

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

JOÃO DE FREITAS GOMES NETO

**MEMBRANAS NANOCOMPÓSITAS DE PGS/CaP/AgNPs PARA  
REGENERAÇÃO TECIDUAL**

BOTUCATU - SP

2024

JOÃO DE FREITAS GOMES NETO

**MEMBRANAS NANOCOMPÓSITAS DE PGS/CaP/AgNPs PARA  
REGENERAÇÃO TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi

BOTUCATU – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Gomes Neto, João de Freitas.

Membranas nanocompósitas de PGS/CaP/AgNPs para regeneração  
tecidual / João de Freitas Gomes Neto. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Carla dos Santos Riccardi

Capes: 90300009

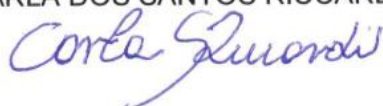
1. Materiais biomédicos. 2. Nanotecnologia. 3. Biopolímeros.  
4. Regeneração óssea.

Palavras-chave: Materiais bioativos; Nanotecnologia verde;  
Polímeros biodegradáveis; Regeneração óssea.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOÃO DE FREITAS GOMES NETO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 08:30 horas, no(a) Sala da Pós-Graduação da Central de Aulas, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JOÃO DE FREITAS GOMES NETO, intitulada **Membranas nanocompósitas de PGS/CaPs/AgNPs para regeneração tecidual**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronômicas - Unesp - Câmpus de Botucatu , Profa. Dra. IVANA CESARINO LEÃO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ANA LIZ GARCIA ALVES (Participação Presencial) do(a) Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - Unesp Botucatu. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI



*“Nunca se pode saber o que se deve querer, pois só se tem uma vida  
e não pode compará-la com as vidas anteriores nem corrigi-la  
nas vidas posteriores.”*

(Milan Kundera)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por todo o apoio que deram em minha jornada acadêmica e pelo incentivo a persistir e seguir meus sonhos, especialmente minha mãe Alessandra e meu pai Dagoberto, meus irmãos Pedro e Paulo, meu tio Douglas e minhas tias Heloísa e Ruth, minhas primas Jéssica, Dariane e Helen, e por fim, meus avós Maria e Pedro, todos por estarem sempre ao meu lado nesta jornada.

Agradeço também a meus amigos companheiros dessa jornada, Mariane Maximo, Beatriz Camargo, Maria Carra, Júlia Bucci, Larissa Baldo e João, pelo apoio e suporte que me ajudou a estar onde estou hoje, por terem sido minha família em Botucatu e por termos vivido experiências incríveis e extraordinárias que jamais serão esquecidas. Vocês marcaram minha graduação, minha pós-graduação e minha vida, é impossível me imaginar passando por essa etapa sem cada um de vocês.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla dos Santos Riccardi, por todo o suporte nessa pesquisa, por me acolher em seu grupo de pesquisa, por sua disposição em me orientar me proporcionando a experiência de ser inserido na pesquisa de um projeto que amo e na vida acadêmica que hoje penso em seguir.

Por fim, gostaria de agradecer à UNESP, ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), ao grupo de pesquisa Green Biotech Network, ao Laboratório de Eletroanalítica e Nanotecnologia (LEN), ao Laboratório de Bioenergia e Produtos Renováveis (LBPR), ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT-DATREM, Unesp/Instituto de Química de Araraquara), a UFSCar e ao Departamento de Engenharia de Materiais (DeMa/UFSCar).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.696116/2022-00 (Bolsa) e auxílio à pesquisa Proc. CNPq 465571/2014-0, Proc. FAPESP 2014/50945-4 e Proc. CAPES 88887136426/2017/00.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|          |                                                                                                            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACPN     | Redes anfífilas                                                                                            |
| AgNPs    | Nanopartículas de prata                                                                                    |
| ATR-FTIR | Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier por refletância total atenuada |
| BMU      | Unidade Celular Básica                                                                                     |
| DLS      | Espalhamento dinâmico de luz                                                                               |
| DSC      | Calorimetria exploratória diferencial                                                                      |
| EF       | Eficiência de liberação                                                                                    |
| GI       | Grau de intumescimento                                                                                     |
| HAp      | Hidroxiapatita                                                                                             |
| ID       | Índice de degradação                                                                                       |
| LLOQ     | Menor limite de quantificação                                                                              |
| MTT      | Sal de tetrazolio                                                                                          |
| NaCl     | Cloreto de sódio                                                                                           |
| NNI      | Iniciativa Nacional de Nanotecnologia                                                                      |
| NP       | Nanopartícula                                                                                              |
| PBS      | Solução tampão-fosfato                                                                                     |
| PCL      | Poli- $\epsilon$ -caprolactona                                                                             |
| PGA      | Ácido poliglicólico                                                                                        |
| PGS      | Poli (glicerol sebacato)                                                                                   |
| PLA      | Ácido polilático                                                                                           |
| PLGA     | Poli (lático-co-glicolídeo)                                                                                |
| Pre-PGS  | Pré polímero de PGS                                                                                        |
| SBF      | Fluído corporal simulado                                                                                   |
| SFB      | Soro fetal bovino                                                                                          |
| TGA      | Termogravimetria                                                                                           |
| Tg       | Transição vítrea                                                                                           |
| THF      | Tetrahidrofurano                                                                                           |
| ULOQ     | Maior limite de quantificação                                                                              |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Estrutura química do material de estudo neste trabalho, o Poli (Glicerol Sebacato). Traduzido e reutilizado com permissão de Rai, et al. 2012. Copyright © 2012 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

**Figura 2** – Aplicações dos derivados de PGS em sistemas biológicos. Traduzido e reutilizado com permissão de Sha, et al. 2021. Copyright © 2021 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

**Figura 3** – Técnicas de fabricação de scaffolds de PGS. Traduzido e reutilizado com permissão de Wu, et al. 2021. Copyright © 2021 Wiley-VCH GmbH Todos os direitos reservados.

**Figura 4** – Apresentação esquemática da regeneração óssea utilizando materiais convencionais e nanomateriais. Traduzido e reutilizado com permissão de Kumar, et al. 2019. Copyright © 2019 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

**Figura 5** – Fluxograma do processo de síntese das membranas de PGS denso e esponja.

**Figura 6** – Fluxograma do processo de síntese de AgNPs e incorporação nas membranas de PGS.

**Figura 7** – Fluxograma de processos da deposição biomimética de CaPs e incorporação de AgNPs nas membranas de PGS.

**Figura 8** – Amostras de 8mm de diâmetro e 2 mm de altura para as densas e 7 mm de altura para as esponjas, que foram utilizados no ensaio de compressão.

**Figura 9** – Amostras submetidas ao ensaio de compressão, (a) densa e (b) esponja.

**Figura 10** – Visão macrovisual das membranas de PGS, onde: (a) pré-polímero, (b) densa e (c) esponja.

**Figura 11** – Visão macrovisual das membranas de PGS, onde: (a) denso/SBF0, (b) denso/SBF1, (c) denso/SBF2, (d) esponja/SBF0, (e) esponja/SBF1 e (f) esponja/SBF2.

**Figura 12** – Visão macrovisual das membranas de PGS (a) denso/AgNP evaporação, (b) esponja/AgNP evaporação, (c) denso/AgNP imersão e (d) esponja/AgNP imersão.

**Figura 13** – Processo de síntese biogênica das AgNPs representado pelas mudanças de coloração na suspensão, em que (a) é o extrato alcoólico de própolis vermelha solubilizado com água deionizada, (b) é após o ajuste de pH para 10,6 com solução 0,1M de NaOH, e (c) é a suspensão final após adição de AgNO<sub>3</sub> e 20 minutos de agitação.

**Figura 14** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas de PGS em seu formato denso com magnitude de (a)5000x, (b) 10000x e (c)25000x; e em seu formato poroso com magnitude de (d) 100x, (e) 500x e (f) 1000x.

**Figura 15** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das esponjas de PGS, onde se tem a presença de microporos ao redor dos poros maiores, onde (a) representa uma visão maior da estrutura, já (b) e (c) apresentam uma visão mais focada nos microporos.

**Figura 16** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas densas de PGS tratadas com solução SBF, em que: SBF0, (a) 500x, (b) 1000x, (c) 10000x e (d) 25000x; SBF1, (e) 500x, (f) 1000x, (g) 10000x e (h) 25000x; SBF2, (i) 500x, (j) 1000x, (k) 10000x e (l) 25000x.

**Figura 17** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das esponjas de PGS tratadas com solução SBF, em que: SBF0, (a) 100x, (b) 250x, (c) 10000x e (d) 25000x; SBF1, (e) 100x, (f) 250x, (g) 10000x e (h) 25000x; SBF2, (i) 100x, (j) 250x, (k) 1000x e (l) 25000x.

**Figura 18** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de membranas densas de PGS tratadas com SBF e com AgNPs, apresentando possíveis diferentes fases de CaP depositadas em um mesmo grupamento da membrana.

**Figura 19** – Espectros comparativos de ATR-FTIR do pré-polímero de PGS, membrana de PGS densa e membrana de PGS esponja.

**Figura 20** – Espectros comparativos de ATR-FTIR, em que (a) representa a membrana esponja e (b) representa a membrana densa.

**Figura 21** – Espectros de ATR-FTIR das esponjas de PGS tratadas com soluções SBF e AgNPs por método de evaporação de solvente e imersão.

**Figura 22** – Espectros de ATR-FTIR das membranas densas de PGS tratadas com soluções SBF e AgNPs por método de evaporação de solvente e imersão.

**Figura 23** – Grau de intumescimento das membranas densas de PGS após o período de 24 horas imersas em solução PBS.

**Figura 24** – Grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS após o período de 24 horas imersas em solução PBS.

**Figura 25** – Índice de degradação hidrolítica das membranas densas de PGS após o período de 96 horas imersas em solução PBS.

**Figura 26** – Índice de degradação hidrolítica das membranas esponjas de PGS após o período de 96 horas imersas em solução PBS.

**Figura 27** – Gráfico de tensão vs. deformação dos ensaios de compressão das membranas esponjas de PGS controle e tratadas com solução SBF.

**Figura 28** – Gráfico de tensão vs. deformação dos ensaios de compressão das membranas densas de PGS controle e tratadas com solução SBF.

**Figura 29** – Gráfico referente ao módulo de elasticidade das membranas esponjas de PGS controle e tratadas com solução SBF.

**Figura 30** – Gráfico referente ao módulo de elasticidade das membranas densas de PGS controle e tratadas com solução SBF.

**Figura 31** – Curvas de DSC das membranas controle densa e esponja de PGS, com o ponto de Tg indicado.

**Figura 32** – Curvas de DSC das membranas densas de PGS tratadas com solução SBF, com o ponto de Tg indicado.

**Figura 33** – Curvas de DSC das membranas esponjas de PGS tratadas com solução SBF, com o ponto de Tg indicado.

**Figura 34** – Termogramas de TGA das amostras de PGS, onde podem ser observados os perfis de degradação térmica das amostras.

**Figura 35** – Termogramas de TGA de materiais poliméricos, dentre eles o policloreto de vinila (PVC). Traduzido e reutilizado com permissão de Jing; Zhang; Wu. 2002. Copyright © 2002 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

**Figura 36** – Porcentagem de viabilidade celular realizado por MTT das membranas esponjas de PGS, com os tratamentos controle, PGS/CaP, PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs.

**Figura 37** – Porcentagem de viabilidade celular realizado por MTT das membranas densas de PGS, com os tratamentos controle, PGS/CaP, PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs.

**Figura 38** – Espectros de absorção de AgNPs, exemplificando os comprimentos de onda característicos de um Ag-nanoseed e um Ag-nanoprism. Traduzido e reutilizado com permissão de Torres-Rivero et al., 2021. Copyright © 2021 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

**Figura 39** – Espectro de absorção na região do UV-Vis da suspensão de AgNPs, onde pode ser observado o pico de absorção em 424 nm.

**Figura 40** – Gráfico de regularização da presença de AgNPs na suspensão. Fonte: Software DYNAMICS V6.

**Figura 41** – Gráfico de correlação da suspensão de AgNPs. Fonte: Software DYNAMICS V6.

**Figura 42** – Espectros de absorção na região do UV-Vis das suspensões de AgNPs, em diferentes concentrações, evidenciando LLOQ e ULOQ em 424 nm.

**Figura 43** – Curva analítica obtida por regressão linear, contendo 11 pontos que será utilizada para a quantificação de liberação das AgNPs.

**Figura 44** – Perturbação da densidade eletrônica de uma nanoesfera provocada pela interação com o campo elétrico da radiação excitante. Traduzido e reutilizado com permissão de Kelly et al., 2003. Copyright © 2003 American Chemical Society. Todos os direitos reservados

**Figura 45** – Espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções de própolis vermelha, em diferentes concentrações, evidenciando LLOQ e ULOQ em 285 nm.

**Figura 46** – Curva analítica obtida por regressão linear, contendo 9 pontos que será utilizada para a quantificação de liberação de própolis vermelha.

**Figura 47** – Fotografia do extrato cru e seco da própolis vermelha, extraída do sul do Brasil. Fonte: Adaptado de (Martins et al., 2020).

**Figura 48** – Eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

**Figura 49** – Eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

**Figura 50** – Eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

**Figura 51** – Eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

**Figura A1** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento da membrana esponja controle de PGS.

**Figura A2** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com SBF.

**Figura A3** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com AgNPs.

**Figura A4** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com SBF e AgNPs.

**Figura A5** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento da membrana densa controle de PGS.

**Figura A6** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com SBF.

**Figura A7** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com AgNPs.

**Figura A8** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com SBF e AgNPs.

**Figura B1** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja controle de PGS.

**Figura B2** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com SBF.

**Figura B3** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com AgNPs.

**Figura B4** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com SBF e AgNPs.

**Figura B5** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa controle de PGS.

**Figura B6** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com SBF.

**Figura B7** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com AgNPs.

**Figura B8** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com SBF e AgNPs.

**Figura C1** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de imersão.

**Figura C2** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.

**Figura C3** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de imersão.

**Figura C4** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.

**Figura C5** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de imersão.

**Figura C6** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.

**Figura C7** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de imersão.

**Figura C8** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Diferentes fases de fosfatos de cálcio por suas razões molares Ca/P. Fonte: Adaptado de Eliaz & Metoki, 2017.

**Tabela 2** – Concentrações iônicas das diferentes soluções SBF utilizadas ( $\text{mmol.dm}^{-3}$ ).

**Tabela 3** – Sequências de adições dos sais nas soluções de SBF e sua quantidade respectiva.

**Tabela 4** – Frequências de absorção no ATR-FTIR do pre-PGS.

**Tabela 5** – Frequências de absorção no ATR-FTIR do PGS.

**Tabela 6** – Frequências de absorção no ATR-FTIR dos fosfatos de cálcio.

**Tabela 7** – Valores de Tg das membranas de PGS submetidas a análise de calorimetria exploratória diferencial.

**Tabela 8** – Tabela de transição vítrea (Tg) de alguns materiais poliméricos que vem sendo reportados na literatura.

**Tabela 9** – Picos de temperatura de degradação térmica das amostras analisadas, onde *Tonset* é a temperatura de início de degradação e *Tpeak* é a temperatura máxima de degradação.

**Tabela 10** – Dados coletados pela técnica de DLS que informam principalmente o raio médio e a polidispersão das AgNPs.

## RESUMO

O número crescente de defeitos ósseos causados por traumas, patologias, defeitos congênitos e envelhecimento da população infere no uso de substitutos ósseo para a regeneração de tecidos. Neste contexto, esta pesquisa tem como hipótese aliar as características elastômeras do polímero poli (glicerol sebacato) (PGS), à bioatividade conferida por fosfatos de cálcio (CaP) de interesse biológico auxiliando a cicatrização e remodelação de tecidos danificados ou perdidos, a incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs), obtidas por síntese biogênica, objetivando aliar propriedades terapêuticas antiinflamatórias e antimicrobiana. O PGS é sintetizado a partir de ácido sebácico e glicerol (1:1) por aquecimento em micro-ondas, e seguida pela etapa de cura à 150 °C por 24 horas. A deposição da fase inorgânica a base de fosfatos de cálcio na matriz orgânica foi conduzida por método biomimético a partir de solução de simulação de fluidos corporais (SBF, do inglês *Simulated Body Fluid*) sob três diferentes condições de composições iônicas. As AgNPs foram sintetizadas por rota verde, a partir do extrato de própolis vermelha e, então, incorporadas nas membranas por dois processos diferentes (1) imersão e (2) evaporação de solvente. As amostras PGS controle, PGS/CaP, PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho médio com reflectância total atenuada (ATR-FTIR), grau de intumescimento, degradação hidrolítica e ensaios biológicos por método indireto. As amostras PGS controle e PGS/CaP foram submetidas a ensaios mecânicos de compressão e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As amostras PGS controle e PGS/SBF0 foram submetidas a análises de termogravimetria (TGa). As AgNPs foram caracterizadas por UV-vis e espalhamento dinâmico de luz (DLS). As amostras PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs foram submetidas a ensaios de liberação *in vitro* a fim de quantificar a liberação de AgNPs. A padronização da síntese do PGS assistida micro-ondas possibilitou redução de tempo nas etapas de pré-polimerização e cura quando comparada ao método convencional de policondensação sob pressão reduzida (24 ou 48h) seguido por cura do material até 96h. Os resultados macrovisuais das membranas densa e esponjas apresentaram característica consistente para a aplicação em tecido ósseo, sendo a membrana esponja altamente porosa, mimetizando a fase esponja do tecido, e a membrana densa possui uma flexibilidade atraente para a aplicação. Os resultados de MEV indicam a reticulação do material obtida com sucesso, juntamente com a deposição de CaP sobre a superfícies da membrana, essas fases que podem estar mistas graças a solução SBF. As caracterizações referentes a composição química do PGS realizadas por ATR-FTIR apresentam bandas características do processo de polimerização do material, sendo possível observar seus deslocamentos, e apresentam bandas características de CaP, comprovando novamente a deposição sobre as membranas. Os testes de intumescimento e degradação hidrolítica apresentam que o material possui uma característica hidrofóbica, passando para hidrofílica com a presença de poros, e que seu índice de degradação está satisfatório para o nível de reticulação do material apresentado pela literatura. Os resultados de ensaios de compressão indicam que o PGS possui um nível de resistência, porém não tanto quando comparado a outros polímeros utilizados em regeneração óssea. Os testes de DSC e TGa apresentam o comportamento térmico do material, mostrando que ele sofre transição vítrea e se degrada acima de 400 °C. Os ensaios biológicos indicam que o material possui biocompatibilidade, porém precisa de tratamentos para correção de pH. Os testes de liberação de AgNPs indicam que possui perspectivas de cinética de liberação. Sendo assim, o PGS é um bom candidato para regeneração óssea, com as devidas incorporações de CaP e AgNPs.

**Palavras-chave.** Polímeros biodegradáveis. Materiais bioativos. Nanotecnologia verde. Regeneração óssea.

## ABSTRACT

The increasing number of bone defects caused by traumas, pathologies, congenital defects, and aging of the population necessitates the use of bone substitutes for tissue regeneration. In this context, this research hypothesizes combining the elastomeric characteristics of the polymer poly (glycerol sebacate) (PGS) with the bioactivity conferred by calcium phosphate (CaP) of biological interest, aiding in the healing and remodeling of damaged or lost tissues. The incorporation of silver nanoparticles (AgNPs), obtained through biogenic synthesis, aims to combine anti-inflammatory and antimicrobial therapeutic properties. PGS is synthesized from sebacic acid and glycerol (1:1) by microwave heating, followed by curing at 150 °C for 24 hours. The deposition of the inorganic phase based on calcium phosphates in the organic matrix was conducted through a biomimetic method using a simulated body fluid (SBF) solution under three different ionic composition conditions. AgNPs were synthesized through a green route using red propolis extract and then incorporated into the membranes by two different processes: (1) immersion and (2) solvent evaporation. The PGS control, PGS/CaP, PGS/AgNPs, and PGS/CaP/AgNPs samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), swelling degree, hydrolytic degradation, and indirect biological assays. The PGS control and PGS/CaP samples underwent compression mechanical tests and differential scanning calorimetry (DSC). The PGS control and PGS/SBF0 samples were subjected to thermogravimetric analysis (TGA). AgNPs were characterized by UV-vis and dynamic light scattering (DLS). The PGS/AgNPs and PGS/CaP/AgNPs samples underwent in vitro release tests to quantify AgNPs release. The standardization of microwave assisted PGS synthesis allowed a reduction in time for pre-polymerization and curing compared to the conventional polycondensation method under reduced pressure (24 or 48h) followed by material curing for up to 96h. The macrovisual results of dense and sponge membranes exhibited consistent characteristics for bone tissue application, with the sponge membrane being highly porous, mimicking the sponge phase of the tissue, and the dense membrane having attractive flexibility for application. SEM results indicate the successful crosslinking of the material along with CaP deposition on the membrane surfaces, these phases may be mixed due to the SBF solution. Characterizations related to the chemical composition of PGS by ATR-FTIR show characteristic bands of the material's polymerization process, with observable shifts, and exhibit CaP characteristic bands, confirming the deposition on the membranes. Swelling and hydrolytic degradation tests show that the material has hydrophobic characteristics, transitioning to hydrophilic with the presence of pores, and its degradation rate is satisfactory for the material's crosslinking level presented in the literature. Compression test results indicate that PGS has a level of resistance, though not as much when compared to other polymers used in bone regeneration. DSC and TGA tests present the thermal behavior of the material, showing glass transition and degradation above 400 °C. Biological assays indicate that the material is biocompatible but requires pH correction treatments. AgNPs release tests indicate promising release kinetics. Therefore, PGS is a good candidate for bone regeneration, with the appropriate incorporations of CaP and AgNPs.

