi seco em estufa a 100 °C por 24 horas, macerado para descompactar o pó e armazenado.

A síntese das HA substituídas com magnésio seguiu a mesma metodologia da HA pura, mas com adição de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂•6H₂O) à segunda solução. Desta forma, foram sintetizadas HA substituindo 2,5%, 5% e 10% da molaridade do cálcio por magnésio. A tabela 5 apresenta as abreviaturas das hidroxiapatitas sintetizadas e a Figura 10 mostra imagens de etapas da síntese.

Grupos de HA	Abreviatura
Hidroxiapatita pura	НАр
Hidroxiapatita substituída com magnésio 2,5%	HA-Mg 2,5%
Hidroxiapatita substituída com magnésio 5%	HA-Mg 5%
Hidroxiapatita substituída com magnésio 10%	HA-Mg 10%
FONTE: A autora, 2021.	

Figura 10. Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita







Etapas da síntese: agitação das soluções em banho de silicone a 100°C, filtração e lavagem do precipitado, e as nanopartículas em pó após maceração. FONTE: A autora, 2021.

3.4.2.2. Preparação do hidrogel

A síntese dos hidrogéis multipoliméricos, contendo hidroxiapatita e vitamina D, foi desenvolvida com base nos protocolos propostos por Thangprasert *et al.* (2019) Wongsawichai *et al.*(2019).

Para a preparação dos hidrogéis foram utilizadas as seguintes soluções base: quitosana de baixa massa molecular relativa (1% m/v) dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 2%; CMC (2% m/v) dissolvida em água deionizada; gelatina (7% m/v) dissolvida em água deionizada; PVA (7% m/v) dissolvido em água deionizada.

Sob agitação, foram adicionadas 500 mg das HA e 50 mg de vitamina D e misturados à solução de quitosana, e logo após, a solução aquosa de carboximetilcelulose foi adicionada gota-a-gota. Em seguida, as soluções de gelatina e PVA foram adicionadas a mistura, que ficou sob agitação por 1 hora. Decorrido este tempo, a mistura foi neutralizada até atingir pH 7 com hidróxido de sódio 10% e lavada três vezes a 3000 rpm por 10 minutos com água deionizada. Ao final, o sobrenadante foi descartado e os hidrogéis armazenados a 4 °C. A Figura 11 ilustra as etapas de preparação dos hidrogéis.



Figura 11. Preparação dos hidrogéis

Etapas de preparação dos hidrogéis: solubilização das soluções poliméricas, adição das nanopartículas de HA e da vitamina D, ajuste de pH, lavagem com centrifugações a 3000 rpm por 10 min e o hidrogel final. FONTE: A autora, 2021. Os hidrogéis formados foram congelados a -20 °C e liofilizados para a realização dos testes de caracterização e testes *in vitro*. Para testes *in vitro*, os hidrogéis foram esterilizados através de várias lavagens com álcool 70% e PBS esterilizado, seguidas de 20 minutos sob luz ultravioleta. Em todos os testes foram utilizados corpos de prova de 10 x 2 mm.

A proporção base dos hidrogéis é 40% de hidroxiapatita, 30% de quitosana e 30% CMC. Wongsawichai *et al.* (2019), demonstraram que a proporção 40/30/30 para HA/quitosana/CMC apresenta alta densidade e força de compressão (0,0354 \pm 0,0064 MPa), e valores de módulo elástico moderado (0,3411 \pm 0,1126 MPa).

Ao final, adicionalmente à proporção base, os hidrogéis contêm 17,5% de gelatina, 4% de PVA e 4% de vitamina D. O uso e as proporções de gelatina e PVA foram determinadas levando em consideração que, em conjunto, estes polímeros têm a capacidade de melhorar as propriedades mecânicas do compósito, mas em alta concentração, principalmente o PVA, diminui sua porosidade, reduzindo a possibilidade de colonização celular (THANGPRASERT *et al.*, 2019; WONGSAWICHAI *et al.*, 2019). A vitamina D foi determinada pela quantidade de hidroxiapatita.

A Tabela 6 apresenta a composição e identificação de cada hidrogel preparado.

Hidrogel	Composição	Identificação
1	HAp, Vitamina D, Quitosana, Carboximetilcelulose, Gelatina e PVA	Gel 1
2	HA-Mg2,5%, Vitamina D, Quitosana, Carboximetilcelulose, Gelatina e PVA	Gel 2
3	HA-Mg5%, Vitamina D, Quitosana, Carboximetilcelulose, Gelatina e PVA	Gel 3
4	HA-Mg10%, Vitamina D, Quitosana, Carboximetilcelulose, Gelatina e PVA FONTE: A autora, 2021.	Gel 4

TABELA 6. Composição d	los hidrogéis	preparados
------------------------	---------------	------------

3.4.2.3. Caracterização físico-química das hidroxiapatitas e dos hidrogéis

3.4.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das HA foi estudada por MEV utilizando microscópio eletrônico JEOL JSM - 6360LV, com sistema EDS (Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X) acoplado, com uma tensão de aceleração de 20 kV e magnificações de 1000x. O sistema de Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) forneceu informação sobre o teor dos componentes químicos, através dos quais determinou-se qualitativamente a composição metálica das amostras.

A morfologia dos hidrogéis foi estudada por MEV utilizando o microscópio eletrônico FIB Quanta 200 FEG 3D também com EDS. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ por 4 horas. Após a remoção do fixador foi adicionado o tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. As amostras em tampão foram enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG, onde foram realizadas as etapas de fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO₂ e metalização, e posterior análise.

3.4.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e tamanho das HA foram avaliadas por MET utilizando microscópio Tecnai G2-12 - FEI Spirit Biotwin 120 kV. Para as análises, as amostras foram dispersas em água e levadas ao ultrassom por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, as suspensões foram depositadas em grades de cobre com filme de carbono para facilitar a condução de elétrons e evitar o acúmulo de cargas e com consequente destruição da amostra. As médias das alturas e dos diâmetros das HA foram obtidas com o software ImageJ.

As análises de microscopia foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG.

3.4.2.3.3. Espectroscopia de absorção atômica

A quantificação de cálcio e magnésio presente nas HA foi realizada também por espectroscopia de absorção atômica (Varian - Modelo AA240FS, Austrália). Para realizar as medições, 20 mg de cada amostra de HA foi dispensada em uma mistura contendo 10 mL de água deionizada e 10 mL de solução nítrica ácida concentrada (65%). Para a dissolução completa das HA, a solução ácida foi aquecida a 250 °C até evaporar cerca de 2/3 da solução. O volume foi aumentado para 50 ml usando água deionizada, o pH foi ajustado para aproximadamente 7 e as amostras foram submetidas a análise de espectrometria de absorção atômica. A substituição em mol (%) do cálcio por magnésio foi calculada a partir das medidas fornecidas pela espectroscopia de absorção atômica, de acordo com a relação abaixo (BIGI *et al.*, 2007):

Substituição experimental mol (%) = cátion / (cátion + Ca) x 100. (Eq.2)

3.4.2.3.4. Difração de raio-X (DRX)

A difração de raio-X foi realizada para determinar o grau de cristalização dos cristais de hidroxiapatita sintetizados, utilizando-se tubo de cobre e radiação de CuKα=1,54051 Å, operando a 30 kV e 30 mA, com variação do ângulo 20 de 10 a 70 graus com velocidade de varredura de 40.min⁻¹, do difratômetro SHIMADZU, XRD-7000 X-RAY, do Departamento de Química da UFMG. Os perfis de difração foram analisados com o *software* OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

O banco de dados do Centro Internacional de Dados de Difração (ICDD) foi utilizado em conjunto com o programa Search-match para identificação das fases presentes nos difratogramas. Os padrões de difração da HA estequiométrica (ICDD - PDF # 01-074-0565) e do β -fosfatotricálcico (β -TCP / ICDD - PDF # 04-008-8714) foram comparados diretamente com os padrões de difração de raios-X de todas as amostras para investigar a presença de picos característicos destes fosfatos de cálcio. Para todas as amostras de HA, os parâmetros de rede, a e c, foram calculados utilizando respectivamente os picos de difração correspondentes aos planos (300) e (002) e usando a equação (CHADHA *et al.*, 2020):

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$$
(Eq.3)

Onde 'd' é o espaçamento interplanar e h, k, l são os índices de Miller. Após o cálculo dos parâmetros de rede os valores encontrados foram utilizados para estimar o volume da rede com a equação:

$$V = 0,866 a^2 c$$
 (Eq.4)

O tamanho do cristalito foi calculado com base nas medidas do pico de difração correspondente ao plano cristalográfico (002) da HA, usando a equação de Scherrer (COX *et al.*, 2014):

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$
(Eq.5)

Onde L = tamanho do cristalito, K = constante de Scherrer dependente da forma do cristal (0,9), λ = comprimento de onda da radiação utilizada, β = é a largura da meia altura do pico em radianos (FWHM) e θ = ângulo de Bragg.

A cristalinidade é definida como a fração de fase cristalina em um volume de amostra. O grau de cristalinidade (Xc) dos nHAs foi calculado usando a seguinte equação:

$$Xc = \left(\frac{K_A}{B_{1/2}}\right)^3$$
(Eq.6)

Onde K_A é uma constante definida em 0,24 e $B_{1/2}$ é o FWHM do plano cristalográfico (002) em graus (REN *et al.*, 2009).

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

A espectroscopia de infravermelho foi realizada para investigar a composição das HA, da vitamina D, dos polímeros e dos hidrogéis. Os espectros de absorção na região do infravermelho das HA, da vitamina D, dos polímeros e dos hidrogéis foram registrados em espectrofotômetro *Perkin Elmer Spectrum GX*, do Departamento de

Química da UFMG. Os espectros foram obtidos a partir de pastilhas de KBr na região de 4500-400 cm⁻¹, e a intensidade dos picos nos espectros indica o material. Os dados foram tratados pelos programas ACD/SpecManager 6.0, ACDLabs, e os espectros foram posteriormente gerados utilizando o programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

3.4.2.3.6. Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada para avaliar a perda de massa das HA, da vitamina D, dos polímeros e dos hidrogéis em função da variação da temperatura. Para as análises, as amostras foram aquecidas a uma razão de 10°C por minuto até 600°C, sob atmosfera dinâmica de N₂, com vazão de 50 mLmin⁻¹. As curvas foram obtidas através do equipamento DTG60 (Shimadzu, Japão) do Departamento de Química da UFMG. Os dados obtidos foram analisados no programa OriginPro 7.0, OriginLab Corportion.

3.4.2.3.7. Isoterma de adsorção e área superficial

A técnica de adsorção de nitrogênio sobre superfícies de materiais é um método amplamente usado na determinação de área de superfície, porosidade e distribuição de poros. As análises foram realizadas no equipamento *Quantachrome AutosorbIQ2 equipament*, do Departamento de Química da UFMG. As HA foram previamente aquecidas a 120°C por 6 horas para desgaseificação. A distribuição do diâmetro de poros foi obtida através da técnica de fisissorção de nitrogênio a 77K. Para o cálculo das áreas específicas, foi empregado o método BET (Brunauer, Emmett e Teller) e BJH (Barrett, Joyner e Halenda), adotando uma faixa de pressão relativa (p/p0) entre 0,03 a 0,5. Os dados obtidos foram plotados no programa OriginPro 7.0, OriginLab Corportion.

3.4.2.3.8. Espalhamento de luz eletroforético

Para avaliar a estabilidade do espalhamento das dispersões das HA e conhecer a carga sobre a superfície das partículas, medições de potencial zeta foram feitas utilizando o equipamento Zetasiser ZS Nanoseries, Malvern Instruments, com cubetas de poliestireno (DTS 0112). Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da média de três medidas, sendo que para cada medida, foram realizadas 30 leituras. Foram preparadas dispersões nas concentrações de 1 mg·mL⁻¹ em água deionizada e pH 7. Após 3 minutos de dispersão ao ultrassom foi retirado 1 mL da suspensão de partículas para medições do Potencial Zeta das HA.

3.4.2.3.9. Medida de pH

Este teste foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Lu *et al.* (2011) e Lee *et al.*(2017). As medidas de pH foram realizadas com amostras de cada hidrogel imersas em 6 mL de Fluido Corporal Artificial (FCA) e mantidas a 37 °C.

O protocolo para preparo do FCA utilizado foi descrito por Kokubo e Takadama (2006), tendo composição semelhante à do plasma sanguíneo humano. O FCA continha 8,035g de NaCl, 0,355g de NaHCO₃, 0,225g KCl, 0,231g de K₂HPO₄.3H₂O, 0,311g de MgCl₂·6H₂O, 39 mL de ácido clorídrico na concentração de 1 mol.L⁻¹ (1.0M-HCl), 0,292g de CaCl₂, 0,072g de Na₂SO₄ e 6,118g de tris-hidroximetil aminometano ((HOCH₂)3CNH₂) dissolvidos em água deionizada e tamponado a pH 7,4 com 1.0M-HCl, para obtenção de 1 L de FCA.

O valor do pH para cada amostra foi medido nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos e após cada 24h por 4 dias, usando pHmetro (MS TECNOPON, mPA-210, Brasil). O FCA foi substituído diariamente após cada medida de pH. Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos pela média das medidas de cada amostra.

3.4.2.3.10. Teste de liberação de íons

O estudo da liberação de íons tendo os hidrogéis como matriz foi feito utilizando as metodologias adaptadas de Alkhraisat *et al.* (2013), Elahpour *et al.* (2018) e Taha *et al.* (2017). As amostras de hidrogel foram imersas em 8 mL de água deionizada e levadas a 37°C. As medidas foram feitas após 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias e a concentração dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinadas por espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama (Varian – Modelo AA240FS, Austrália).

Antes de cada aferição, o líquido foi coletado e centrifugado a 1,400 rpm por 3 minutos, para precipitação das partículas em suspensão. Em seguida, o líquido foi filtrado usando filtro de papel Whatman® e armazenado para aferição. As medidas foram realizadas em triplicata e, após cada tempo do experimento, a água deionizada foi trocada.

3.4.2.3.11. Teste de Swelling

Para estudar o comportamento de intumescimento dos hidrogéis, o teste de *Swelling* foi realizado de acordo com as metodologias de Malik *et al.* (2020) e Ren *et al.* (2018). Amostras de aproximadamente 10 mg dos hidrogéis liofilizados de cada grupo foram separadas e colocadas em PBS pH 7,4 a 37°C. Nos tempos experimentais 30 min, 1 h, 3 h, 12 h e 24 h, os hidrogéis foram retirados do PBS, colocados em papel de filtro por 1 segundo para remover a água da superfície e depois pesados. A razão de intumescimento foi então calculada usando a seguinte fórmula:

Razão de Swelling (%) = 100 x (massa final – massa inicial) / (massa inicial) (Eq.7)

3.4.2.3.12. Biodegradação in vitro

A biodegradação *in vitro* e a estabilidade fisiológica dos hidrogéis foi estudada através do monitoramento da perda de massa em função do período de incubação. Os testes foram realizados segundo metodologia adaptada de Gorgieva e Kokol (2012) e Ren *et al.* (2018).

Amostras de aproximadamente 50 mg dos hidrogéis liofilizados e esterilizados foram incubadas a 37 °C sob agitação (60 rpm) em 25 mL de duas soluções diferentes: uma solução enzimática (32 mg de colagenase em 200 mL de PBS com adição de 290 mg de CaCl₂) e uma solução fisiológica (PBS pH 7,4). As amostras foram incubadas por 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias e, após este período, elas foram retiradas das soluções, colocadas em papel de filtro por 1 segundo para remover a água da superfície e depois pesados. A taxa de perda de massa foi definida pela seguinte fórmula:

Perda de Massa (%) = 100 x (massa final – massa inicial) / (massa inicial) (Eq.8)

3.4.2.3.13. Capacidade de formação da apatita

A capacidade de formação de apatita na superfície dos hidrogéis foi avaliada de acordo com protocolo adaptado de He *et al.* (2012) e Lu *et al.* (2011). A bioatividade *in vitro* dos hidrogéis desenvolvidos foi avaliada pela capacidade de formação de apatita em suas superfícies, após imersão em FCA (protocolo de preparo descrito no item 3. 4.2.3.9 Medição de pH). Para a realização do experimento, amostras foram imersas em 20 mL de FCA e levadas a 37 °C por 14 dias. Decorrido o tempo experimental, as amostras foram removidas da solução, lavadas suavemente com água deionizada e secas a 37°C por 24 h. O teste foi realizado em duplicata e o FCA foi trocado a cada dois dias. As alterações das superfícies das amostras foram investigadas por MEV FIB Quanta 200 FEG 3D com EDS.

3.4.2.4. Estudos in vitro

3.4.2.4.1. Cultivo de células

Os fibroblastos de camundongo (L929) e as células endoteliais (EA.hy926) foram cultivados em garrafas contendo DMEM High Glucose (4500 mg.L⁻¹), suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 unidades.mL⁻¹/ estreptomicina 10 mg.mL⁻¹). Os pré-osteoblastos de camundongo (MC3T3) foram cultivados em garrafas contendo α MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 unidades.mL⁻¹/ estreptomicina 10 mg.mL⁻¹). Todas as células foram incubadas em estufa umidificada contendo CO₂ a 5%, a 37 °C.

3.4.2.4.2. Citotoxicidade

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

Após atingir confluência de 80%, as células foram tripsinizadas com tripsina/EDTA e transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 1×10^4 células/poço. Depois de 24 horas de incubação à 37 °C e CO₂ a 5%, para os testes das nanopartículas, dispersões contendo 200 µg.mL⁻¹ de cada HA em meio de cultura, foram adicionadas em hexaplicata, e incubadas novamente à 37 °C e CO₂ a 5%, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Para os testes com os hidrogéis, as amostras de cada gel foram imersas em meio de cultura e incubados a 37 °C, 5% de CO₂, por 24 horas e, após este período, 100 µL deste eluato, foram adicionados, em hexaplicata, e incubados nas mesmas condições e tempos experimentais.

Após cada período de incubação, as placas foram lavadas com solução de PBS estéril, acrescidas do reagente de MTT, na concentração 5 mg.mL⁻¹, dissolvido em DMEM sem vermelho de fenol. As placas foram protegidas da luz devido à fotossensibilidade do MTT. Depois de 4 horas de incubação à 37 °C, 5% de CO₂, para formação dos cristais azuis de formazam, foi adicionado solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS). Então ao completar 18 horas, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®) no comprimento de onda de 570 nm. Controles negativos (contendo somente células sem tratamento) e brancos (sem células e sem tratamento) foram analisados em todas as placas.

A citotoxicidade foi calculada segundo a fórmula:

Citotoxicidade (%) = (valor experimental) / (controle positivo - controlo negativo) × 100 (Eq.8)

Assim, a porcentagem relativa de células viáveis, presente nos grupos em teste, foi calculada considerando-se o grupo controle como 100% de viabilidade. A citotoxicidade celular foi classificada de acordo com o Padrão Internacional de Organização (ISO 10993-5), descrita em Xiao *et al.* (2018), onde:

- grau 0: viabilidade celular ≥ 100%;
- grau 1: 75% ≤ viabilidade celular ≤ 99%;
- grau 2: $50\% \le$ viabilidade celular $\le 75\%$;
- grau 3: $25\% \leq$ viabilidade celular $\leq 49\%$;
- grau 4: $1\% \leq$ viabilidade celular $\leq 25\%$;
- grau 5: viabilidade celular = 0.

Os graus 0 e 1 representam não citotoxicidade e, os graus 2, 3, 4 e 5 representam diferentes níveis de citotoxicidade.

3.4.2.4.3. Teste de aderência e morfologia celular

O teste de aderência celular foi realizado utilizando a metodologia adaptada de Begam *et al.* (2017). Para o teste de aderência celular ao material, os corpos de prova de cada um dos hidrogéis foram colocados, em poços de placa de 24 poços, em triplicata. Neste experimento foram utilizados dois tipos celulares: EA.hy926 e MC3T3. Sobre os corpos de prova foram semeadas 1x10⁶ células, gota a gota, e a placa foi incubada por 30 minutos, a 37 °C, 5% de CO₂. Após este período, foi acrescentado 300 µL do meio de cultura específico para cada célula. As placas foram mantidas a 37 °C, 5% de CO₂. A aderência celular foi avaliada após 2 e 4 horas, a partir da semeadura. Em cada intervalo experimental, o meio de cultura de cada poço foi coletado e o número de células presentes no sobrenadante foi contado. O número de células aderidas foi quantificado subtraindo o número de células em suspensão da concentração inicial de células semeadas.

Para a observação da morfologia celular sobre o material, as amostras de hidrogel semeadas com as células EA.hy926 e MC3T3 foram lavadas com PBS estéril duas vezes, no tempo experimental 3 dias. Então, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ por 4 horas. Após a remoção do fixador foi adicionado o tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. As amostras em tampão foram enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG, onde foram realizadas as etapas de fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO₂ e metalização, e posterior análise em MEV FIB Quanta 200 FEG 3D.

3.4.2.4.4. Teste de proliferação

O teste de proliferação e morfologia celular foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Xiao *et al.* (2018). Neste experimento foram utilizados dois tipos celulares: EA.hy926 e MC3T3.

Em placas de 24 poços, foram colocadas as amostras de cada hidrogel, em triplicata, e sobre cada amostra foram adicionados 400 µL do meio específico para

cada célula. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂, por 2 horas. Após, o meio foi retirado e 200 μ L de meio contendo 1,5x10⁴ células foram adicionados, gota a gota, sobre cada amostra, e novamente as placas foram incubadas 37 °C, 5% de CO₂, por 2 horas. Em seguida, mais 400 μ L de meio foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 1, 4, 7 e 14 dias a 37 °C, 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

Em cada tempo experimental, as placas tiveram o meio de cultura removido dos poços, estes foram lavados com PBS estéril, e em seguida, o teste de MTT foi realizado. Foram acrescentados 600 µL de solução de MTT na concentração 5 mg.mL⁻¹, dissolvido em DMEM sem vermelho de fenol em cada poço. Depois de 4 horas de incubação à 37 °C, 5% de CO₂, foi adicionado 600 µL de solução de SDS. Após 18 horas de incubação a 37 °C, 5% de CO₂, a placa foi lida em espectrofotômetro a 570 nm.

3.4.2.4.5. Teste de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica).

As células MC3T3, na densidade de 1,5x10⁴, foram incubadas em placa de 24 poços com os hidrogéis, em triplicata, a 37 °C e 5% de CO₂, por 7, 14 e 21 dias. Ao final de cada tempo experimental, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS estéril duas vezes e preenchidos com 2 mL de solução 0,2% de Triton-X100. Após 10 minutos, o lisado de células foi recolhido para quantificação da fosfatase alcalina e de proteínas totais.

Inicialmente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 μ L dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37 °C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 mol.L⁻¹ e NaOH a 0,25 mol.L⁻¹. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 590 nm.

O conteúdo de proteínas totais de cada amostra foi determinado utilizando o kit Micro BCA Protein Assay e seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, foi feita uma curva padrão com albumina. Um reagente de trabalho foi preparado a partir dos reagentes A, B e C. Em tubos, 1 mL do lisado de células de cada amostra foi adicionado a 1 mL do reagente de trabalho, misturado, tampado e incubado por 1 hora em banho maria à 60 °C. Os tubos resfriaram à temperatura ambiente e, em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 562 nm.

A atividade relativa da fosfatase alcalina foi calculada pela normalização dos valores de densidade ótica com as proteínas totais.

3.4.2.4.6. Ensaio da produção de nódulos de mineralização por coloração pelo método Von Kossa

Para determinar se as células diferenciadas em osteoblastos produziam nódulos mineralizados *in vitro*, foi realizado o teste de Von Kossa 14º dia de cultivo, utilizando metodologia relatada por Trajano *et al.*, (2016). Von Kossa é um método específico para visualizar a calcificação. É um ensaio colorimétrico muito útil na detecção de mineralização dentro da matriz.

O meio dos poços foi aspirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com 100 μ L de formaldeído 10% por 5 min. O fixador foi removido e as células lavadas com água deionizada. Adicionou-se 200 μ L de Nitrato de Prata 5% e deixou-se a placa por 1 hora dentro da capela de fluxo com a luz ultravioleta ligada. Após, a placa foi lavada 3 vezes com água deionizada. Adicionou-se 200 μ L de Tiossulfato de Sódio 5% por 3 minutos. Em seguida, o Tiossulfato foi removido e adicionou-se 200 μ L de Safranina 1% por 30 segundos. A análise visual dos nódulos foi realizada através da objetiva de 10x do microscópio invertido de luz (BEL Photonics®, BEL Equipamentos Ltda., Piracicaba - SP).

3.4.2.4.7. Concentração do óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico foi determinada usando reagente de *Griess* para detectar o nível de nitrito presente no sobrenadante das células EA.hy926 e MC3T3. O teste foi realizado de acordo com metodologia determinada pelo manual do fabricante do *Griess Reagent Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Após incubação das células com os hidrogéis por 7 e 14 dias, os sobrenadantes das células foram coletados e, 150 μ L destes foram incubados com 130 μ L de água deionizada e 20 μ L do reagente de *Griess*, por 30 minutos, à temperatura ambiente, protegidos da luz. A leitura do ensaio foi realizada a 548 nm. A concentração de nitrito foi calculada pela média dos valores de curva-padrão de nitrito e os valores foram expressos em μ mol/L de nitrito.

3.4.2.4.8. Teste de formação de vasos

O teste de formação de vasos foi realizado utilizando metodologia adaptada de Yu *et al.* (2017b). Para os testes com os hidrogéis, corpos de prova de cada amostra também foram imersos em 1 mL de DMEM com 10% de SFB e incubados a 37 °C, 5% de CO₂, por 7 dias. Após este período, 50 µL de Geltrex com depleção de fatores de crescimento foram adicionados a uma placa de 96 poços e incubado a 37°C por 30 minutos para gelificação. Em seguida, o Geltrex foi coberto com uma suspensão de células EA.hy926 (2×10⁴ células/poço) que foram pré-tratadas com o 100 µL dos eluatos de hidrogel por 30 minutos. Após incubação por 6 e 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂, a atividade de formação do tubo foi estimada pela contagem do número de capilares completos de conectando pontos individuais das estruturas poligonais.

As imagens utilizadas para visualização dos capilares foram imagens fornecidas por microscópio óptico com magnificação de 10x. Após os tempos experimentais, o número de estruturas semelhantes a tubos, presente em 3 poços selecionados aleatoriamente foram quantificados usando o software Image J (LU *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017b).

3.4.2.4.9. Análises estatísticas dos dados

Todos os ensaios foram realizados em hexaplicata, e os resultados foram obtidos em experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através de Análise de Variância - ANOVA de dois fatores, seguido do pós-teste de Bonferroni, disponível no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Diferenças foram consideradas significativas se P < 0,05.

3.5. Resultados e Discussão

3.5.1. Caracterização físico-química das hidroxiapatitas

3.5.1.1. Morfologia e distribuição de tamanho das partículas

As micrografias de transmissão e os histogramas com as médias de comprimento e diâmetro de cada uma das HA estão dispostos nas Figuras 12, 13 e 14.

Os dados obtidos através do MET permitem determinar a geometria e a morfologia das HA. As micrografias mostram tamanho nanométrico (abaixo de 100 nm) para todas as HA sintetizadas, confirmando a eficiência do método escolhido. A HAp apresentou 49,86 nm (±14,89 nm) de comprimento e 19,74 nm (±6,64 nm) de diâmetro médio, bastante semelhante à HA-Mg2,5%. As HA com substituições de 5 e 10% apresentaram menor comprimento em comparação às demais 33,7 nm (±13,99) e 24,28 nm (±6,41), respectivamente. Todas as HA apresentaram o formato bastonete e pequenas aglomerações entre as nanopartículas foram percebidas. Tamanho nano e formato bastonete são bastante vantajosos na aplicação das nano HA. Ambos já foram reportados por influenciar positivamente na aderência, crescimento e proliferação celular (SHI *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2013).

Uma diminuição no tamanho da partícula foi observada com o aumento da porcentagem de magnésio presente nas HA. Essa diminuição das partículas já foi relatada na literatura e é consistente com a substituição dos íons Ca⁺² por Mg⁺² (COX *et al.*, 2014; FARZADI *et al.*, 2014). Sendo o raio iônico do magnésio menor, em casos de substituição, o Mg⁺² ocupa menor espaço que Ca⁺². Com base nisso, Farzadi *et al.*, (2014), sugeriram que a presença do magnésio, em certa quantidade, diminui o grão da hidroxiapatita.

Aglomerações são observadas nas HA, principalmente as de menor tamanho. Os estudos de Cóta (2015) sugerem que quando o tamanho da partícula de HA se torna inferior a 1µm, estas apresentam uma maior tendência a interagir e se aglomerar. Zoccal (2015) menciona que a aglomeração de nanopartículas é um dos principais problemas recorrentes na suspensão de nanopartículas, uma vez que apresentam alta energia na superfície e, dessa forma, tendem a ficar unidas.



FIGURA 12. Micrografias de transmissão das HA sintetizadas.

Imagens das nanopartículas de hidroxiapatita obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - FEI Spirit Biotwin, com uma tensão de aceleração de 20 a 120 kV, para análise de geometria e morfologia. A) HAp. B) HA-Mg2,5%. C) HA-Mg5%. D) HA-Mg10%. Barra de escala 100 nm. FONTE: CM-UFMG



FIGURA 13. Histogramas de distribuição de comprimento das nanopartículas de HA sintetizadas.

A medida do comprimento médio das nanopartículas de hidroxiapatita feita utilizando o *software* ImageJ, seguida de análise estatística (média, desvio padrão e distribuição gaussiana) no *software* Origin 7.0. A) HAp. B) HA-Mg2,5%. C) HA-Mg5%. D) HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.



FIGURA 14. Histogramas de distribuição de largura das nanopartículas de HA sintetizadas.

A medida do diâmetro médio das nanopartículas de hidroxiapatita feita utilizando o *software* ImageJ, seguida de análise estatística (média, desvio padrão e distribuição gaussiana) no *software* Origin 7.0. A) HAp. B) HA-Mg2,5%. C) HA-Mg5%. D) HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

3.5.1.2. Morfologia da superfície e análise suplementar

As micrografias de MEV e os espectros de EDS de cada uma das HA estão dispostos nas Figuras 15 e 16.

As micrografias, na Figura 15, mostram a superfície das partículas. É possível observar os cristais e numerosas aglomerações, especialmente em HA-Mg2,5% e HA-Mg10%. As imagens sugerem aglomerados formados de agregados menores. A morfologia de superfície das HA substituídas revelou-se diferente da HAp e com irregularidades.



FIGURA 15. Micrografias de varredura das nanopartículas de HA sintetizadas.

Imagens das nanopartículas de hidroxiapatita obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM - 6360LV, com sistema EDS, com uma tensão de aceleração de 20 kV, para análise da morfologia de superfície. A) HAp. B) HA-Mg2,5%. C) HA-Mg5%. D) HA-Mg10%. Magnificação x1000 Barra de escala 10 μm. FONTE: CM-UFMG

As aglomerações podem sugerir tensão de superfície associados ao tamanho nano dos cristalitos (COX *et al.*, 2014; FARZADI *et al.*, 2014). Em relação às irregularidades nas superfícies, a presença de íons substitutos pode alterar a morfologia da HA, mas essas alterações podem ser vantajosas. Já foi relatado que as irregularidades na superfície de HA substituídas auxiliam na aderência e proliferação celular (BEGAM *et al.*, 2017; COSTA-RODRIGUES *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2016).

Os espectros de EDS estão apresentados na Figura 16. Os EDS identificaram apenas picos característicos dos elementos presente na composição das HA e do magnésio usado nas substituições (Ca, P, O e Mg). A razão molar Ca/P e a razão (Ca + M) / P das HA foi calculada utilizando os dados fornecidos pela análise semiquantitativa realizada por EDS (Tabela 7).



FIGURA 16. Espectro de EDS das nanopartículas de HA.

Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) das nanopartículas de hidroxiapatita obtida através de microscopia eletrônica de varredura para identificação dos elementos presentes na composição. Na amostra de hidroxiapatita pura foram identificados cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O). Nas amostras de hidroxiapatita substituídas foram identificados cálcio (Ca), fósforo (P), oxigênio (O) e magnésio (Mg). A) HAp. B) HA-Mg2,5%. C) HA-Mg5%. D) HA-Mg10%. FONTE: CM-UFMG

TABELA 7. Relação Ca / P e relação (Ca + dopante) / P calculada a partir dos dados fornecidos pelo EDS

Amostra	Razão Ca/P	Razão (Ca+M)/P		
НАр	1,66	N/A*		
HA-Mg 2,5%	1,55	1,58		
HA-Mg 5%	1,64	1,65		
HA-Mg 10%	1,52	1,61		
*Não se aplica FONTE: A autora, 2021.				

A hidroxiapatita estequiométrica, com fórmula Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ possui razão molar Ca/P=1,67, e o resultado da HAp está bem próximo deste valor, 1,66. Todas as HA sintetizadas apresentaram razão Ca/P e (Ca + M) / P menores que o valor

estequiométrico, sendo HA-Mg 5% a que manteve valores mais aproximados. Esfahani *et al.* (2016) menciona que a razão de hidroxiapatitas não estequiométricas pode variar entre 1,5-1,67, devido à inserção de pequenas quantidades de íons na estrutura, o que também acontece em condições naturais. Caccioti *et al.* (2009) apresentaram valores razão (Ca + M) / P em substituições com magnésio iguais às estequiométricas. Já Bang, Long e Othman (2014) apresentaram valores maiores que 2 para substituições com carbonato e sílica. Mas é importante ressaltar que valores acima de 2 já são considerados outros fosfatos de cálcio que não hidroxiapatita.

As quantidades de magnésio presentes nas HA também foram determinadas por espectrometria de absorção atômica. A partir dessas medidas foi calculada a substituição experimental em mol (%) dos íons dopantes (Tabela 8). Os dados mostram que a quantidade em mol% de magnésio incorporada às HA é menor do que a calculada.

Amostra	Dopante	Substituição teórica mol (%)	Substituição experimental mol (%)
НАр	N/A*	N/A*	N/A*
HA-Mg2,5%	Mg	2.5	1,14
HA-Mg5%	Mg	5	2,18
HA-Mg10%	Mg	10	5,36

TABELA 8. Substituição teórica e experimental de acordo com os dados fornecidos por absorção atômica.

*Não se aplica FONTE: A autora, 2021.

Alguns autores já reportaram uma menor incorporação de íons de magnésio, diferente de outros íons como estrôncio que apresenta substituição experimental e teórica bem aproximada (COX *et al.*, 2014; DIAS, 2020; GENG *et al.*, 2016). Landi *et al.* (2006) sugerem que há um limite de substituição do cálcio pelo magnésio. Laurencin *et al.* (2011) demonstram que as diferenças entre os raios iônicos de cálcio e magnésio, a preferência do magnésio pelo sítio de incorporação Ca (II) na HA e as ligações Mg-O dentro da molécula podem influenciar no processo de incorporação.
3.5.1.3. Difração de raio-X

A difração de raios-X foi utilizada para avaliar a estrutura e a cristalinidade das HA. A Figura 17 mostra os difratogramas das HA pura e substituídas com magnésio. Os padrões de DRX das HA foram comparados com os padrões do banco de dados ICDD para HA estequiométrica (PDF # 01-074-0565) e β -TCP (PDF # 04-008-8714).

A HAp apresentou picos intensos, em valores de 2θ e planos correspondentes em: 25,75° (002), 28,61° (210), 31,80° (211), 32,81° (112), 33,99° (300), 39,77° (310), 46,59° (222) e 49,11° (213). Além de intensos, o difratograma da HAp mostra picos estreitos que, conforme a literatura, são característicos de hidroxiapatita pura sintetizada (FARZADI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016). Não foram identificadas fases secundárias.





Análise da estrutura e cristalinidade das hidroxiapatitas sintetizadas pelo método da co-precipitação por meio da difração de raio-X. Planos cristalinos característicos de hidroxiapatita foram demarcados e picos correspondentes podem ser visualizados nas 4 amostras. FONTE: A autora, 2021.

104

O método de síntese da hidroxiapatita e, até mesmo o tratamento térmico recebido pelas partículas, pode levar ao surgimento de outras fases de compostos de fosfato de cálcio. A presença de diferentes fases pode ser observada através da difratometria de raios-X (COSTA *et al.*, 2009). Na literatura já foi demonstrado que sínteses em baixas temperaturas, conforme os protocolos deste trabalho, não formam fases secundárias (BIGI *et al.*, 2007; COX *et al.*, 2014; GENG *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2009).

A substituição de íons de cálcio por magnésio pode causar uma desestabilização da estrutura da hidroxiapatita, devido ao menor raio iônico do magnésio, e assim reduzir seu grau de cristalinidade (COX *et al.*, 2014; FADEEV *et al.*, 2003; FAZARDI *et al.*, 2014; KANZAKI *et al.*, 2000; LAURENCIN *et al.*, 2011). Os resultados apresentados nos difratogramas correspondentes às HA-Mg exibiram um pequeno deslocamento em 2θ, em comparação com a HAp. Uma visível redução das intensidades dos picos é percebida e o alargamento dos picos também observado, especialmente nos planos 210, 112, 300 e 310. Isto sugere que a substituição do cálcio resultou em alterações da rede cristalina da hidroxiapatita.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de rede das HA sintetizadas. Os parâmetros de rede a e c exibidos pela HA-P foram menores que o da HA estequiométrica (a= 9,4218 e c= 6,884). As constantes de rede das amostras de HA substituídas com magnésio exibiram uma diminuição parâmetro c e um pequeno aumento no parâmetro a, sendo consistente com dados da literatura (BERTONI *et al.*, 1998; FARZADI *et al.*, 2014), que reportam que a incorporação do magnésio na apatita causam distúrbios nos parâmetros de rede.

Amostra	D (nm)	a =b (Å)	c (Å)	V (Å)³	X _c (%)
НАр	18,61	9,4090	6,9140	526,49	0,1298
HA-Mg2.5%	18,05	9,4153	6,8714	526,31	0,1216
HA-Mg5%	16,72	9,4144	6,8549	526,15	0,1195

TABELA 9. Parâmetros da rede das amostras de HA, incluindo os parâmetros de rede a, c, volume da célula unitária (V), tamanho médio do cristalito (D) e grau de cristalinidade (Xc)

FONTE: A autora, 2021.

6,8375

524,48

0,1257

9,4114

HA-Mg10%

17,06

Os dados mostram baixo grau de cristalinidade, que tenderam a diminuir à medida que a quantidade da incorporação do magnésio aumentou. A presença do 105

magnésio não encoraja a cristalinização da hidroxiapatita (FARZADI *et al.*, 2014; LANDI *et al.*, 2000). A baixa cristalinidade também pode ser causada pelas baixas temperaturas da síntese. Hidroxiapatitas puras e substituídas que passam por tratamento térmico acima de 500 °C tem sua cristalinidade aumentada, mas as altas temperaturas também propiciam ambiente para formação de outros fosfatos de cálcio (BERTONI *et al.*, 1998; FADEEV *et al.*, 2003).

3.5.1.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite identificar os grupos funcionais das HA. Os espectros de FT-IR das HA estão apresentados na Figura 18, de forma a comparar os modos vibracionais da HA pura e substituída.





Análise dos grupos funcionais da HA e os efeitos da substituição catiônica sobre estes grupos, utilizando a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). FONTE: A autora, 2021.

O espectro da HAp sintetizado apresentou as bandas de absorção atribuídas aos estiramentos -OH, das ligações hidroxila da apatita (entre 3700 e 3433 cm⁻¹) e radicais fosfato. A banda larga entre 3000 e 3700 cm⁻¹ e a banda em 1637 cm⁻¹ são relacionadas aos modos vibracionais da água adsorvida no material (AGUDELO, 2015). A banda em 1407 cm⁻¹ teve sua intensidade aumentada a medida que a porcentagem de magnésio aumenta entre as HA e pode ser atribuída a vibrações de CO_3^{-2} substituindo parcialmente os grupos PO₄⁻³ (AGUDELO, 2015).

A presença do sítio de fosfato PO₄-³ é observada pelos modos estiramento assimétrico (v3) do P-O em 1096 e 1027 cm⁻¹, do modo de estiramento simétrico (v1) 966 cm⁻¹ e pelos modos do grupo O-P-O observados em 643 e 573 cm⁻¹ (PEREIRA, 2017).

Os espectros das HA substituídas com magnésio apresentaram as mesmas bandas observadas na HAp, mas com algumas alterações na intensidade das bandas. À medida que a porcentagem de substituição de cálcio por magnésio aumentou, observou-se maiores alterações na intensidade das bandas relacionadas à água adsorvida. Apesar do aumento de intensidade entre as bandas 3000 e 3700 cm⁻¹, uma redução na intensidade da banda 3589 cm⁻¹ (-OH) foi observada, sugerindo a diminuição da cristalinidade e redução das partículas de hidroxiapatita devido à incorporação dos íons de magnésio (FARZADI et al, 2014).

3.5.1.5. Análise térmica

A estabilidade térmica das HA foi avaliada pela análise das curvas TG. A Figura 19 mostra as curvas TG das HA obtidas quando submetidas a temperaturas entre 25 e 700°C. A porcentagem de perda de massa das HA está apresentada na Tabela 10.

As curvas TG mostraram que esse material é termicamente estável em temperaturas entre 25 e 700 °C, apresentando entre 7 e 9,32% de redução em suas massas devido à perda água.

FIGURA 19. Curvas TG das nanopartículas de HA



Análise da estabilidade térmica e avaliação da perda de massa das HA sintetizadas submetidas a temperaturas entre 25 e 700 °C. FONTE: A autora, 2020

Amostra	Perda de massa (%)
НАр	9,32
HA-Mg 2,5%	8,57
HA-Mg 5%	7,00
HA-Mg 10%	8,26

TABELA 10. Perda de massa das HA observada em curvas TG.

Caccioti *et al.* (2009) relataram perdas de massa em HA pura e substituída com magnésio entre 3% e 5% na faixa de 150-600°C. Esta perda foi associada à perda de água e carbonatos combinados, uma perda intracristalina. Em comparação, a HA substituída com magnésio dos estudos de Cox *et al.* (2014) exibiu uma perda de massa de 15,28%, o que foi atribuído a um teor relativamente alto (10,27%) de água contida na camada de hidrato sugerida para envolver partículas de hidroxiapatita precipitadas. Bertoni *et al.* (1998) também observaram perda de massa de 15%.

FONTE: A autora, 2020

3.5.1.6. Potencial Zeta

A caracterização de propriedades químicas da superfície das HA foi medida através do potencial zeta. Os valores de potencial zeta das amostras estão apresentados na Tabela 11.

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos através da análise de dispersões de HA em água deionizada nem concentrações entre 1-2 mg/mL. Com exceção à HA-Mg10%, as demais amostras apresentaram valores negativos.

Tabela 11. Valores de carga superficial das HA dispersas em água deionizada à temperaturaambiente

Amostra	Potencial Zeta / (mV)
НАр	-5,61 ± 0,15
HA-Mg 2,5%	-3,14 ± 0,73
HA-Mg 5%	-3,9 ± 0,81
HA-Mg 10%	1,94 ± 0,17

FONTE: A autora, 2021.

A literatura traz valores de carga superficial para hidroxiapatita pura entre -25 e -5 mV, quando dispersos em diferentes soluções fisiológicas ou solventes orgânicos (LOPES *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2015; YOUNG *et al.*, 1997). Rossato, Camaratta e Volkmer (2014) apresentaram valores negativos para hidroxiapatita pura e positivos quando houve substituição do cálcio por outro metal. Já Botelho *et al.* (2002) apresentaram resultados com valores extremamente baixos para hidroxiapatita pura e substituída com silício, -50 e -71 mV, respectivamente. O que pode indicar que cada tipo de substituição na rede das partículas pode interferir de maneira diversa nas cargas superficiais das HA.

Cheng *et al.* (2005) demonstraram que hidroxiapatitas com potenciais mais baixos podem resultar em maior aderência de células ósseas. Segundo o estudo, a variação do potencial zeta pode influenciar a adsorção dos íons de cálcio sobre o material, influenciando também que proteínas da matriz extracelular sejam adsorvidas, propiciando ambiente para a aderência e proliferação celular.

Wu *et al.* (2015) testaram diferentes concentrações de HA em tampão neutro (pH7) e observaram que quanto maior a concentração de partículas na dispersão, maior o valor do potencial zeta. Concentrações mais próximas de 1 mg/mL

apresentaram valores mais próximos de zero ou positivos. Outro ponto a ser considerado são as soluções aquosas onde a hidroxiapatita é suspensa. Quando colocadas em contato com fluidos corporais, como saliva e sangue, ou fluidos semelhantes, as HA apresentam valores mais próximos da faixa entre -15 e -25 mV (YOUNG *et al.*,1997).

3.5.1.7. Isoterma de adsorção e área superficial

As análises de área superficial específica das amostras de HA foram feitas através de isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio pelo método de BET. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

As isotermas observadas para todas as HA são típicas de isoterma do tipo 2. Este tipo é característico de sólidos não-porosos e macroporosos, onde ocorre adsorção irrestrita de monocamada-multicamada (CONDON, 2006).



FIGURA 20. Isotermas de adsorção e dessorção das nanopartículas de HA.

As áreas de superfície específica das amostras das HA foram obtidas pelos métodos BET (Brunauer, Emmett e Teller), adotando uma faixa linear de p / p0 para estimativa de área específica (C constante positivo). FONTE: A autora, 2021.

A Tabela 12 traz os valores de área superficial. Observa-se que as HA pura e substituída com 2,5 e 10% de magnésio apresentaram resultados iguais. Apenas a HA-Mg 5% apresentou o maior valor de área superficial (73 m².g⁻¹), observado pela 110 maior quantidade de adsorção de nitrogênio. A média entre as amostras foram 53,25 m².g⁻¹.

Amostra	Área superficial específica (m².g⁻¹)
НАр	44
HA-Mg 2,5%	48
HA-Mg 5%	73
HA-Mg 10%	48
FONTE:	A autora, 2021.

TABELA 12. Área superficial das HA obtida pelo método de BET

A literatura relata a importância de poros de tamanhos macro em scaffolds de hidroxiapatita e de como os macroporos desempenham um papel fundamental na regulação da osteogênese e angiogênese (LI *et al.*, 2016). No estudo de Thein-Han e Xu (2013) uma estrutura macroporosa a base de fosfato de cálcio foi projetada para pré-vascularização e investigação da colonização de cocultura de células endoteliais e células osteoblásticas.