**Keywords:** Biodegradable polymers. Bioactive materials. Green nanotechnology. Bone regeneration.

## SUMÁRIO

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                            | <b>17</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                 | <b>21</b> |
| 2.1. TECIDO ÓSSEO .....                                                               | 21        |
| 2.2. REGENERAÇÃO ÓSSEA .....                                                          | 22        |
| 2.3. REPARO ÓSSEO .....                                                               | 23        |
| 2.4. BIOMATERIAIS .....                                                               | 25        |
| 2.5. FOSFATOS DE CÁLCIO .....                                                         | 26        |
| 2.6. BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS .....                                                   | 28        |
| 2.7. POLI (GLICEROL SEBACATO) .....                                                   | 29        |
| 2.8. NANOTECNOLOGIA .....                                                             | 34        |
| 2.9. NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....                                                    | 37        |
| 2.10. PRÓPOLIS VERMELHA .....                                                         | 38        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                             | <b>40</b> |
| <b>4. METODOLOGIAS .....</b>                                                          | <b>41</b> |
| 4.1. SÍNTESE DO POLÍMERO PGS .....                                                    | 41        |
| 4.2. OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE PGS DENSA E ESPONJA .....                              | 41        |
| 4.3. PREPARO DE SOLUÇÕES SBF .....                                                    | 42        |
| 4.4. SÍNTESE BIOGÊNICA DE AgNPS E INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE PGS .....              | 44        |
| 4.5. PREPARO DE MEMBRANAS DE PGS/CaPs/AgNPs .....                                     | 46        |
| 4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....                                  | 47        |
| 4.7. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO ..... | 47        |
| 4.8. TESTES DE INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA .....                          | 47        |
| 4.9. ENSAIOS MECÂNICOS .....                                                          | 48        |
| 4.10. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....                                     | 50        |
| 4.11. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA .....                                                 | 50        |
| 4.12. ENSAIOS BIOLÓGICOS .....                                                        | 50        |
| 4.13. CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS E AgNPs .....                    | 51        |
| 4.14. CARACTERIZAÇÕES DAS AgNPS .....                                                 | 51        |
| 4.15. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA PRÓPOLIS E AgNPS .....                                 | 52        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                | <b>53</b> |
| 5.1. ANÁLISE MACROVISUAL .....                                                        | 53        |
| 5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....                                        | 60        |

|                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO .....  | 68         |
| 5.5. GRAU DE INTUMESCIMENTO .....                           | 74         |
| 5.6. DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA.....                            | 77         |
| 5.7. ENSAIOS MECÂNICOS .....                                | 81         |
| 5.8. ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL ..... | 85         |
| 5.9. ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA .....                      | 89         |
| 5.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS .....                              | 91         |
| 5.11. CARACTERIZAÇÕES DAS AgNPs.....                        | 95         |
| 5.12. CURVA ANALÍTICA DE AgNPs E PRÓPOLIS VERMELHA .....    | 99         |
| 5.13. TESTES DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....             | 104        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>                                   | <b>109</b> |
| <b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                         | <b>111</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                  | <b>112</b> |
| <b>APÊNDICE A .....</b>                                     | <b>128</b> |
| <b>APÊNDICE B.....</b>                                      | <b>132</b> |
| <b>APÊNCIDE C .....</b>                                     | <b>136</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo desempenha papel fundamental no sistema esquelético do corpo humano e tem como principal função fornecer suporte estrutural permitindo o movimento e protegendo os órgãos internos. Composto por uma matriz mineralizada rica em cálcio e fosfato, juntamente a células especializadas como osteoblastos e osteoclastos, o tecido ósseo é dinâmico e está em constante processo de remodelação. Além de sua função mecânica, também desempenha papel na regulação da homeostase de minerais, como cálcio e fósforo, ajudando a manter níveis adequados desses elementos no sangue. O estudo do tecido ósseo é relevante para entender a anatomia e fisiologia do corpo humano e para desenvolver pesquisas e tratamentos relacionados a várias condições médicas que afetam o sistema esquelético (Salhotra et al., 2020).

Neste contexto, a regeneração óssea é um processo natural do corpo humano e desempenha papel na capacidade dos tecidos ósseos se recuperarem após lesões, fraturas ou cirurgias. Esse processo de regeneração é coordenado por células especializadas, como os osteoblastos (responsáveis pela produção da estrutura óssea) e os osteoclastos (responsáveis por remodelá-la). A complexidade desse processo é influenciada por vários fatores incluindo a vascularização da área afetada, a presença de nutrientes essenciais e a interação entre as células e os fatores de crescimento. Compreender os mecanismos referentes à regeneração óssea possibilitam desenvolver abordagens terapêuticas inovadoras em áreas como traumatologia, ortopedia e odontologia, com o objetivo de promover uma recuperação eficaz e a restauração completa da função óssea (Florencio-Silva et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2022 foram relatados aproximadamente 8.9 milhões de casos envolvendo fraturas ósseas mundialmente, tornando o estudo do processo de regeneração ósseas e materiais para serem utilizados nestas aplicações de extrema importância (De Villiers; Goldstein, 2022).

No sentido de regeneração do tecido ósseo, as falhas no processo de remodelação podem ocorrer em casos de lesões no tecido ósseo que envolvem uma perda tecidual excessiva e limitações na regeneração óssea espontânea (Ho-Shui-Ling et al., 2018). Embora os autoenxertos (do paciente) ou aloenxertos (de um doador) sejam considerados o padrão-ouro, algumas limitações são apontadas incluindo extensão da área a ser

reparada, condições aceitáveis da área doadora, desconforto para o paciente, transferência de patógenos e recuperação prolongada (Iaquinta et al., 2019).

Desta forma, os biomateriais surgem como alternativa de material aloplástico para favorecer o crescimento ósseo em aplicações biomédicas como reconstrução maxilofacial, periodontia e ortopedia (Hench; Roki; Fenn, 2014). Nesta perspectiva, a literatura vem reportando novas estratégias por meio da combinação de polímeros biodegradáveis com biocerâmicas, sendo apontados como materiais com propriedades mecânicas, estabilidade fisiológica, capacidade de biomineralização e citocompatibilidade (Yang et al., 2015).

Dentre a ampla gama de biomateriais, os biomateriais poliméricos que têm como base estruturas de polímeros (caracterizadas por cadeias moleculares longas) e são minuciosamente confeccionados para interagir de maneira segura e eficaz com sistemas biológicos. O que torna os biomateriais poliméricos particularmente notáveis é sua variedade de aplicações que vão desde implantes médicos, como próteses e suturas, até sistemas de liberação controlada de medicamentos e veículos para terapias genéticas. A maleabilidade desses materiais e a capacidade de serem adaptados para atender às necessidades específicas favorecem seu uso na engenharia de tecidos, viabilizando a criação de estruturas que promovem a regeneração e reparo de órgãos e tecidos lesados. Além disso, biomateriais poliméricos têm a característica de biocompatibilidade, ou seja, a interação com o corpo não desencadeia reações adversas (Aoki; Saito, 2020; Ratner, 2013).

O poli (glicerol sebacato) (PGS) é um biomaterial polimérico de interesse na área da engenharia de tecidos e regeneração de órgãos. Este polímero é obtido por meio da reação entre o glicerol e o ácido sebácico, formando uma estrutura biocompatível e biodegradável. O PGS apresenta propriedades singulares que o tornam altamente adequado para diversas aplicações no campo biomédico; por exemplo, sua elasticidade e capacidade de degradação controlada viabilizam a fabricação de *scaffolds*, que podem ser empregados para orientar o crescimento e a regeneração de tecidos, abrangendo áreas como a pele, cartilagem, vasos sanguíneos, tecido ósseo. Outras propriedades do PGS que se destacam e que contribuem para seu valor na concepção de dispositivos médicos personalizados e implantes são: a maleabilidade (que permite sua moldagem em diferentes formatos); seu baixo custo de produção; seu potencial osteogênico; suas rotas de sínteses flexíveis e sua resistência mecânica. A maleabilidade permite que sejam

desenvolvidas combinações de PGS com outros materiais de interesse, como nanopartículas (NP), nanocelulose, bioativos, outros polímeros etc. (Cai; Liu, 2008; Piszko et al., 2021; Pomerantseva et al., 2009; Zaky et al., 2017).

Aliado as características do PGS, os fosfatos de cálcio de interesse biológico (CaPs) representam um dos principais biomateriais estudados para a reposição e regeneração óssea. Esses materiais atuam na composição de ossos e dentes e apresentam uma diversidade de estruturas e propriedades que têm ação na regulação do metabolismo do cálcio e na formação da matriz óssea. Além disso, podem ser aplicados em diversos campos biomédicos, como biomateriais utilizados para reparos em tecidos ósseos e dentários, e têm um impacto significativo na indústria farmacêutica, onde são empregados em suplementos de cálcio e fármacos destinados ao tratamento de distúrbios relacionados ao metabolismo de cálcio (Panda; Biswas; Paul, 2021). Assim, tanto na biologia como na medicina, os fosfatos de cálcio influenciam substancialmente nosso conhecimento sobre a saúde óssea e contribuem para diversas aplicações terapêuticas e tecnológicas (Vallet-Regí; Salinas, 2019).

Outro ponto a ser destacado, é a necessidade em situações clínicas da utilização de um material bioativo para reparo ósseo com atividade antimicrobiana no sentido de evitar a formação de biofilmes bacterianos na superfície dos materiais sintéticos (aloplásticos) durante a etapa de reparo/regeneração tecidual. Várias moléculas de antibióticos foram introduzidas na prática clínica para a prevenção de infecção, porém a disseminação da resistência bacteriana promoveu um desafio quanto a novas estratégias de tratamento. Neste contexto, as nanopartículas, mais especificamente, nanopartículas de prata (AgNPs), têm emergido como uma inovação promissora no campo de novas estratégias para o combate a infecções comuns e causadas por bactérias multirresistentes (Orbaek; Mchale; Barron, 2015).

Sendo assim, a fim de melhorar capacidades antiinflamatórias e antimicrobianas, as AgNPs podem ser sintetizadas por métodos químicos, físicos ou biológicos (síntese biogênica ou nanotecnologia verde), sendo que no último, utiliza-se extratos vegetais ou micro-organismos (Khan et al., 2023). Entre as vantagens da rota verde estão uma baixa toxicidade, e o agente redutor também é responsável pelo recobrimento da superfície da NPs metálica propiciando uma melhor estabilidade química e minimizando a aglomeração (Singh et al., 2018). Considerando o uso de extratos vegetais, a literatura tem reportado o uso de *Eucalyptus globulus*, *Azadirachta indica*, *Cissus*

*quadrangularis*, *Lantana camara* flower, *Rubus illecebrosus* leaf, *Nephelium lappaceum* peel, *Ricinus communis*, *Calotropis gigantea* (Tariq et al., 2022).

Para que seja possível realizar uma síntese biogênica com sucesso de AgNPs, a própolis vermelha vêm se destacando nesta área, pois, além de já conter diversas vitaminas, flavonoides e outras ótimas características (Alencar et al., 2007) ela se mostra eficaz na síntese de AgNPs (Barreto et al., 2022) aumentando suas possibilidades de aplicação. Ressalta-se, ainda, o fato de o Brasil ser um país que conta com mais de 14 espécies de própolis e, assim, o estudo das propriedades e benefícios do uso da própolis agrega valor às atividades de apicultura.

A possibilidade de utilização de um material proveniente de origem natural para a síntese de AgNPs que podem ser aplicadas em engenharia de tecidos, além de agregar valor ao comércio deste produto, propõe um sinergismo em relação a estabilidade destas partículas com os componentes naturais do produto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um conector especializado que possui importantes papéis no corpo humano, como locomoção, suporte, proteção de tecidos, armazenamento de cálcio e fosfato e proteção da medula óssea, possuindo quatro tipos diferentes de células: osteoblastos, revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos (Florencio-Silva et al., 2015). Apesar de parecer inerte, o tecido ósseo é dinâmico e está sempre sendo reabsorvido por osteoclastos e neoformado por osteoblastos.

A remodelação óssea é um processo complexo em que um tecido ósseo antigo é substituído por um novo, em um ciclo composto por três fases: início da reabsorção óssea pelos osteoclastos; transição da reabsorção para a nova formação óssea; e formação óssea por osteoblastos. Este processo é possível graças à ação dos osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo que, juntos, formam uma estrutura anatômica temporária, chamada de Unidade Básica Multicelular (BMU, do inglês *Basic Multicellular Unit*) (Florencio-Silva et al., 2015).

Presentes na medula óssea e responsáveis pela síntese da matriz óssea e pela sua posterior mineralização, as células-tronco mesenquimais dão origem aos osteoblastos uma vez que tais células se comprometem com a linhagem osteoblástica passando por um processo chamado osteogênese ou osteoblastogênese. Neste processo, as células-tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos imaturos, que então amadurecem e se tornam funcionais. Por outro lado, os osteoclastos são células gigantes multinucleadas formadas a partir da fusão de progenitores mononucleares dos monócitos/macrófagos em um processo chamado osteoclastogênese (Siddiqui; Partridge, 2016).

Neste contexto, os osteoblastos e os osteoclastos, juntos, realizam o processo de remodelação óssea, pois formam a BMU que tem como objetivo principal facilitar a renovação e a manutenção contínua do tecido ósseo, garantindo a integridade estrutural e adaptação às necessidades fisiológicas.

Quando ocorre uma lesão no tecido ósseo, a cicatrização pode seguir dois processos distintos: regeneração ou reparação. A regeneração ocorre quando as células originais do tecido se proliferam e diferenciam, repovoando o tecido danificado. Nesse caso, o tecido regenerado apresenta as mesmas propriedades funcionais e características morfológicas do tecido original. Já no processo de reparação, o tecido danificado é

substituído por tecido conjuntivo fibroso, resultando na formação de uma cicatriz de colágeno que leva a uma perda das características e funções originais do tecido. Atualmente, a regeneração óssea é considerada prioritária em casos de traumas, visando recuperar a forma e as funções originais do osso, em vez de apenas promover a reparação (Zambuzzi et al., 2011).

## **2.2. REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Os defeitos ósseos frequentemente surgem devido a trauma, ressecção de tumores, cirurgia reconstrutiva, malformações congênitas, infecções ou cirurgias. Embora o osso seja um órgão ativo por meio de remodelação contínua ao longo da vida adulta e possua considerável capacidade de reparo e de regeneração de fraturas normais, em algumas condições adversas é preciso uma grande quantidade de regeneração óssea e, por isso, intervenções clínicas são necessárias (Majidinia; Sadeghpour; Yousefi, 2018).

Com objetivo de promover a reparação do tecido ósseo danificado e restaurar sua função adequada, a regeneração óssea envolve um conjunto coordenado de eventos biológicos que incluem indução e condução óssea, eventos que ocorrem em uma sequência temporal e espacial específica e envolvem diferentes tipos de células e vias de sinalização molecular intracelular e extracelular (Dimitriou et al., 2011).

A reparação de fraturas ósseas é considerada um processo regenerativo composto por três fases sobrepostas: inflamação, renovação e remodelação. Diferentemente do que ocorre com outros tecidos moles, em que a formação de uma cicatriz fibrosa é predominante no local da lesão, durante a cicatrização de uma fratura ocorre a formação de novo tecido ósseo que é indistinguível do osso não lesionado. Existem dois principais mecanismos envolvidos na reparação de fraturas ósseas: a remodelação direta (que envolve formação mínima de cicatriz fibrosa) e, mais predominantemente, a remodelação indireta (que ocorre com formação de cicatriz fibrosa por meio de uma combinação de ossificação intramembranosa e endocondral) (Wang et al., 2013). Dessa maneira, apesar de em geral o osso regenerado ter suas propriedades originais consideravelmente restauradas, em alguns casos de cicatrização de fraturas, a regeneração óssea pode ser prejudicada resultando em atraso na união ou não união da fratura (Dimitriou et al., 2011).

A linhagem esquelética compreende um grupo diversificado de células responsáveis pela manutenção e reparo do osso durante a homeostase e em casos de

lesões. Essa linhagem celular inclui osteoblastos, osteócitos e condrócitos. Esses tipos de células esqueléticas estão principalmente envolvidos na formação de osso e cartilagem, enquanto os osteoclastos, derivados da linhagem hematopoiética, são responsáveis pela reabsorção óssea. A homeostase normal do osso é mantida por um equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos. No entanto, durante o processo de envelhecimento, especialmente em mulheres após a menopausa, a atividade dos osteoclastos supera a dos osteoblastos, resultando em um aumento da reabsorção óssea global e enfraquecimento dos ossos (Salhotra et al., 2020).

A engenharia de tecidos tem como objetivo replicar a estrutura base de um tecido e proporcionar a aplicação de um material, o mesmo acontece com a engenharia de tecido ósseo, que tem como objetivo replicar as propriedades do osso, como sua capacidade osteocondutora, osteoindutora e osteogênica (Valtanen et al., 2021).

### **2.3. REPARO ÓSSEO**

O tecido ósseo está entre os tecidos mais frequentemente lesionados, e tais lesões estão entre as condições mais tratadas atualmente por profissionais da área. Compreender a biologia da reparação do tecido ósseo, bem como as técnicas disponíveis para o tratamento se torna importante para o melhor diagnóstico e tratamento. Ele apresenta uma característica única em relação aos outros tecidos, já que sua reparação ocorre por regeneração e não cicatrização; significando o osso lesionado é substituído por tecido ósseo remodelado, em vez de uma cicatriz fibrosa (Slade; Chou, 1998).

O início do processo regenerativo envolve três fases principais: recrutamento, modulação e osteocondução. O recrutamento refere-se à atração de células osteoprogenitoras para o local da lesão, já que essas células possuem capacidade de produzir tecido ósseo em resposta a estímulos; já a modulação envolve a ativação de osteócitos locais e células periosteais para iniciar a formação óssea, e este processo é acompanhado da osteoindução; a osteocondução é o resultados de diversas influências, incluindo fatores de crescimento e campos elétricos, resultando em uma estrutura atuando como suporte para que as células osteoprogenitoras possam depositar o novo tecido ósseo e, as substâncias osteocondutivas incluem colágeno e hidroxiapatita (HAp) (Marx, 2007; Slade; Chou, 1998).

A reparação natural do tecido ósseo segue um padrão, composto por seis etapas: impacto, indução, inflamação, calo ósseo não-mineralizado, calo ósseo mineralizado e remodelação. O impacto se refere-se à absorção de energia pelo tecido ósseo e a lesão resultante. Na etapa de indução, ocorre a formação do hematoma da fratura, promovendo a modulação e osteoindução das células locais, tendo duração aproximadamente de 48 horas. A etapa de inflamação é caracterizada pela chegada de neutrófilos, macrófagos, mastócitos e fibroblastos; acarretando degradação osteoclástica do tecido necrótico, substituição do hematoma da fratura por tecido de granulação e rápido crescimento capilar; clinicamente, coincide com o início do inchaço e dor. Na etapa de calo ósseo não-mineralizado ocorre a formação de um novo tecido ósseo subperiosteal adjacente à lacuna da fratura, com a presença de condroblastos que convertem o estroma fibrovascular em tecido cartilaginoso. Já em tecido ósseo mineralizado, ocorre a ossificação endocondral do calo cartilaginoso para formar o tecido trabecular; clinicamente resultando na cicatrização da fratura. E por fim, a remodelação ocorre ao longo de meses e anos, englobando a conversão do tecido ósseo trabecular em tecido ósseo lamelar, a reconstituição do canal medular e a restauração do diâmetro ósseo original (Marx, 2007; Slade; Chou, 1998).

A utilização de compostos à base de cálcio (Ca) e/ou fósforo (P) para substituir o tecido ósseo tem uma longa história, e diversos compostos, abrangendo uma grande faixa de solubilidade, desde sulfato de cálcio até a HAp foram caracterizados por serem seguros. Após a primeira síntese de HAp em 1980, o interesse se expandiu em relação a materiais reabsorvíveis que pudessem ser substituídos pelo tecido ósseo, o que levou ao surgimento de produtos com razões de Ca:P, ou até mesmo fosfatos de magnésio isentos de cálcio. Em termos gerais, os substitutos inorgânicos são considerados por ter uma função “estrutural”, atuando como uma barreira física, e acredita-se ser necessário garantir que a taxa de crescimento ósseo linear seja maior que a taxa de reabsorção, para evitar a invasão por tecido fibroso (Habibovic; Barralet, 2011).

Biomateriais e nano-biomateriais, bem como suas tecnologias de produção surgiram como uma alternativa às abordagens convencionais de mimetização de tecidos biológicos. Essas estruturas de suporte engenheiradas e nanoengenheiradas podem controlar a liberação de terapêuticos para orientar o comportamento celular. Geometrias complexas, como fibras, esferas, folhas, tubos, redes etc. podem ser fabricadas para imitar as estruturas biológicas. Uma variedade de biomateriais e nanomateriais cerâmicos e

poliméricos tem sido utilizada para a engenharia de tecidos ortopédicos, incluindo osso, cartilagem, tendão e ligamentos (Cross et al., 2016), além de que, a vascularização é um dos aspectos mais importantes para o sucesso destes materiais em engenharia de tecidos, e representam um obstáculo significativo para a medicina regenerativa (García; García, 2016).

## **2.4. BIOMATERIAIS**

Por definição, um biomaterial ou material biomédico é um material projetado para, por meio de interações com sistemas vivos, assumir uma forma capaz de direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (Williams, 2019). Ao interagir com o meio biológico, biomateriais não apresentam toxicidade para o organismo e podem ser usados para substituir, parcial ou totalmente, sistemas biológicos a fim de adicionar, substituir ou desempenhar funções naturais. Além disso, são empregados na fabricação de dispositivos médicos e têm diversas aplicações em diagnóstico, vacinação, cirurgia e terapia (Ratner, 2013).

Assim, a biocompatibilidade, característica fundamental de um biomaterial, se define como a capacidade de um material apresentar uma resposta adequada do hospedeiro em uma aplicação específica (Williams, 2019); ou seja, a habilidade de existir em conjunto com os tecidos biológicos sem causar qualquer tipo de dano é o fator que distingue um biomaterial de qualquer outro material (Williams, 2008).

A fim de compreender o desenvolvimento das pesquisas em biomateriais ao longo dos últimos anos, podemos identificar três gerações distintas: materiais bioinertes (primeira geração), materiais bioativos e biodegradáveis (segunda geração) e materiais projetados para estimular respostas celulares específicas em nível molecular (terceira geração). Essas gerações não devem ser interpretadas em termos cronológicos, mas como conceitos que representam a evolução dos requisitos e propriedades dos materiais envolvidos. Cada geração introduz materiais que não substituem, necessariamente, o uso das gerações anteriores (Agarwal; García, 2015; Chen et al., 2021; Gsib et al., 2020; Navarro et al., 2008).

As duas formas mais comuns de classificar biomateriais têm como base a estrutura química (metal, cerâmica, polímero e compósitos) e o grau de interação com o ambiente biológico (inerte, bioativo, bioabsorvível. Uma terceira classificação, relativamente

menos utilizada, tem base na "origem" do material, que pode ser sintética ou natural. Quando é apresentado um enfoque histórico, compreende-se como necessária a classificação de biomateriais em outras três categorias (Marin; Boschetto; Pezzotti, 2020), as quais se distinguem pelo nível tecnológico para sua confecção:

a) primitivos: materiais de proveniência natural que são moldados mediante ferramentas simples (como osso);

b) manufaturados: materiais que passam por um processo de refinamento por meio de uma prática tecnológica específica (por exemplo, a produção de fios de linho exige competências rudimentares de tecelagem);

c) transformados: materiais que demandam alterações físicas ou químicas mais substanciais para sua elaboração (como a redução de óxidos de ferro e a compreensão da metalurgia para a produção de aço).

## **2.5. FOSFATOS DE CÁLCIO**

A investigação dos fosfatos de cálcio (CaPs) tem sido de interesse na pesquisa envolvendo medicina regenerativa, pois a composição química desses compostos exhibe semelhanças com os tecidos ósseos encontrados nos ossos e em dentes, permitindo a manutenção do equilíbrio iônico com os fluidos biológicos (Canillas et al., 2017).

Devido sua natureza bioativa, os fosfatos de cálcio exibem propriedades osteocondutoras importantes sendo capazes, por exemplo, de induzir a formação óssea ou a osteoindução (Eliaz; Metoki, 2017). A finalidade de recobrir biomateriais não bioativos com CaPs é atribuída às propriedades de osteocondução desses compostos, pois elas têm o potencial de aumentar a bioatividade do biomaterial e de promover uma interação mais eficaz entre o material e o tecido hospedeiro (Habraken et al., 2016).

Os fosfatos de cálcio podem ser classificados pelas relações entre cálcio e fósforo (Ca/P), essas classificações são apresentadas na Tabela 1:

**Tabela 1** – Diferentes fases de fosfatos de cálcio por suas razões molares Ca/P.  
Fonte: Adaptado de Eliaz & Metoki, 2017.

| Ca/P        | Composto                      | Abreviação    | Fórmula química                                                  | Solubilidade (g/L) |
|-------------|-------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>2,0</b>  | Fosfato Tetracálcico          | TTCP          | $\text{Ca}_2\text{O}(\text{PO}_4)_2$                             | ~0.0007            |
| <b>1,67</b> | Hidroxiapatita                | HAp           | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$                     | ~0.0003            |
| <b>1,5</b>  | $\alpha$ -Fosfato Tricálcico  | $\alpha$ -TCP | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                     | ~0.0025            |
| <b>1,5</b>  | $\beta$ -Fosfato Tricálcico   | $\beta$ -TCP  | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                     | ~0.0005            |
| <b>1,3</b>  | Fosfato Octacálcio            | OCP           | $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | ~0.0081            |
| <b>1,0</b>  | Fosfato Bicálcico Dihidratado | DCPD          | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                       | ~0.088             |
| <b>1,0</b>  | Fosfato Bicálcico (Monetita)  | DCPA          | $\text{CaHPO}_4$                                                 | ~0.048             |
| <b>0,5</b>  | Fosfato Monocálcico Monohi.   | MCPM          | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$    | ~18                |

A solubilidade dos CaPs influencia diretamente sua degradação em ambiente biológico e é uma das principais diferenças nas propriedades das diferentes fases de fosfatos de cálcio estando relacionada à razão Ca/P; quanto maior a solubilidade, mais rápido o processo de reabsorção. Entretanto, o uso de fosfatos de cálcio em áreas sujeitas a esforços mecânicos é restritivo, pois, quando comparados a outras biocerâmicas, eles apresentam limitações como a tenacidade à fratura e a baixa resistência mecânica (Habraken et al., 2016).

Em termos de síntese de CaPs, vários métodos são reportados pela literatura, incluindo co-precipitação, hidrotérmico, hidrotérmico assistido por micro-ondas e sol-gel (Kokubo; Yamaguchi, 2015). Sendo que, o método de escolha para a formação de CaPs em superfícies de materiais poliméricos é o biomimético (do termo em inglês *Simulated Body Fluid* ou *Synthetic Body Fluid*, SBF), que possibilita uma composição química próxima ao plasma sanguíneo humano e mantida em condições de valor de pH e temperatura fisiológicas. A SBF foi inicialmente empregada por Kokubo et. al. em 1990, com o intuito de avaliar alterações na superfície de materiais vitrocerâmicos bioativos por meio da análise do comportamento *in vitro*. Como resultado foi possível observar a formação de apatitas de baixa cristalinidade, com deficiência de cálcio e de conteúdo de carbonatado semelhante à “apatita óssea”. Desta forma, foi comprovado que quando a apatita está nucleada ela pode crescer espontaneamente no ambiente em que está sendo adicionada (Abe; Kokubo; Yamamuro, 1990; Kokubo, 1990). É possível alterar as

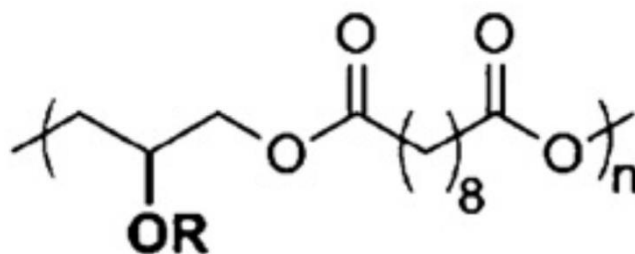
concentrações iônicas e realizar um estudo sobre a influência de certos íons na formação de fosfatos de cálcio (Abe; Kokubo; Yamamuro, 1990; Tas, 2000).

A mineralização biomimética por meio de imersão em solução SBF de biomateriais poliméricos, como ácido polilático (PLA), ácido polilático-co-glicólico (PLGA), poli(2-hidroxietilmetacrilato) (poli-HEMA), policaprolactona (PCL) e polihidroxialcanoato (PHA) tem sido proposta a fim de avaliar *in vitro* se há alterações nas propriedades biológicas dessas superfícies poliméricas quanto a capacidade de interação óssea (Kepa; Coleman; Grøndahl, 2015).

## 2.6. BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

Existem dois tipos de biomateriais poliméricos biodegradáveis que são utilizados em engenharia tecidual, os polímeros naturais e os sintéticos. Polímeros naturais, como os polissacarídeos (amido, alginato, quitina/quitosana, derivados de ácido hialurônico etc.) ou as proteínas (soja, colágeno, fibrina, fibroína etc.) proporcionam excelente aderência e crescimento celular (Aoki; Saito, 2020).

Polímeros sintéticos têm como base poliésteres, como o PLA, ácido poliglicólico (PGA), poli (glicerol sebacato) (PGS), PCL, PLGA. Estes polímeros podem ser produzidos com uma estrutura personalizada e a taxa de degradação pode ser controlada com facilidade, porém, possuem a desvantagem de ter pouca bioatividade (Chocholata; Kulda; Babuska, 2019). A Figura 1 apresenta a estrutura de nosso material polimérico de estudo:



**Poli (Glicerol Sebacato)**

**Figura 1** – Estrutura química do material de estudo neste trabalho, o Poli (Glicerol Sebacato). Traduzido e reutilizado com permissão de Rai, et al. 2012. Copyright © 2012 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

A utilização de polímeros como biomateriais teve origem entre as décadas de 1930 e 1940, sendo consolidada por meio da aplicação do nylon como componente em fios de sutura. Naquele contexto, o entendimento acerca de questões como toxicidade, processos de esterilização, reações imunológicas, inflamações e biodegradação desses biomateriais era limitado. Com o avanço tecnológico e a aquisição de conhecimentos sobre os princípios de biodegradabilidade e biocompatibilidade, esses materiais passaram a conquistar espaço no campo da medicina (Aoki; Saito, 2020).

Polímeros de origem natural, incluindo polissacarídeos e proteínas, desempenham papel importante nos sistemas orgânicos vivos. Sua composição química única tem a capacidade de estimular processos celulares, tornando sua relevância biológica ainda mais significativa do que a dos polímeros sintéticos. Essas macromoléculas, quando isoladas, encontraram aplicação na criação de estruturas de suporte, conhecidas como *scaffolds*, para a engenharia de tecidos. Frequentemente, são combinadas com polímeros sintéticos a fim de aprimorar a interação biológica dos biomateriais e garantir sua estabilidade mecânica. A junção de polímeros sintéticos e naturais resulta em uma classe de materiais com propriedades mecânicas aprimoradas e biocompatibilidade semelhante à que cada tipo de polímero apresentada individualmente. Essa categoria emergente é referida como "materiais poliméricos bioartificiais ou biosintéticos" (Ratner, 2013).

Quando exibem características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, os polímeros sintéticos podem ser classificados como biopolímeros. Eles oferecem vantagens em relação aos polímeros naturais, incluindo a capacidade de controlar a taxa de degradação, a facilidade de modificar suas propriedades químicas e o alcance de características mecânicas satisfatórias, como alta resistência à tração, dureza e capacidade de alongamento. Especificamente, os polímeros sintéticos de natureza hidrofílica, quando empregados em aplicações biomédicas, têm o potencial de interagir com sistemas biológicos de maneira eficaz. Isso ocorre devido à presença de um ambiente químico que demonstra afinidade pelo microambiente celular (Pérez et al., 2013).

## **2.7. POLI (GLICEROL SEBACATO)**

Bioelastômeros, que exibem biodegradabilidade e elasticidade semelhante à borracha, têm sido amplamente utilizados em várias aplicações biomédicas (Yu et al., 2023). O Poli (Glicerol Sebacato) (PGS) é um polímero elastomérico biodegradável

obtido por meio de uma reação de polimerização por policondensação a partir de precursores equimolares de glicerol e ácido sebácico, seguida por reticulação em alta temperatura. Devido à natureza ajustável (que permite a adaptação específica para tecidos das propriedades mecânicas, comportamento de degradação e hidrofilicidade) esse polímero tem sido empregado para a substituição e regeneração de diversos tipos teciduais (Guler et al., 2022) e tem recebido considerável atenção no campo biomédico desde que foi sintetizado pela primeira vez, em 2002, principalmente, devido às suas propriedades elásticas ajustáveis, biodegradabilidade linear e biocompatibilidade (Yu et al., 2023).

Além disso, o PGS apresenta um baixo módulo de elasticidade (0,3 Mpa) e uma alta taxa de reabsorção (menos de 4 meses). Para aumentar a resistência mecânica deste polímero, nanopartículas ou micropartículas têm sido amplamente utilizadas em materiais nanocompósitos (Atari; Labbaf; Javanmard, 2023; Sha et al., 2021; Wang et al., 2019).

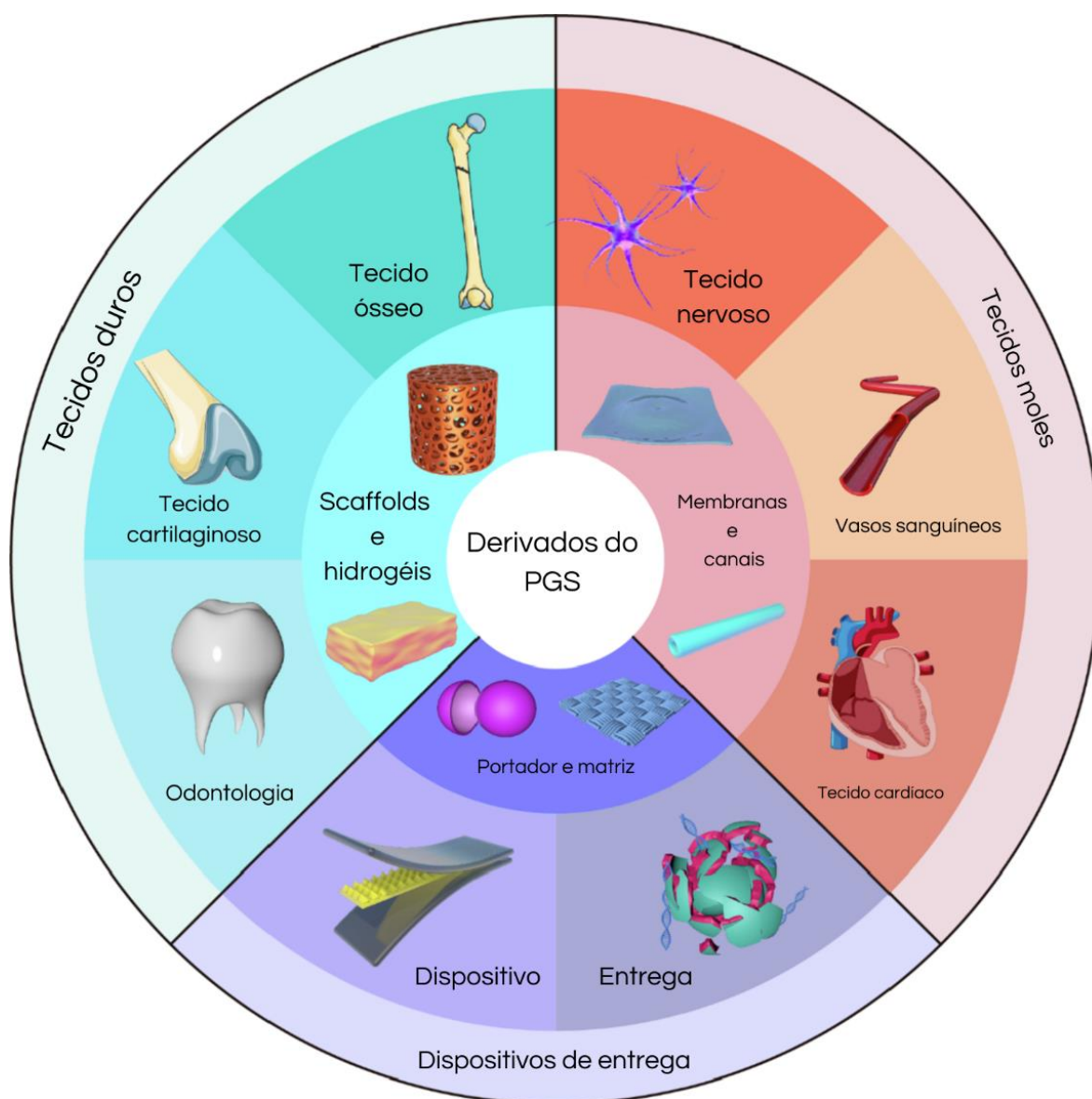
Diversas pesquisas que empregam o PGS demonstraram, consistentemente, que este polímero é não imunogênico e não citotóxico *in vitro*, induzindo apenas uma resposta inflamatória mínima com formação reduzida de cápsula fibrosa *in vivo* (Guler et al., 2022). Graças às propriedades mecânicas adaptáveis e comportamento de degradação (que podem ser ajustados para atender requisitos específicos) o PGS solidificou sua relevância como um material de suporte crucial, particularmente, na regeneração de tecidos moles como miocárdio, vasos sanguíneos, córnea e tecido nervoso (Kemppainen; Hollister, 2010). Ao longo dos anos, os biomateriais baseados em PGS têm sido cada vez estudados em aplicações de liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos, abrangendo domínios como cardíaco e cardiovascular, cicatrização de feridas e pele, regeneração de tecidos nervosos, órgãos como córnea e tecidos orais, sistemas musculoesqueléticos, tecido adiposo, cartilagem, dentes e osso, além de encontrar utilidade em aplicações bioeletrônicas em tecidos moles (Krook et al., 2020; Lee et al., 2018; Vogt et al., 2021).

Nos diversos campos biomédicos, o propósito fundamental ao utilizar biomateriais é respaldar, aprimorar ou substituir tecidos lesados, acelerar ou cumprir a regeneração e reintegrar funções físicas e biológicas (Li et al., 2013). Entre as várias características do PGS (Figura 2), o desempenho mecânico, as propriedades de hidratação e as funcionalidades emergem como os três aspectos mais críticos, considerados essenciais para aprimoramentos em aplicações bem-sucedidas (Liang et al., 2020). As

propriedades mecânicas frequentemente exercem impactos diretos na funcionalidade dos biomateriais implantados e, por isso, são identificadas como máxima prioridade para aprimoramento (Loh; Abdul-Karim; Owh, 2015). A capacidade de hidratação é outro parâmetro crucial em aplicações biomédicas, pois determina diretamente a estabilidade mecânica, os perfis de degradação e as características biológicas das implantações sob um ambiente fisiológico dinâmico (Ogueri et al., 2019). Além disso, a funcionalidade, referente à habilidade do biomaterial implantado de facilitar o processo de cicatrização ou outros procedimentos, também tem conquistado significativa atenção por parte da literatura (Sha et al., 2021).

O PGS é obtido por meio de uma reação de polimerização por policondensação. Essa síntese ocorre em duas etapas principais: a primeira envolve a reação entre o glicerol e o ácido sebácico para formar um oligômero de precursores reativos (etapa de pré-polimerização); a segunda etapa inclui a polimerização desses oligômeros para formar as cadeias poliméricas (etapa de cura). A polimerização do PGS pode ser controlada por parâmetros primários e secundários como temperatura de reação, pressão, tempo, proporções dos reagentes glicerol e ácido sebácico. Desta forma, o controle da esterificação da cadeia do polímero e a formação de ligações cruzadas intermoleculares permite propriedades mecânicas e a taxa de degradação ajustável, tornando-o altamente adaptável para diferentes aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos (Godinho; Gama; Ferreira, 2022).

A Figura 2 apresenta as principais aplicações dos derivados de PGS em engenharia de tecidos, desde a aplicação em tecidos moles (tecido nervoso, tecido cardíaco e vasos sanguíneos), tecidos duros (tecido ósseo, tecido cartilaginoso e odontologia) e atuando como dispositivos de entrega.



**Figura 2** – Aplicações dos derivados de PGS em sistemas biológicos. Traduzido e reutilizado com permissão de Sha, et al. 2021. Copyright © 2021 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

Além de possuir rotas de síntese flexíveis, o PGS é altamente modelável, ou seja, é possível adaptarmos a estrutura deste polímero a fim de direcionarmos sua aplicação. As mudanças mais utilizadas são na forma densa e na forma porosa. A primeira síntese de PGS na forma densa foi descrita por Wang, et al. em 2002, onde era composta por duas etapas de aquecimento.