3.5.2. Citotoxicidade das hidroxiapatitas

A citotoxicidade das HA pura e substituídas foi avaliada *in vitro*, na concentração de 200 µg/mL, através do método de MTT, em fibroblastos de camundongo (L929), pré-osteoblastos de camundongo (MC3T3) e células endoteliais (EA.hy926). As Figuras 21, 22 e 23 mostram os resultados para as HA.

Observa-se que todos os resultados apresentaram proliferação celular acima de 90% caracterizando todas as HA como não citotóxicas para os tipos celulares testados. Dentre as HA substituídas HA-Mg2,5% foi a que apresentou resultados menos expressivos.

Quando testadas com L929, HA-Mg5% e HA-Mg10% apresentaram crescimento celular bem acima dos valores do controle e mostraram diferenças estatísticas significativas frente ao HAp e HA-Mg2,5%, com P < 0,01 nos tempos 24 e 48 horas, e P < 0,05 no tempo 72 horas. No tempo 24 horas, HA-Mg5% apresentous se compatível do HA-Mg10%, com P < 0,01.

Nos testes com MC3T3, HA-Mg5% e HA-Mg10% apresentaram resultados acima de 150% de proliferação celular, indicando uma possível indução do crescimento celular, visto que são células da linhagem osteoblástica e a hidroxiapatita é osteoindutora. Estes resultados foram estatisticamente significativos (P < 0,05) em relação as demais HA e o controle de MC3T3. HA-Mg5% e HA-Mg10% não apresentaram diferença estatística entre si.

Quando testadas com EA.hy926, HA-Mg5% e HA-Mg10% promoveram maior crescimento celular em relação as outras HA, principalmente nos tempos 24 e 72 horas. HAp mostrou resultados melhores que HA-Mg2,5% no tempo 24 horas (P < 0,01).



FIGURA 21. Citotoxicidade das HA em contato direto com fibroblastos L929.

As células fibroblásticas L929 foram tratadas com suspensões contendo as HA pura e substituídas com magnésio por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001) FONTE: A autora, 2021.



FIGURA 22. Citotoxicidade das HA em contato direto com pré-osteoblastos MC3T3

As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram tratadas com suspensões contendo as HA pura e substituídas com magnésio por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (** P < 0,01, *** P < 0,001). FONTE: A autora, 2021.



FIGURA 23. Citotoxicidade das HA em contato direto com células endoteliais EA.hy926

As células endoteliais EA.hy926 foram tratadas com suspensões contendo as HA pura e substituídas com magnésio por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada através do método colorimétrico de MTT.

Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). FONTE: A autora, 2021. A hidroxiapatita e outras biocerâmicas de fosfato de cálcio são importantes para o reparo ósseo devido à sua excelente biocompatibilidade e bioatividade (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007). A inserção de hidroxiapatita nestes materiais teve intenção de fornecer um ambiente ideal para reação celular e colonização por osteoblastos. Os resultados do presente estudo mostraram que as células préosteoblásticas, MC3T3, tiveram aumento da taxa de proliferação celular quando na presença das HA. Sendo a hidroxiapatita um componente da matriz óssea, esperavase que as células pré-osteoblásticas apresentassem não só citocompatibilidade com as HA sintéticas, mas também que demonstrassem mesmo com testes básicos, uma proliferação acima do controle celular do experimento.

A literatura para HA apresenta bons resultados em testes de viabilidade celular com MC3T3. Cox et al. (2014) testaram diferentes metais substituintes na HA, magnésio, incluindo е quando testados com MC3T3 demonstraram citocompatibilidade, aderência, disseminação e proliferação celular. Ozeki, Aoki e Fukuzi (2008) demonstram que hidroxiapatitas puras e adsorvidas com vitamina D induziram crescimento de MC3T3 e aumentaram a atividade da enzima fosfatase alcalina, marcador bioquímico do metabolismo ósseo. Huang et al. (2016) demostraram proliferação celular de MC3T3 quando testadas com hidroxiapatita pura e substituída. Esta proliferação foi crescendo à medida que os dias de incubação aumentavam.

Os fibroblastos são um dos tipos celulares animais mais utilizados devido à sua facilidade de isolamento e cultivo (RAAB *et al.*, 2014). São células de tecido conjuntivo fundamentais para a deposição, remodelação e organização da matriz extracelular, especialmente durante os processos de cicatrização (HINZ *et al.*, 2007), sendo consideradas células colonizadoras. Os resultados obtidos para as HA e L929 estão condizentes com a literatura, demonstrando que HA não apresentam citotoxicidade para estas células (SJEROBABIN *et al.*, 2016; SUN; KHAN; SULTANA, 2014). Ryu *et al.* (2004) demonstraram que hidroxiapatita substituída com magnésio apresenta melhores resultados que hidroxiapatita pura quando testadas com L929, o que confirma nossos resultados.

As células endoteliais EA.hy926, são células hibridas geradas a partir da fusão de células primárias da veia umbilical humana (HUVEC) com um clone resistente a tioguanina de A549 (célula de carcinoma pulmonar). Elas foram escolhidas por serem

da linhagem celular vascular, visto que um dos objetivos é a formação de novos vasos auxiliando a regeneração óssea. A literatura reporta o uso desta linhagem para estudos da atividade angiogênica (MOHANDAS *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017a, 2017b) Os resultados demonstraram boa citocompatibilidade das HA e potencial indução da proliferação celular. Nos estudos de Yu, *et al.* (2017a), a hidroxiapatita associada a um fármaco conseguiu induzir a proliferação de EA.hy926 e ainda estimular a formação de vasos em experimento adicional. Yu *et al.* (2017b) demonstraram que microesferas de hidroxiapatita substituída com cobre também estimularam a proliferação celular e induziram angiogênese.

3.5.3. Caracterização físico-química dos hidrogéis

3.5.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A FT-IR foi realizada para investigar os grupos funcionais dos hidrogéis. Os espectros dos hidrogéis está representado na Figura 24. Para compração os espectros dos polimeros e da vitamina D, estão representados na Figura 25. Os FT-IR das HA encontram-se no item 3.5.1.4, Figura 18.

No geral, observa-se que os espectros dos hidrogéis são bem semelhantes entre si e os grupos funcionais principais de cada material que compõe os hidrogéis foram observados nos espectros.



FIGURA 24. Espectros de absorção na região de infravermelho dos hidrogéis.

Análise dos grupos funcionais que compõem os hidrogéis desenvolvidos, utilizando a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).
Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.
FONTE: A autora, 2021.

Figura 25. Espectros de absorção na região de infravermelho da vitamina D e dos polímeros: quitosana, carboximetilcelulose, gelatina e álcool polivinílico.



Identificação dos grupos funcionais dos polímeros quitosana, carboximetilcelulose, gelatina e álcool polivinílico, e da vitamina D, utilizando a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). FONTE: A autora, 2021.

O estiramento O-H entre 3700 e 3000 cm⁻¹ presente nos espectros das HA, dos polímeros e da vitaminda D (Figuras 18 e 25) também foi apresentado nos espectro dos hidrogéis (Figura 24), e com maior intensidade no Gel 1. Essa banda também corresponde ao estiramento N-H da quitosana (ZHOU *et al.*, 2009). A banda entre 3000 e 2800 cm⁻¹, demarcada em 2840 cm⁻¹ são estiramentos de C-H, característicos de quitosana e da vitamina D3 (MOREIRA *et al.*, 2016; TENG; LUO; WANG, 2013). A banda 2360 cm⁻¹ possivelmente está associada a estiramentos de CO₂ (PRUSTY; BARIK; SWAIN, 2019).

Os grupamentos amida são bem característicos da quitosana. Eles estão indicados nos géis pela banda de absorção em 1640 cm⁻¹, que é referente ao modo de estiramento do C=O (do grupo amida I), e pela banda de absorção em 1560 cm⁻¹

referente ao modo de deformação N-H do grupo amina (MOREIRA *et al.*, 2016). Mas os grupamentos amida também podem estar relacionadas à gelatina e, o grupamento amida I à vitamina D (LIMA IIDA *et al.*, 2020; MARRELLA *et al.*, 2018).

A banda em 1407 cm⁻¹ é característica de HA e atribuída a vibrações de CO₃-², substituindo grupamentos PO₄-³ (ZHANG *et al.*, 2014). Esta banda também foi relacionada com o grupamento carboximetil da carboximetilcelulose. Outra banda relacionada à carboximetilcelulose é a 1332 cm⁻¹ do estiramento C-H (MISHRA *et al.*, 2011). As bandas 1407 cm⁻¹ e 1332 cm⁻¹ podem ser associadas também a estiramentos C-H do PVA (MARRELLA *et al.*, 2018).

A banda 1023 cm⁻¹ pode estar associada aos estiramentos C-O cíclico da quitosana, do PVA, da carboximetilcelulose e da vitamina D (LIMA IIDA *et al.*, 2020; MARRELLA *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2016). Mas também pode ser relacionada ao estiramento assimétrico (v3) do P-O da HA. Além disso, a presença do sítio de fosfato PO₄-³ da HA pode ser observada pelo grupo O-P-O nas bandas 640 e 570 cm⁻¹ (PEREIRA *et al.*, 2017).

3.5.3.2. Análise térmica

A estabilidade térmica e o comportamento de degradação de hidrogéis foram investigados por TG. A Figura 26 mostra as curvas TG dos hidrogéis obtidas quando submetidas a temperaturas entre 25 e 600°C. A porcentagem de perda de massa está apresentada na Tabela 13.

Todas as curvas obtidas apresentaram perfis bastante semelhantes entre si.





Análise da estabilidade térmica e avaliação da perda de massa dos hidrogéis submetidos a temperaturas entre 25 e 600 °C. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

Amostra	Perda de massa (%)
Gel 1	72,47
Gel 2	70,71
Gel 3	69,62
Gel 4	70,35
FON	TE: A autora, 2021.

A primeira perda de massa observada ocorreu em torno de 100 °C e pode ser atribuída à evaporação da água superficial, seguida da quebra das ligações da água (PEREIRA *et al.*, 2017). Esta perda correspondeu a aproximadamente 10-12% da massa dos hidrogéis de maneira geral.

Outra perda foi observada, na faixa de temperatura entre 210–300 °C. Esta perda correspondeu a aproximadamente 40% da massa dos hidrogéis. Em 240 °C inicia a degradação da carboximetilcelulose (THOMAS; SOLOMAN; REJINI, 2016). Acima de 300°C observa-se uma leve perda de massa, que a literatura relaciona à termodecomposição da gelatina, devido à degradação de proteínas (AGUDELO,

2015), a pirólise da quitosana devido ao rompimento aleatório das ligações glicosídicas, seguida por mais decomposição e eliminação em produtos voláteis (MAITY *et al.*, 2016), e a degradação do PVA (CAMPA-SIQUEIROS *et al.*, 2020).

Na faixa de 200 a 600°C, a perda de massa também pode estar relacionada à perda de água intracristalina e à redução do grupo OH⁻ presente nas HA (AGUDELO, 2015).

A partir de 300 °C seguiu-se uma perda de massa gradual até atingir os 600 °C. Os géis com HA substituída com magnésio tiveram perda de massa total igual e mostraram diferença mínima em relação ao gel contendo HAp (Gel 1). Todos os géis apresentaram estabilidade térmica semelhante.

3.5.3.3. Morfologia dos hidrogéis

A morfologia dos hidrogéis foi avaliada por MEV. As micrografias estão apresentadas na Figura 27. As imagens representativas apresentam a superfície irregular dos géis e a presença de poros arredondados. O tamanho dos poros do Gel 1 mediram entre 27-102 μ m; o Gel 2 apresentou-se na faixa entre 31-109 μ m; o Gel 3 entre 33-105 μ m; e Gel 4 de 22-98 μ m.

Apesar das diferenças na porcentagem de magnésio nas nanopartículas de hidroxiapatita, o tamanho dos poros e a morfologia de superfície dos hidrogéis mantiveram-se homogêneos.

Os resultados obtidos nestas micrografias corroboram com a literatura, segundo Li, Z. *et al.* (2005), Mishra *et al.* (2011) e Whang *et al.* (1999) e indicam que estes tamanhos de poro e morfologia os hidrogéis desenvolvidos neste trabalho estão compatíveis com os as condições necessárias para propiciar a migração e proliferação de células de osteoblastos.

FIGURA 27. Morfologia dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.



Micrografias dos hidrogéis obtidas no microscópio eletrônico de varredura, FIB Quanta 200 FEG 3D com sistema EDS acoplado, para análise da morfologia de superfície e tamanho de poro.
A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. Magnificação x5000
Barra de escala 20 µm. FONTE: CM-UFMG

O EDS semi-qualitativo das amostras está na Figura 28. O EDS das amostras mostra a presença de cálcio, fósforo, carbono, oxigênio, magnésio e sódio, correspondente à composição dos polímeros e HA.



FIGURA 28. Espectros de EDS dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.

Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) obtida através de microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis para identificação dos elementos presentes em suas composições. Foram identificados nos hidrogéis: cálcio (Ca), fósforo (P), carbono (C), oxigênio (O), magnésio (Mg) e sódio (Na), todos elementos correspondentes à composição dos polímeros e da HA Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: CM-UFMG

Na literatura, o tamanho de poros de hidrogéis com base polimérica semelhante às desenvolvidas neste trabalho, está entre 10 e 900 µm (MISHRA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2016; THANGPRASERT *et al.*, 2019; THORPE *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2018). Normalmente, a estrutura porosa de hidrogéis de quitosana apresentam tamanhos de poros variando entre 100 a 300 µm e a presença de gelatina também faz aumentar o tamanho dos poros (MOREIRA *et al.*, 2016; THANGPRASERT *et al.*, 2019; ZHAI *et al.*, 2018). De maneira oposta, a presença de PVA e carboximetilcelulose diminuem o tamanho dos poros (MISHRA *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2014; THANGPRASERT *et al.*, 2019). Como o tamanho de poro das matrizes de hidrogel diminui com o grau de reticulação, tal diminuição pode ser atribuída à maior extensão da reticulação, principalmente pelas proporções de carboximetilcelulose (MISHRA *et al.*, 2011). A presença da celulose também já foi relatada como fator importante na homogeneização do tamanho dos poros (SHI *et al.*, 2014).

3.5.3.4. Formação de apatita

A capacidade de formação da apatita dos géis, após 14 dias de imersão em FCA, foi avaliada por MEV. As micrografias estão apresentadas na Figura 29.

Uma diferença expressiva pode ser observada entre a Figura 29 A e as demais – 29 B, 29 C e 29 D. A camada de apatita se formou com maior espessura sobre o hidrogel contendo hidroxiapatita pura (HAp), demonstrando maior mineralização. Este resultado também sugere que a substituição de cálcio por magnésio na rede cristalina das HA fez a formação da camada apatita ser menor.

Fazendo um comparativo das micrografias da formação de apatita sobre a superfície dos hidrogéis da Figura 29 com a morfologia de superfície dos hidrogéis da Figura 27 (item 4.3.3.3), é possível perceber claramente a camada de apatita formada sobre as amostras de hidrogel após o período experimental. A superfície dos géis com apatita ficou mais irregular e com aspecto granulado. A mineralização abaixo da superfície também foi detectada, indicando que os íons poderiam penetrar na estrutura de rede ultrafina para formar partículas.

Os espectros de EDS semi-qualitativo das amostras (Figura 30) após imersão em FCA apontam alterações nos índices de Ca e P. As setas nos espectros apontam os picos de Ca e P. Dois picos de Ca são vistos em todos os espectros. A amostra com maiores aumentos nos índices de Ca foi Gel 1. Gel 2 foi a amostra com aumento menos expressivo no segundo pico de Ca. Os outros elementos (cloro – Cl e alumínio – Al) apareceram em quantidades residuais devido à composição do FCA.



FIGURA 29. Formação de apatita sobre hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.

Micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura, FIB Quanta 200 FEG 3D, com sistema EDS acoplado, da formação de apatita sobre os hidrogéis, após imersão destes em fluido corporal artificial por 14 dias. A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-

Mg10%. Magnificação x5000 Barra de escala 20 µm. FONTE: CM-UFMG



FIGURA 30. Espectros de EDS da formação de apatita sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.

Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) obtida através de microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis para identificação dos elementos presentes em suas composições, após imersão em fluido corporal artificial por 14 dias. Foram identificados nos hidrogéis: cálcio (Ca), fósforo (P), carbono (C), oxigênio (O), magnésio (Mg), sódio (Na), cloro (CI) e alumínio (AI), todos elementos correspondentes à composição dos hidrogéis e do fluido corporal artificial.

As setas apontam dois picos de cálcio (nas pontas dos gráficos) e um pico de fósforo (no meio dos gráficos)

Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: CM-UFMG

O fluido corporal artificial com concentrações de íons aproximadas às do plasma sanguíneo humano tem sido amplamente utilizado para a avaliação *in vitro* da bioatividade de materiais artificiais (OYANE *et al.*, 2003). Um material bioativo para aplicação em engenharia de tecido ósseo tem como uma de suas principais características a capacidade de se ligar ao osso vivo por meio de uma nova camada de apatita que se formou em suas superfícies em contato com o fluido corporal. Alguns autores já relataram a capacidade de formação de apatita sobre hidrogéis. Hong *et al.* (2006) usou um tratamento em solução de CaCl₂ seguido de imersão em FCA num hidrogel de celulose. A formação de cristais de hidroxiapatita sobre o hidrogel após 14 foi confirmada por MEV-EDS, dispersão de raio-X e FT-IR. Trabalho semelhante com hidrogel de celulose bacteriana e soluções de fosfato e cloreto de cálcio foi realizado

por Hutchens *et al.* (2006). A caracterização físico-química sugeriu formação de fosfato de octacálcio.

A apatita desempenha um papel essencial na formação, crescimento e manutenção da interface tecido-biomaterial (LU *et al.*, 2011). Por isso, a formação de mineralização dentro do material também se faz necessária. O crescimento ósseo para dentro de um material ósseo é importante no desenvolvimento de uma fixação inicial adequada, uma vez que pode diminuir a possibilidade de reabsorção óssea e promover a formação de uma interface estável (HE *et al.*, 2012).

A formação de apatita e a liberação de íons cálcio e fosfato também influenciam no aumento do grau de fixação, proliferação e diferenciação osteogênica das células pré-osteoblásticas *in vitro*. A camada de apatita fornece o substrato adequado para a ligação entre o material implantado e o tecido ósseo circundante (LU *et al.*, 2011).

3.5.3.5. Teste de pH

As variações de pH dos géis em FCA estão dispostas nas Figuras 31 e 32. A Figura 29 apresenta os valores de pH nos primeiros 120 minutos de experimento. Os valores de pH registrados foram moderadamente alcalinos. Os menores valores foram com 5 minutos, com um média de 7,66, e os maiores foram com 120 minutos, com média em 7,9. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados.

Nos dias subsequentes do experimento, o pH dos géis mantiveram-se acima de 8 e estabilizaram no 4º dia de experimento, com média em 8,22, como pode ser visto na Figura 32. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados.

Ao final do preparo dos hidrogéis foi feita uma leitura do pH para certificar de que eles estivessem em pH neutro 7. Possivelmente, os componentes dos géis interagiram quando em contado com o FCA, o que elevou moderadamente o valor do pH.





Avaliação do pH dos hidrogéis, imersos em fluido corporal artificial (pH 7,4), medido nos diferentes tempos experimentais, no intervalo de 5 a 120 minutos. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 32. Variação do pH dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D, após 1, 2, 3 e 4 dias.



Avaliação do pH dos hidrogéis, imersos em fluido corporal artificial (pH 7,4), medido nos tempos experimentais 1, 2, 3 e 4 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

A literatura tem apontado que ambientes alcalinos favorecem o crescimento de células osteoblásticas (LI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2012). Galow *et*

al. (2017) relataram que, em condições alcalinas, genes reguladores de processos de diferenciação de osteoblastos são ativados e tem seu funcionamento acelerado, resultando em mineralização significante após 21 dias do estudo. Shen *et al.* (2012) demonstrou que o pH alcalino (pH 8,5) aumentou o crescimento celular e, não só aumentou a proliferação, como também aumentou a atividade da enzima fosfatase alcalina, importante biomarcador de diferenciação celular. Também foi inferido que a atividade de íons metálicos presentes no material foi aumentada juntamente com o pH. Com isso, podemos sugerir que o aumento do pH pode ser base para a estimulação da formação óssea.

Além disso, a alcalinização do meio extracelular (pH 8,5) pode aumentar a produção de óxido nítrico nas células endoteliais (CAPELLINI *et al.*, 2013). O óxido nítrico é essencial na modulação dos processos angiogênicos. Quando liberados pelas células endoteliais, o óxido nítrico atua na sobrevivência das células endoteliais, proliferação, migração e interação com a matriz extracelular (COOKE, 2003), favorecendo o processo de formação de novos vasos, necessários em processos de cicatrização e regeneração tecidual.

3.5.3.6. Liberação de íons

A análise de absorção atômica foi realizada para avaliar as concentrações liberadas dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺, presentes na HA, após imersão dos géis em água deionizada. O experimento por 28 dias com leituras nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 33 e 34.

A liberação de íons Ca^{2+} aconteceu em maior quantidade, visto que as proporções teóricas de Ca/Mg em mol% eram de Gel 1 (100 – 0), Gel 2 (97,5 – 2,5), Gel 3 (95 – 5), Gel 4 (90 – 10). As concentrações acumuladas mostram uma maior liberação de cálcio no 1º dia. Os valores entre os géis variaram pouco. O Gel 4 apresentou os maiores valores ao longo do experimento, mas no geral, o Gel 1 liberou maior quantidade de íons de cálcio. Isto pode ser explicado pela presença da hidroxiapatita pura, sem substituições, na composição do Gel 1. O perfil de liberação sugere uma liberação controlada de cálcio.

O perfil de liberação acumulada de Mg²⁺ foi semelhante ao de Ca²⁺. Os Géis 2 e 3 iniciaram com valores acumulados bastantes semelhantes. O Gel 4 liberou a maior quantidade de íons, mesmo porque, é o hidrogel com maior quantidade de magnésio presente na HA.



FIGURA 33. Liberação de íons Ca²⁺ após imersão dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em água deionizada

Avaliação da liberação de íons Ca²⁺, presente nas HA, após imersão dos hidrogéis em água deionizada, através da análise de absorção atômica. O experimento durou 28 dias e as leituras ocorreram nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas.

Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 34. Liberação de íons Mg²⁺ após imersão dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em água deionizada



Avaliação da liberação de íons Mg²⁺, presente nas HA, após imersão dos hidrogéis em água deionizada, através da análise de absorção atômica. O experimento durou 28 dias e as leituras ocorreram nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas.

Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros,

vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: A autora, 2021.

A liberação gradual de íons presentes nos materiais é extremamente útil e muito importante na engenharia de tecidos ósseos. A liberação de íons Ca²⁺ e Mg²⁺ e a biodegradação contínua do material podem produzir um ambiente rico nestes íons, estimulando e tornando o ambiente favorável para a proliferação e diferenciação de células (LU *et al.*, 2011). Os íons liberados, principalmente de cálcio, podem atuar nos processos de mineralização (ELAHPOUR *et al.*, 2018). Numa implante de material, a deposição dos íons formando a camada de apatita sobre o material pode fornecer um substrato adequado para fixação de células e proliferação (LU *et al.*, 2011).

Além disso, íons Mg²⁺ modulam o comportamento celular de células endoteliais. A disponibilidade de magnésio no meio afeta a migração e a proliferação. Altos níveis de Mg facilitam a reendotelização de lesões vasculares e aceleram a formação de novos vasos em ferimentos, auxiliando a cicatrização (MAIER *et al.*, 2004).

3.5.3.7. Swelling

A capacidade de *swelling* dos géis está apresentada na Figura 35. O Gel 3 foi o que apresentou menor razão de *swelling* em todos os tempos experimentais. Entre os tempos 12h e 24h, o Gel 1 apresentou um aumento de mais de 400% em seu intumescimento. No tempo 24h, os Géis 1 e 4 apresentaram altas taxas de *swelling*,1333% e 1109%, respectivamente. Comparando os géis entre si, em cada tempo experimental, houve diferença estatística significativa P < 0,001.

A característica mais significativa de um hidrogel é a capacidade de absorver grandes quantidades de soluções aquosas que podem atingir centenas de vezes o seu peso seco (ELSAYED, 2019). Para esse experimento, os hidrogéis foram desidratados. A grande diferença de porcentagem entre o Gel 3 e os demais pode indicar que o tempo de desidratação para o Gel 3 não foi suficiente, o que pode ter alterado sua capacidade de intumescimento.

FIGURA 35. Porcentagem de swelling dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.



O comportamento de *swelling* dos hidrogéis desidratados, imersos em PBS, pH 7,4 a 37 °C, foi estudado nos tempos experimentais 30 minutos, 1, 3, 12 e 24 horas. Os dados apresentados são as médias das triplicatas (*** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

Barros *et al.* (2014) relatam que hidrogéis contendo quitosana e celulose apresentam razão de *swelling* alta. Entretanto, altas concentrações de hidroxiapatita podem diminuir a capacidade de intumescimento (KUMAR *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2018). Os autores sugerem que propriedades hidrofóbicas da HA afetam a porosidade da estrutura do hidrogel e reduzem a capacidade de captação de água. De toda forma, os resultados de *swelling* encontrados nos experimentos deste trabalho correspondem aos valores da encontrados na literatura (BARROS *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2019; MALIK *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2018).

O comportamento de intumescimento é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a aplicabilidade biomédica. Geralmente, a maior taxa de *swelling* dos hidrogéis cria uma área de superfície maior para difusão da bioativos de dentro do hidrogel para o meio ambiente, além de aumentar a capacidade de solubilização dos compostos ativos (HOLBACK; YEO; PARK, 2011).

3.5.3.8. Biodegradação in vitro

A degradação dos géis em soluções fisiológica e enzimática foi acompanhada por 28 dias. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 36 e 37. O aumento significativo da massa nas primeiras 24 horas foi atribuído à capacidade de *swelling* dos géis, que permitiram a retenção da água. As duas degradações tiveram perfis parecidos, mas na presença da solução contendo colagenase houve maior perda de massa. Ao final dos 28 dias, a porcentagem de massa remanescente dos géis 1, 2, 3 e 4 em PBS foi 92,9%, 93,5%, 46,5%, 76,0%, respectivamente. Em PBS/colagenase, a porcentagem de massa remanescente dos géis 1, 2, 3 e 4 foi 41,2%, 30,9%, 13,9%, 52,7%, respectivamente. O Gel 3 foi o que mais sofreu degradação nos dois processos.



FIGURA 36. Perfil de degradação dos hidrogéis multipoliméricos, contendo HA e vitamina D, em solução fisiológica (PBS, pH 7,4).

A avaliação da degradação dos hidrogéis em tampão PBS pH 7,4 foi feita através da imersão dos hidrogéis na solução fisiológica, num período de 28 dias, com pesagens nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.



FIGURA 37. Perfil de degradação dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em solução enzimática (PBS/colagenase)

A avaliação da degradação dos hidrogéis em PBS/colagenase foi feita através da imersão dos hidrogéis na solução enzimática, num período de 28 dias, com pesagens nos tempos experimentais 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias. Os dados apresentados são as médias das triplicatas. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

Ren *et al.* (2018) credita a perda de massa dos hidrogéis de quitosana à hidrólise dentro das redes de hidrogel causada pelo tampão PBS. A clivagem das ligações promove a degradação em massa do hidrogel e estruturas de rede soltas podem levar a uma erosão mais rápida do hidrogel. Por sua vez a colagenase não teria atuação sobre a quitosana, mas teria sobre a gelatina (GORGIEVA; KOKOL, 2012), também presente nos géis.

Entender a degradação dos hidrogéis, assim como a capacidade de intumescimento, é extremamente importante para aplicações biológicas, especialmente quando envolve a liberação controlada de bioativos. À medida que o hidrogel se degrada, as drogas ou proteínas encapsuladas são liberadas do hidrogel e podem se difundir lentamente do gel para o meio externo. Além disso, um hidrogel biodegradável é capaz de cumprir sua função e depois ser lentamente reabsorvido pelo organismo.

O material desenvolvido mostrou resistência de 4 semanas em tampão fisiológico e em tampão enzimático, e pelas porcentagens de massa remanescente poderíamos esperar uma maior resistência. Outros autores demonstraram resultado semelhante ou com menor eficiência (GORGIEVA; KOKOL, 2012; RAUCCI *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2015).

3.5.4. Testes Biológicos in vitro dos hidrogéis

3.5.4.1. Citotoxicidade dos hidrogéis

A citotoxicidade dos hidrogéis foi testada em culturas de L929, MC3T3 e EA.hy926. Os resultados da viabilidade celular estão representados nas Figuras 38, 39 e 40.

Os testes de MTT mostraram que nenhum dos géis apresentaram toxicidade paras as linhagens celulares. Os resultados obtidos mostram mais 95% de citocompatibilidade dos géis com as células, apresentando grau 1 ou 0 de citotoxicidade de acordo com a ISO 10993-5, disposta na metodologia de Xiao *et al.* (2018). Como os componentes dos hidrogéis não são citotóxicos, os resultados já eram esperados.

Em L929, houve diferença estatística significativa apenas no tempo 24 h entre Gel 3 e Gel 4 (P < 0,01).

Quando testadas com os géis, as células pré-osteoblásticas MC3T3 apresentaram viabilidade acima de 150%. Todos os géis apresentaram diferença estatística significativa P < 0,001 em relação ao controle. O Gel 4 no tempo 72 h, apresentou viabilidade celular maior que 200%, apresentando diferença estatística significativa P < 0,05 em relação ao Gel 4 no tempo 24 h e P < 0,001 em relação aos demais géis e o controle no tempo experimental 72 h. Estes resultados não só sugerem citocompatibilidade do material, como também sugere capacidade de indução ao crescimento e proliferação celular.

Para os testes com EA.hy926, Gel 1 e Gel 2, no tempo 48 h. apresentaram diferença estatística significativa P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente, em relação ao Gel 4. No tempo 72 h, Gel 2 também apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle (P < 0,01), ao Gel 1 (P < 0,05) e ao Gel 3 (P < 0,05).

FIGURA 38. Citotoxicidade indireta dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em fibroblastos L929



As células fibroblásticas L929 foram tratadas com eluatos dos hidrogéis por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos hidrogéis foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (** P < 0,01) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 39. Citotoxicidade indireta dos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D em células pré-osteoblásticas MC3T3



As células pré-osteoblasticas MC3T3 foram tratadas com eluatos dos hidrogéis por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos hidrogéis foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, *** P < 0,001) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: A autora, 2021.





As células endoteliais EA.hy926 foram tratadas com eluatos dos hidrogéis por 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos hidrogéis foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, ** P < 0,01) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

As células L929 já foram testadas previamente em outros hidrogéis contendo quitosana, HA pura ou substituída, PVA, gelatina e outros componentes, e os resultados foram similares aos obtidos neste experimento (BAGHAIE *et al.*, 2017; JAIPAN; NGUYEN; NARAYAN, 2017; JAISWAL *et al.*, 2013; MARRELLA *et al.*, 2018). Os fibroblastos são bastante usados em testes de citocompatibilidade de materiais. Por serem células abundantes do tecido conjuntivo, estarem envolvidos na síntese de componentes da matriz extracelular, e nos processos de cicatrização, incluindo angiogênese do local, a viabilidade dos fibroblastos perante compósitos e *scaffolds* desenvolvidos para regeneração de tecidos é extremamente importante. (ESLAMI; SOLATI-HASHJIN; TAHRIRI, 2009; JAIPAN; NGUYEN; NARAYAN, 2017; SINGER, A. J.; CLARCK, 1999; SJEROBABIN *et al.*, 2016).

Os componentes da formulação dos hidrogéis não são citotóxicos e influenciam o crescimento e a proliferação de MC3T3. Mammoli *et al.* (2019) demonstraram as funções e ações do magnésio e da vitamina D em osteoblastos e osteoclastos. Malik *et al.* (2020) apresentaram um hidrogel à base de quitosana, carboximetilcelulose e hidroxiapatita que não apresentava citotoxicidade para MC3T3 e ainda tinha potencial pró-angiogênico. Pasqui *et al.* (2014) desenvolveram um hidrogel biológico de carboximetilcelulose e hidroxiapatita que não apresentou toxicidade em osteoblastos MG63 e induziu crescimento, proliferação e produção de mineralização. Os hidrogéis 136

apresentados por Thangprasert *et al.* (2019) trouxeram diferentes porcentagens de PVA e gelatina que auxiliaram na aderência celular, proliferação, atividade da fosfatase alcalina, liberação e deposição de cálcio.

Shi *et al.* (2017) demonstraram a interação não citotóxica de nanopartículas de HA com células endoteliais. Nos dois trabalhos de Mohandas *et al.* (2015, 2018) o uso de quitosana não apresentou toxicidade e ainda aumentou a capacidade angiogênica das células quando expostas ao material.

3.5.4.2. Aderência celular

A aderência celular foi testada em dois métodos: pela contagem de células e por imagens em MEV. O resultado da porcentagem de células MC3T3 e EA.hy926 aderidas ao material após 2 e 4 horas está representado nas Figuras 41 e 42.

Após o tempo experimental 2 h, as MC3T3 expostas aos Géis 3 e 4 já apresentavam aproximadamente 75% de aderência, com diferença estatística significativa P < 0,001 em relação aos Géis 1 e 2. No tempo 4 h, houve aderência de praticamente 100%.

As EA.hy926 expostas ao Gel 4 aderiram 86% nas primeiras 2 horas, com diferença estatística significativa P < 0,001 em relação aos Géis. O Gel 3 apresentou diferença estatística significativa P < 0,001 em relação ao Gel 1 e P < 0,01 em relação ao Gel 2. O tempo 4 h apresentou resultados também com aderência de praticamente de 100%. Gel 1 e Gel 2, no tempo 48 h apresentaram diferença estatística significativa P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente, em relação ao Gel 4. No tempo 72 h, Gel 2 também apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle (P < 0,01), ao Gel 1 (P < 0,05) e ao Gel 3 (P < 0,05).





As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram semeadas sobre os hidrogéis e após 2 e 4 horas, o meio de cultura foi aspirado e a quantidade de células em suspensão foi contada. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (***P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 42. Aderência *in vitro* de células endoteliais EA.hy926 aos hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D



As células endoteliais EA.hy926 foram semeadas sobre os hidrogéis e após 2 e 4 horas, o meio de cultura foi aspirado e a quantidade de células em suspensão foi contada. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (***P < 0,001).

Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros,

vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.

FONTE: A autora, 2021.

Para a visualização da morfologia das células aderidas sobre o material desenvolvido foram realizadas as micrografias em MEV. As micrografias das células aderidas estão nas Figuras 41 e 43. As Figuras 42 e 44 são ampliações das micrografias 41 e 43, respectivamente.

Nas imagens obtidas, podemos ver a aderência das células MC3T3 e EA.hy926 após o tempo experimental. Algumas áreas principais foram apontadas com setas ou delimitadas. Muitas ramificações podem ser visualizadas em ambas as células. Em EA.hy926 é possível visualizar estruturas semelhantes a tubos, principalmente nos Géis 2 e 4. As MC3T3 exibiram morfologia espalhada característica de aderência celular adequada, segundo a literatura.


FIGURA 43. Aderência das células MC3T3 sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.

Micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura FIB Quanta 200 FEG 3D, para observação da morfologia celular dos pré-osteoblastos MC3T3 sobre os hidrogéis, após 3 dias de semeadura. A células foram lavadas, fixadas e levadas à preparação no Centro de Microscopia da UFMG. A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. As setas e o círculo destacam algumas células. Magnificação x10000 Barra de escala 10 µm.

FONTE: CM-UFMG

Figura 44. Áreas em destaque nas micrografias de aderência das células MC3T3 sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.



Recorte das áreas destacadas na Figura 41. A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: CM-UFMG

A aderência de osteoblastos sobre um material desenvolvido para aplicação óssea é um passo fundamental para ancorar a interface do material ao osso. O uso da gelatina, derivado do colágeno, inclusive tem sido justificado em alguns compósitos por sua capacidade de ligação e ancoragem das células (LIAO et al., 2011; PETER et al., 2010; WONGSAWICHAI et al., 2019). Xiao et al. (2018) apresentam morfologia e aderência de MC3T3 sobre HA pura e substituída testada em diferentes dias. As células sobre HA substituída parecem mais aderidas e com 7 dias de aderência apresentam ramificações como vemos em nossas imagens, após apenas 3 dias. O mesmo comparativo pode ser feito entre nossas imagens de 3 dias e as de 7 dias de Jahan et al. (2020). Eles avaliaram morfologia e aderência de MC3T3 com 7 e 28 dias em scaffold de quitosana e hidroxiapatita. Em ambos os tempos experimentais, as células, que foram marcadas, exibiram uma morfologia espalhada e com fibras de Factina distintas e bem-organizadas. Yu et al. (2013) avaliaram a morfologia e aderência também de MC3T3 sobre um substrato de titânio com cobertura de cerâmica. Em algumas das imagens é possível ver estruturas assemelhadas às nossas. Lan et al. (2019) testaram a aderência celular em diferentes scaffolds de PVA,

nanotubos de carbono e fosfato de cálcio, para cada *scaffold* as MC3T3 apareceram com uma morfologia diferente: mais fusiforme, mais arredondada. Nossas MC3T3 se assemelham em morfologia das que foram testadas apenas em PVA e fosfato de cálcio.

A spot WD mag = tilt 4.5 10.0 mm 25 000 x -0 ° HV det spot WD mag = 5.00 kV ETD 4.5 10.3 mm 10 000 4 µm Quanta 3D CM-UFMG Quanta 3D CM-UFMG - ☆ HV det spot WD mag □ tilt HFW 5.00 kV ETD 4.5 10.3 mm 10 000 x -0 ° 29.8 µm WD mag = tilt HFW 9 mm 10 000 x -0 ° 29 8 ur Quanta 3D CM-UFMG

FIGURA 45. Aderência das células EA.hy926 sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.

Micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura FIB Quanta 200 FEG 3D, para observação da morfologia celular das células endoteliais EA.hy926 sobre os hidrogéis, após 3 dias de semeadura.
 A células foram lavadas, fixadas e levadas à preparação no Centro de Microscopia da UFMG.
 A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%.
 As setas e o círculo destacam algumas células.
 Magnificação x10000
 Barra de escala 10 μm. FONTE: CM-UFMG

FIGURA 46. Áreas em destaque nas micrografias de aderência das células EA.hy926 sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.



Recorte das áreas destacadas na Figura 43. A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: CM-UFMG

A aderência e migração de células endoteliais é fundamental para uma série de processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento vascular e a angiogênese. A aderência já foi investigada em uma variedade de contextos, incluindo cicatrização de feridas, engenharia de tecidos e design de biomateriais (REINHART-KING, 2008). Nos experimentos de Braz (2019) foi demonstrado, em micrografias, a aderência de EA.hy926 após 4 horas de semeadura, como observamos em nosso experimento de contagem do número de células. As imagens de Braz (2019) ainda mostram que a morfologia das células aderidas era irregular e estrelada, marcada por prolongamentos, que segundo a autora auxilia no recrutamento e proliferação celular sobre superfície. Yang *et al.* (2021) em experimentos para explorar a aderência e viabilidade de coculturas de células endoteliais e adipócitos com potencial para

morfologia de célula endotelial característica. Lee *et al.* (2018) em imagens semelhantes as nossas, mas em menor aumento, mostram aderência das células endoteliais em *scaffold* de base polimérica. Os trabalhos de Matschegewski *et al.* (2016) e Recek *et al.* (2016) apresentam nanofibras poliméricas para aplicação em engenharia de tecidos vasculares. A aderência e a visualização da morfologia de células endoteliais em nanofibras são notáveis, aderência com aspecto fixo e morfologia bastante característica: estrelada com prolongamentos bem definidos.

3.5.4.3. Proliferação celular

A capacidade de proliferação das células MC3T3 e EA.hy926 sobre os hidrogéis foi avaliada utilizando o método de MTT. Os resultados obtidos estão dispostos nas Figuras 47 e 48. Todos os hidrogéis promoveram proliferação das células MC3T3 e EA.hy926 após 1, 4, 7 e 14 dias de experimento. Os valores em absorbância mostram que, em geral, MC3T3 apresentou maior proliferação que EA.hy926.

Nos testes com MC3T3 observamos que o Gel 3 induziu melhor proliferação nos 7 primeiros dias, seguido de pequena redução no crescimento com 14 dias. O Gel 2 apresentou proliferação semelhante ao Gel 3 e os demais promoveram crescimento gradual ao longo do experimento. Diferenças estatísticas significativas ocorreram entre Gel 1 e Gel 3 nos tempos 4 e 7 dias, P < 0,05 e P < 0,001, respectivamente, e entre Gel 1 e Gel 4 no tempo 14 dias, P < 0,05.

Nos testes com EA.hy926 observamos que Gel 3 induziu melhor proliferação nos 4 primeiros dias. No dia 7, os valores entre Gel 2, 3 e 4 foram bastante semelhantes. No último tempo experimental, Gel 4 apresentou melhores valores de proliferação. Diferenças estatísticas significativas ocorreram entre Gel 1 e Gel 3 no tempo 7 dias, P < 0,01, entre Gel 1 e Gel 4 nos tempos 7 e 14 dias, P < 0,05 e P < 0,001, respectivamente, e entre Gel 2 e Gel 4, no tempo 14 dias, P < 0,05.

Estes resultados indicam que os hidrogéis serviram de substrato para o crescimento celular, pois a quantidade de células viáveis aumentou ao longo do experimento. Somados aos resultados de citotoxicidade do material e aderência celular, podemos considerar os hidrogéis citocompatíveis e bioindutores.





As células pré-osteoblásticas foram semeadas sobre os hidrogéis e, após 1, 4, 7 e 14 dias, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, *** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 48. Proliferação celular de células endoteliais EA.hy926 sobre os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D.



As células endoteliais EA.hy926 foram semeadas sobre os hidrogéis e, após 1, 4, 7 e 14 dias, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

Inúmeros autores já demonstraram a capacidade de *scaffolds* de base polimérica e nanopartículas de HA induzirem a proliferação celular de osteoblastos e células endoteliais (DHIVYA *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2019; MOHANDAS *et al.*, 2018; RE *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2017a, 2017b). As propriedades estruturais e físico-mecânicas dos hidrogéis e liberação de íons metálicos (Ca e Mg) no meio são bastante relevantes para a ancoragem, proliferação, diferenciação celular.

Lu *et al.* (2011) e Lei *et al.* (2019) demonstraram que a liberação de íons da HA seguida pela deposição dos íons no material estimula a aderência e torna o ambiente favorável para a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Além disso, a estrutura tridimensional, multipolimérica e porosa propiciam a base necessária. Avaliando os resultados de Raucci *et al.* (2018), Pasqui *et al.* (2014) e Thangprasert *et al.* (2019) vemos que polímeros como carboximetilcelulose, gelatina e PVA associados à hidroxiapatita auxiliaram na aderência, induziram o crescimento, proliferação e produção de mineralização dos osteoblastos. Luo *et al.* (2015) e Re *et al.* (2019) revelaram a proliferação de osteoblastos em micrografias de MEV em experimentos de até 21 dias, nos quais é possível visualizar o aumento da ocupação dos poros do material desenvolvido pelos osteoblastos.

A vasculatura óssea desempenha um papel vital no desenvolvimento, remodelação e homeostase óssea. A formação de novos vasos sanguíneos é crucial tanto durante o desenvolvimento ósseo primário quanto no reparo de fraturas em adultos. Tanto o reparo quanto a remodelação óssea envolvem a ativação e a complexa interação entre as vias angiogênicas e osteogênicas (SARAN; GEMINI PIPERNI; CHATTERJEE, 2014). Por isso, o estudo da aderência, proliferação e migração de células endoteliais são fundamentais para a regeneração óssea. Maier *et al.*(2004) demonstrou que a presença de magnésio estimula a proliferação de células endoteliais. Yu *et al.* (2017a) e Yu *et al.* (2017b) demonstraram o potencial de materiais contendo HA na proliferação de células endoteliais, além da proliferação de osteoblastos. Entretanto, grande parte dos trabalhos desenvolvidos na área apostam em proliferação dos osteoblastos e regulam de forma positiva a expressão da fosfatase alcalina, proteína relacionada à diferenciação dos osteoblastos, e os osteoblastos passam a secretar fator de crescimento endoteliai vascular (VEGF) que

estimula a proliferação das células endoteliais (MURPHY *et al.*, 2016; STEINER *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2021).

3.5.4.4. Atividade da fosfatase alcalina

A atividade quantitativa da enzima fosfatase alcalina foi avaliada após 7, 14 e 21 dias da semeadura das células com os hidrogéis. Os resultados estão dispostos na Figura 49. Os dados mostram que a atividade da fosfatase alcalina secretada pelas células aumentou com o tempo de cultura, o que pode sugerir a diferenciação das células pré-osteoblásticas MC3T3 em osteoblastos. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas no tempo experimental 7 dias. Entre os géis e o controle ocorreram diferenças significativas nos tempos 14 e 21 dias (P < 0,001). Também ocorreram diferenças significativas com 21 dias entre o Gel 1 e Gel 2 (P < 0,05), e entre Gel 1 e Gel 3 e 4 (P < 0,01).

Os resultados mostram que os Géis 2, 3 e 4 promoveram o mesmo nível de secreção de fosfatase alcalina pelas MC3T3, sem diferença estatisticamente significativa. Os Géis 2, 3 e 4 conseguiram induzir a diferenciação celular sem a necessidade do uso de meios osteogênicos. Estes resultados provavelmente estão relacionados à presença de componentes como a Vitamina D₃ e HA pura e substituída com magnésio na formulação nos hidrogéis, uma vez que estes componentes têm influência nos processos de proliferação, diferenciação e mineralização óssea.



FIGURA 49. Atividade da enzima fosfatase alcalina

As células pré-osteoblásticas MC3T3 foram semeadas sobre os hidrogéis e, após 7, 14 e 21 dias, a produção da enzima fosfatase alcalina foi medida usando o kit Labtest. A atividade relativa da fosfatase alcalina foi calculada pela normalização dos valores de densidade ótica com as proteínas totais.

Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

A atividade da enzima fosfatase alcalina tem sido usada como um marcador precoce para a funcionalidade e diferenciação de osteoblastos em experimentos *in vitro*, uma vez que participa dos processos de formação e mineralização óssea (WANG *et al.*, 2016). Sendo a verificação qualitativa e quantitativa da secreção desta enzima um parâmetro importante para análise dos efeitos causados no tecido ósseo, já que ela reflete a atividade osteoblástica (OHGUSHI *et al.*, 1993). Resultados semelhantes aos nossos foram relatados em diversos trabalhos (LU *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2011; THANGPRASERT *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2019). Xiao *et al.* (2018) relaciona o aumento da produção da fosfatase alcalina à substituição metálica da hidroxiapatita. Ye *et al* (2019) demonstraram que o *scaffold* contendo quitosana, fosfato de cálcio e íons metálicos aumentaram significativamente a produção da fosfatase alcalina.