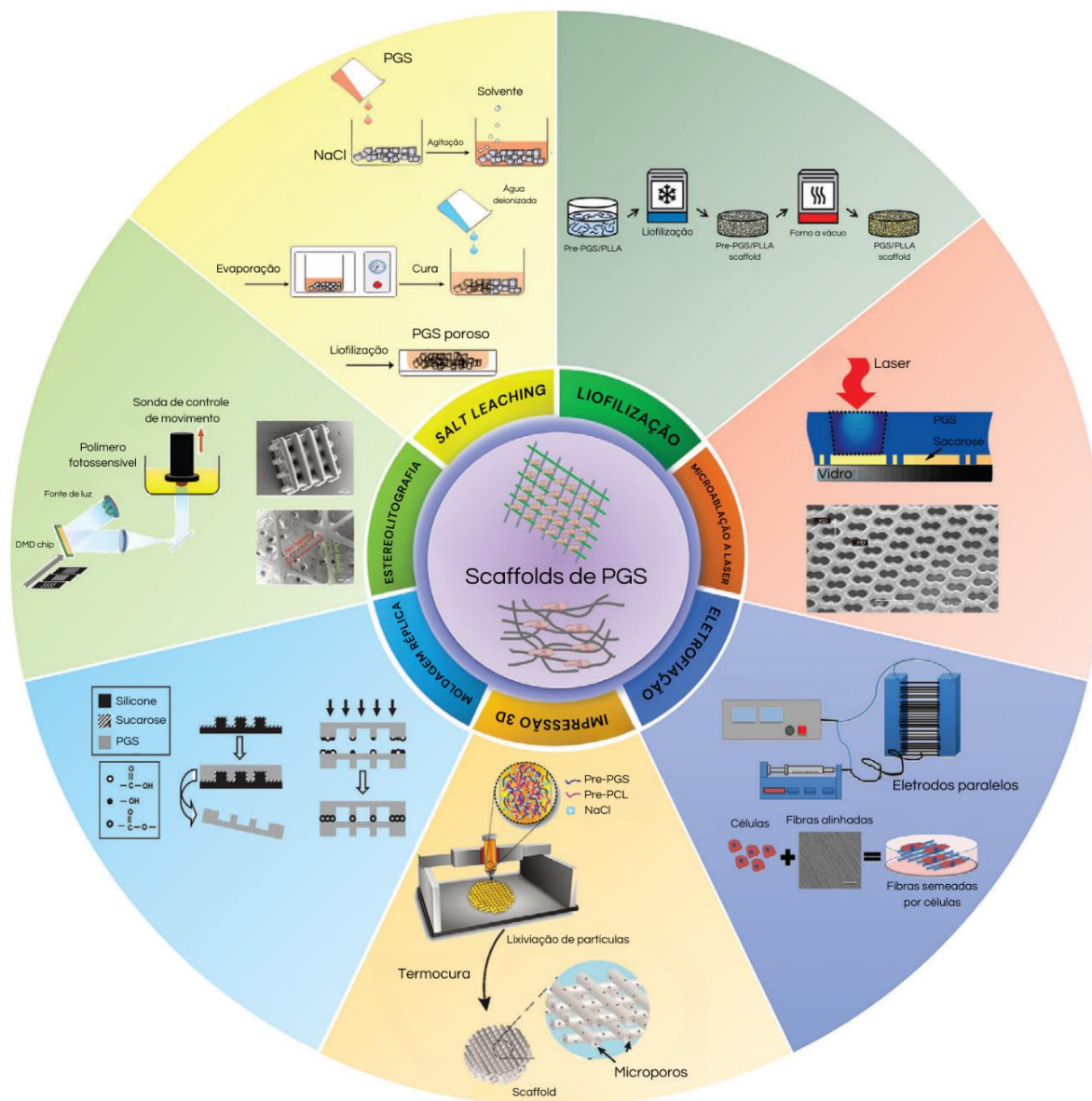
Neste método, o pré-polímero de PGS (pre-PGS) é sintetizado a partir de uma relação equimolar de glicerol e ácido sebácico sob aquecimento à 110-140 °C por 24-48 horas e seguido por aquecimento em vácuo por 0-48 horas, resultando em um pre-PGS

branco e com consistência de cera à temperatura ambiente. Então, o pre-PGS é levado para a segunda etapa de cura na estufa à 110-150 °C entre 7,5-168 horas (Wang et al., 2002; Yu et al., 2023). Outros métodos de síntese do PGS já foram apresentados de forma a obter um menor gasto energético, um deles é a etapa de síntese do pre-PGS assistida por micro-ondas com parâmetros de controle quanto à potência (150 a 650 W), temperatura (130 a 140 °C) e tempo (3 minutos até 3h) (Aydin et al., 2013; Lee et al., 2018).

As propriedades desejáveis dos *scaffolds* poliméricos não são apenas influenciadas pelas características do polímero sintetizado, mas também, dependentes da seleção do processo de fabricação (Haider et al., 2020; Wu et al., 2021a). Sendo que as principais de técnicas de manufatura de *scaffolds* de PGS podem ser resumidas pela Figura 3, como *salt leaching*, liofilização, impressão 3D, eletrofiação, microablação à laser, moldagem réplica e estereolitografia (Wu et al., 2021a).

Apesar das diferentes técnicas de fabricação utilizadas para a obtenção de *scaffolds*, múltiplas opções de tratamento clínico estão disponíveis para a recuperação de tecidos danificados. Contudo, nenhuma delas demonstrou ser totalmente satisfatória em termos de alcançar resultados regenerativos ideais ou a restauração completa e permanente da função. Dentre essas dificuldades, pode ser ressaltado a dificuldade em se obter uma matriz polimérica porosa com um controle adequado de parâmetros geométricos, bem como número, tamanho e interconectividade de poros (Li; Kaplan; Zreiqat, 2014).

Dentre elas, vale ressaltar o processo de obtenção de *scaffolds* porosos de PGS pelo método de *salt leaching*, onde ocorre a adição de um agente porogênico em que o polímero é vertido sobre partículas de Cloreto de Sódio (NaCl) com a utilização de um solvente, sendo o tetraidrofurano (THF) mais reportado pela literatura (Gao; Crapo; Wang, 2016). Em controversa, o THF é conhecido por acarretar impactos na saúde humana e animal, mesmo que minimamente (Fowles et al., 2013). Desta forma, outros solventes vêm sendo estudados para a solubilização do PGS, como acetona, isopropanol e ácido acético (Chang et al., 2021; Piszko et al., 2021, 2023; Rai et al., 2012; Wu et al., 2021).



**Figura 3** – Técnicas de fabricação de scaffolds de PGS. Traduzido e reutilizado com permissão de Wu, et al. 2021. Copyright © 2021 Wiley-VCH GmbH Todos os direitos reservados.

## 2.8. NANOTECNOLOGIA

A palavra "nanomaterial" significa um material natural, incidental ou fabricado, composto por partículas sólidas que estão presentes, seja por si próprias ou como partículas constituintes identificáveis em agregados ou aglomerados, e onde 50% ou mais dessas partículas na distribuição de tamanhos baseada em número atendem a pelo menos uma das seguintes condições:

(a) uma ou mais dimensões externas da partícula estão na faixa de tamanho de 1 nm a 100 nm;

(b) a partícula tem uma forma alongada, como uma haste, fibra ou tubo, onde duas dimensões externas são menores que 1 nm e a outra dimensão é maior que 100 nm;

(c) a partícula tem uma forma semelhante a uma placa, onde uma dimensão externa é menor que 1 nm e as outras dimensões são maiores que 100 nm.

Na determinação da distribuição de tamanhos baseada em número das partículas, não é necessário considerar partículas com pelo menos duas dimensões externas ortogonais maiores que 100  $\mu\text{m}$ . No entanto, um material com uma área superficial específica por volume inferior a 6  $\text{m}^2/\text{cm}^3$  não deve ser considerado um nanomaterial (Comissão Européia, [s.d.])

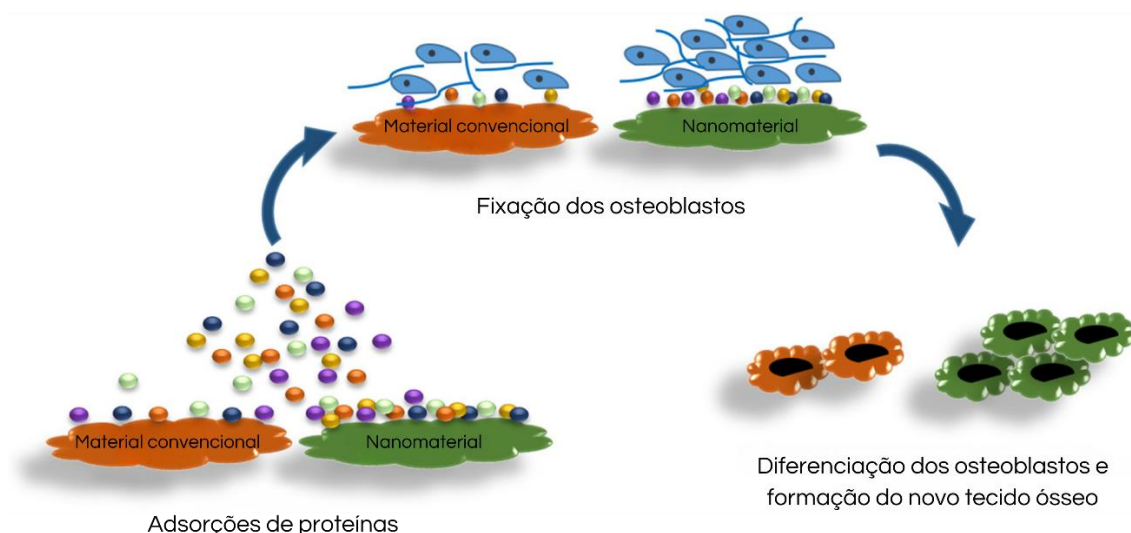
A nanotecnologia é uma área de estudo e aplicação que se concentra na capacidade de transformar os princípios da nanociência em aplicações práticas. Isso é realizado por meio da observação, medição, manipulação, montagem, controle e fabricação de materiais em escala nanométrica. Nos Estados Unidos, a *National Nanotechnology Initiative* (NNI) aponta aplicações inovadoras em diversas áreas, abrangendo desde a química, física e biologia até a medicina, engenharia e eletrônica.

O uso e a integração da nanotecnologia e da ciência dos materiais na área médica tiveram um crescimento acelerado devido às oportunidades que podem oferecer nas terapias atuais. A combinação da nanotecnologia com biomateriais permite reparar, detectar e tratar danos e doenças em níveis celulares e moleculares e, ainda, se revela como uma ferramenta valiosa no desenvolvimento e teste de compostos farmacêuticos, oferecendo uma alternativa e/ou complemento aos experimentos em animais (De-Bartolo; Salerno, 2017).

A aplicação de nanomateriais na medicina está constantemente aprimorando as técnicas e instrumentações tradicionais de análise. Isso se deve ao fato de que o uso de técnicas de diagnóstico baseadas em nanopartículas oferece sensibilidade, especialmente no que diz respeito ao diagnóstico precoce de câncer. Por exemplo, quando uma nanopartícula é altamente seletiva na marcação de células neoplásicas e essa marcação é detectada por meio de métodos de imagem ou outras técnicas analíticas altamente sensíveis, isso aumenta significativamente as chances de um paciente ser curado da

doença sem que ela atinja estágios mais avançados (Cancino; Marangoni; Zucolotto, 2014).

Nanomateriais também são explorados para aplicações em bioimplantes (Figura 4) devido suas propriedades de superfície ajustáveis e natureza bioativa. Esses nanomateriais proporcionam uma área de superfície ampliada, rigidez eficaz, rugosidade e propriedades físico-químicas alteradas que aprimoram a aderência, a proliferação, a síntese de proteínas relacionadas aos ossos e, ainda, a deposição de minerais contendo cálcio. Considerando que os nanomateriais podem imitar as proporções dos componentes constituintes do osso biológico, eles se destacam como candidatos promissores para uso em implantes ortopédicos (Kumar et al., 2020).



**Figura 4** – Apresentação esquemática da regeneração óssea utilizando materiais convencionais e nanomateriais. Traduzido e reutilizado com permissão de Kumar, et al. 2019. Copyright © 2019 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

O avanço no desenvolvimento de materiais multifuncionais para o reparo do tecido ósseo tem despertado o interesse no uso de nanomateriais com propriedades antimicrobianas para prevenir e tratar infecções (Monte et al., 2023) . Devido ao amplo espectro antibacteriano as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente utilizadas para o recobrimento de superfície em odontologia, lentes de contato, *stents* cardiovasculares, próteses ortopédicas e cimentos ósseos (Wang et al., 2020).

No contexto da discussão de nanoregulação e da nanotoxicidade, as estratégias globais de regulação na área da nanotecnologia enfatizam a importância do autorregulamento como um primeiro passo para o desenvolvimento de legislações específicas relacionadas a nanoproductos. As agências reguladoras internacionais têm alcançado êxito ao implementar regulamentações voltadas para a segurança ocupacional e a minimização do impacto ambiental associado aos nanomateriais (Riccardi; Gastaldi, 2013).

## **2.9. NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm propriedades distintivas, que incluem estabilidade química, alta condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, produção em larga escala e capacidade antimicrobiana contra bactérias, vírus, fungos e protozoários; essas propriedades explicam o motivo de tais nanopartículas serem amplamente pesquisadas e utilizadas na esfera industrial e comercial (Câmara; Viana; Viana, 2021; Durán et al., 2018; Pal et al., 2017; Shaaban; Zayed; Salama, 2023).

Na literatura, existem vários métodos de síntese de nanopartículas que podem ser produzidas por meio de abordagens físicas, químicas e biogênicas (Duran; Seabra, 2018). Os métodos químicos, por exemplo, envolvem a redução de íons  $\text{Ag}^+$  na presença de um agente redutor apropriado, resultando na formação de uma dispersão coloidal de nanopartículas metálicas. Já as rotas físicas tendem a ser demoradas, dispendiosas e podem apresentar riscos. Em contraste, a abordagem biogênica é considerada uma alternativa de baixo custo, ecologicamente correta, realizada à temperatura e pressão ambiente, tipicamente em meio aquoso, e não gera resíduos químicos tóxicos (Câmara; Viana; Viana, 2021).

Considerada uma ferramenta significativa para reduzir impactos negativos associados aos métodos tradicionais de síntese de nanopartículas, frequentemente empregados em laboratórios e na indústria, a síntese verde tem a capacidade de incorporar materiais biológicos diversos, como fungos, bactérias, algas e extratos de plantas, proporcionando uma alternativa viável, eficaz e escalonável (Singh et al., 2018).

A síntese verde compreende três etapas principais: a escolha de um solvente adequado, a seleção de um agente redutor ecologicamente sustentável e o uso de substâncias não tóxicas para estabilizar as AgNPs produzidas (Câmara; Viana; Viana,

2021). A caracterização das nanopartículas desempenha um papel fundamental, fornecendo informações como tamanho, forma e distribuição das partículas, que são essenciais para determinar suas aplicações (De Brito et al., 2020; Khalil; Mohamed; El-Naggar, 2021; Khan et al., 2023). Esses dados permitem uma avaliação detalhada dos mecanismos de formação, eficácia dos agentes redutores e estabilizantes, bem como das condições de preparação, proporcionando um maior controle sobre o processo de síntese das nanopartículas (Kischkel et al., 2020; Leong et al., 2022; Park et al., 2014; Rosman et al., 2021).

Na síntese verde, substâncias bioativas menores, como flavonoides, polifenóis, terpenoides e alcaloides, desempenham um papel vital na formação de nanopartículas. As nanopartículas produzidas por meio da tecnologia verde são mais vantajosas em comparação com métodos físicos e químicos. A síntese verde de nanopartículas requer menos energia, é ecologicamente amigável e não tóxica. Além disso, ela apresenta a mais alta estabilidade e um procedimento menos complexo (Khan et al., 2023).

## **2.10. PRÓPOLIS VERMELHA**

A busca por novos agentes farmacêuticos ativos tem avançado com o uso de novas tecnologias, como as NPs. A síntese biogênica de NPs, como a empregada neste estudo, busca desenvolver produtos e processos associados à sustentabilidade usando materiais e métodos não tóxicos. A própolis é um composto produzido principalmente pelas abelhas (*Apis mellifera L.*) a partir de matéria-prima coletada de plantas. A própolis é explorada na medicina natural para o tratamento de várias doenças e exibe atividades biológicas devido à presença de metabólitos secundários de plantas no exsudato coletado pelas abelhas. Esses metabólitos incluem ácidos fenólicos, éteres fenólicos, hidrocarbonetos, álcoois, ácidos alifáticos e aromáticos, aldeídos, cetonas, flavonoides, ácidos graxos, ésteres e seus derivados, terpenoides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas, minerais, ácidos cinâmicos e artepilina C, que mostram atividade antioxidante e podem atuar como agentes redutores e estabilizadores de NPs (Ferreira et al., 2017; Kischkel et al., 2020).

Produzida por abelhas a partir de resinas coletadas de plantas, a própolis é uma substância resinosa utilizada por esses insetos para vedar cavidades em suas colmeias, proporcionando uma proteção adicional. A composição da própolis varia dependendo da

região geográfica e do momento em que é coletada, podendo incluir uma variedade de componentes como álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, minerais, ésteres, ácidos fenólicos, flavonoides, diterpenos, sesquiterpenos, aldeídos aromáticos, lignanas e ácidos graxos (Batista et al., 2012). Alguns estudos comprovam que a própolis vermelha apresenta características de atividades antiinflamatórias, antioxidantes, analgésicas, antitumorais, antibacterianas além de efeito cicatrizante e outros benefícios (Albuquerque-Júnior et al., 2009; Alencar et al., 2007).

A própolis brasileira apresenta compostos químicos únicos quando comparada à de outros países. Isso se deve, em grande parte, à rica diversidade de plantas e à variedade de espécies de abelhas encontradas no Brasil, muitas das quais resultam de cruzamentos entre espécies europeias e africanas. Por meio de análises físico-químicas, foram identificados catorze tipos de própolis no Brasil (Ferreira et al., 2017).

Dentre esses tipos, a própolis vermelha, originária das florestas de mangue no Norte e Nordeste do Brasil, tem recebido grande destaque e exploração nos últimos anos (Barreto et al., 2022); além disso, existem diversos estudos que comprovam a presença de nanopartículas de prata em sua composição (Barbosa et al., 2019; Barsola; Kumari, 2022; Do Nascimento et al., 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento de membranas compósitas de Poli (Glicerol Sebacato) (PGS) com a deposição biomimética de fosfatos de cálcio (CaP) de interesse biológico e incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) para regeneração tecidual óssea.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a síntese do polímero de PGS em seu formato denso e esponja com as devidas proporções;
- Padronizar o método SBF e incorporação do método sobre a superfície das membranas de PGS;
- Padronizar a síntese biogênica de AgNPs e incorporação delas nas superfícies das membranas de PGS;
- Desenvolver as membranas densas e esponjas de PGS tratadas com solução SBF e incorporadas com AgNPs;
- Avaliar a estrutura macro e micro visual de todos os grupos de membranas de PGS por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a composição química de todos os grupos de membranas de PGS por espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier por refletância total atenuada;
- Avaliar o comportamento de grau de intumescimento e degradação hidrolítica de todos os grupos das membranas de PGS;
- Avaliar o comportamento das membranas controle e PGS/CaP no ensaio mecânico de compressão;
- Avaliar o comportamento das membranas controle e PGS/CaP em testes de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- Avaliar o comportamento de todos os grupos de PGS em ensaios biológicos de citotoxicidade para a viabilidade celular;
- Avaliar as características das AgNPs para comprovar a síntese, e realizar os ensaios de liberação *in vitro* para as membranas PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs.

## 4. METODOLOGIAS

### 4.1. SÍNTESE DO POLÍMERO PGS

O estudo dos parâmetros de síntese do polímero PGS foi realizado inicialmente por avaliação das características macrovisuais no material obtido em duas etapas: (1) pré-policondensação (pré-polímero de PGS) e (2) cura (*crosslinking* do polímero PGS). Desta forma, foram avaliados a variação da quantidade molar entre glicerol e ácido sebácico (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1), o tempo de síntese do pré-polímero de PGS por forno micro-ondas (3, 5 e 10 minutos) e o tempo de etapa de cura em estufa (24 e 48h) à 150 °C. O melhor resultado macro visual da membrana de PGS com as variações de condições, foi o escolhido para a aplicação.

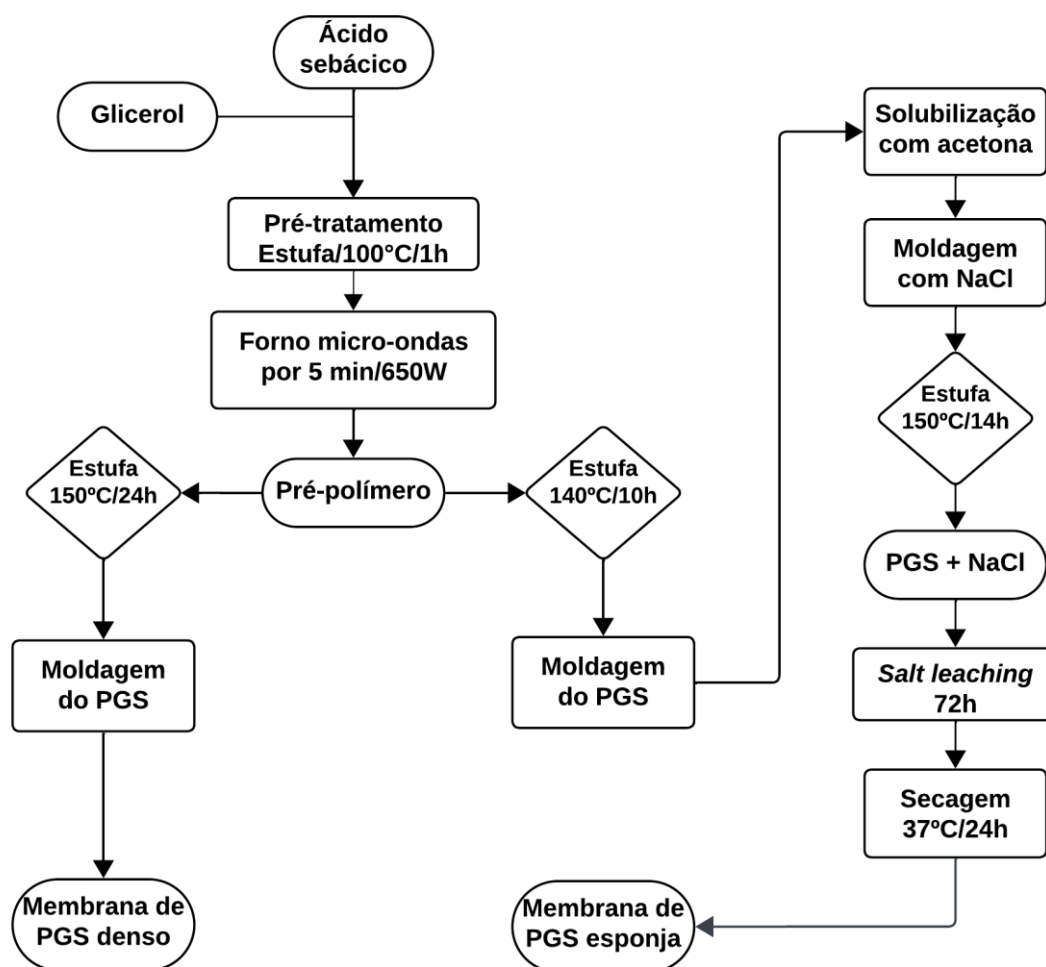
### 4.2. OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE PGS DENSA E ESPONJA

Para a obtenção das membranas, quantidades 1:1 de monômeros de glicerol (99,5%, *Synth*) e ácido sebácico (99%, *Aldrich Chemistry*) respectivamente, foram pesados separadamente em béqueres (25 ml). Os reagentes foram pré-aquecidos à 100 °C/1h em uma estufa (SX 1.2 DTME, n° 0253, *Sterilifer Ind. e Com. LTDA*). Após esta etapa, as quantidades de glicerol e ácido sebácico foram misturadas e submetida a pré-policondensação forno micro-ondas (Electrolux, n° 64610530, modelo ME28S) operado à 650W. A irradiação foi aplicada interminavelmente por 5 minutos com intervalos de 10 segundos, onde o vapor formado foi removido ao abrir a porta do forno e nenhum catalizador ou reagente foi utilizado nesta etapa.