Ozeki, Aoki e Fukui (2008) relatam que a associação de hidroxiapatita a e Vitamina D₃ (25(OH)D₃) promoveram maior aumento da produção da enzima em relação a outras formas da Vitamina D e da Vitamina K. A Vitamina D3 é conhecida por estimular a atividade da fosfatase alcalina durante os estágios de proliferação e

diferenciação em osteoblastos. Seus efeitos sobre a mineralização e regulação enzimática sugerem um envolvimento direto da forma 1,25-(OH)₂D₃ no processo (VAN DRIEL; POLS; VAN LEEUWEN, 2005). A Vitamina D, além disso, já foi reportada por induzir a expressão de osteocalcina, proteína da matriz óssea, dependente da Vitamina K, envolvida na maturação óssea (METZGER *et al.*, 2013).

3.5.4.5. Mineralização pelo método Von Kossa

Para avaliar a capacidade de mineralização da matriz extracelular pelas MC3T3, foi realizada a coloração dos nódulos de mineralização pelo método de Von Kossa, após 14 dias de cultivo das células com os Géis. Imagens ópticas obtidas após a coloração estão dispostas na Figura 50. É possível visualizar inúmeros nódulos corados pelo método. Todos os Géis quando comparados com o controle apresentaram o campo repleto de nódulos.

O método de coloração de Von Kossa tem sido usado para representar a mineralização óssea. Bonewald *et al.* (2003) explicita que as adaptações feitas no método original utilizam nitrato de prata para corar depósitos de cálcio, que na verdade, não reage com o cálcio, e sim com o fosfato na presença de material ácido. Apenas a coloração do fosfato não é satisfatória para afirmar que a mineralização ocorreu, métodos complementares são necessários como Alizarin Red (coloração do cálcio), FT-IR, DRX ou testes dos marcadores de mineralização (fosfatase alcalina e osteocalcina). Contudo, baseado nos resultados previamente apresentados neste trabalho no teste da fosfatase alcalina e nas imagens obtidas neste teste podemos inferir que nossos hidrogéis apresentam capacidade de mineralização.



FIGURA 50. Estruturas mineralizadas coradas pelo método de Von Kossa

Após 14 dias de semeadura dos pré-osteoblastos MC3T3 em contato com os hidrogéis, foi feita a coloração pelo método Von Kossa para observação de mineralização.
A) Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. B) Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. C) Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. D) Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. Controle Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas com magnificação x10. FONTE: A autora, 2021.

A literatura reporta trabalhos que utilizam diversos materiais para aumentar a capacidade de mineralização. Costa (2014) demonstrou que compostos poliméricos associados à fosfatos de cálcio e testosterona também aumentam a capacidade de mineralização em MC3T3. Trajano *et al.* (2016) desenvolveram um compósito polimérico associado a uma biocerâmica e doxiciclina que também apresentou excelentes resultados na mineralização de MC3T3 após 14 dias de experimento. Grellier *et al.* (2009) imobilizaram uma cocultura de células osteoblásticas e endoteliais em um microesfera polimérica e conseguiram induzir melhor mineralização óssea que no uso de monocultura, demonstrando a como estas células auxiliam na regulação positiva uma da outra e como os processos de formação óssea e vascular são interdependentes. Re *et al.* (2019) demonstraram mineralização após 21 dias de contato dos osteoblastos com o hidrogel à base de gelatina e quitosana com uso de meio osteogênico.

É importante ressaltar que a capacidade de mineralização não é observável em todos os tipos de osteoblastos. Em um estudo foi mencionado características fenotípicas de 5 tipos diferentes de osteoblastos dos quais apenas MC3T3 e SAOS-2 apresentavam a capacidade de mineralização (SAMMONS, 2015).

3.5.4.6. Expressão do óxido nítrico

Para avaliar o efeito dos compósitos na produção de óxido nítrico pelas células MC3T3 e EA.hy926, a quantidade de nitrito (NO₂-) foi mensurada no meio de cultura, uma vez que este representa um produto final estável do óxido nítrico, por meio da utilização do reagente de Griess. Os resultados estão apresentados nas Figuras 51 e 52.

Os gráficos mostram que, na presença dos hidrogéis, ambas as células apresentaram aumento na produção de óxido nítrico, em relação ao controle. MC3T3 apresentou maiores valores de óxido nítrico com Gel 2 e Gel 4, nos dois tempos experimentais. EA.hy926 apresentou maiores valores com Gel 3 e Gel 4. Para MC3T3, diferenças estatísticas significativas foram observadas no tempo 7 dias entre Gel 1 e 4 (P < 0,05), Gel 2 e 3 (P < 0,05) e Gel 2 e controle (P < 0,001). Com 14 dias, todos os géis apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (P < 0,001). Para EA.hy926, diferenças estatísticas significativas foram observadas no tempo 7 dias no tempo 7 dias entre Gel 1.

dias entre Gel 2 e controle (P < 0,01), Gel 3 e controle (P < 0,001), Gel 4 e controle (P < 0,05). Com 14 dias, Gel 1 apresentou diferenças significativas com Gel 2 (P < 0,05) e os demais géis (P < 0,001). Diferenças estatísticas significativas também aparecem entre Gel 2 e 3 (P < 0,05). Todos os géis apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (P < 0,001).



FIGURA 51. Concentração de óxido nítrico produzida por MC3T3

Avaliação do efeito dos hidrogéis sobre a produção do óxido nítrico pelos pré-osteoblastos MC3T3, após 7 e 14 dias. O nitrito, produto mais estável do óxido nítrico foi mensurado no meio de cultura, utilizando o reagente de Griess. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, *** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 52. Concentração do óxido nítrico produzida por EA.hy926



Avaliação do efeito dos hidrogéis sobre a produção do óxido nítrico pelas células endoteliais EA.hy926, após 7 e 14 dias. O nitrito, produto mais estável do óxido nítrico foi mensurado no meio de cultura, utilizando o reagente de Griess. Teste ANOVA Two-way e pós-teste Bonferroni (* P < 0,05, *** P < 0,001). Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021. O óxido nítrico é um radical livre produzido endogenamente que desempenha importantes funções biológicas, como promoção da vasodilatação, angiogênese, reparo de tecidos, cicatrização de feridas, ação antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Em tecido ósseo já foi demonstrado que o óxido nítrico desempenha um papel importante nos processos de formação e cicatrização óssea e pode ser gerado por muitos tipos de células presentes no meio ósseo, mais significativamente, os osteoblastos. Para osteogênese, em baixas concentrações, o óxido nítrico promove crescimento e diferenciação celular dos osteoblastos (TSUKAHARA *et al.*, 1996), sendo um importante regulador do metabolismo ósseo, uma vez que osteoblastos não só produzem óxido nítrico como respondem à presença dele no meio.

Altas concentrações de óxido nítrico podem alterar o funcionamento dos osteoblastos (TSUKAHARA *et al.*, 1996). Os resultados deste experimento para MC3T3 mostram valores que tenderam a um aumento, mas considerando os resultados dos demais experimentos com estas células, não foi observada redução no crescimento celular nem aumento da citotoxicidade do material. Trabalhos que investigam o reparo ósseo envolvendo o fluxo sanguíneo ósseo já demonstraram que quando o nível de óxido nítrico está baixo, a vasodilatação local e o fluxo sanguíneo diminuem, prejudicando um reparo ósseo adequado (HEINONEN *et al.*, 2018).

O óxido nítrico é também um mediador crítico da angiogênese. A presença dele aumenta a sobrevivência, inibe a apoptose celular, induz a proliferação e a migração das células endoteliais, além de induzir a expressão de fatores de crescimento (COOKE, 2003). Ademais aos efeitos diretos, entre os efeitos indiretos do óxido nítrico nas células endoteliais está o aumento do fluxo sanguíneo local, como ocorre em reparos teciduais e lesões (PITTARELLA *et al.*, 2015). Os resultados apresentados nos experimentos com EA.hy926 mostram valores tendendo a um aumento que já era esperado, uma vez que o óxido nítrico produzido pelas células endoteliais está intimamente ligado às funções básicas delas.

Ademais, dois componentes dos hidrogéis representam fatores estimulantes para a produção de óxido nítrico nas células endoteliais: a Vitamina D₃ e o magnésio. Maier *et al.* (2004) demonstraram que magnésio estimula a produção de óxido nítrico nas células endoteliais. Pittarella *et al.* (2015) concluiu que um possível envolvimento

153

do óxido nítrico nos efeitos proliferativos e migratórios das células endoteliais pode ser induzidos pela Vitamina D.

3.5.4.7. Formação de vasos

O potencial angiogênico dos hidrogéis foi avaliado através do teste de formação de tubos. A Figura 53 apresenta imagens das células após 6 horas em contato com os eluatos dos Géis. As Figuras 54, 55, 56 e 57 são imagens representativas das células após 24 horas em contato com os eluatos dos Géis 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

O teste de formação de tubos revelou que, após 6 horas, as células EA.hy926 alinharam-se formando, o que a literatura chama de conexões celulares (ARANDA; OWEN, 2009), onde duas ou mais células endoteliais se alinham em estruturas tubulares. Então após 24 horas, o número de tubos formados aumentou, com maior quantidade de células conectadas e com estruturas em formato poligonal. No aumento de cada imagem ótica é possível ver com maiores detalhes as conexões intercelulares, as junções e os tubos formados. Aranda e Owen (2009) mencionam que o tempo experimental com EA.hy926 é um pouco arbitrário, e dependendo dos meios de cultura e dos fatores angiogênicos do composto, o processo de formação de tubos pode ocorrer entre 6 e mais de 20 horas. Em nossos testes, os melhores resultados foram após 24 horas.

O potencial angiogênico não é apontado apenas pela formação de estruturas poligonais. Os diversos métodos medem: a formação do tubo, o comprimento dos tubos, a área dos capilares, o número de tubos, o número de polígonos formados, a organização tridimensional da rede (ARANDA; OWEN, 2009). Este ensaio é um método bastante simples e rápido para quantificar o potencial angiogênico de um composto, mas não fornece informações sobre o mecanismo específico pelo qual o composto realmente afeta o processo de formação de vasos (XIE *et al.*, 2013). Para isso novos experimentos são necessários.

Os resultados mostram potencial angiogênico para todos os hidrogéis. Após a contagem do número de tubos formados, observamos que quando comparados ao controle, os géis mostraram valores expressivamente maiores (Figura 58). Entre os hidrogéis, Gel 3 e 4 apresentaram valores semelhantes, sem diferença estatística

significativa. Ambos apresentaram diferença estatística significativa em relação a Gel 1 e 2 (P < 0,05).



FIGURA 53. Formação de tubos das células endoteliais EA.hy926 com os hidrogéis multipoliméricos contendo HA e vitamina D, após 6 horas

Após pré-tratamento com os eluatos dos hidrogéis, as células endoteliais EA.hy926 foram incubadas sobre Geltrex por 6 horas para formação de tubos. Os círculos destacam células conectadas e com estruturas em formato poligonal.

Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas com magnificação x10. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021.

FIGURA 54. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 1, após 24 horas



Após pré-tratamento com o eluato do Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp, as células endoteliais EA.hy926 foram incubadas sobre Geltrex por 24 horas para formação de tubos. Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas. Magnificação x10 à esquerda. Recorte de áreas destacadas à direita. As setas apontam formação de tubos: células conectadas ou estruturas em formato poligonal. FONTE: A autora, 2021. FIGURA 55. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 2, após 24 horas.



Após pré-tratamento com o eluato do Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%, as células endoteliais EA.hy926 foram incubadas sobre Geltrex por 24 horas para formação de tubos. Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas. Magnificação x10 à esquerda. Recorte de áreas destacadas à direita. As setas apontam formação de tubos: células conectadas ou estruturas em formato poligonal. FONTE: A autora, 2021. FIGURA 56. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 3, após 24 horas.



Após pré-tratamento com o eluato do Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%, as células endoteliais EA.hy926 foram incubadas sobre Geltrex por 24 horas para formação de tubos.
 Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas. Magnificação x10 à esquerda. Recorte de áreas destacadas à direita. As setas apontam formação de tubos: células conectadas ou estruturas em formato poligonal.
 FONTE: A autora, 2021.



FIGURA 57. Formação de tubo das células endoteliais EA.hy926 com Gel 4, após 24 horas

Após pré-tratamento com o eluato do Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%, as células endoteliais EA.hy926 foram incubadas sobre Geltrex por 24 horas para formação de tubos. Imagens digitais de microscopia ótica foram registradas. Magnificação x10 à esquerda. Recorte de áreas destacadas à direita. As setas apontam formação de tubos: células conectadas ou estruturas em formato poligonal.

FONTE: A autora, 2021.





As conexões celulares foram contadas utilizando o *software* ImageJ e analisadas no *software* Origin 7.0. *** P < 0,001. Gel 1 – polímeros, vitamina D e HAp. Gel 2 – polímeros, vitamina D e HA-Mg2,5%. Gel 3 – polímeros, vitamina D e HA-Mg5%. Gel 4 – polímeros, vitamina D e HA-Mg10%. FONTE: A autora, 2021. A formação de novos vasos envolve uma série de eventos programados. Sinalização e liberação de fatores de crescimento de vasos, ativação das células endoteliais, produção de óxido nítrico, liberação de enzimas, migração e proliferação das células endoteliais e formação do lúmen para início da formação de novos vasos (GERRITSEN, 2001). Analisando os resultados obtidos, os hidrogéis desenvolvidos, com destaque para o Gel 4, foram capazes de aumentar a produção do óxido nítrico, induzir aderência e proliferação celular e a formação de estruturas tubulares, sem apresentar toxicidade. Isso demonstra que foi atingida uma sequência dentro do processo de angiogênese, embora testes complementares ainda sejam necessários.

Os componentes poliméricos dos hidrogéis desenvolvidos podem não apresentar atividade pro-angiogênica isoladamente, mas a associação deles em combinação com as nanopartículas de HA e a vitamina D demonstraram este potencial. Os polímeros, por serem biocompatíveis, biodegradáveis, e oferecerem estrutura para aderência e proliferação celular, por si só, já representam excelentes escolhas como base do material.

A presença da HA, pura e substituída com magnésio, e da Vitamina D trazem ao material, além da atividade angiogênica, a atividade osteogênica. Wong *et al.* (2014) demonstraram que a Vitamina D3 promoveu a regeneração do endotélio vascular, induzindo o processo angiogênico de proliferação e migração celular. Pittarella *et al.* (2015) demonstraram que a Vitamina D atua na proliferação e migração das células endoteliais. Bose *et al.* (2013) relatam a capacidade angiogênica do magnésio *in vitro*. Maier *et al.* (2004) apresentam a importância do magnésio para a angiogênese e como ele modula o comportamento celular das células endoteliais.

3.6. Resumo dos Resultados

- O método de co-precipitação em baixa temperatura foi efetivo para síntese das HA e resultou em partículas de dimensões nanométricas.
- As análises de difração de raios-X e FTIR demonstraram que a presença do magnésio alterou os parâmetros da rede cristalina das HA sintetizadas e baixa cristalinidade.
- As HA não apresentaram citotoxicidade, demostraram significativa biocompatibilidade e promoveram a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais.
- Os hidrogéis desenvolvidos demonstraram estabilidade térmica similar e a incorporação dos componentes na formulação.
- As imagens de MEV mostraram morfologia de superfície irregular e poros arredondados com tamanho médio entre 22-109 µm. Na presença de fluido corporal artificial, os hidrogéis foram capazes de formar a camada de apatita sobre a superfície. Os testes de pH demonstraram que o pH ficou moderadamente alcalino.
- Os testes de liberação de íons demonstraram um perfil de liberação continuada tanto de Ca²⁺ quanto Mg²⁺.
- Os hidrogéis contendo hidroxiapatita pura (Gel 1) e hidroxiapatita substituída com 10% de magnésio (Gel 4) apresentaram maior capacidade de *Swelling*. No teste de biodegradação, houve alto grau de *Swelling* e após 28 dias, o hidrogel contendo hidroxiapatita substituída com 5% de magnésio (Gel 3) foi o que sofreu maior degradação.
- Nos testes biológicos, os hidrogéis demonstraram citocompatibilidade quando testados com L929, MC3T3 e EA.hy926.
- Os hidrogéis foram capazes de induzir maior aderência e proliferação celular de MC3T3 e EA.hy926. Nos testes *in vitro* foi possível observar aderência de mais de 90% das células após 4 horas de semeadura, para ambas as células. As imagens de MEV mostram as células aderidas à superfície dos hidrogéis. Nas micrografias contendo EA.hy926, é possível visualizar estruturas semelhantes a microvasos, indicando que os hidrogéis podem induzir o comportamento de formação de vasos.

- Os hidrogéis aumentaram a expressão do óxido nítrico em EA.hy926, indicando uma maior possibilidade de indução de proliferação e migração celular para formação vascular. Em MC3T3, o aumento da produção de óxido nítrico também foi visualizado.
- As MC3T3 na presença dos hidrogéis formaram nódulos de mineralização e tiveram aumento na produção da fosfatase alcalina, principalmente no hidrogel contendo hidroxiapatita substituída com 10% de magnésio (Gel 4).
- Nos testes de formação de tubos, foi possível identificar estruturas tubulares e formatos poligonais característicos da formação de tubos, indicando que os hidrogéis conseguiram induzir o comportamento de formação de vasos.

A tabela 14 mostra de forma resumida quais hidrogéis apresentaram os melhores resultados em cada experimento. Observando os dados da tabela, o hidrogel mais promissor e com perspectiva para continuação dos estudos é o Gel 4 (polímeros, vitamina D e HA-10%).

Testes	Hidrogéis			
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4
рН	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Swelling				\checkmark
Biodegradação <i>in vitro</i>				\checkmark
Formação de apatita	\checkmark			
Citotoxicidade				\checkmark
Aderência celular	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Proliferação celular				\checkmark
Fosfatase alcalina		√	\checkmark	\checkmark
Mineralização por Von Kossa	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Concentração de óxido nítrico				\checkmark
Formação de vasos				\checkmark

Tabela 14. Os melhores resultados de cada experimento

FONTE: A autora, 2021.

3.7. Conclusão e Perspectivas futuras

Os hidrogéis desenvolvidos demonstraram efeito sinérgico entre os polímeros de sua matriz e a associação destes polímeros (quitosana, carboximetilcelulose, gelatina e álcool polivinílico) com à biocerâmica hidroxiapatita (pura e substituída com magnésio) e a vitamina D resultou em um biomaterial que estimulou aderência e proliferação celular, formação nódulos de mineralização e aumento na produção da fosfatase alcalina nos osteoblastos, e aumentou a produção do óxido nítrico, induziu aderência e proliferação celular e a formação de estruturas tubulares em células endoteliais.

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho, concluiu-se que os hidrogéis apresentam potencial osteogênico e pró-angiogênico. Contudo um aprofundamento nos testes pode trazer novas perspectivas.

Devido ao período de quarentena, alguns ensaios, que estavam previstos no cronograma de desenvolvimento desse trabalho, não puderam ser realizados ainda. Dessa forma, como perspectivas futuras, os hidrogéis devem ter seus perfis de viscosidade e comportamento reológico avaliado. A avaliação da atividade osteogênica do biomaterial poderia ser complementada por testes *in vitro* como a produção de colágeno, a coloração Alizarin Red para avaliação mineralização e a expressão de marcadores moleculares de mineralização. Um estudo *in vivo* dos hidrogéis também seria importante para acompanhar histologicamente o processo de regeneração tecidual e avaliar as respostas. A avaliação da atividade pró-angiogênica poderia ser complementada pelo teste *ex vivo* do anel aórtico para avaliar se os hidrogéis tem capacidade de induzir brotamento de microvasos e por ensaios *in vivo* para avaliar histologicamente a capacidade de indução da formação de vasos dentro do tecido ósseo.

3.8. Referências bibliográficas

ABUKAWA, Haru; PAPADAKI, Maria; ABULIKEMU, Mailikai; LEAF, Jeremy; VACANTI, Joseph P.; KABAN, Leonard B.; TROULIS, Maria J. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dental Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 50, n. 2, p. 205–216, 2006. DOI: 10.1016/j.cden.2005.11.006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011853205001047.

AGUDELO, R. R. Preparação E Caracterização De Matrizes De Liberação Controlada De Doxiciclina À Base De Nanofibras De Policaprolactona E Gelatina Carreadas Com Nanopartículas De Hidroxiapatita. 2015. Universidade Federal de Minas Gerais, *[S. l.]*, 2015.

AHMADI, F.; OVEISI, Z.; SAMANI, Mohammadi; AMOOZGAR, Z. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. **Research in Pharmaceutical Sciences**, *[S. I.]*, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2015.

AHMADI, Raheleh; BURNS, Alan J.; DE BRUIJN, Joost D. Chitosan-based hydrogels do not induce angiogenesis. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, *[S. I.]*, v. 4, n. 4, p. 309–315, 2009. DOI: 10.1002/term.247. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/term.247.

AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.Journal of Advanced Research, [S. I.], v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015. DOI:10.1016/j.jare.2013.07.006.Disponível

http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006.

AKRAM, M.; HUSSAIN, R. Nanohydrogels: History, Development, and Applications in Drug Delivery. *In*: JAWAID, Mohammad; MOHAMMAD, Faruq (org.). **Nanocellulose and Nanohydrogel Matrices: Biotechnological and Biomedical Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2017. p. 297–330.

ALIHOSSEINI, F. Plant-based compounds for antimicrobial textiles. *In*: SUN, G. (org.). **Antimicrobial Textiles**. 1st. ed. [s.l.] : Elsevier, 2016. p. 155–195. DOI: 10.1016/B978-0-08-100576-7.00010-9. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005767000109.

ALKHRAISAT, Mohammad Hamdan; CABREJOS-AZAMA, Jatsue; RODRÍGUEZ, Carmen Rueda; JEREZ, Luis Blanco; CABARCOS, Enrique López. Magnesium substitution in brushite cements. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 33,

n. 1, p. 475–481, 2013. DOI: 10.1016/j.msec.2012.09.017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.017.

ARANDA, Evelyn; OWEN, Gareth I. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. **Biological Research**, *[S. I.]*, v. 42, n. 3, p. 377–389, 2009. DOI: 10.4067/S0716-97602009000300012.

ARAVAMUDHAN, Aja; RAMOS, Daisy M.; NADA, Ahmed A.; KUMBAR, Sangamesh G. Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. *In*: KUMBAR, Sangamesh G.; LAURENCIN, Cato T.; DENG, Meng (org.).
Natural and Synthetic Biomedical Polymers. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. p. 67–89.
DOI: 10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1.

ARNOLD, Frank; WEST, David C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology** and **Therapeutics**, *[S. l.]*, v. 52, n. 3, p. 407–422, 1991. DOI: 10.1016/0163-7258(91)90034-J.

ASRAN, Ashraf Sh.; HENNING, S.; MICHLER, Goerg H. Polyvinyl alcohol–collagen– hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. **Polymer**, *[S. I.]*, v. 51, n. 4, p. 868–876, 2010. DOI: 10.1016/j.polymer.2009.12.046. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386110000145.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Da. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, *[S. l.]*, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003. DOI: 10.1590/S0104-14282003000400006. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-

14282003000400006&Ing=pt&tIng=pt.