Para a obtenção das membranas de PGS densa, o pre-PGS obtido foi transferido para o molde de silicone e a etapa de cura foi conduzida à 150 °C por 24h.

Para a obtenção da esponja de PGS, o pre-PGS é transferido para aquecimento na estufa no béquer, e a etapa de cura foi conduzida à 140 °C por 10h. Posteriormente, o PGS foi solubilizado com 9 ml de acetona (99,7% *LS Chemicals*) e vertido no molde de silicone previamente preenchido com 9,4g de NaCl (99%, *Sigma Aldrich*). A cura completa do material foi conduzida em estufa à 150 °C por 14h. Após, o agente porogênico (NaCl) foi removido por processo de *salt leaching*, ou seja, imerso em água destilada sob agitação por 72h, com troca de o solvente a cada 24h. Então, a esponja de PGS foi seca em estufa à 37 °C/24h.

O processo de síntese do PGS e obtenção de membranas densa e esponja pode ser resumido no fluxograma apresentado pela Figura 5:



**Figura 5** – Fluxograma do processo de síntese das membranas de PGS denso e esponja.

#### 4.3. PREPARO DE SOLUÇÕES SBF

As soluções de fluido corpóreo simulado (SBF) foram preparadas segundo a metodologia padrão de Abe et al., (1990) e modificadas por Tas (2000) e Thomazini (2009). As composições e ordem de adição dos sais estão descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2** – Concentrações iônicas das diferentes soluções SBF utilizadas (mmol.dm<sup>-3</sup>).

|             | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Cl <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
|-------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>SBF0</b> | 142,0           | 5,0            | 1,5              | 2,5              | 147,8           | 1,0                            | 0,5                           | 4,2                           |
| <b>SBF1</b> | 142,0           | 5,0            | 1,5              | 2,5              | 125,0           | 1,0                            | 0,5                           | 27,0                          |
| <b>SBF2</b> | 140,4           | -              | -                | 2,5              | 142,0           | 1,86                           | -                             | -                             |

**Tabela 3** – Sequências de adições dos sais nas soluções de SBF e sua quantidade respectiva.

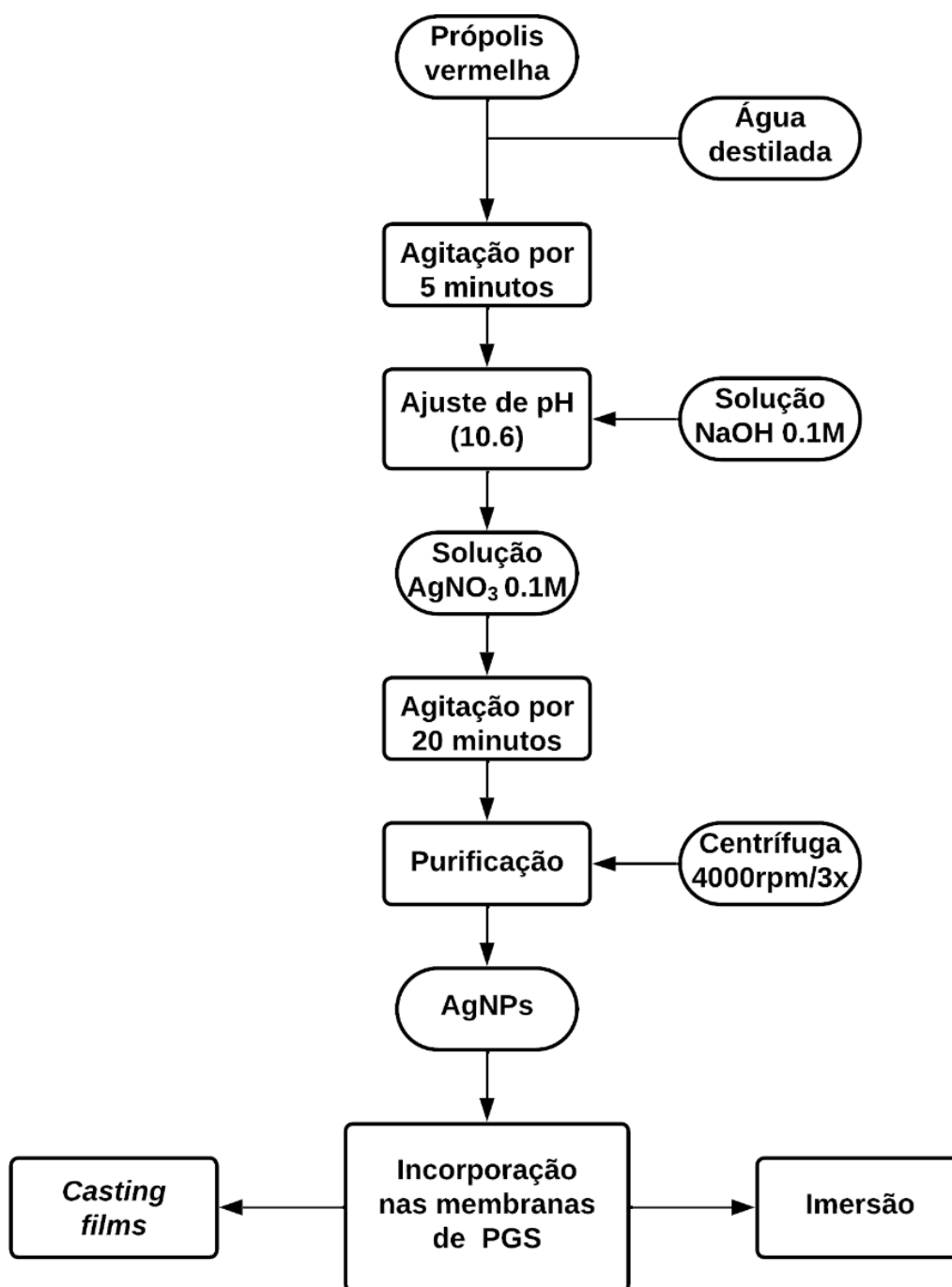
| <b>SBF0</b><br>(Abe et. al., 1990) |                                                    |                 | <b>SBF1</b><br>(Tas, 2000) |                                                    |                 | <b>SBF2</b><br>(Thomazini, 2009) |                                                    |                 |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
|                                    | <b>Substância</b>                                  | <b>Qnt. (g)</b> |                            | <b>Substância</b>                                  | <b>Qnt. (g)</b> |                                  | <b>Substância</b>                                  | <b>Qnt. (g)</b> |
| <b>1</b>                           | NaCl                                               | 8,003           | <b>1</b>                   | NaCl                                               | 8,003           | <b>1</b>                         | NaCl                                               | 8,202           |
| <b>2</b>                           | NaHCO <sub>3</sub>                                 | 0,335           | <b>2</b>                   | NaHCO <sub>3</sub>                                 | 2,269           | <b>2</b>                         | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                   | 0,331           |
| <b>3</b>                           | KCl                                                | 0,224           | <b>3</b>                   | KCl                                                | 0,224           | <b>3</b>                         | HCl (ml)                                           | 40              |
| <b>4</b>                           | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 0,174           | <b>4</b>                   | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 0,174           | <b>4</b>                         | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O               | 0,456           |
| <b>5</b>                           | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                    | 0,071           | <b>5</b>                   | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                    | 0,071           | <b>5</b>                         | NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> | 6,057           |
| <b>6</b>                           | HCl (ml)                                           | 40              | <b>6</b>                   | HCl (ml)                                           | 40              |                                  |                                                    |                 |
| <b>7</b>                           | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O               | 0,368           | <b>7</b>                   | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O               | 0,368           |                                  |                                                    |                 |
| <b>8</b>                           | MgCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O                | 0,305           | <b>8</b>                   | MgCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O                | 0,170           |                                  |                                                    |                 |
| <b>9</b>                           | NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> | 6,057           | <b>9</b>                   | NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> | 6,057           |                                  |                                                    |                 |

O recobrimento das membranas densas e esponjas de PGS foi realizado por uma etapa de pré-tratamento com solução 0.1M de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Hong et al., 2006a) a 36.5±0.5 °C por 72h em banho termostatizado (FANEM, modelo BM 1100, *water bath*). Sendo que foram realizadas trocas de solução à cada 24h. Esta etapa de pré-incubação em solução contendo íons Ca<sup>2+</sup> é considerada importante para garantir a deposição de apatitas na superfície de biomateriais poliméricos, sendo estudada por diversos autores no preparo de membranas compósitas polímero-apatita (Granja et al., 2001; Hong et al., 2006b; Müller et al., 2005; Takeuchi et al., 2003) Posteriormente, as membranas foram imersas nas soluções SBF 0, 1 ou 2 e tratadas à 36.5±0.5 °C por 168h com troca de soluções a cada 48 horas. Após, as membranas passaram pelo processo de secagem à 37 °C por 24h.

#### 4.4. SÍNTESE BIOGÊNICA DE AgNPS E INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE PGS

Para realizar a síntese verde das nanopartículas de prata (AgNPs), 200 µl do extrato alcoólico de própolis vermelha (*Organish Petersen*, Salomon Propolis) foi adicionado em 100 ml de água destilada e mantido em agitação em um agitador magnético (*Heidolph Instruments*, nº 200147553) à 500 rpm por 5 minutos. Então, o ajuste do valor de pH da solução foi realizado com uma solução 0.1M de NaOH (97%, *Qhemis*), sendo o valor aferido com um pHmetro (*Metrohm*, 827 pH lab) até 10,6 (Roy et al., 2010). O controle deste parâmetro pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) no extrato de própolis, que são agentes redutores de íons prata durante a síntese de AgNPs e, portanto, devem ser oxidados em valor de pH alcalino permitindo que elétrons disponíveis sejam doados no processo de redução. Posteriormente, 500 µl de solução 0,1M de AgNO<sub>3</sub> (99,96%, *NEON*) é adicionado e deixado em agitação por 20 minutos.

A suspensão coloidal de AgNPs foi submetida à centrifugação (*Novatecnica*, NT 820) à 4000 rpm por 30 minutos. O *pellet* foi resuspendido em 15 ml de água deionizada e submetido à 3 ciclos de lavagem e centrifugação (Corciovă, 2019). Esta etapa foi realizada para garantir a purificação das AgNPs após a síntese. As AgNPs foram armazenadas sob proteção à exposição da luz. Posteriormente, as AgNPs foram incorporadas nas membranas de PGS por dois métodos: imersão e deposição física por evaporação de solvente. O processo de síntese e incorporação pode ser analisado pelo fluxograma de processos apresentado na Figura 6:

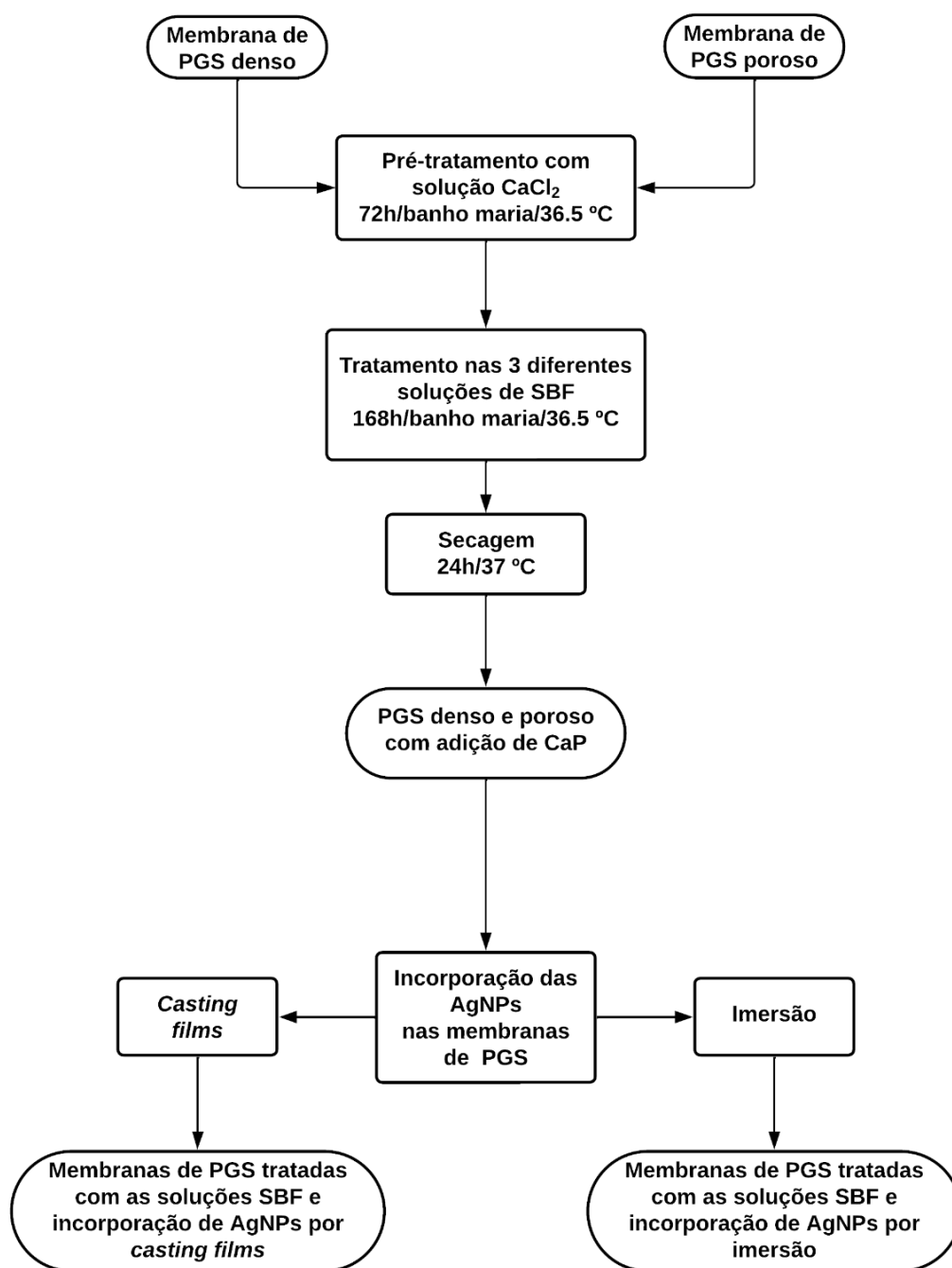


**Figura 6** – Fluxograma do processo de síntese de AgNPs e incorporação nas membranas de PGS.

Para o processo de imersão, as membranas de PGS (densas e esponjas) foram submersas em 10 ml de suspensão de AgNPs e deixadas por 24h em temperatura ambiente, seguida do processo de secagem à 37 °C por 24h. Para o processo de evaporação de solvente foi adicionado 5 ml de suspensão de AgNPs na superfície das membranas de PGS (densas e esponjas), e foram secas à 37 °C por 24h.

#### 4.5. PREPARO DE MEMBRANAS DE PGS/CaPs/AgNPs

A deposição biomimética dos fosfatos de cálcio foi realizada nas membranas densas e esponjas de PGS como descrito no item 4.3 e, sequencialmente, submetidas à incorporação das AgNPs, como descrito no item 4.4. A Figura 7 apresenta o fluxograma geral do processo de obtenção das membranas densas e esponjas de PGS/CaPs/AgNPs.



**Figura 7** – Fluxograma de processos da deposição biomimética de CaPs e incorporação de AgNPs nas membranas de PGS.

#### **4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

A morfologia da superfície das amostras de PGS, PGS/CaPs, PGS/AgNPs e PGS/CaPs/AgNPs foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (FEI, modelo Quanta 200) do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu, IBB-UNESP e também pelo microscópio eletrônico de varredura (FEI, modelo Quanta 400) (FEI Corp, Hillsboro, Oregon, USA) no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/UFSCar).

Em ambos os testes, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio, e recobertas com uma fina camada de ouro para viabilizar a análise, os microscópios foram operados a uma voltagem de 5 e 12,5 kV.

#### **4.7. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO**

As medidas de espectroscopia na região do infravermelho médio por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) centrado no Departamento de Produção Vegetal (DPV) da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Campus de Botucatu – SP. As análises foram realizadas utilizando o espectrofotômetro de infravermelho, Spectrum Two<sup>TM</sup> da PerkinElmer.

#### **4.8. TESTES DE INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA**

Os testes de intumescimento e degradação hidrolítica foram realizados em triplicatas. Para o teste de intumescimento, as amostras foram imersas em 10 mL de solução tampão-fosfato (PBS) com pH de 7,4, por 24h. Em períodos de 1h, 2h, 3h, 6h, 12h e 24h, as amostras eram retiradas da solução fisiológica, colocadas sobre um papel filtro para a retirada do excesso de solução, pesadas e devolvidas para a solução. O cálculo do grau de intumescimento (GI) foi realizado seguindo a relação:

$$GI\% = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $m_f$  é a massa final da amostra e  $m_i$  é a massa inicial da amostra, em gramas.

Após o término dos ensaios de intumescimento, a partir das 24 horas de imersão na solução PBS, se iniciou os testes de degradação hidrolítica. As amostras foram retiradas da solução PBS e imersas em 10 mL de uma nova solução de PBS com pH de 7,4 por 96 horas. Em períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, as amostras eram retiradas, colocadas sobre papel filtro para retirar o excesso, pesadas e devolvidas à solução. O cálculo do índice de degradação (ID) foi realizado seguindo a relação:

$$ID\% = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2)$$

Em que  $m_f$  é a massa final da amostra e  $m_i$  é a massa inicial da amostra, em gramas.

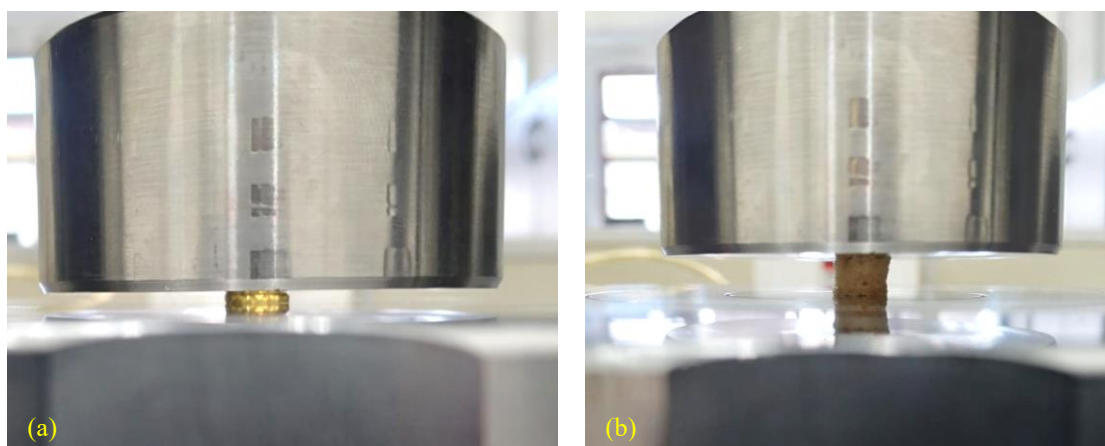
#### 4.9. ENSAIOS MECÂNICOS

A caracterização mecânica do PGS denso controle, esponja controle e PGS/CaP denso e esponja foi realizado por meio de testes de compressão uniaxial, de acordo com a norma ASTM D 695-15. As amostras usadas foram estampadas das placas prensadas e possuíam diâmetro de 8mm e altura de 2 mm para as densas e 7 mm para as porosas (Figura 8), a estampagem foi realizada utilizando um vazador de aço. Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios Instron (Figura 9), modelo 5569, usando uma célula de carga de 500 N, pré carga de 15 N, velocidade de travessa de 1,3 mm/min e utilizando o software Bluehill, 2.15.

A análise comparativa entre os valores médios de módulo elástico foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste Tukey com nível de significância de 0,05.



**Figura 8** – Amostras de 8mm de diâmetro e 2 mm de altura para as densas e 7 mm de altura para as esponjas, que foram utilizados no ensaio de compressão.



**Figura 9** – Amostras submetidas ao ensaio de compressão, (a) densa e (b) esponja.

#### **4.10. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL**

As temperaturas características de transição vítrea ( $T_g$ ) do PGS controle e do PGS/CaP foram avaliados pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para o teste, foi utilizado o equipamento da TA *Instruments*, modelo QS100, com nitrogênio como gás de arraste, em fluxo contínuo de 50 mL/min. As medidas foram realizadas submetendo as amostras ao seguinte procedimento: (a) aquecimento de 10 °C/min de -60 °C até 40 °C; (b) isoterma de 3 minutos; (c) resfriamento a taxa de 10 °C/min até -60 °C; (d) segundo aquecimento à 10 °C/min de -60 até 40 °C.