AUGUSTINE, Robin; DOMINIC, Edwin Anto; REJU, Indu; KAIMAL, Balarama; KALARIKKAL, Nandakumar; THOMAS, Sabu. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. **RSC Advances**, *[S. I.]*, v. 4, n. 93, p. 51528–51536, 2014. DOI: 10.1039/c4ra07361d. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1039/C4RA07361D.

AYATULLAH HOSNE ASIF, A. K. M.; RAHMAN, Mahbubur; SARKER, Priti; HASAN, Md. Zayedul; PAUL, Debasree. Hydrogel Fibre: Future Material of Interest for

165

Biomedical Applications. Journal of Textile Science and Technology, [S. I.], v. 05, n. 04, p. 92–107, 2019. DOI: 10.4236/jtst.2019.54009.

BAGHAIE, Shaghayegh; KHORASANI, Mohammad T.; ZARRABI, Ali; MOSHTAGHIAN, Jamal. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, *[S. l.]*, v. 28, n. 18, p. 2220–2241, 2017. DOI: 10.1080/09205063.2017.1390383. Disponível em: http://doi.org/10.1080/09205063.2017.1390383.

BAI, Xin; GAO, Mingzhu; SYED, Sahla; ZHUANG, Jerry; XU, Xiaoyang; ZHANG, Xue Qing. Bioactive hydrogels for bone regeneration. **Bioactive Materials**, *[S. l.]*, v. 3, n. 4, p. 401–417, 2018. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2018.05.006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.

BANG, L. T.; LONG, B. D.; OTHMAN, R. Carbonate hydroxyapatite and siliconsubstituted carbonate hydroxyapatite: Synthesis, mechanical properties, and solubility evaluations. **The Scientific World Journal**, *[S. l.]*, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/969876.

BARRAL, Danilo. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, *[S. I.]*, v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007. DOI: 10.4034/1519.0501.2007.0073.0019.

BARROS, Sandra Cerqueira; DA SILVA, Ana Alves; COSTA, Diana Barbosa; CESARINO, Ivana; COSTA, Carlos M.; LANCEROS-MÉNDEZ, Senentxu; PAWLICKA, Agnieszka; SILVA, Maria Manuela. Thermo-sensitive chitosan–cellulose derivative hydrogels: swelling behaviour and morphologic studies. **Cellulose**, *[S. l.]*, v. 21, n. 6, p. 4531–4544, 2014. DOI: 10.1007/s10570-014-0442-9.

BEGAM, Howa; KUNDU, Biswanath; CHANDA, Abhijit; NANDI, Samit Kumar. MG63 osteoblast cell response on Zn doped hydroxyapatite (HAp) with various surface features. **Ceramics International**, *[S. 1.]*, v. 43, n. 4, p. 3752–3760, 2017. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.12.010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.010.

BERTONI, Enrico; BIGI, Adriana; COJAZZI, Gianna; GANDOLFI, Massimo; PANZAVOLTA, Silvia; ROVERI, Norberto. Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, *[S. I.]*, v. 72, n. 1–2, p. 29–35, 1998. DOI: 10.1016/S0162-0134(98)10058-2.

BIGI, A.; FALINI, G.; FORESTI, E.; RIPAMONTI, A.; GAZZANO, M.; ROVERI, N. Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. Journal of Inorganic Biochemistry, *[S. l.]*, v. 49, n. 1, p. 69–78, 1993. DOI: 10.1016/0162-0134(93)80049-F.

BIGI, Adriana; BOANINI, Elisa; CAPUCCINI, Chiara; GAZZANO, Massimo. Strontiumsubstituted hydroxyapatite nanocrystals. **Inorganica Chimica Acta**, *[S. l.]*, v. 360, n. 3, p. 1009–1016, 2007. DOI: 10.1016/j.ica.2006.07.074.

BOARDMAN, Saskia J.; LAD, Rajan; GREEN, David C.; THORNTON, Paul D. Chitosan hydrogels for targeted dye and protein adsorption. **Journal of Applied Polymer Science**, *[S. I.]*, v. 134, n. 21, 2017. DOI: 10.1002/app.44846. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/app.44846.

BONEWALD, L. F.; HARRIS, S. E.; ROSSER, J.; DALLAS, M. R.; DALLAS, S. L.; CAMACHO, N. P.; BOYAN, B.; BOSKEY, A. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. **Calcified Tissue International**, *[S. I.]*, v. 72, n. 5, p. 537–547, 2003. DOI: 10.1007/s00223-002-1057-y. BOSE, Susmita; FIELDING, Gary; TARAFDER, Solaiman; BANDYOPADHYAY, Amit. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. **Trends in Biotechnology**, *[S. I.]*, v. 31, n. 10, p. 594–605, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.06.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005.

BOSE, Susmita; ROY, Mangal; BANDYOPADHYAY, Amit. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, *[S. I.]*, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005.

BOTELHO, C. M.; LOPES, M. A.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; SANTOS, J. D. Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. I.]*, v. 3, p. 1123–1127, 2002.

BRAZ, J. K. F. da S. Carcterização morfológica e funcional das células endoteliais
de coelho e humanas cultivas sobre superficies tratadas a plasma. 2019.
Universidade Federal Rural do Semi-árido, *[S. I.]*, 2019.

BUENO, Ericka M.; GLOWACKI, Julie. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. **Nature Reviews Rheumatology**, *[S. l.]*, v. 5, n. 12, p. 685–697, 2009.

DOI:10.1038/nrrheum.2009.228.Disponívelem:http://www.nature.com/articles/nrrheum.2009.228.

BUHUS, Gabriela; PEPTU, Catalina; POPA, Marcel; DESBRIÈRES, Jacques. Controlled release of water soluble antibiotics by carboxymethylcellulose- And gelatinbased hydrogels crosslinked with epichlorohydrin. **Cellulose Chemistry and Technology**, *[S. I.]*, v. 43, n. 4–6, p. 141–151, 2009.

CACCIOTTI, Ilaria; BIANCO, Alessandra; LOMBARDI, Mariangela; MONTANARO, Laura. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour. **Journal of the European Ceramic Society**, *[S. I.]*, v. 29, n. 14, p. 2969–2978, 2009. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2009.04.038.

CALÓ, Enrica; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, *[S. I.]*, v. 65, p. 252–267, 2015. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.

CAMARGO, N. H. A.; BELLINI, O. J.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M. Synthesis and characterization of nanostructured ceramics powders for biomedical applications. **Matéria (Rio de Janeiro)**, *[S. I.]*, v. 12, n. 4, p. 574–582, 2007. DOI: 10.1590/S1517-70762007000400005. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-

70762007000400005&lng=en&tlng=en.

CAMPA-SIQUEIROS, Paola; MADERA-SANTANA, Tomás Jesús; AYALA-ZAVALA, Jesús Fernando; LÓPEZ-CERVANTES, Jaime; CASTILLO-ORTEGA, María Mónica; HERRERA-FRANCO, Pedro Jesús. Nanofibers of gelatin and polivinyl-alcoholchitosan for wound dressing application: fabrication and characterization. **Polímeros**, *[S. I.]*, v. 30, n. 1, 2020. DOI: 10.1590/0104-1428.07919. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-

14282020000100404&tlng=en.

CAO, Lingyan; WANG, Jing; HOU, Juan; XING, Wanli; LIU, Changsheng. Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N,6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2. **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 35, n. 2, p. 684–698, 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.005.

CAPELLINI, Verena K.; RESTINI, Carolina B. A.; BENDHACK, Lusiane M.; EVORA, Paulo R. B.; CELOTTO, Andréa C. The Effect of Extracellular pH Changes on

Intracellular pH and Nitric Oxide Concentration in Endothelial and Smooth Muscle Cells from Rat Aorta. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 8, n. 5, p. 2–8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0062887.

CASCONE, Sara; LAMBERTI, Gaetano. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 573, n. May 2019, p. 118803, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118803. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118803.

CHADHA, Ravinder Kumar; SINGH, Kanchan L.; SHARMA, Chetan; SINGH, Anirudh P.; NAITHANI, Vandana. Effect of microwave and conventional processing techniques on mechanical properties of Strontium substituted hydroxyapatite. Ceramics 46. 2020. International, [S. 1.], ۷. n. 1, p. 1091-1098, DOI: 10.1016/j.ceramint.2019.09.076. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.076.

CHENG, Kui; WENG, Wenjian; WANG, Huiming; ZHANG, Sam. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 26, n. 32, p. 6288–6295, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.041.

CHIRANI, N; YAHIA, LH; GRITSCH, L; MOTTA, F. L. ..; CHIRANI, S. ..; FARÉ, S. History and Applications of Hydrogels. **Journal of Biomedical Sciencies**, *[S. I.]*, v. 04, n. 02, p. 1–23, 2015. DOI: 10.4172/2254-609x.100013.

COATHUP, Melanie; CAMPION, Charlie; BLUNN, Gordon. A carboxymethyl cellulose bone graft carrier delays early bone healing in an ovine model. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 108, n. 3, p. 612–618, 2020. DOI: 10.1002/jbm.b.34415.

COMMS, Grace. **Carboxymethylcellulose image for ellanse**. 2018. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carboxymethylcellulose_image_for_ellanse.j pg. Acesso em: 10 jan. 2021.

CONDON, J. Surface Area and Porosity Determinations by Physisorption. 1st. ed. [s.l.] : Elsevier Science, 2006.

COOKE, John P. NO and angiogenesis. **Atherosclerosis Supplements**, *[S. l.]*, v. 4, n. 4, p. 53–60, 2003. DOI: 10.1016/S1567-5688(03)00034-5.

COSTA-PINTO, A. R.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, *[S. l.]*, v. 17, n. 50, p. 331–347, 2011.

COSTA-RODRIGUES, João; FERNANDES, Anabela; LOPES, Maria A.; FERNANDES, Maria H. Hydroxyapatite surface roughness: Complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 8, n. 3, p. 1137–1145, 2012. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.032.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V; VIANA, K. M. S. Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações. **Revista Eletronica de Materiais e Processos**, *[S. I.]*, v. 4, n. 3, p. 29–38, 2009.

COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application. **Quimica Nova**, *[S. I.]*, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000600034.

COSTA, K. J. R. Efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido lático-co-glicólico / policaprolactona / Fosfato de cálcio bifásico na resposta biológica in vitro e in vivo. 2014. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. I.], 2014.

CÓTA, L. F. **Processamento de nanopartículas biocerâmicas de fosfato de cálcio para regeneração óssea**. 2015. Universidade Federal do Rio de Janeiro, *[S. I.]*, 2015. Disponível em: http://www.metalmat.ufrj.br/index.php/br/pesquisa/producaoacademica/-7/2015-2/282--262/file.

COX, Sophie C.; JAMSHIDI, Parastoo; GROVER, Liam M.; MALLICK, Kajal K. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 35, n. 1, p. 106–114, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2013.10.015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.10.015.

D'AYALA, Giovanna Gomez; MALINCONICO, Mario; LAURIENZO, Paola. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. **Molecules**, *[S. I.]*, v. 13, n. 9, p. 2069–2106, 2008. DOI: 10.3390/molecules13092069.

DAVIS, Samuel *et al.* Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. **Cell**, *[S. l.]*, v. 87, n. 7, p. 1161–1169, 1996. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81812-7. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400818127.

DEL GAUDIO, Costantino; BAIGUERA, Silvia; BOIERI, Margherita; MAZZANTI,

Benedetta; RIBATTI, Domenico; BIANCO, Alessandra; MACCHIARINI, Paolo. Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats. **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 34, n. 31, p. 7754–7765, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.040. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.040.

DHIVYA, S.; SARAVANAN, S.; SASTRY, T. P.; SELVAMURUGAN, N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. **Journal of Nanobiotechnology**, *[S. I.]*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1186/s12951-015-0099-z.

DIAS, A. M. Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro de cimento ósseo à base de nano hidroxiapatitas substituídas com magnésio, estrôncio e zinco. 2020. Universidade Federal de Minas Gerais, *[S. I.]*, 2020.

DICKSON, K. F.; KATZMAN, S.; PAIEMENT, G. The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures. **Contemporary orthopaedics**, *[S. l.]*, v. 30, n. 6, p. 489–93, 1995. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10150380.

DRAPEAU, S. J. ..; WEI, G. Bone delivery system having a therapeutic agent, US 20130280303 A1, 2013.

DRURY, Jeanie L.; MOONEY, David J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203003405.

EGGINK, L. L. ..; HOOBER, J. K. Pro-angiogenic peptides and uses thereof, USRE47245E1, 2013.

ELAHPOUR, Nafise; RABIEE, Sayed Mahmood; EBRAHIMZADEH, Mohammad Hossein; MORADI, Ali. In-vitro formation and growth kinetics of apatite on a new lightcured composite calcium phosphate cement. **Ceramics International**, *[S. l.]*, v. 44, n. 13, p. 15317–15322, 2018. DOI: 10.1016/j.ceramint.2018.05.178.

ELASTAGEN; HARVARD. Elastic hydrogel, US 9688741 B2, 2017.

ELICEIRI, Brian P.; CHERESH, David A. The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **Journal of Clinical Investigation**, *[S. l.]*, v. 103, n. 9, p. 1227–1230, 1999. DOI: 10.1172/JCI6869. Disponível em: http://www.jci.org/articles/view/6869.

ELSAYED, Marwa Mohamed. Hydrogel Preparation Technologies: Relevance

Kinetics, Thermodynamics and Scaling up Aspects. **Journal of Polymers and the Environment**, *[S. l.]*, v. 27, n. 4, p. 871–891, 2019. DOI: 10.1007/s10924-019-01376-4. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10924-019-01376-4.

ESFAHANI, Hamid; SALAHI, Esmaeil; TAYEBIFARD, Ali; RAHIMIPOUR, Mohammad Reza; KEYANPOUR-RAD, Mansour. Structural and morphological analysis of zinc incorporated non-stoichiometric hydroxyapatite nano powders. **Revista Materia**, *[S. I.]*, v. 21, n. 3, p. 569–576, 2016. DOI: 10.1590/S1517-707620160003.0055.

ESLAMI, Hossein; SOLATI-HASHJIN, Mehran; TAHRIRI, Mohammadreza. The comparison of powder characteristics and physicochemical, mechanical and biological properties between nanostructure ceramics of hydroxyapatite and fluoridated hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 29, n. 4, p. 1387–1398, 2009. DOI: 10.1016/j.msec.2008.10.033. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.033.

FADEEV, I. V.; SHVORNEVA, L.I.; BARINOV, S. M; ORLOVSKII, V. P. Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite. **Inorganic Materials**, *[S. I.]*, v. 39, n. 9, p. 947–950, 2003. DOI: 10.1023/A:1025509305805. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025509305805.

FARZADI, Arghavan; BAKHSHI, Farhad; SOLATI-HASHJIN, Mehran; ASADI-EYDIVAND, Mitra; OSMAN, Noor Azuan Abu. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. Ceramics International, JS. 1.], 40, n. 4, p. 6021-6029, 2014. DOI: ۷. 10.1016/j.ceramint.2013.11.051. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.11.051.

FRETZ, J. A.; ZELLA, L. A.; KIM, S.; SHEVDE, N. K.; PIKE, J. W. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces expression of the Wnt signaling co-regulator LRP5 via regulatory elements located significantly downstream of the gene's transcriptional start site. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, *[S. I.]*, v. 103, n. 608, p. 440–445, 2008.

FU, Wei Li; XIANG, Zhou; HUANG, Fu Guo; GU, Zhi Peng; YU, Xi Xun; CEN, Shi Qiang; ZHONG, Gang; DUAN, Xin; LIU, Ming. Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone. **Tissue Engineering - Part A**, *[S. I.]*, v. 21, n. 5–6, p. 948–959, 2015. DOI:

10.1089/ten.tea.2014.0267.

GALOW, Anne Marie; REBL, Alexander; KOCZAN, Dirk; BONK, Sebastian M.; BAUMANN, Werner; GIMSA, Jan. Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. **Biochemistry and Biophysics Reports**, *[S. l.]*, v. 10, n. February, p. 17–25, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.02.001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.001.

GAO, Tiejun; ARO, Hannu T.; YLÄNEN, Heimo; VUORIO, Eero. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 22, n. 12, p. 1475–1483, 2001. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00288-X. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120000288X.

GENG, Zhen *et al.* Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite. **Journal of Biomaterials Applications**, *[S. l.]*, v. 31, n. 1, p. 140–151, 2016. DOI: 10.1177/0885328216633892. Disponível em: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0885328216633892.

GÉRARD, Catherine; BORDELEAU, Louis Jean; BARRALET, Jake; DOILLON, Charles J. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 31, n. 5, p. 824–831, 2010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.009.

GERRITSEN, M. E. Angiogenesis and chronic disease. 24-29 April 2001. **Trends in molecular medicine**, *[S. I.]*, v. 7, n. 8, p. 333–4, 2001. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516974.

GIANNOUDIS, Peter V.; DINOPOULOS, Haralambos; TSIRIDIS, Eleftherios. Bone substitutes: An update. **Injury**, *[S. I.]*, v. 36, n. 3, p. S20–S27, 2005. DOI: 10.1016/j.injury.2005.07.029. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020138305002871.

GIBSON, Iain Ronald; SKAKLE, Janet Mabel Scott; CONWAY, Jordan Christopher; ANNAZ, Basil. **Bone Graft System**, US 2013/0095183 A1, 2013.

GILBERT, Scott F. Osteogenesis: The Development of Bones. *In*: **Developmental Biology**. 6th. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/.

GOMES, S.; RENAUDIN, G.; JALLOT, E.; NEDELEC, J. M. Structural characterization and biological fluid interaction of sol-gel-derived Mg-substituted biphasic calcium phosphate ceramics. **ACS Applied Materials and Interfaces**, *[S. l.]*, v. 1, n. 2, p. 505–513, 2009. DOI: 10.1021/am800162a.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, *[S. l.]*, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11000427.

GORGIEVA, Selestina; KOKOL, Vanja. Preparation, characterization, and in vitro enzymatic degradation of chitosan-gelatine hydrogel scaffolds as potential biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. I.]*, v. 100 A, n. 7, p. 1655–1667, 2012. DOI: 10.1002/jbm.a.34106.

GRELLIER, Maritie; GRANJA, Pedro L.; FRICAIN, Jean-Christophe; BIDARRA, Sílvia J.; RENARD, Martine; BAREILLE, Reine; BOURGET, Chantal; AMÉDÉE, Joelle; BARBOSA, Mário A. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. **Biomaterials**, JS. *I.*], 30. n. 19, p. 3271-3278, 2009. ν. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.033. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209002300.

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**, *[S. I.]*, v. 59, n. 4–5, p. 234–248, 2007. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.011.

HAHN, Thomas; TAFI, Elena; PAUL, Aman; SALVIA, Rosanna; FALABELLA, Patrizia; ZIBEK, Susanne. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, *[S. I.]*, v. 95, n. 11, p. 2775–2795, 2020. DOI: 10.1002/jctb.6533.

HANAI, Yoshiteru; TOKUDA, Haruhiko; YASUDA, Eisuke; NODA, Takahiro; OHTA, Toshiki; TAKAI, Shinji; KOZAWA, Osamu. Up-regulation by zinc of FGF-2-induced VEGF release throughenhancing p44/p42 MAP kinase activation in osteoblasts. **Life Sciences**, *[S. l.]*, v. 80, n. 3, p. 230–234, 2006. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.09.003. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320506007004.

HANKENSON, Kurt D.; DISHOWITZ, Michael; GRAY, Chancellor; SCHENKER, Mara. Angiogenesis in bone regeneration. **Injury**, *[S. I.]*, v. 42, n. 6, p. 556–561, 2011. DOI:

10.1016/j.injury.2011.03.035.

Disponível

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002013831100129X.

HE, Qiang *et al.* Porous surface modified bioactive bone cement for enhanced bone bonding. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 7, n. 8, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0042525.

HEINONEN, I.; BOUSHEL, R.; HELLSTEN, Y.; KALLIOKOSKI, K. Regulation of bone blood flow in humans: The role of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine.
Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, [S. I.], v. 28, n. 5, p. 1552–1558, 2018. DOI: 10.1111/sms.13064. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/sms.13064.

HINZ, Boris; PHAN, Sem H.; THANNICKAL, Victor J.; GALLI, Andrea; BOCHATON-PIALLAT, Marie-Luce; GABBIANI, Giulio. The Myofibroblast: one function, multipleorigins. The American Journal of Pathology, [S. I.], v. 170, n. 6, p. 1807–1816, 2007.DOI:10.2353/ajpath.2007.070112.Disponívelem:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010613909.

HOLBACK, H.; YEO, Y.; PARK, K. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. *In*: **Biomedical Hydrogels**. [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, 2011. p. 3–24. DOI: 10.1533/9780857091383.1.3. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.1.3.

HOLICK, M. F. .. Vitamin D and Bone Health. **Symposium: Nutritional Advances in Human Bone Metabolism Vitamin**, *[S. l.]*, v. 126, p. 1159S-1164S, 1996.

HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, *[S. l.]*, v. 60, n. 13–14, p. 1710–1713, 2006. DOI: 10.1016/j.matlet.2005.12.004.

HUANG, Yong; QIAO, Haixia; NIAN, Xiaofeng; ZHANG, Xuejiao; ZHANG, Xiaoyun; SONG, Guigin; XU, Zhiwei; ZHANG, Honglei; HAN, Shuguang. Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. Surface and Coatings Technology, ſS. *I.]*, ۷. 291, p. 205–215, 2016. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2016.02.042. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.02.042.

HUTCHENS, Stacy A.; BENSON, Roberto S.; EVANS, Barbara R.; O'NEILL, Hugh M.; RAWN, Claudia J. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a

em:
natural hydrogel. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 27, n. 26, p. 4661–4670, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.032.

ISNER, Jeffrey M.; ASAHARA, Takayuki. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. **Journal of Clinical Investigation**, *[S. I.]*, v. 103, n. 9, p. 1231–1236, 1999. DOI: 10.1172/JCI6889.

JAHAN, Kaushar; MANICKAM, Garthiga; TABRIZIAN, Maryam; MURSHED, Monzur. In vitro and in vivo investigation of osteogenic properties of self-contained phosphatereleasing injectable purine-crosslinked chitosan-hydroxyapatite constructs. **Scientific Reports**, *[S. I.]*, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-67886-7. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-020-67886-7.

JAIPAN, Panupong; NGUYEN, Alexander; NARAYAN, Roger J. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. **MRS Communications**, *[S. I.]*, v. 7, n. 3, p. 416–426, 2017. DOI: 10.1557/mrc.2017.92.

JAISWAL, Maneesh; GUPTA, Asheesh; AGRAWAL, Ashwini K.; JASSAL, Manjeet; DINDA, Amit Kr; KOUL, Veena. Bi-layer composite dressing of gelatin nanofibrous mat and poly vinyl alcohol hydrogel for drug delivery and wound healing application: In-vitro and in-vivo studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, *[S. I.]*, v. 9, n. 9, p. 1495–1508, 2013. DOI: 10.1166/jbn.2013.1643.

JAMALI, Nasim; SORENSON, Christine M.; SHEIBANI, Nader. Vitamin D and regulation of vascular cell function. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, *[S. I.]*, v. 314, n. 4, p. H753–H765, 2018. DOI: 10.1152/ajpheart.00319.2017.

KALITA, S. J.; BOSE, S.; HOSICK, H. L.; BANDYOPADHYAY, A. CaO-P2O5-Na2Obased sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 25, n. 12, p. 2331–2339, 2004. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.012.

KALITA, Samar J.; BHATT, Himesh A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 27, n. 4, p. 837–848, 2007. DOI: 10.1016/j.msec.2006.09.036.

KANZAKI, Noriko; ONUMA, Kazuo; TREBOUX, Gabin; TSUTSUMI, Sadao; ITO, Atsuo. Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face. **The Journal of Physical Chemistry B**, *[S. I.]*, v. 104, n. 17, p. 4189–4194, 2000. DOI: 10.1021/jp9939726. Disponível em:

https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp9939726.

KHOR, E.; GUO, C. M.; WU, H.; LIM, L. Y. Bone and/or dental cement composition and uses thereof, WO 2009029049, 2009.

KIM, Kyobum *et al.* Osteochondral tissue regeneration using a bilayered composite hydrogel with modulating dual growth factor release kinetics in a rabbit model. **Journal of Controlled Release**, *[S. I.]*, v. 168, n. 2, p. 166–178, 2013. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.013.

KO, Hsu-Feng; SFEIR, Charles; KUMTA, Prashant N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, *[S. I.]*, v. 368, n. 1917, p. 1981–1997, 2010. DOI: 10.1098/rsta.2010.0009. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsta.2010.0009.

KOKUBO, Tadashi; TAKADAMA, Hiroaki. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.

KORAH, Lini V; ANILKUMAR, Gopinathan; THOMAS, Sabu. Hydrogels, DNA, and RNA polypeptides for the preparation of biomaterials. *In*: THOMAS, Sabu; BALAKRISHNAN, Preetha; SREEKALA, M. S. (org.). **Fundamental Biomaterials: Polymers**. [s.l.] : Elsevier Ltd., 2018. p. 85–104. DOI: 10.1016/B978-0-08-102194-1.00005-0. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00005-0.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, *[S. l.]*, v. 62, n. 4, p. 600–612, 2002. DOI: 10.1002/jbm.10280. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.10280.

KUMAR, B. Y. Santos.; ISLOOR, Arun M.; KUMAR, G. C. Moha.; INAMUDDIN; ASIRI, Abdullah M. Nanohydroxyapatite Reinforced Chitosan Composite Hydrogel with Tunable Mechanical and Biological Properties for Cartilage Regeneration. **Scientific Reports**, *[S. I.]*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-52042-7. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52042-7.

LAN, Weiwei; ZHANG, Xiumei; XU, Mengjie; ZHAO, Liqin; HUANG, Di; WEI, Xiaochun; CHEN, Weiyi. Carbon nanotube reinforced polyvinyl alcohol/biphasic calcium

phosphate scaffold for bone tissue engineering. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 9, n. 67, p. 38998–39010, 2019. DOI: 10.1039/c9ra08569f.

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. **Journal of the European Ceramic Society**, *[S. I.]*, v. 20, n. 14–15, p. 2377–2387, 2000. DOI: 10.1016/S0955-2219(00)00154-0.

LANDI, Elena; LOGROSCINO, Giandomenico; PROIETTI, Luca; TAMPIERI, Anna; SANDRI, Monica; SPRIO, Simone. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. I.]*, v. 19, n. 1, p. 239–247, 2008. DOI: 10.1007/s10856-006-0032-y.

LANDI, Elena; TAMPIERI, Anna; MATTIOLI-BELMONTE, Monica; CELOTTI, Giancarlo; SANDRI, Monica; GIGANTE, Antonio; FAVA, Paola; BIAGINI, Graziella. Biomimetic Mg- and Mg,CO3-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. **Journal of the European Ceramic Society**, *[S. I.]*, v. 26, n. 13, p. 2593–2601, 2006. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2005.06.040.

LARANJEIRA, Mauro C. M.; DE FÁVERE, Valfredo T. Quitosana: biopolimero funcional com potencial industrial biomedico. **Quimica Nova**, *[S. l.]*, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300011.

LAURENCIN, Danielle et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. **Biomaterials**, ſS. 1.], ۷. 32, n. 7, p. 1826–1837, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.017.

LEE, Cheng-Hung *et al.* Promoting vascular healing using nanofibrous ticagreloreluting stents. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. Volume 13, p. 6039– 6048, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S166785. Disponível em: https://www.dovepress.com/promoting-vascular-healing-using-nanofibrous-ticagreloreluting-stents-peer-reviewed-article-IJN.

LEE, Gil Su; PARK, Jeong Hui; WON, Jong Eun; SHIN, Ueon Sang; KIM, Hae Won. Alginate combined calcium phosphate cements: Mechanical properties and in vitro rat bone marrow stromal cell responses. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. I.]*, v. 22, n. 5, p. 1257–1268, 2011. DOI: 10.1007/s10856-011-4296-5.

LEE, Gun Hee; MAKKAR, Preeti; PAUL, Kallyanshis; LEE, Byong Taek. Incorporation of BMP-2 loaded collagen conjugated BCP granules in calcium phosphate cement

based injectable bone substitutes for improved bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 77, p. 713–724, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.296. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.296.

LEGEROS, Racquel Zapanta. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, *[S. l.]*, v. 395, p. 81–98, 2002. DOI: 10.1097/00003086-200202000-00009. Disponível em: http://journals.lww.com/00003086-200202000-00009.

LEHMANN, Susan W.; LEE, Janet. Lithium-associated hypercalcemia and hyperparathyroidism in the elderly: What do we know? **Journal of Affective Disorders**, *[S. l.]*, v. 146, n. 2, p. 151–157, 2013. DOI: 10.1016/j.jad.2012.08.028. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165032712005976.

LEI, Xiongxin; GAO, Jianping; XING, Fangyu; ZHANG, Yang; MA, Ye; ZHANG, Guifeng. Comparative evaluation of the physicochemical properties of nanohydroxyapatite/collagen and natural bone ceramic/collagen scaffolds and their osteogenesis-promoting effect on MC3T3-E1 cells. **Regenerative Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 6, n. 6, p. 361–371, 2019. DOI: 10.1093/rb/rbz026.

LI, F.; WANG, A.; WANG, C. Analysis of friction between articular cartilage and polyvinyl alcohol hydrogel artificial cartilage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. 1.]*, v. 27, n. 5, p. 87, 2016. DOI: 10.1007/s10856-016-5700-y. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s10856-016-5700-y.

LI, Jinyu; ZHI, Wei; XU, Taotao; SHI, Feng; DUAN, Ke; WANG, Jianxin; MU, Yandong; WENG, Jie. Ectopic osteogenesis and angiogenesis regulated by porous architecture of hydroxyapatite scaffolds with similar interconnecting structure in vivo. **Regenerative Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 3, n. 5, p. 285–297, 2016. DOI: 10.1093/rb/rbw031.

LI, Qianwen; WANG, Donghui; QIU, Jiajun; PENG, Feng; LIU, Xuanyong. Regulating the local pH level of titanium: Via Mg-Fe layered double hydroxides films for enhanced osteogenesis. **Biomaterials Science**, *[S. l.]*, v. 6, n. 5, p. 1227–1237, 2018. DOI: 10.1039/c8bm00100f.

LI, Xiaowei *et al.* Nanofiber-hydrogel composite–mediated angiogenesis for soft tissue reconstruction. **Science Translational Medicine**, *[S. I.]*, v. 11, n. 490, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau6210.

LI, Zhensheng; RAMAY, Hassna R.; HAUCH, Kip D.; XIAO, Demin; ZHANG, Miqin. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v.

26, n. 18, p. 3919–3928, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.062.

LIAO, Hongbing; WALBOOMERS, X. Frank; HABRAKEN, Wouter J. E. M.; ZHANG, Zheng; LI, Yubao; GRIJPMA, Dirk W.; MIKOS, Antonios G.; WOLKE, Joop G. C.; JANSEN, John A. Injectable calcium phosphate cement with PLGA, gelatin and PTMC microspheres in a rabbit femoral defect. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 7, n. 4, p. 1752– 1759, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.12.020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.020.

LIEN, Sio-Mei; KO, Liang-Yu; HUANG, Ta-Jen. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 5, n. 2, p. 670–679, 2009. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.09.020. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706108003036.

LIMA IIDA, Aline Sayuri; LUZ, Karina Novais; BARROS-ALEXANDRINO, Taís Téo; FÁVARO-TRINDADE, Carmen Sílvia; DE PINHO, Samantha Cristina; GARRIDO ASSIS, Odílio Benedito; MARTELLI-TOSI, Milena. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polimeros**, *[S. I.]*, v. 29, n. 4, 2020. DOI: 10.1590/0104-1428.04119.

LIN, K; CHANG, J. Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. *In*: MUCALO, M. (org.). **Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications**. [s.l.] : Elsevier, 2015. p. 3–14.

LIU, Fang; WANG, Baomin; XING, Yunqing; ZHANG, Kunkun; JIANG, Wei. Effect of Polyvinyl Alcohol on the Rheological Properties of Cement Mortar. **Molecules**, *[S. I.]*, v. 25, n. 3, p. 754, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030754. Disponível em: https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/754.

LIU, Mengqian; NAKASAKI, Manando; SHIH, Yu-Ru Vernon; VARGHESE, Shyni. Effect of Age on Biomaterial-mediated in situ Bone Tissue Regeneration. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 78, p. 329–340, 2019.

LIU, Wenlong; DAN, Xiuli; LU, William Weijia; PAN, Haobo. Importance of Biomaterials In Vivo Microenvironment pH (µe-pH) in the Regeneration Process of Osteoporotic Bone Defects. *In*: LIU, C.; HE, H. (org.). **Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements**. Singapore: Springer Nature, 2018. p. 473–495. DOI: 10.1007/978-981-10-5975-9_11. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5975-9_11.

LIU, Y.; VRANA, N. E.; CAHILL, P. A.; MCGUINNESS, G. B. Physically crosslinked

composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 90B, n. 2, p. 492–502, 2009. DOI: 10.1002/jbm.b.31310. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.31310.

LIUYUN, Jiang; YUBAO, Li; LI, Zhang; JIANGUO, Liao. Preparation and properties of a novel bone repair composite: nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. I.]*, v. 19, n. 3, p. 981–987, 2008. DOI: 10.1007/s10856-007-3208-1. Disponível em:

http://link.springer.com/10.1007/s10856-007-3208-1.

LONG, Dang Duc; LUYEN, Dang Van. Chitosan-Carboxymethylcellulose Hydrogels as Supports for cell Immobilization. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, *[S. I.]*, v. 33, n. 12, p. 1875–1884, 1996. DOI: 10.1080/10601329608011013.

LOPES, M. A.; MONTEIRO, F. J.; SANTOS, J. D.; SERRO, A. P.; SARAMAGO, B. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research**, *[S. l.]*, v. 45, n. 4, p. 370–375, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(19990615)45:4<370::AID-JBM12>3.0.CO;2-0.

LU, Jingxiong; WEI, Jie; YAN, Yonggang; LI, Hong; JIA, Junfeng; WEI, Shicheng; GUO, Han; XIAO, Tiqiao; LIU, Changsheng. Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, [S. I.], v. 22, n. 3, p. 607–615, 2011. DOI: 10.1007/s10856-011-4228-4.

LUO, Yongxiang; LODE, Anja; AKKINENI, Ashwini Rahul; GELINSKY, Michael. Concentrated gelatin/alginate composites for fabrication of predesigned scaffolds with a favorable cell response by 3D plotting. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 5, n. 54, p. 43480– 43488, 2015. DOI: 10.1039/c5ra04308e. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1039/C5RA04308E.

MADDALONI, Marina; VASSALINI, Irene. Green Routes for the Development of Chitin / Chitosan Sustainable Hydrogels. **Sustainable Chemistry**, *[S. I.]*, n. Figure 1, p. 325–344, 2020. DOI: doi:10.3390/suschem1030022.

MAIER, Jeanette A. M.; BERNARDINI, Daniela; RAYSSIGUIER, Yves; MAZUR, Andrzej. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, *[S.*

l.], v. 1689, n. 1, p. 6–12, 2004. DOI: 10.1016/j.bbadis.2004.02.004.

MAITY, Santu; DATTA, Arpita; LAHIRI, Susanta; GANGULY, Jhuma. A dynamic chitosan-based self-healing hydrogel with tunable morphology and its application as an isolating agent. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 6, n. 84, p. 81060–81068, 2016. DOI: 10.1039/C6RA15138H. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA15138H.

MALIK, Muhammad Hamza; SHAHZADI, Lubna; BATOOL, Razia; SAFI, Sher Zaman; KHAN, Abdul Samad; KHAN, Ather Farooq; CHAUDHRY, Aqif Anwar; REHMAN, Ihtesham Ur; YAR, Muhammad. Thyroxine-loaded chitosan/carboxymethyl cellulose/hydroxyapatite hydrogels enhance angiogenesis in in-ovo experiments. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. I.]*, v. 145, n. xxxx, p. 1162–1170, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.043.

MAMMOLI, Fabiana *et al.* Magnesium is a key regulator of the balance between osteoclast and osteoblast differentiation in the presence of vitamin D 3. **International Journal of Molecular Sciences**, *[S. l.]*, v. 20, n. 2, p. 1–17, 2019. DOI: 10.3390/ijms20020385.

MARRELLA, Alessandra; LAGAZZO, Alberto; DELLACASA, Elena; PASQUINI, Camilla; FINOCCHIO, Elisabetta; BARBERIS, Fabrizio; PASTORINO, Laura; GIANNONI, Paolo; SCAGLIONE, Silvia. 3D porous gelatin/PVA hydrogel as meniscus substitute using alginate micro-particles as porogens. **Polymers**, *[S. I.]*, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2018. DOI: 10.3390/polym10040380.

MATSCHEGEWSKI, Claudia; MATTHIES, Jörn Bo; GRABOW, Niels; SCHMITZ, Klaus Peter. Cell adhesion and viability of human endothelial cells on electrospun polymer scaffolds. **Current Directions in Biomedical Engineering**, *[S. l.]*, v. 2, n. 1, p. 11–14, 2016. DOI: 10.1515/cdbme-2016-0006.

MCKAY, W. F. Delivery systems, US9655994B2, 2014.

MELLIS, David J.; ITZSTEIN, Cecile; HELFRICH, Miep H.; CROCKETT, Julie C. The skeleton: a multi-functional complex organ. The role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. **Journal of Endocrinology**, *[S. l.]*, v. 211, n. 2, p. 131–143, 2011. DOI: 10.1530/JOE-11-0212. Disponível em: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/211/2/131.xml.

METZGER, W. *et al.* Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in two- and three-dimensional culture. **Biotechnic & Histochemistry**, *[S. l.]*, v. 88, n. 2, p. 86–102, 2013. DOI: 10.3109/10520295.2012.741262. Disponível em:

http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10520295.2012.741262.

MISHRA, Debasish; BHUNIA, Bibhas; BANERJEE, Indranil; DATTA, Pallab; DHARA, K. Santanu; MAITI, Tapas Enzymatically crosslinked carboxymethylchitosan/gelatin/nano-hydroxyapatite injectable gels for in situ bone tissue engineering application. Materials Science and Engineering C, [S. I.], v. 31, n. 7, p. 1295–1304, 2011. DOI: 10.1016/j.msec.2011.04.007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.007.

MOHAMMAD, Faruq; AL-LOHEDAN, Hamad A. Chitosan-Mediated Layer-by-Layer Assembling Approach for the Fabrication of Biomedical Probes and Advancement of Nanomedicine. *In*: JAWAID, Mohammad; MOHAMMAD, Faruq (org.). **Nanocellulose and Nanohydrogel Matrices**. Weinheim: Wiley-VCH, 2017. p. 91–124.

MOHANDAS, Annapoorna; ANISHA, B. S.; CHENNAZHI, K. P.; JAYAKUMAR, R. Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, *[S. l.]*, v. 127, p. 105–113, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.01.024. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.024.

MOHANDAS, Annapoorna; SUN, Wook; NIMAL, T. R.; SHANKARAPPA, Sahadev A.; HWANG, Nathaniel S.; JAYAKUMAR, Rangasamy. Injectable chitosanfibrin/nanocurcumin composite hydrogel for the enhancement of angiogenesis. **Research on Chemical Intermediates**, *[S. I.]*, v. 44, n. 8, p. 4873–4887, 2018. DOI: 10.1007/s11164-018-3340-1. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11164-018-3340-1.

MOHITE, S; PRASAD, E. **Hydrogel Market Report**. [s.l: s.n.]. Disponível em: https://www.alliedmarketresearch.com/hydrogel-market.

MONTERO, Ramon B.; VIAL, Ximena; NGUYEN, Dat Tat; FARHAND, Sepehr; REARDON, Mark; PHAM, Si M.; TSECHPENAKIS, Gavriil; ANDREOPOULOS, Fotios M. BFGF-containing electrospun gelatin scaffolds with controlled nano-architectural features for directed angiogenesis. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 8, n. 5, p. 1778–1791, 2012. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.12.008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.12.008.

MOREIRA, Cheisy D. F.; CARVALHO, Sandhra M.; MANSUR, Herman S.; PEREIRA, Marivalda M. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. **Materials Science and** **Engineering C**, *[S. l.]*, v. 58, p. 1207–1216, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.075. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.075.

MURPHY, Kaitlin C.; STILHANO, Roberta S.; MITRA, Debika; ZHOU, Dejie; BATARNI, Samir; SILVA, Eduardo A.; LEACH, J. Kent. Hydrogel biophysical properties instruct coculture-mediated osteogenic potential. **FASEB Journal**, *[S. I.]*, v. 30, n. 1, p. 477–486, 2016. DOI: 10.1096/fj.15-279984.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by amodified chitosan. Biomaterials, [S. l.], v. 15, n. 13, p. 1075–1081, 1994. DOI:10.1016/0142-9612(94)90093-0.Disponívelem:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961294900930.

NAGHAVI ALHOSSEINI, S.; MOZTARZADEH, F.; MOZAFARI, M.; ASGARI, S.; DODEL, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; KARGOZAR, S.; JALALI, N. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. I.]*, n. January, p. 25, 2012. DOI: 10.2147/ijn.s25376.

NASCIMENTO, M. H. M. ..; PELEGRINO, M. T. ..; PIERETTI, J. C.; SEABRA, A. B. How can nitric oxide help osteogenesis? **AIMS Molecular Science**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, p. 29–48, 2020. DOI: 10.3934/molsci.2020003.

NÓBREGA, K. C.; AMORIM, L. V. Influência da massa molar de CMC no comportamento reológico e de filtração de suspensões argilosas. **Cerâmica**, *[S. l.]*, v. 61, n. 360, p. 399–408, 2015. DOI: 10.1590/0366-69132015613601904. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132015000400399&Ing=pt&tIng=pt.

NUGENT, Matthew A.; IOZZO, Renato V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, *[S. l.]*, v. 32, n. 2, p. 115–120, 2000. DOI: 10.1016/S1357-2725(99)00123-5. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272599001235.

O'BRIEN, Charles A.; NAKASHIMA, Tomoki; TAKAYANAGI, Hiroshi. Osteocyte control of osteoclastogenesis. **Bone**, *[S. I.]*, v. 54, n. 2, p. 258–263, 2013. DOI: 10.1016/j.bone.2012.08.121. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328212011350.

O'REILLY, M. *et al.* Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. **Cell**, *[S. l.]*, v. 79, n. 2, p. 315–

328, 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90200-3. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494902003.

 O'REILLY, Michael S. *et al.* Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and

 Tumor Growth. Cell, [S. I.], v. 88, n. 2, p. 277–285, 1997. DOI: 10.1016/S0092

 8674(00)81848-6.

 Disponível
 em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400818486.

OHGUSHI, Hajime; DOHI, Yoshiko; TAMAI, Susumu; TABATA, Shiro. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, *[S. l.]*, v. 27, n. 11, p. 1401–1407, 1993. DOI: 10.1002/jbm.820271107. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820271107.

OYANE, Ayako; ONUMA, Kazuo; ITO, Atsuo; KIM, Hyun Min; KOKUBO, Tadashi; NAKAMURA, Takashi. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. I.]*, v. 64, n. 2, p. 339–348, 2003. DOI: 10.1002/jbm.a.10426.

OZEKI, K.; AOKI, H.; FUKUI, Y. The effect of adsorbed vitamin D and K to hydroxyapatite on ALP activity of MC3T3-E1 cell. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. l.]*, v. 19, n. 4, p. 1753–1757, 2008. DOI: 10.1007/s10856-007-3288-y.

PASQUI, Daniela; TORRICELLI, Paola; DE CAGNA, Milena; FINI, Milena; BARBUCCI, Rolando. Carboxymethyl cellulose - Hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. I.]*, v. 102, n. 5, p. 1568–1579, 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.34810.

PEIXOTO, Paulo V.; KLEM, Marcius A. P.; FRANÇA, Ticiana N.; NOGUEIRA, Vivian A. Hipervitaminose D em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, *[S. l.]*, v. 32, n. 7, p. 573–594, 2012. DOI: 10.1590/S0100-736X2012000700001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

736X2012000700001&lng=pt&tlng=pt.

PEREIRA, R. F. Avaliação de Biocerâmicas de Fosfatos de Cálcio Dopadas com Európio e Magnésio : Caracterização , Dissolução e Citotoxicidade in vitro. 2017. Universidade Federal do ABC, *[S. l.]*, 2017.

PEREIRA, Rafael Matsumoto; ANDRADE, Grazielle Santos Silva; DE CASTRO, Heizir

Ferreira; CAMPOS, Maria Gabriela Nogueira. Performance of chitosan/glycerol phosphate hydrogel as a support for lipase immobilization. **Materials Research**, *[S. I.]*, v. 20, p. 190–201, 2017. DOI: 10.1590/1980-5373-mr-2017-0091.

PETER, Mathew; GANESH, Nitya; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosangelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, *[S. I.]*, v. 80, n. 3, p. 687–694, 2010. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.050. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.050.

PETROVA, Tatiana V.; MAKINEN, Taija; ALITALO, Kari. Signaling via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. **Experimental Cell Research**, *[S. l.]*, v. 253, n. 1, p. 117–130, 1999. DOI: 10.1006/excr.1999.4707. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482799947079.

PITTARELLA, Pamela; SQUARZANTI, Diletta F.; MOLINARI, Claudio; INVERNIZZI, Marco; UBERTI, Francesca; RENÒ, Filippo. NO-dependent proliferation and migration induced by Vitamin D in HUVEC. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, *[S. l.]*, v. 149, p. 35–42, 2015. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.12.012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.12.012.

POGORELOV, M. V.; SIKORA, V. Z.; BUMEYSTER, V. I. In-vivo tests of new chitosan-hydroxyapatite composite biomaterials. **Bone**, *[S. I.]*, v. 48, p. S167, 2011. DOI: 10.1016/j.bone.2011.03.379. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328211004728.

PORTER, Joshua R.; RUCKH, Timothy T.; POPAT, Ketul C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, *[S. 1.]*, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009. DOI: 10.1002/btpr.246.

PRABAHARAN, Mani; MANO, João F. Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials.

Macromolecular Bioscience, *[S. l.]*, v. 6, n. 12, p. 991–1008, 2006. DOI: 10.1002/mabi.200600164.

PRAMATAROVA, L; PECHEVA, E. Modified Inorganic Surfaces as a Model for Hydroxyapatite Growth. [s.l.] : Trans Tech Publications Ltd, 2006.

PRIYA, Ganesan; MADHAN, Balaraman; NARENDRAKUMAR, Uttamchand; SURESH KUMAR, Rayadurgam Venkata; MANJUBALA, Inderchand. In Vitro and In

Vivo Evaluation of Carboxymethyl Cellulose Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications . **ACS Omega**, *[S. l.]*, v. 6, n. 2, p. 1246–1253, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.0c04551.