#### **4.11. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA**

A análise termogravimétrica (TGA) foi empregada a fim de avaliar a estabilidade térmicas das membranas de PGS e PGS/SBF0, bem como determinar o teor de carga incorporado nas mesmas. Para o teste, foi utilizado o equipamento de TA *Instruments*, modelo TGA Q50, à uma taxa de 20 °C/min, a partir da temperatura ambiente até 800 °C, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

#### **4.12. ENSAIOS BIOLÓGICOS**

Para a realização dos ensaios biológicos, inicialmente, foi realizado o condicionamento do meio com os polímeros de PGS, os quais foram colocados em diferentes tubos contendo meio de cultura alpha-MEM, sendo o volume de meio determinado conforme ISO 10993:2012(E). Após essa etapa os tubos foram colocados na estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24h. Em seguida, para realização do teste de viabilidade celular, as células murinas MC3T3-E1 subclone-4 foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em microplacas de 96 poços e cultivadas por 24h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem a semi-confluência, 24h após o plaqueamento, os meios foram filtrados e suplementados com 10% soro fetal bovino (SFB), as células foram então tratadas com os meios condicionados do PGS. Após 24h e 72h, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do sal de tetrazolio (MTT), a absorbância correspondente a cada poço foi determinada por espectrofotometria a 570 nm em leitor de microplacas (Biotek – Sinergy HTX) (Mosmann, 1983).

Os resultados foram realizados em seis replicatas, média  $\pm$  SD e foi utilizado *one-way* ANOVA. Esses ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas, do Instituto de Biociências de Botucatu, IBB-UNESP.

#### **4.13. CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS E AgNPs**

As soluções do extrato alcóolico de própolis vermelha (*Organish Petersen*, Salomon Propolis) foram preparados em um intervalo de concentrações de 0,001 a 0,005 g/l. Os valores de absorbância de cada solução foram medidos entre os comprimentos de onda de 240 nm a 400 nm utilizando o espectrofotômetro BEL Photonics M51. A partir dos espectros, os valores de absorbância nos comprimentos de onda 285 e 424 nm, referente à absorção máxima dos polifenóis presentes na própolis e AgNPs. Os resultados obtidos correspondem à média de três determinações, que foram utilizados para a construção da curva analítica. A equação da reta foi obtida por regressão linear.

#### **4.14. CARACTERIZAÇÕES DAS AgNPs**

As AgNPs foram sintetizadas seguindo os passos descritos no item 4.4 e, logo após, foram caracterizadas com a técnica de UV-Vis utilizando o espectrofotômetro BEL Photonics M51, em parceria com o Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia (DBB), e o equipamento centrado no Laboratório Central Multiusuário (LACEM), da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Campus de Botucatu – SP.

Após, foram submetidas à análise do diâmetro hidrodinâmico (nm) por espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando o equipamento DynaPro Titan, DP-TH-03, vale ressaltar, que os gráficos obtidos pelo DLS foram criados utilizando o software DYNAMICS V6, em parceria com o Departamento de Biofísica e Farmacologia (DBF), e o equipamento centrado no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME), do Instituto de Biociências (IB), Campus de Botucatu – SP.

#### 4.15. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA PRÓPOLIS E AgNPS

A análise da cinética de liberação da própolis vermelha e das AgNPs foram realizadas em triplicatas. Todas as amostras foram pesadas antes da realização dos testes. Após a elaboração das duas curvas padrões, as amostras tratadas com a solução suspensa de AgNPs foram submersas em 10 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9% durante 6 dias. Nos intervalos de tempo de 0h30min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96, 120h e 144h uma alíquota de 3,0 ml foi retirada de cada amostra e analisadas por espectrofotometria na região do UV-Vis para obter a curva de liberação *in vitro* da própolis e AgNPs. A alíquota retirada foi então devolvida na solução de origem após cada leitura. A concentração de própolis vermelha e AgNPs em cada tempo foi determinada pela equação da curva analítica padrão (Item 4.9).

A construção da curva da eficiência de liberação (EF) em porcentagem de própolis vermelha e das AgNPs foi realizado seguindo a relação:

$$EF\% = \frac{C_t}{C_a \times m} \times 100 \quad (3)$$

Em que  $C_t$  é a concentração da solução no determinado tempo,  $C_a$  é a concentração absoluta de própolis vermelha e AgNPs e  $m$  é a massa da amostra.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISE MACROVISUAL

O pré-polímero de PGS (Figura 10.a) apresentou um aspecto esbranquiçado e com uma consistência de cera à temperatura ambiente, evidenciando então o processo de pré-policondensação. A membrana densa de PGS (Figura 10.b), após a etapa de cura, apresentou uma coloração amarelada e com características translúcidas, possuindo boa elasticidade com tendência de retornar à forma original após cessar o esforço aplicado, devido a efeito de memória de forma deste elastômero (Zulkifli et al., 2022). A esponja de PGS (Figura 10.c) apresentou uma coloração amarela/alaranjada, porém, a flexibilidade da membrana é altamente impactada devido ao grande número de poros.

A esponja de PGS se assemelha com a fase porosa do tecido ósseo, obtendo com êxito um material que mimetiza a fase desejada, se tornando um grande potencial de aplicação para a regeneração tecidual óssea.

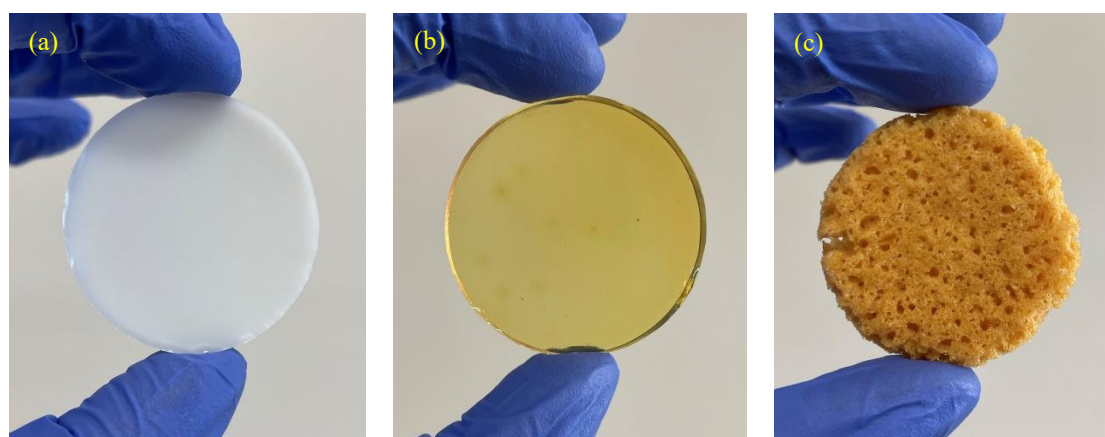
A reparação do tecido ósseo causada por um trauma ou doença é um processo que necessita a busca por abordagens mais eficazes para promover a regeneração óssea. Biomateriais vem sendo desenvolvidos para cumprir este papel, e ganham destaques por contornarem as limitações nas fontes de tecido ósseo e evitarem rejeições imunológicas associadas aos transplantes autógenos e alogênicos (Liang et al., 2020; Sheng et al., 2019). Os elastômeros de PGS tem demonstrado êxito em diversas áreas biomédicas devido à biocompatibilidade, propriedades elásticas e à presença abundante de grupos hidroxila laterais, que podem ser facilmente funcionalizadas (Liang et al., 2020).

Para assegurar uma maior capacidade angiogênica, é interessante a presença de poros no material, que regula e facilita o crescimento celular, integrando os vasos sanguíneos. As técnicas de fabricação desempenham um papel importante na determinação das propriedades físico-químicas e biológicas do *scaffold* (Miri et al., 2016).

A grande vantagem de o PGS possuir característica elastomérica elevada, é a possibilidade da adição de poros em sua superfície, que tornam o material semelhante ao tecido esponjoso ósseo. Esse tecido esponjoso desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade óssea, predominantemente encontrada nas extremidades dos ossos longos e nas regiões centrais dos ossos planos; possui uma arquitetura baseada em um rede tridimensional, formando pequenos espaços interconectados, que são

preenchidos por medula óssea, conferindo resistência e peso relativamente baixo (Phipps et al., 2012).

Com a presença de poros no tecido, são conferidas funções biológicas essenciais, pois estes espaços proporcionam um ambiente propício para o armazenamento de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, contribuindo para a produção de células sanguíneas e metabolismo energético, além de facilitar a difusão de nutrientes, oxigênio e outros elementos para o metabolismo celular. Sendo assim, o desenvolvimento de um *scaffold* que seja capaz de mimetizar essa estrutura óssea se torna de grande interesse para a engenharia de tecidos (Salhotra et al., 2020; Valtanen et al., 2021).

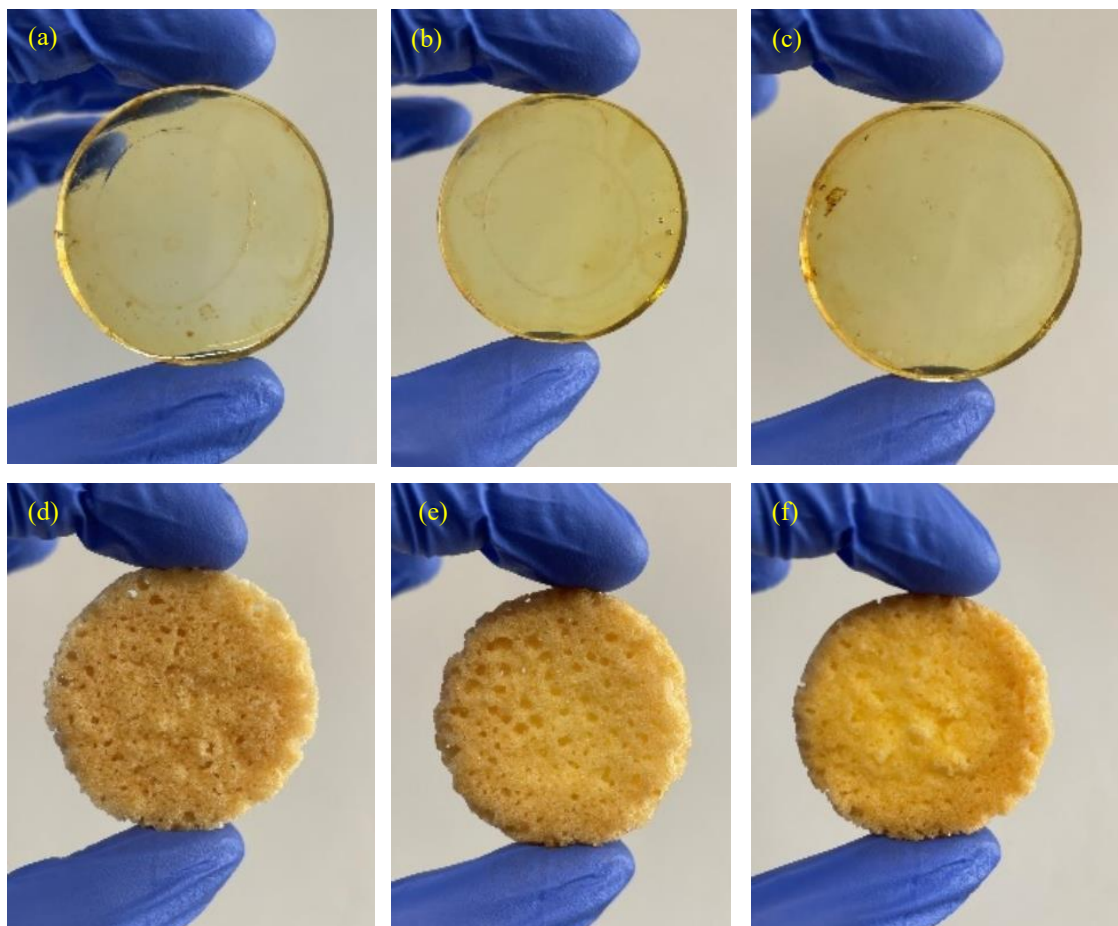


**Figura 10** – Visão macrovisual das membranas de PGS, onde: (a) pré-polímero, (b) densa e (c) esponja.

A notável diferença de estrutura macrovisual do PGS denso para o esponja é evidente, onde podem ser estudados diferentes campos de aplicação do material, que se assemelhem ao seu *design* gerado pela síntese, como por exemplo, aplicações em tecidos nervosos, cartilagosos e dérmicos para o material em formato denso, e ósseo, cardíaco e nervoso para o material esponja (Wu et al., 2021<sup>a</sup>).

Ao ser realizado a deposição biomimética de CaP na estrutura do PGS (denso e esponja) já era esperado que não ocorressem mudanças macrovisuais evidentes, visto que a técnica de SBF é eficiente para uma deposição em escala micrométrica, sendo assim, como apresentado na Figura 11, as membranas tratadas não sofreram mudanças macrovisuais, não foi observado perda de translucidez ou de flexibilidade nas membranas

densas, e nas membranas esponjas a flexibilidade continua comprometida devido ao grande nível de poros ainda presentes em sua estrutura (Wang et al., 2019; Yu et al., 2023; Zaky et al., 2017).



**Figura 11** – Visão macrovisual das membranas de PGS, onde: (a) denso/SBF0, (b) denso/SBF1, (c) denso/SBF2, (d) esponja/SBF0, (e) esponja/SBF1 e (f) esponja/SBF2.

Os materiais poliméricos incorporados com nanomateriais, os nanocompósitos, tem sido amplamente utilizado como revestimento devido suas propriedades únicas provenientes da interação entre materiais em escala nanométrica e as características processáveis e flexíveis dos polímeros. As membranas de nanocompósitos tem como aplicação, por exemplo, em processos de separação de gases e funcionam como membrana de osmose reversa, proporcionando alta seletividade e permeabilidade; além de que, essas membranas são empregadas em embalagens para atender a requisitos específicos de propriedade de barreira (Bonnet et al., 2007; Venkatesh et al., 2021).

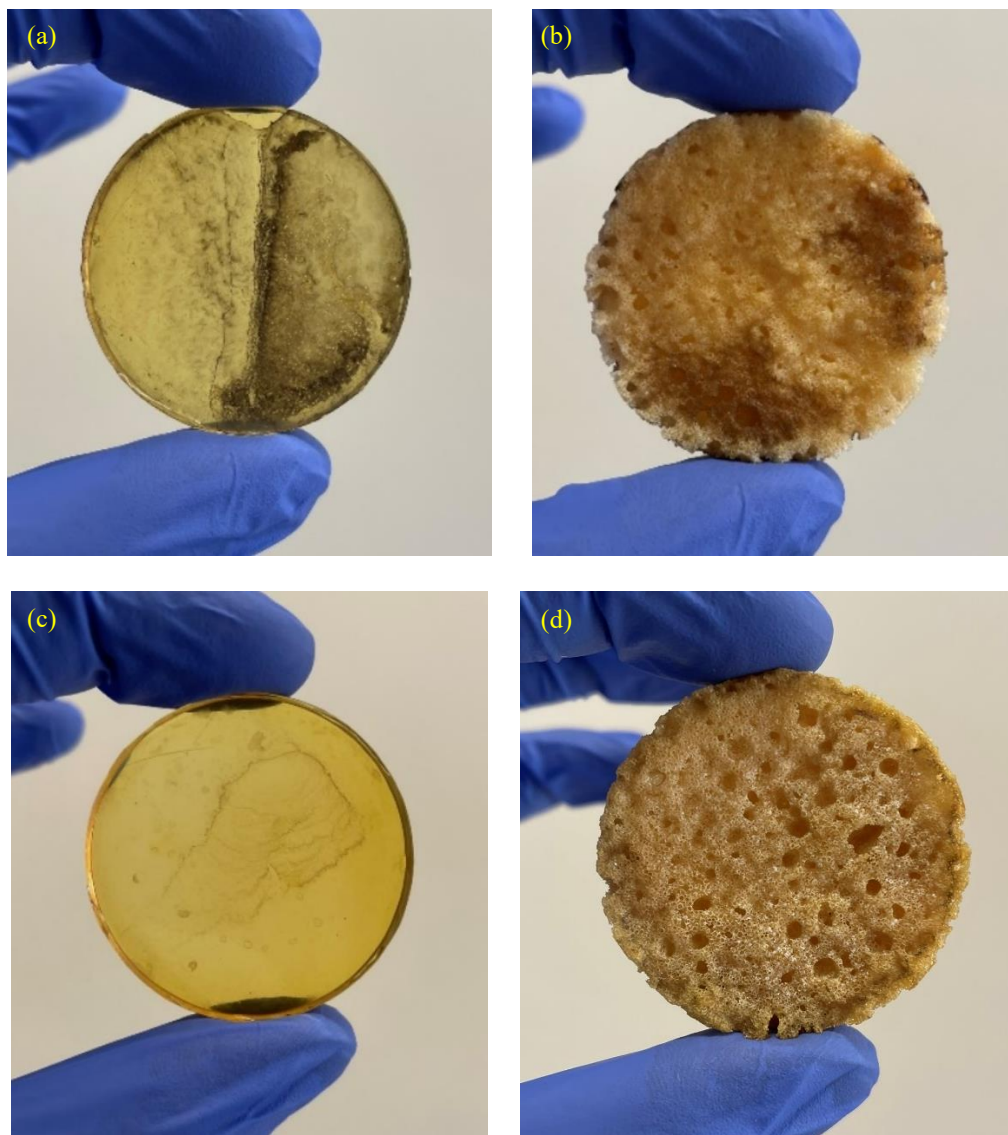
Os métodos convencionais de produção de nanocompósitos enfrentam desafios na fabricação de revestimentos e membranas com frações elevadas de NPs, já que as forças interparticulares intensas e alta área superficial dos materiais em escala nanométrica os tornam propensos à agregação, dificultando etapas de mistura, composição, e produção de filmes finos (Bose et al., 2017; Siegel et al., 2020). Esses métodos convencionais baseados em solução ou fissão são normalmente otimizados para processar misturas com menos de 10% de NPs. A polimerização *in situ*, que envolve a mistura de monômeros e NPs, seguida pela polimerização dos monômeros nos interstícios das NPs, possibilita maiores frações de preenchimentos devido à baixa viscosidade dos monômeros, porém, as NPs podem impedir a polimerização, e muitos polímeros naturais, como polissacarídeos e proteínas, não podem ser polimerizados facilmente a partir de seus monômeros (Bose et al., 2017; Venkatesh et al., 2021).

As membranas poliméricas nanocompósitas altamente carregadas de NPs, que possuem uma fração volumétrica maior que 50%, apresentam melhorias de propriedades, como térmica e elétrica, essenciais para atingir alta condutividade. Deste modo, estes materiais apresentam aprimoramentos significativos em sua condutividade, alcançando ordens de magnitude superiores; um teor de carga mais elevado, resulta em índices de refração mais altos, além de promover melhorias na resistência e tenacidade (Bonnet et al., 2007).

Por exemplo, membranas nanocompósitas poliméricas com elevada proporção de NPs anisotrópicas, que mimetizam a estrutura da ostra, podem apresentar simultaneamente alta resistência, rigidez e tenacidade, tornando-os especialmente adequados para aplicações em revestimento de proteção (Venkatesh et al., 2021).

A Figura 12 apresenta as membranas densas e esponjas de PGS/AgNPs, onde as NPs foram depositadas por métodos de evaporação de solvente e por imersão. Em 12.a e 12.b é visível a deposição por evaporação, porém, como o PGS possui um caráter hidrofóbico, a deposição por evaporação não se torna eficiente em ser homogênea, ela acaba se agregando em regiões específicas do material, produzindo “manchas” pela superfície, porém em nenhuma das membranas foi apresentado mudança de flexibilidade, elas permanecem com seu comportamento original (Bonnet et al., 2007; Bose et al., 2017; Venkatesh et al., 2021).

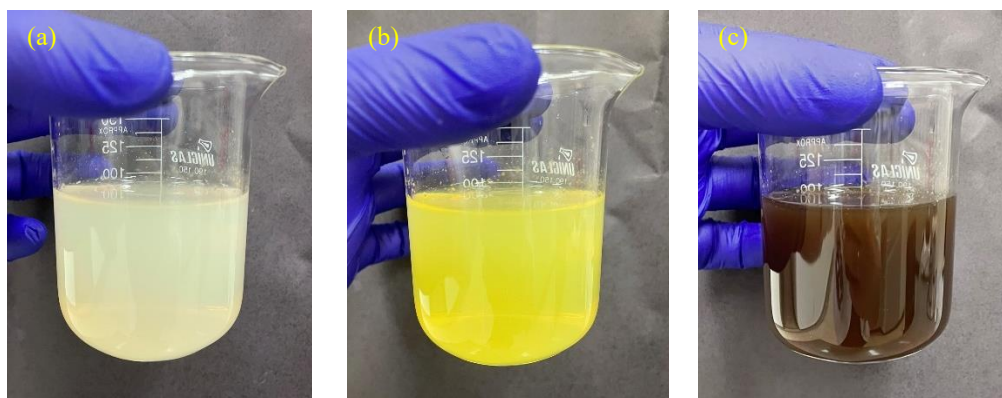
Tendo em vista a ausência de “manchas”, as figuras 12.c e 12.d sugerem que o método de imersão das membranas de PGS nas suspensões de AgNPs foi mais eficiente em uma deposição homogênea. Ambas as membranas permaneceram com suas flexibilidades originais, conforme mencionado anteriormente (Shaaban; Zayed; Salama, 2023; Singh et al., 2018).



**Figura 12** – Visão macrovisual das membranas de PGS (a) denso/AgNP evaporação, (b) esponja/AgNP evaporação, (c) denso/AgNP imersão e (d) esponja/AgNP imersão.

Cabe destacar que, durante a síntese das AgNPs, o meio reacional sofre uma mudança de coloração. Neste sentido, a Figura 13.a apresenta a solução inicial do processo de síntese, onde o extrato alcoólico de própolis vermelha está solubilizado em

água destilada. A imagem 13.b por sua vez, evidenciou a mudança de coloração ao realizar o ajuste de valor de pH para 10,6 devido a ativação com compostos presentes na solução de própolis, como por exemplo, terpenoides e flavonoides (Kischkel et al., 2020). Após a adição do reagente  $\text{AgNO}_3$ , ocorre a mudança de coloração de amarelo para o marrom escuro (Figura 13.c), indicando a redução dos íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) para a formação das AgNPs (Kischkel et al., 2020).



**Figura 13** – Processo de síntese biogênica das AgNPs representado pelas mudanças de coloração na suspensão, em que (a) é o extrato alcoólico de própolis vermelha solubilizado com água deionizada, (b) é após o ajuste de pH para 10,6 com solução 0,1M de NaOH, e (c) é a suspensão final após adição de  $\text{AgNO}_3$  e 20 minutos de agitação.

As AgNPs tem sido estudadas em tecnologias de membranas devido às suas propriedades antibacterianas, ópticas, elétricas e catalíticas. A membrana que incorpora AgNPs demonstra eficiência única de separação e desempenho, com alta atividade antimicrobiana, degradação fotocatalítica, resposta térmica e eletrocondutividade (Yu et al., 2022). Estes estudos indicam que as AgNPs podem aprimorar o efeito *antifouling* das membranas, seja por meio exclusivo de AgNPs ou em combinação com substâncias como óxido de grafeno (Sun et al., 2015), nitreto de carbono grafítico (Zhao et al., 2020), polidopamina (Xu et al., 2013) e outras (Yu et al., 2022).

Considerando que o efeito antimicrobiano é uma das propriedades mais proeminentes das AgNPs, o qual quando tratado por rota biogênica, promove um sinergismo entre os componentes do bioativo, que ajuda na estabilização das AgNPs na suspensão. Esse efeito antimicrobiano é principalmente determinado por dois processos

distintos: (i) a dissolução/liberação de AgNPs e  $\text{Ag}^+$ , (ii) e a reação de AgNPs e  $\text{Ag}^+$  com as células (Rastogi et al., 2019; Yu et al., 2022).

Este processo ocorre, pois, as AgNPs de tamanho mais elevado se dissolvem devido as reações físicas ou químicas complexas com o ambiente circundante. Posteriormente, as AgNPs menores e o íon  $\text{Ag}^+$  são produzidos e danificam diretamente a estrutura celular dos microrganismos, causando sua morte. O processo antimicrobiano das AgNPs depende significativamente do seu tamanho e dos íons presentes na solução, ou seja, o processo de dissolução está diretamente ligado com a atividade antimicrobiana das AgNPs (Rastogi et al., 2019; Siegel et al., 2020; Xu et al., 2013).

A dissolução das AgNPs está associada a três fatores principais: liberação de NPs em tamanho reduzido e íons  $\text{Ag}^+$ ; passivação na superfície das AgNPs; e desativação. Normalmente, a reação entre AgNPs e  $\text{O}_2$  forma uma camada de óxido  $\text{AgO}_x(\text{OH})_y$  na superfície externa das NPs. Substâncias levemente ácidas ou corrosivas (por exemplo, moléculas contendo amônia, aminas primárias e/ou aminas secundárias) podem promover a dissolução da camada de óxido, facilitando a liberação dos íons  $\text{Ag}^+$ . Além disso, a geração de íons  $\text{Ag}^+$  leva à fragmentação das AgNPs maiores, acompanhado pela formação de AgNPs menores durante a redução de  $\text{Ag}^+$  sob condições químicas ou induzidas por luz (Li; Lenhart, 2012).

Porém, o efeito fototérmico da excitação plasmônica leva à redução de  $\text{Ag}^+$  para AgNPs, que gradualmente se tornam partículas maiores. Tanto a formação de precipitados insolúveis quanto AgNPs de grande porte, resultam na perda da atividade antimicrobiana. Em solução, as NPs, tendem a se segregar devido as interações de Van der Waals. À medida que a força iônica da solução aumenta, a energia potencial de repulsão eletrostática entre as AgNPs é neutralizada, que acaba promovendo sua agregação (Levard et al., 2011; Li; Lenhart, 2012).

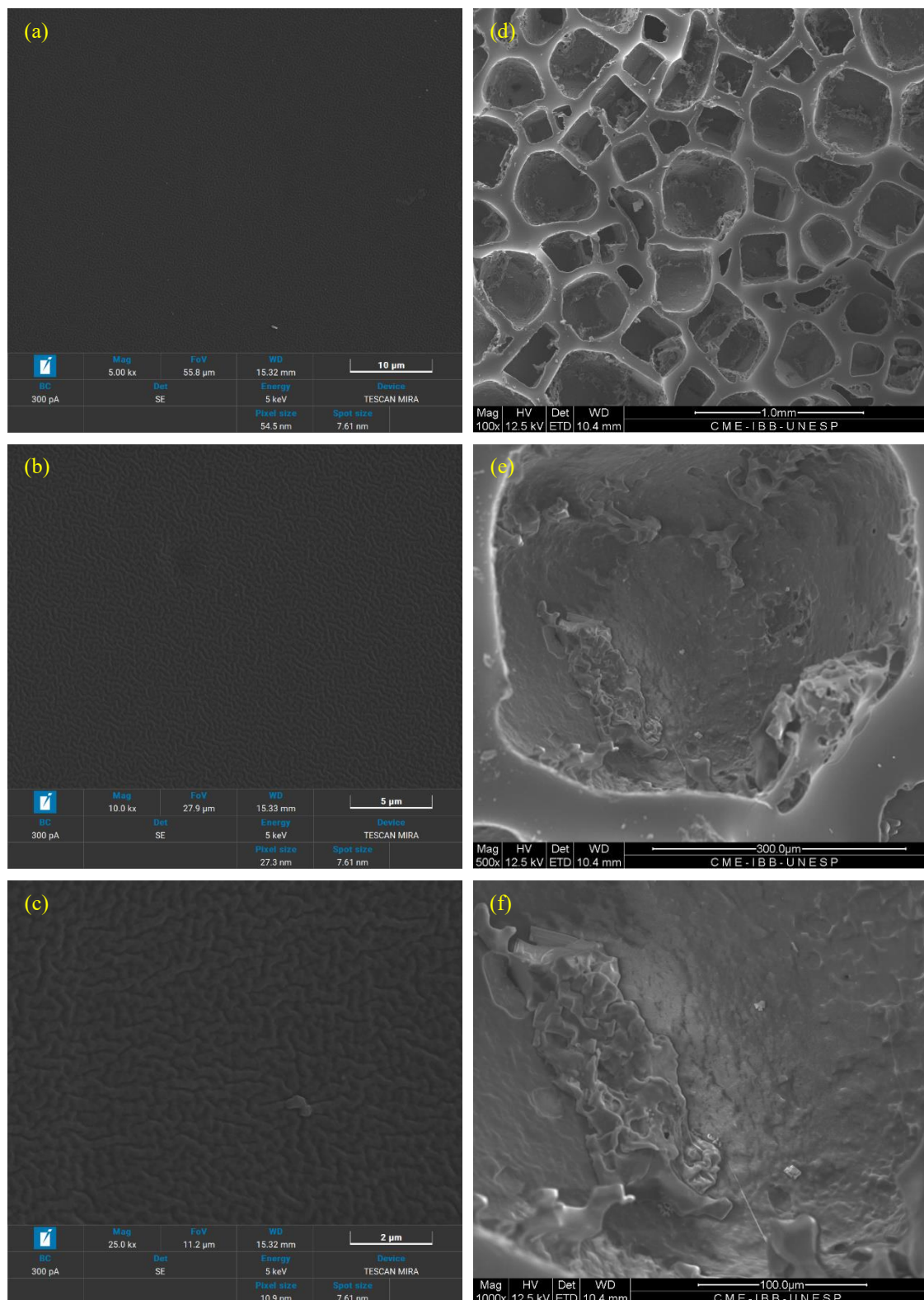
Desta forma, tanto a formação de precipitados insolúveis quanto de AgNPs maiores resultam na redução da atividade antimicrobiana. De maneira geral, a passivação complexa das NPs geralmente está acompanhada pela desativação das AgNPs e íons  $\text{Ag}^+$  de menor tamanho (Badawy et al., 2010; Yu et al., 2022).

## 5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentadas na Figura 14.a indicam a visão com uma magnitude de 5.000x da membrana controle densa de PGS, caracterizada por uma estrutura lisa e contínua, que já se difere quando adicionamos uma maior magnitude, apresentados na Figura 14.b e 14.c, onde se torna visível a presença de uma quantidade relativamente alta de rugosidade na superfície do material, isso se dá devido ao nível de reticulação do polímero. Essa característica estrutural do material acaba sendo significativa para a aplicação em engenharia de tecidos, na área de tecidos moles, visto que sua estrutura lisa e planar pode propiciar a agregação de células e ser capaz de receber maiores níveis de impacto (Lau et al., 2020a; Sencadas; Sadat; Silva, 2020).

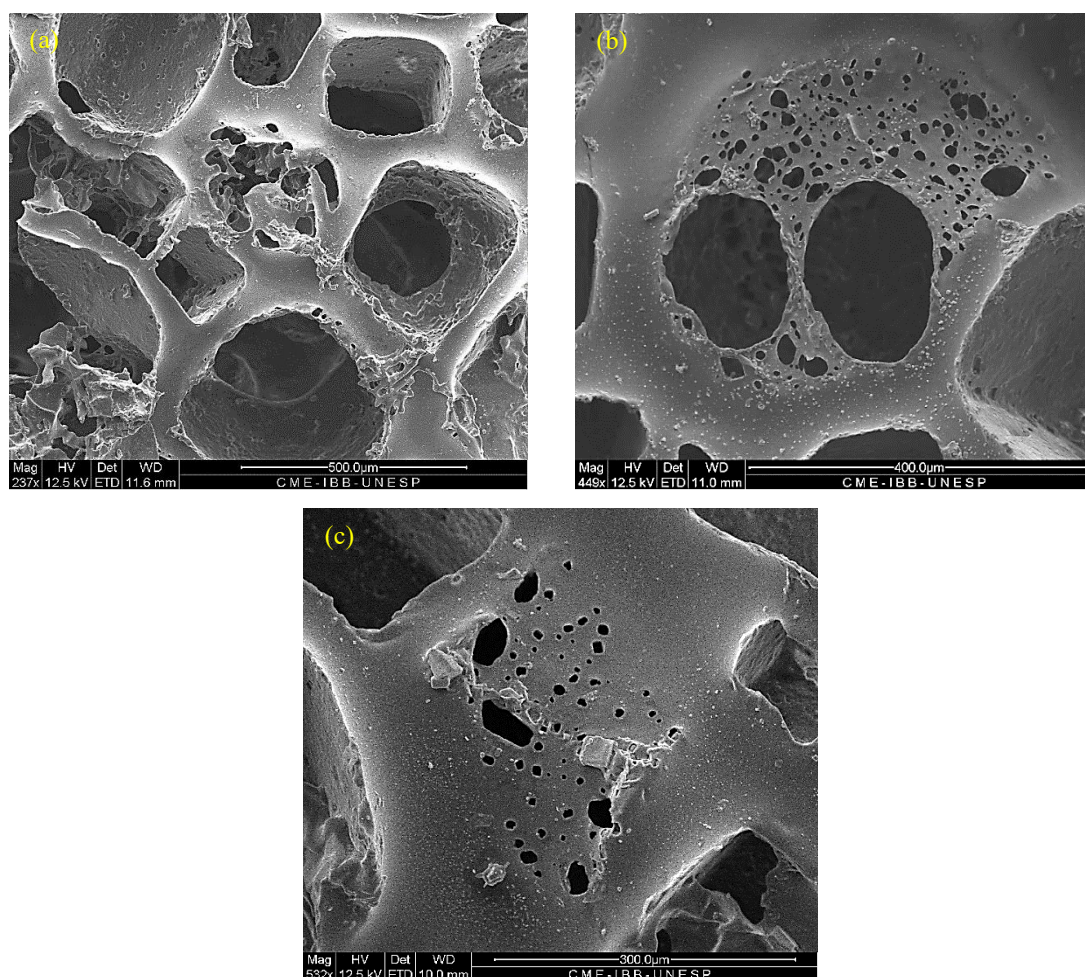
A Figura 14.d apresenta a estrutura da membrana esponja de PGS em magnitude de 100x, a fim de proporcionar uma visão macro dos poros depositados pelo agente porogênico. Essa imagem confirma que a membrana esponja apresenta um alto nível de poros, variando de poros grandes (400  $\mu\text{m}$ ) a poros menores ( $\sim 75 \mu\text{m}$ ); que são indicativos de que o processo de *salt leaching* com a utilização de partículas de NaCl obteve sucesso. Porém, esse método não apresenta uma deposição completa de poros sobre o material, mas é o método mais comumente utilizado, direto e simples de aplicação em materiais poliméricos (Leblon et al., 2013). A Figura 14.e e 14.f apresentam uma aproximação ainda maior sobre um dos poros principais, onde também se observa uma estrutura rugosa do material, se tornando interessante para aplicação em regeneração óssea.

Uma das características interessantes da utilização do método *salt leaching* para deposição de poros em um material poliméricos, e que pelo PGS ser um polímero elastômero, possuir a capacidade de se moldar e apresentar certa flexibilidade, ao adentrar os interstícios do agente porogênico, ele mantém o formato do material (no caso das partículas de NaCl, um formato quadrangular característico) (Rai et al., 2013).



**Figura 14** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas de PGS em seu formado (a, b e c) denso e (d, e e f) esponja.

Ao realizar uma observação mais precisa das membranas esponjas de PGS, é possível observar a presença de microporos, melhor observados na Figura 15, que podem ter sido criados pela remoção do glicerol durante o processo de transesterificação, já que, este processo ocorre durante todo o processo de policondensação da matriz do polímero, assim permitindo que a molécula de glicerol desempenhe a função de agente porogênico, pois o NaCl utilizado não possuía partículas menores que 20  $\mu\text{m}$ , portanto não foram responsáveis pela deposição destes microporos; e, sendo que a presença de água não faz com que o PGS inche, concluiu-se que esses microporos não foram causados pelo processo de lixiviação e sua subsequente remoção durante o processo de secagem (Gao et. al., 2006).



**Figura 15** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das esponjas de PGS, onde se tem a presença de microporos ao redor dos poros maiores, onde (a) representa uma visão maior da estrutura, já (b) e (c) apresentam uma visão mais focada nos microporos.

Com a realização da deposição biomimética de CaP sob a superfície das membranas de PGS, podem ser observadas mudanças de microestrutura da superfície. A biomineralização, como a formação de apatita, ocorre principalmente pela adsorção de íons de cálcio em um grupo artificialmente carregado negativamente no material e sua subsequente complexação com íons fosfato (Leonor et al., 2007; Tanahashi; Matsuda, 1997). Como resultado, fosfato de cálcio amorfo com uma baixa razão de Ca/P será formado, o que é uma fase metaestável e eventualmente se transformará em apatita estável (Kokubo et al., 2004; Kokubo; Kim; Kawashita, 2003; Leonor et al., 2007).

A Figura 16 apresenta as micrografias de superfície das membranas densas comparando os diferentes tratamentos SBF propostos. Quando comparado com a membrana controle, essas diferenças se tornam evidentes, onde pode ser observado a presença de partículas sob a superfície anteriormente lisa e contínua da membrana, e quando amplificado a magnitude da imagem, é possível observar as camadas de recobrimento depositadas sobre a superfície da membrana (Lau et al., 2020a).

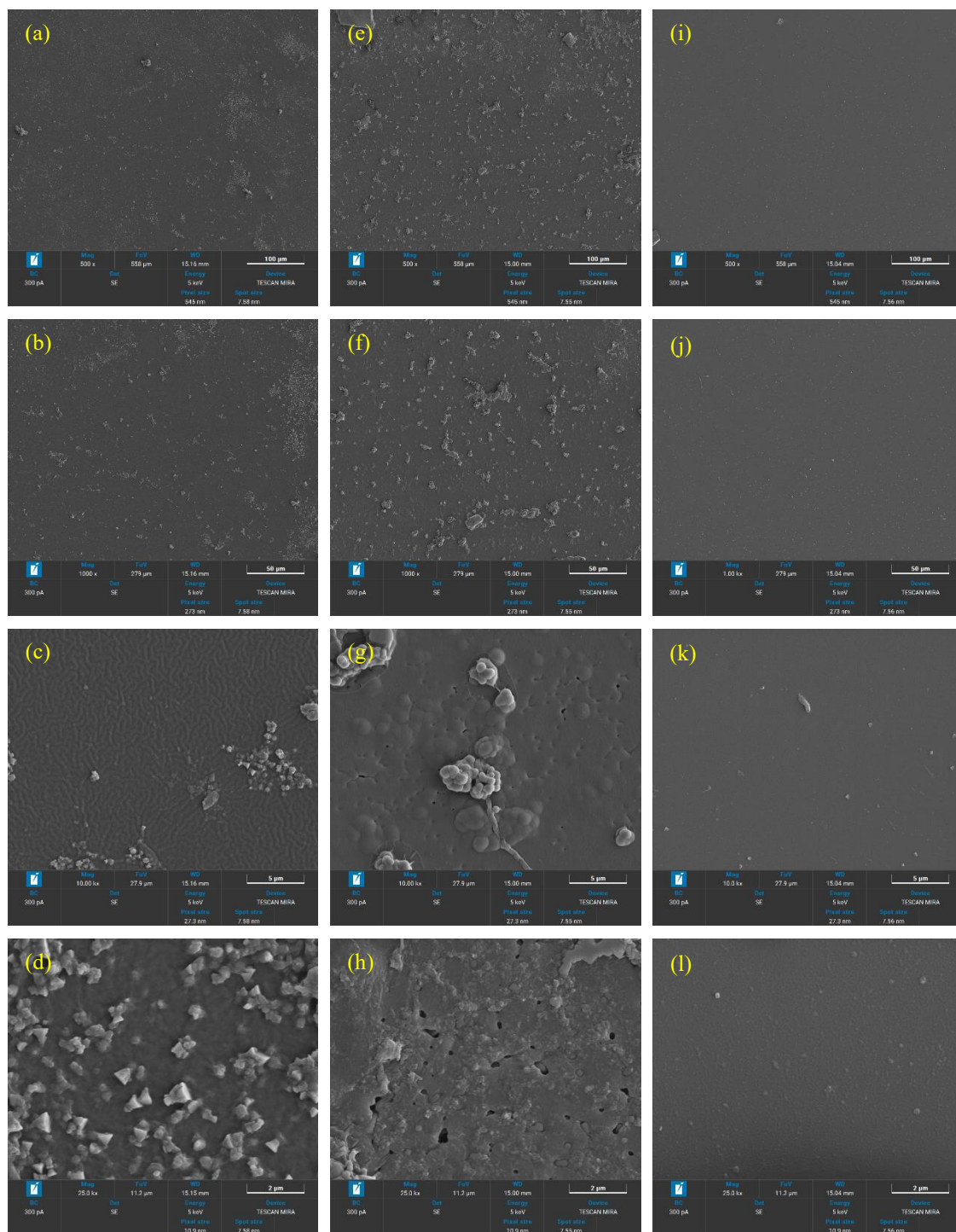
Pode ser observado na Figura 16.c a estrutura lisa e uniforme característica do PGS denso, e com alguns aglomerados de partículas ao lado, representando o tratamento por solução SBF0; ou seja, esta composição não foi adequada para uma deposição uniforme de CaP na superfície do PGS, que já pode ser diferenciada quando analisado a Figura 16.g e 16.h, onde se tem claramente uma deposição homogênea de fases de CaP na membrana. Visualmente, o recobrimento está em uma forma satisfatória e condiz com o esperado e previsto pela literatura ao realizar deposição biomimética de CaP por método SBF, porém não é possível afirmar qual a fase cristalina de fosfatos de cálcio de interesse biológico formada no recobrimento, uma vez que não se tem a proporção Ca/P ou aplicação da técnica de Difração de Raios x (DRX) (Furko et al., 2023; Wu et al., 2023a).

Quando observamos as mudanças estruturais do PGS esponja com os diferentes tratamentos de SBF na Figura 17, podemos observar novamente a presença de deposição de CaP nos interstícios dos poros, que possuem uma estrutura mais condensada e rugosa quando comparado ao grupo controle na Figura 14.d. Essas diferenças podem ser observadas em todos os tratamentos, porém quando analisadas em uma maior magnitude (Figura 17.d.h.l) a presença do recobrimento se torna presente e característico, onde existem agregados maiores e menores de partículas que possuem morfologia adequada de um CaP em diferentes fases de deposição (Davoodi et al., 2022; Lau et al., 2020a).