PRUSTY, Kalyani; BARIK, Sunita; SWAIN, Sarat K. A Corelation Between the Graphene Surface Area, Functional Groups, Defects, and Porosity on the Performance of the Nanocomposites. *In*: JAWAID, M.; BOUHFID, R.; QAISS, A. K. (org.). **Functionalized Graphene Nanocomposites and their Derivatives**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 265–283. DOI: 10.1016/B978-0-12-814548-7.00013-1. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128145487000131.

RAAB, Stefanie; KLINGENSTEIN, Moritz; LIEBAU, Stefan; LINTA, Leonhard. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. **Stem Cells International**, *[S. I.]*, v. 2014, p. 12, 2014. DOI: 10.1155/2014/768391. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/sci/2014/768391/.

RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. (ORG.). **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2nd. ed. [s.l.] : Elsevier, 2004.

RAUCCI, M. G. ..; DEMITRI, C. ..; SORIENTE, A. ..; FASOLINO, I. ..; SANNINO, A. ..; AMBROSIO, L. Gelatin/nano-hydroxyapatite hydrogel scaffold prepared by sol-gel technology as filler to repair bone defects. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. I.]*, v. 106, n. 7, p. 2007–2019, 2018. DOI: 10.1002/jbm.a.36395 LK

http://nf4hr2ve4v.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=15524965&id=doi: 10.1002%2Fjbm.a.36395&atitle=Gelatin%2Fnano-

hydroxyapatite+hydrogel+scaffold+prepared+by+sol-

gel+technology+as+filler+to+repair+bone+defects&stitle=J.+Biomed.+Mater.+Res.+P art+A&title=Journal+of+Biomedical+Materials+Research+-

+Part+A&volume=106&issue=7&spage=2007&epage=2019&aulast=Raucci&aufirst= Maria+Grazia&auinit=M.G.&aufull=Raucci+M.G.&coden=JBMRC&isbn=&pages=200 7-2019&date=2018&auinit1=M&a. Disponível em: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L621

799139%0Ahttp://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.36395.

RE, Federica *et al.* 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic

differentiation. Journal of Tissue Engineering, [S. I.], v. 10, 2019. DOI: 10.1177/2041731419845852.

RECEK, Nina; RESNIK, Matic; MOTALN, Helena; LAH-TURNŠEK, Tamara; AUGUSTINE, Robin; KALARIKKAL, Nandakumar; THOMAS, Sabu; MOZETIČ, Miran. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. **International Journal of Polymer Science**, *[S. I.]*, v. 2016, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1155/2016/7354396.

REINHART-KING, Cynthia A. Endothelial Cell Adhesion and Migration. *In*: **Methods in Enzymology**. Ithaca: Elsevier Inc, 2008. v. 443p. 45–64. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02003-X.

REN, F.; XIN, R.; GE, X.; LENG, Y. Characterization and structural analysis of zincsubstituted hydroxyapatites. **Acta Biomaterialia**, *[S. I.]*, v. 5, n. 8, p. 3141–3149, 2009. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.04.014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.04.014.

REN, Bowen *et al.* Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 118, p. 1257–1266, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.200.

ROSSATO, J. H. H.; CAMARATTA, R.; VOLKMER, T. M. Síntese e avaliação das propriedades bactericidas de hidroxiapatita parcialmente substituída com íons de prata. **Disciplinarum Scientia**, *[S. l.]*, v. 15, n. 1, p. 75–85, 2014.

ROSSI, AM; TERRA, J.; MAVROPOULOS, Elena; MOREIRA, EL. **A ciência e tecnologia das biocerâmicas**. 2000. Disponível em: https://portal.cbpf.br/pt-br/revistas-do-cbpf/revista-do-cbpf-em-capitulos/separacao-por-conteudo/a-ciencia-e-tecnologia-das-bioceramicas. Acesso em: 15 maio. 2019.

RUDE, Robert K.; GRUBER, Helen E.; NORTON, H. James; WEI, Livia Y.; FRAUSTO, Angelica; KILBURN, Jeremy. Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in the rat. **Bone**, *[S. l.]*, v. 37, n. 2, p. 211–219, 2005. DOI: 10.1016/j.bone.2005.04.005. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328205001444.

RYU, Hyun Seung; HONG, Kug Sun; LEE, Jung Kun; KIM, Deug Joong; LEE, Jae Hyup; CHANG, Bong Soon; LEE, Dong Ho; LEE, Choon Ki; CHUNG, Sung Soo. Magnesia-doped HA/β-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility.

Biomaterials, *[S. l.]*, v. 25, n. 3, p. 393–401, 2004. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00538-6.

SAMMONS, R. Biological responses to hydroxyapatite. *In*: MUCALO, M. (org.). **Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications**. [s.l.] : Elsevier, 2015. p. 53–83. SANOSH, K. P.; CHU, Min-Cheol; BALAKRISHNAN, A.; KIM, T. N.; CHO, Seong-Jai. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. **Bulletin of Materials Science**, *[S. l.]*, v. 32, n. 5, p. 465–470, 2009. DOI: 10.1007/s12034-009-0069-x. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12034-009-0069-x.

SARAN, Uttara; GEMINI PIPERNI, Sara; CHATTERJEE, Suvro. Role of angiogenesis in bone repair. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *[S. l.]*, v. 561, p. 109–117, 2014. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.006.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle - an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, *[S. l.]*, v. 39, n. 4, p. 241–251, 2004. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2004.00509.x. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2004.00509.x.

SERRE, C. M.; PAPILLARD, M.; CHAVASSIEUX, P.; VOEGEL, J. C.; BOIVIN, G. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**, *[S. l.]*, v. 42, n. 4, p. 626–633, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<626::AID-JBM20>3.0.CO;2-S. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-

4636(19981215)42:4%3C626::AID-JBM20%3E3.0.CO;2-S.

SETIAWATI, Rosy; RAHARDJO, Paulus. Bone Development and Growth. *In*: YANG, H. (org.). **Osteogenesis and Bone Regeneration**. 1. ed. [s.l.] : IntechOpen, 2018. p. 1–21. DOI: 10.5772/intechopen.82452. Disponível em: https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/livenessdetection-in-biometrics.

SHAMOSI, Atefeh; FAROKHI, Mehdi; AI, Jafar; SHARIFI, Esmaeel. Induction of spontaneous neo-angiogenesis and tube formation in human endometrial stem cells by bioglass. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, *[S. I.]*, v. 9, n. 2, p. 94–98, 2015. DOI: 10.1016/j.jmhi.2015.09.004. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmhi.2015.09.004.

SHEN, Zhi Sen; CUI, Xiang; HOU, Rui Xia; LI, Qun; DENG, Hong Xia; FU, Jun. Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 5, n. 69, p. 55640–55647, 2015. DOI: 10.1039/c5ra06835e. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1039/C5RA06835E.

SHEN, Yuhui; LIU, Waiching; WEN, Chunyi; PAN, Haobo; WANG, Ting; DARVELL, Brian W.; LU, William W.; HUANG, Wenhai. Bone regeneration: Importance of local pH - Strontium-doped borosilicate scaffold. **Journal of Materials Chemistry**, *[S. l.]*, v. 22, n. 17, p. 8662–8670, 2012. DOI: 10.1039/c2jm16141a.

SHI, Xiangning; ZHENG, Yudong; WANG, Guojie; LIN, Qinghua; FAN, Jinsheng. PHand electro-response characteristics of bacterial cellulose nanofiber/sodium alginate hybrid hydrogels for dual controlled drug delivery. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 4, n. 87, p. 47056–47065, 2014. DOI: 10.1039/c4ra09640a.

SHI, Xingxing; ZHOU, Kai; HUANG, Fei; WANG, Chen. Interaction of hydroxyapatite nanoparticles with endothelial cells: Internalization and inhibition of angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. I.]*, v. 12, p. 5781–5795, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S140179.

SHI, Zhongli; HUANG, Xin; CAI, Yurong; TANG, Ruikang; YANG, Disheng. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. Acta Biomaterialia, [S. *I.*], ۷. 5, n. 1, р. 338-345, 2009. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.07.023. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.023.

SILVA, Flavia R. O.; LIMA, Nelson B.; GUILHEN, Sabine N.; COURROL, Lilia C.; BRESSIANI, Ana Helena A. Evaluation of europium-doped HA/β-TCP ratio fluorescence in biphasic calcium phosphate nanocomposites controlled by the pH value during the synthesis. **Journal of Luminescence**, *[S. I.]*, v. 180, p. 177–182, 2016. DOI: 10.1016/j.jlumin.2016.08.030. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.08.030.

SILVA, R. L. Sistemas de liberação controlada de quitosana contendo antigeno capsular Vi de Salmonella Typhi. 2012. Universidade Federal do Pará, *[S. l.]*, 2012. SINGER, A. J.; CLARCK, A. F. Cutaneous Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, *[S. l.]*, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SJEROBABIN, Nikola; ČOLOVIĆ, Božana; PETROVIĆ, Milan; MARKOVIĆ, Dejan;

ŽIVKOVIĆ, Slavoljub; JOKANOVIĆ, Vukoman. Cytotoxicity investigation of a new hydroxyapatite scaffold with improved structural design. **Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo**, *[S. I.]*, v. 144, n. 5–6, p. 280–287, 2016. DOI: 10.2298/SARH1606280S.

STEGEN, Steve; VAN GASTEL, Nick; CARMELIET, Geert. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**, *[S. I.]*, v. 70, p. 19–27, 2015. DOI: 10.1016/j.bone.2014.09.017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.017.

STEINER, Dominik; LAMPERT, Florian; STARK, G. Björn; FINKENZELLER, Günter. Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. **Journal of Orthopaedic Research**, *[S. l.]*, v. 30, n. 10, p. 1682–1689, 2012. DOI: 10.1002/jor.22130.

SUN, Tao; KHAN, Tareef Hayat; SULTANA, Naznin. Fabrication and in vitro evaluation of nanosized hydroxyapatite/chitosan- based tissue engineering scaffolds. **Journal of Nanomaterials**, *[S. I.]*, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/194680.

TAHA, Ali; AKRAM, Muhammad; JAWAD, Zaidoon; ALSHEMARY, Ammar Z.; HUSSAIN, Rafaqat. Strontium doped injectable bone cement for potential drug delivery applications. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 80, n. May, p. 93–101, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.117. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.117.

TAVARIA, Freni Kekhasharú; COSTA, Eduardo Manuel; PINA-VAZ, Irene; CARVALHO, Manuel Fontes; PINTADO, Maria Manuela. A quitosana como biomaterial odontológico: Estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, *[S. I.]*, v. 29, n. 1, p. 110–120, 2013. DOI: 10.4322/rbeb.2013.002.

TENG, Zi; LUO, Yangchao; WANG, Qin. Carboxymethyl chitosan-soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. Food Chemistry, JS. *I.*], 141. 1. 524-532. 2013. DOI: ۷. n. p. 10.1016/j.foodchem.2013.03.043. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.043.

THANGPRASERT, Atsadaporn; TANSAKUL, Chittreeya; THUAKSUBUN, Nuttawut; MEESANE, Jirut. Mimicked hybrid hydrogel based on gelatin/PVA for tissue engineering in subchondral bone interface for osteoarthritis surgery. **Materials and Design**, *[S. 1.]*, v. 183, p. 108113, 2019. DOI: 10.1016/j.matdes.2019.108113. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108113.

191

THEIN-HAN, Wahwah; XU, Hockin H. K. Prevascularization of a gas-foaming macroporous calcium phosphate cement scaffold via coculture of human umbilical vein endothelial cells and osteoblasts. **Tissue Engineering - Part A**, *[S. I.]*, v. 19, n. 15–16, p. 1675–1685, 2013. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0631.

THOMAS, Sari; SOLOMAN, P. A.; REJINI, V. O. Preparation of Chitosan- CMC Blends and Studies on Thermal Properties. **Procedia Technology**, *[S. I.]*, v. 24, n. Cmc, p. 721–726, 2016. DOI: 10.1016/j.protcy.2016.05.201. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.201.

THORPE, A. A.; CREASEY, S.; SAMMON, C.; LE MAITRE, Christine L. Hydroxyapatite nanoparticle injectable hydrogel scaffold to support osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **European Cells and Materials**, *[S. I.]*, v. 32, p. 1–23, 2016. DOI: 10.22203/eCM.v032a01.

TRAJANO, V. C. C.; COSTA, K. J. R.; LANZA, C. R. M.; SINISTERRA, R. D.; CORTÉS, M. E. Osteogenic activity of cyclodextrin-encapsulated doxycycline in a calcium phosphate PCL and PLGA composite. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 64, p. 370–375, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.103. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.103.

TRIPATHI, Anjali; SARAVANAN, Sekaran; PATTNAIK, Soumitri; MOORTHI, Ambigapathi; PARTRIDGE, Nicola C.; SELVAMURUGAN, Nagarajan. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper–zinc for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. I.]*, v. 50, n. 1, p. 294–299, 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813011004302.

TSUKAHARA, H.; MIURA, M.; TSUCHIDA, S.; HATA, I.; HATA, K.; YAMAMOTO, K.; ISHII, Y.; MURAMATSU, I.; SUDO, M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. IS. *I.*], 270. n. 5. p. E840-E845, 1996. DOI: ۷. 10.1152/ajpendo.1996.270.5.E840. Disponível em: https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1996.270.5.E840.

VALLE, L. J. d; DÍAZ, A. ..; PUIGGALÍ, J. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives. **Gels**, *[S. l.]*, v. 3, n. 3, p. 27, 2017. DOI: 10.3390/gels3030027. Disponível em: http://www.mdpi.com/2310-2861/3/3/27. VAN DRIEL, M. ..; POLS, H. ..; VAN LEEUWEN, J. P. .. Osteoblast Differentiation and Control by Vitamin D and Vitamin D Metabolites. **Current Pharmaceutical Design**, *[S. l.]*, v. 10, n. 21, p. 2535–2555, 2005. DOI: 10.2174/1381612043383818.

VAN DRIEL, Marjolein; VAN LEEUWEN, Johannes P. T. M. Vitamin D endocrine system and osteoblasts. **BoneKEy Reports**, *[S. l.]*, v. 3, n. FEBRUARY, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1038/bonekey.2013.227. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2013.227.

VISHNU PRIYA, M.; SIVSHANMUGAM, A.; BOCCACCINI, A. R.; GOUDOURI, O. M.; SUN, Wook; HWANG, Nathaniel; DEEPTHI, S.; NAIR, Shantikumar V; JAYAKUMAR, R. Injectable osteogenic and angiogenic nanocomposite hydrogels for irregular bone defects. **Biomedical Materials**, *[S. I.]*, v. 11, n. 3, p. 035017, 2016. DOI: 10.1088/1748-6041/11/3/035017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/11/3/035017.

WANG, Xiao Fei; LU, Pei Jun; SONG, Yang; SUN, Yu Chun; WANG, Yu Guang; WANG, Yong. Nano hydroxyapatite particles promote osteogenesis in a threedimensional bio-printing construct consisting of alginate/gelatin/hASCs. **RSC Advances**, *[S. 1.]*, v. 6, n. 8, p. 6832–6842, 2016. DOI: 10.1039/c5ra21527g. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1039/C5RA21527G.

WEBSTER, Thomas J.; ERGUN, Celaletdin; DOREMUS, Robert H.; SIEGEL, Richard W.; BIZIOS, Rena. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. **Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 22, n. 11, p. 1327–1333, 2001. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00285-4.

WHANG, K. *et al.* Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue Engineering**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. 35–51, 1999. DOI: 10.1089/ten.1999.5.35.

WICHTERLE, O.; LÍM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, *[S. l.]*, v. 185, n. 4706, p. 117–118, 1960. DOI: 10.1038/185117a0. Disponível em: http://www.nature.com/articles/185117a0.

WOLF, F. I.; CITTADINI, A. Magnesium in cell proliferation and differentiation. **Frontiers in Bioscience**, *[S. I.]*, v. 4, n. 1–3, p. d607, 1999. DOI: 10.2741/Wolf. Disponível em: https://fbscience.com/Landmark/articles/10.2741/wolf.

WONG, Michael Sze Ka *et al.* Vitamin D promotes vascular regeneration. **Circulation**, [S. I.], v. 130, n. 12, p. 976–986, 2014. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010650. WONGSAWICHAI, Kanharit; KINGKAEW, Arada; PARIYAISUT, Aninart; KHONDEE, Supang. Porous hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose scaffolds with tunable microstructures for bone tissue engineering. **Key Engineering Materials**, *[S. I.]*, v. 819 KEM, p. 9–14, 2019. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.819.9.

WU, Fei; LIN, Debra D. W.; CHANG, Jin Ho; FISCHBACH, Claudia; ESTROFF, Lara A.; GOURDON, Delphine. Effect of the materials properties of hydroxyapatite nanoparticles on fibronectin deposition and conformation. **Crystal Growth and Design**, *[S. I.]*, v. 15, n. 5, p. 2452–2460, 2015. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b00231.

XIAO, Shengjie; WANG, Ming; WANG, Liping; ZHU, Yingchun. Environment-Friendly Synthesis of Trace Element Zn, Sr, and F Codoping Hydroxyapatite with Noncytotoxicity and Improved Osteoblast Proliferation and Differentiation. **Biological Trace Element Research**, *[S. I.]*, v. 185, n. 1, p. 148–161, 2018. DOI: 10.1007/s12011-017-1226-5.

XIE, Zhiwei; PARAS, Christian B.; WENG, Hong; PUNNAKITIKASHEM, Primana; SU, Lee Chun; VU, Khanh; TANG, Liping; YANG, Jian; NGUYEN, Kytai T. Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. **Acta Biomaterialia**, *[S. I.]*, v. 9, n. 12, p. 9351–9359, 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.030. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.030.

XUE, Weichang; DAHLQUIST, Kelli; BANERJEE, Ashis; BANDYOPADHYAY, Amit; BOSE, Susmita. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, *[S. l.]*, v. 19, n. 7, p. 2669–2677, 2008. DOI: 10.1007/s10856-008-3395-4.

YANG, Guiran; WANG, Fuke; LI, Yanlin; HOU, Jianfei; LIU, Dejian. Construction of tissue engineering bone with the co-culture system of ADSCs and VECs on partially deproteinized biologic bone in vitro: A preliminary study. **Molecular Medicine Reports**, *[S. l.]*, v. 23, n. 1, 2021. DOI: 10.3892/mmr.2020.11696.

YANG, Jen Ming; SU, Wen Yu; LEU, Te Lang; YANG, Ming Chien. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. **Journal of Membrane Science**, *[S. I.]*, v. 236, n. 1–2, p. 39–51, 2004. DOI: 10.1016/j.memsci.2004.02.005.

YASMEEN, Sabina; LO, Man Kit; BAJRACHARYA, Salina; ROLDO, Marta. Injectable
Scaffolds for Bone Regeneration. Langmuir, [S. I.], v. 30, n. 43, p. 12977–12985,
2014. DOI: 10.1021/la503057w. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la503057w.

YASUDA, Kazunori; OSADA, Yoshihito; GONG, Jian Ping; KITAMURA, Nobuto.

Method For Inducing Regeneration Of Cartilage, US 9539366 B2, 2017.

YE, Huilin; ZHU, Junjin; DENG, Dan; JIN, Shue; LI, Jidong; MAN, Yi. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by PCL/chitosan/Sr-doped calcium phosphate electrospun nanocomposite membrane for guided bone regeneration. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, [S. I.], v. 30, n. 16, p. 1505–1522, 2019. DOI: 10.1080/09205063.2019.1646628. Disponível em: https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1646628.

YOUNG, A.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J.; RÖLLA, G.; RYKKE, M. Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the Coulter DELSA 440. **Advances in dental research**, *[S. l.]*, v. 11, n. 4, p. 560–565, 1997. DOI: 10.1177/08959374970110042501.

YU, Jiangming; LI, Kai; ZHENG, Xuebin; HE, Dannong; YE, Xiaojian; WANG, Meiyan. In Vitro and In Vivo Evaluation of Zinc-Modified Ca–Si-Based Ceramic Coating for Bone Implants. **PLoS ONE**, *[S. I.]*, v. 8, n. 3, p. e57564, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057564. Disponível em: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0057564.

YU, Wei Lin *et al.* Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration. **Scientific Reports**, *[S. I.]*, v. 7, n. August 2016, p. 1–16, 2017. a. DOI: 10.1038/srep44129. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep44129.

YU, Weilin *et al.* Copper-doped mesoporous hydroxyapatite microspheres synthesized by a microwave-hydrothermal method using creatine phosphate as an organic phosphorus source: application in drug delivery and enhanced bone regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, *[S. l.]*, v. 5, n. 5, p. 1039–1052, 2017. b. DOI: 10.1039/c6tb02747d.

YUE, Shuai; HE, Hui; LI, Bin; HOU, Tao. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering : A Review. **Nanomaterials**, *[S. I.]*, v. 10, n. 1511, p. 1–24, 2020. DOI: 10.3390/nano10081511. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-4991/10/8/1511. ZEHNDER, Daniel; BLAND, Rosemary; CHANA, Ravinder S.; WHEELER, David C.; HOWIE, Alexander J.; WILLIAMS, Mary C.; STEWART, Paul M.; HEWISON, Martin. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: A novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. Journal of the American Society of Nephrology, [S. I.], v. 13, n. 3, p. 621–629, 2002. ZHAI, Mingcui; XU, Yichen; ZHOU, Biao; JING, Weibin. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. Journal of Photochemistry and 180, р. Photobiology B: **Biology**, [S. I.], v. 253-258, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.02.018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.018.

ZHANG, Jingtao; LIU, Weizhen; SCHNITZLER, Verena; TANCRET, Franck; BOULER, Jean Michel. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, *[S. l.]*, v. 10, n. 3, p. 1035–1049, 2014. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.11.001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.001.

ZHAO, Xinxin; NG, Suxiu; HENG, Boon Chin; GUO, Jun; MA, Lwinlwin; TAN, Timothy Thatt Yang; NG, Kee Woei; LOO, Say Chye Joachim. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. **Archives of Toxicology**, *[S. I.]*, v. 87, n. 6, p. 1037–1052, 2013. DOI: 10.1007/s00204-012-0827-1.

ZHOU, Hui Yun; CHEN, Xi Guang; KONG, Ming; LIU, Cheng Sheng. Preparation of chitosan-based thermosensitive hydrogels for drug delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, *[S. l.]*, v. 112, n. 3, p. 1509–1515, 2009. DOI: 10.1002/app.29721. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/app.29721.

ZICHE, Marina; DONNINI, Sandra; MORBIDELLI, Lucia. Development of New Drugs in Angiogenesis. **Current Drug Targets**, *[S. I.]*, v. 5, n. 5, p. 485–493, 2005. DOI: 10.2174/1389450043345371.

ZITTERMANN, Armin; KOERFER, Reiner. Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, *[S. l.]*, v. 11, n. 6, p. 752–757, 2008. DOI: 10.1097/MCO.0b013e328312c33f. Disponível em: http://journals.lww.com/00075197-200811000-00013.

ZOCCAL, J. V. M. Estudo de métodos para a dispersão de nanopartículas deníquel e ferro em suspensão. 2015. Universidade Federal de São Carlos, [S. I.],2015.Disponívelem:

https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/7591/TeseJVMZ.pdf?sequence= 1&isAllowed=y.