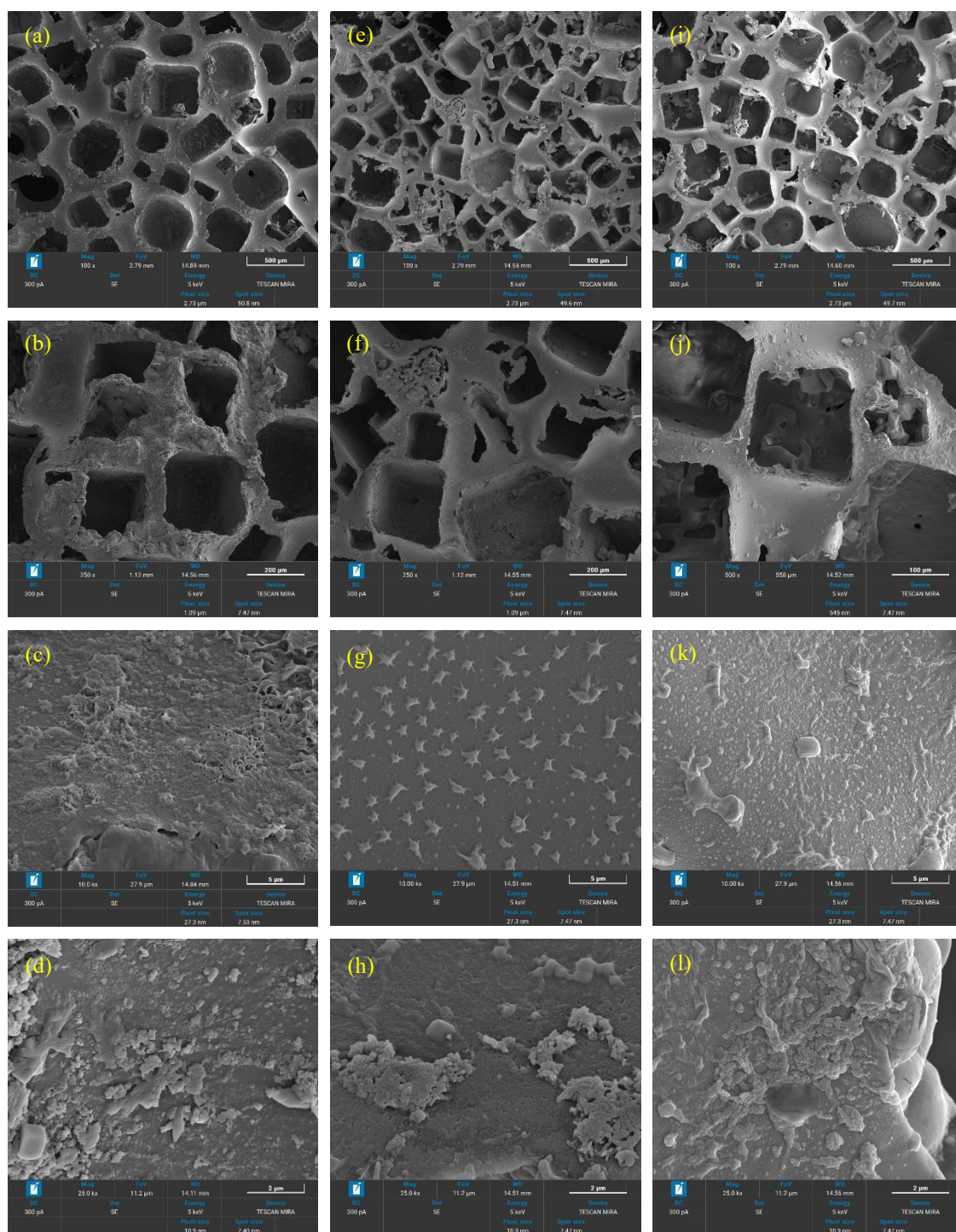
A deposição de CaP nas esponjas de PGS também não ocorreu de forma uniforme, podendo ser explicado pelo alto nível de porosidade do material, que dificulta o processo de deposição, porém o material foi capaz de receber a deposição, o que abrange aplicações em engenharia de tecidos, especificamente em regeneração óssea. Para os recobrimentos das esponjas também não foi possível quantificar a proporção Ca/P, impossibilitando na exatidão da fase de CaP presente pelas deposições.

Como as AgNPs sintetizadas obtiveram um raio de em média 9 nm, os microscópios eletrônicos não possuíam magnitude suficiente para a verificação de incorporação nas membranas de PGS, por conta disso, as imagens das membranas densas e esponjas de PGS tratadas com AgNPs não serão expostas. Para que fosse possível a visualização morfológicas das AgNPs, seria necessário realizar Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Porém, em uma das membranas densas (SBF1/AgNPs) foi possível observar em algumas regiões, a deposição de CaP em possíveis fases diferentes, como mostradas na Figura 18, onde as fases de 18.a e 18.b diferem morfológicamente de 18.c, demonstrando sucesso de deposição de CaP na superfície da membrana, e indicando que as AgNPs podem possuir ação de estímulo para as diferentes fases (Monte et al., 2023b).

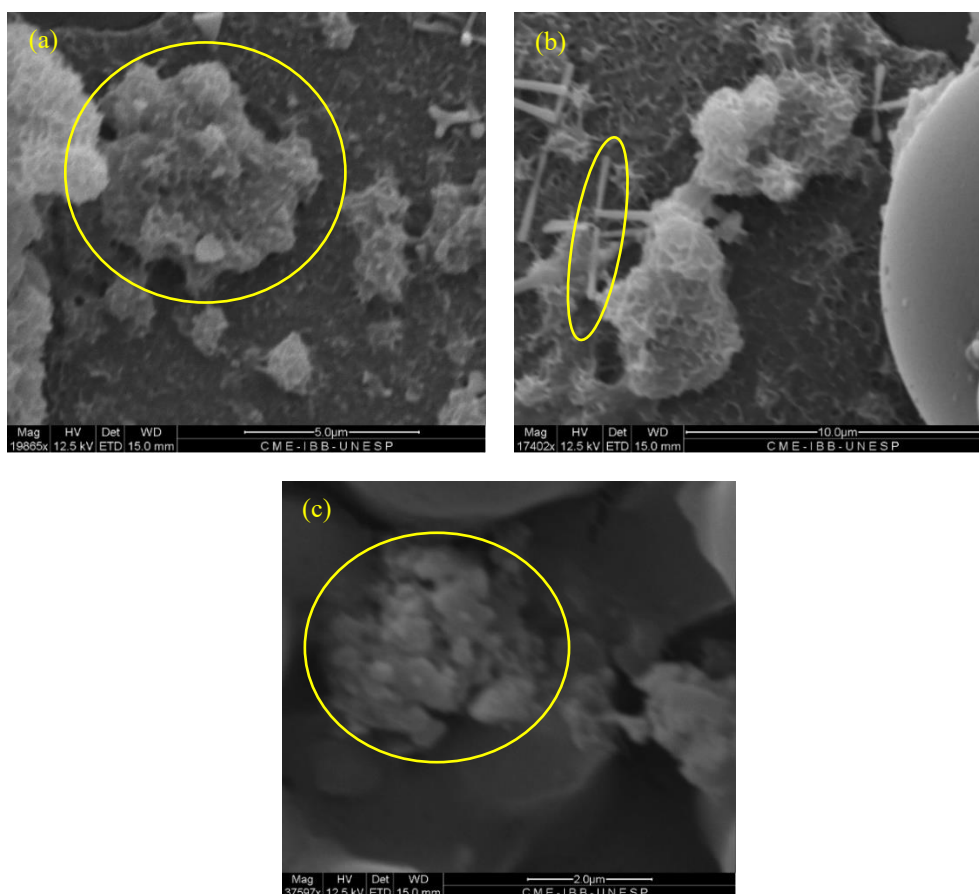


**Figura 16** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas densas de PGS tratadas com solução SBF, em que: (a, b, c e d) SBF0, (e, f, g e h) SBF1 e (i, j k e l) SBF2.



**Figura 17** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das esponjas de PGS tratadas com solução SBF, em que: (a, b, c e d) SBF0, (e, f, g e h) SBF1 e (i, j k e l) SBF2.

A presença de aglomerados com características morfológicas em formato esféricos ou cúbico representa um padrão menos cristalino, sugerindo a presença de fase amorfa de fosfato de cálcio (ACP). A presença de partículas em formato bastões pode ser um indicativo da formação da fase OCP (Aparecida et al., 2007), que é precursora da fase de hidroxiapatita, indicando características de capacidade de substituições catiônicas e aniônicas, bem como habilidade em promover uma adsorção de proteínas e reabsorção rápida em meio biológico. As micrografias em alta magnitude apresenta a formação de cristais em formato de agulhas altamente aglomerados podem ser indicativos da formação de hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P 1,62) (Leonor et al., 2007). Portanto, a caracterização morfológica das amostras submetidas à imersão em SBF durante 7 dias mostraram a efetivação da precipitação de apatitas na superfície do polímero PGS.



**Figura 18** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de membranas densas de PGS tratadas com SBF e com AgNPs, apresentando possíveis diferentes fases de CaP depositadas em um mesmo grupamento da membrana.

#### 5.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO

A eficiência da etapa de cura para a síntese do polímero PGS (Figura 19) foi avaliada pela técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando o acessório de reflexão total atenuada na superfície (ATR). As análises dos grupos químicos presentes nas membranas e esponjas de PGS antes e após a deposição da fase mineral e/ou AgNPs por casting e imersão (Figura 20, (a) esponja e (b) densa, respectivamente) estão representados pelos espectros de FTIR-ATR.

As reações de pré-condensação e polimerização do PGS (Figura 19) podem ser acompanhadas pelas bandas referentes aos grupos hidroxila (-OH), carbonila (-COOH) e metileno (-CH<sub>2</sub>), que indicam como as etapas de síntese influenciam na esterificação e formação de ligações cruzadas. O espectro do pre-PGS apresenta o modo vibracional característico a 1686 cm<sup>-1</sup> referente ao grupo carbonil (C=O) do grupo do ácido carboxílico do ácido sebácico (Aydin et al., 2013; Li et al., 2015) no pré-polímero. Entre 3100-3500 cm<sup>-1</sup>, a presença de uma banda larga é atribuída aos estiramentos antissimétrico e simétrico das vibrações O-H. Sendo que, a banda de absorção de dobramento do grupo hidroxila (OH) pode ser observada a 1415 cm<sup>-1</sup>. A banda a 3318 cm<sup>-1</sup> corresponde ao -OH da molécula do glicerol.

Após a etapa de cura, a banda referente a carbonila é observada em 1733 cm<sup>-1</sup>, juntamente, com o surgimento de uma banda de absorção da ligação C-O em 1159 cm<sup>-1</sup> e 1095 cm<sup>-1</sup>, que são características do grupo éster indicando a reação de esterificação com formação de ligações cruzadas nos pré-polímeros de PGS para a obtenção do polímero elastômero de PGS (espectros PGS denso e PGS esponja, Figura 20). Simultaneamente, a intensidade da banda referente ao estiramento O-H (3445 cm<sup>-1</sup>) diminui, que pode ser indicativo do consumo das hidroxilas com a formação da reticulação do grupo éster (Yang et al., 2015b).

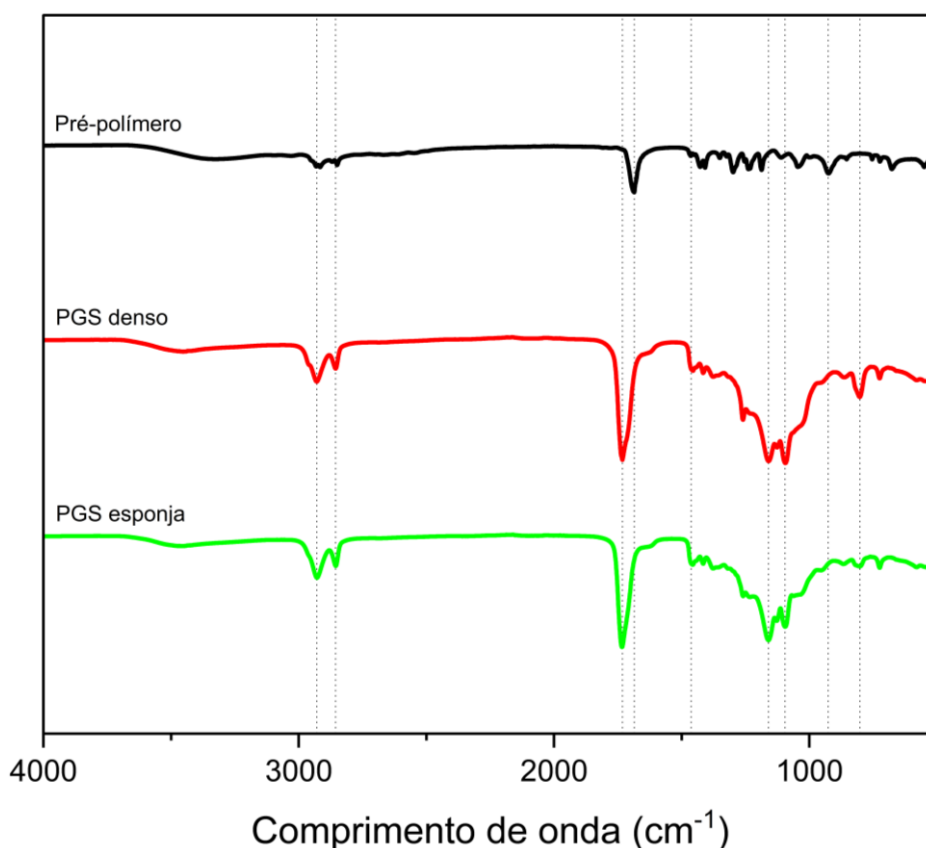
No intervalo de 1300 a 1500 cm<sup>-1</sup>, as bandas indicam a absorção de dobramento dos grupos alcanos. Sendo que as bandas em 1378 cm<sup>-1</sup> e 1460 cm<sup>-1</sup> correspondentes ao dobramento “simétrico” do grupo metil (-CH<sub>3</sub>) e ao dobramento em “tesoura” do alcano principal (-CH<sub>2</sub>) da cadeia, respectivamente (Aydin et al., 2013; Saudi et al., 2019).

Após a deposição com a solução de SBF (Figura 20), foram observados os modos de absorção a 1054, 1037 e 596 cm<sup>-1</sup>. Sendo que as amostras em esponja (Figura 20.a)

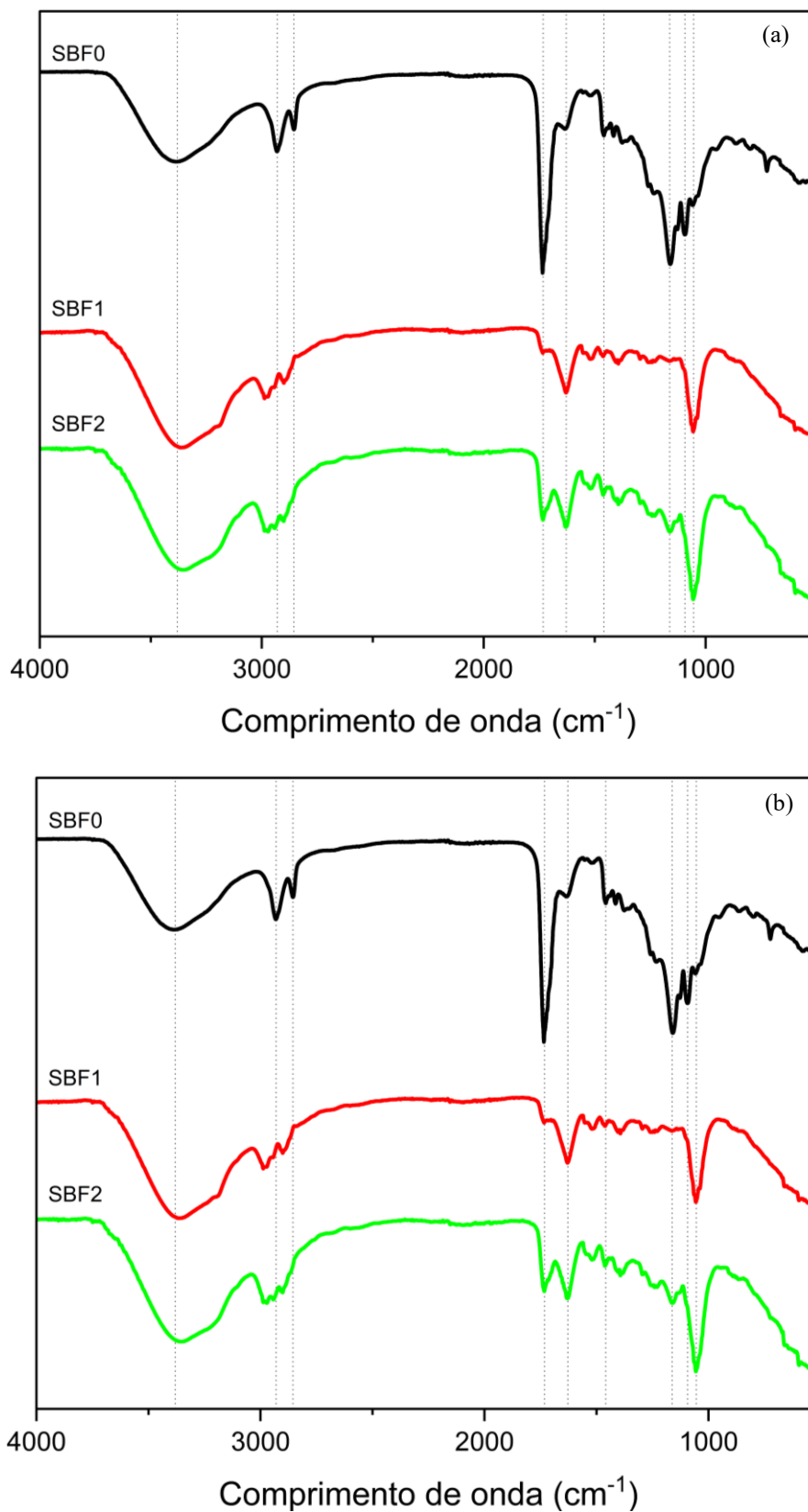
apresentaram maior intensidade das bandas quando comparado às membranas densas (Figura 20.b). Essas bandas de absorção na região de 900-1200  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento  $\text{PO}_4^{2-}$  (estiramentos P-O e deformação angular do modo O-P-O) dos fosfatos de cálcio de interesse biológico (Fraga et al., 2011; Legeros, 1993; Mestres; Le Van; Ginebra, 2012; Rhee, 2002; Yang et al., 2009; Zhao et al., 2014).

A literatura tem reportado que a presença de uma banda intensa em aproximadamente 1035  $\text{cm}^{-1}$  devido a ligação P-O e uma banda a 1544  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído a presença de uma camada de apatitas hidroxycarbonatadas (Tevlek; Agacik; Aydin, 2020).

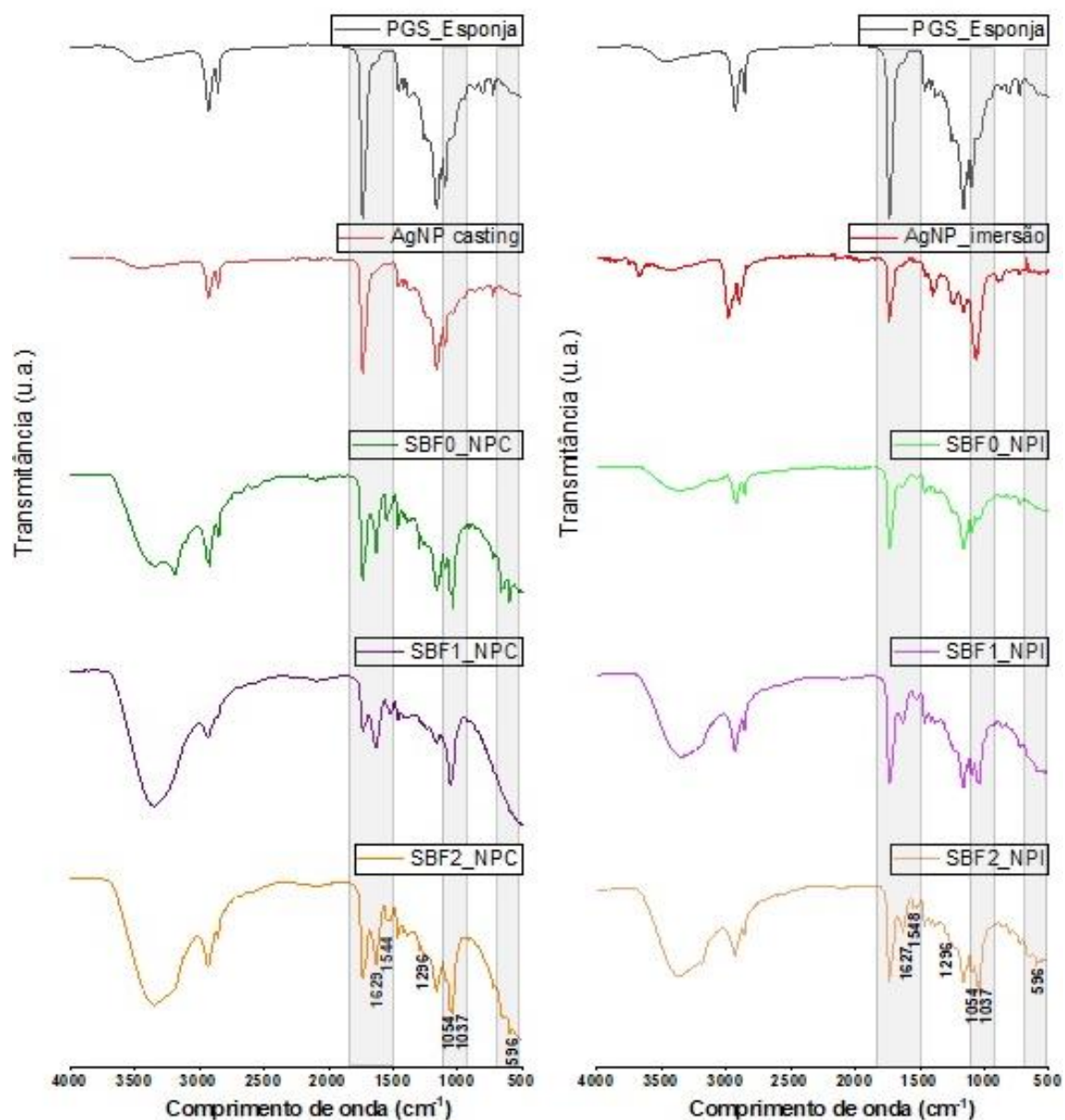
Foram realizadas medidas de ATR-FTIR em todo grupo de esponjas e membranas densas tratadas com método biomimético de soluções SBF e incorporadas com as AgNPs processo casting e imersão (Figuras 21 e 22).



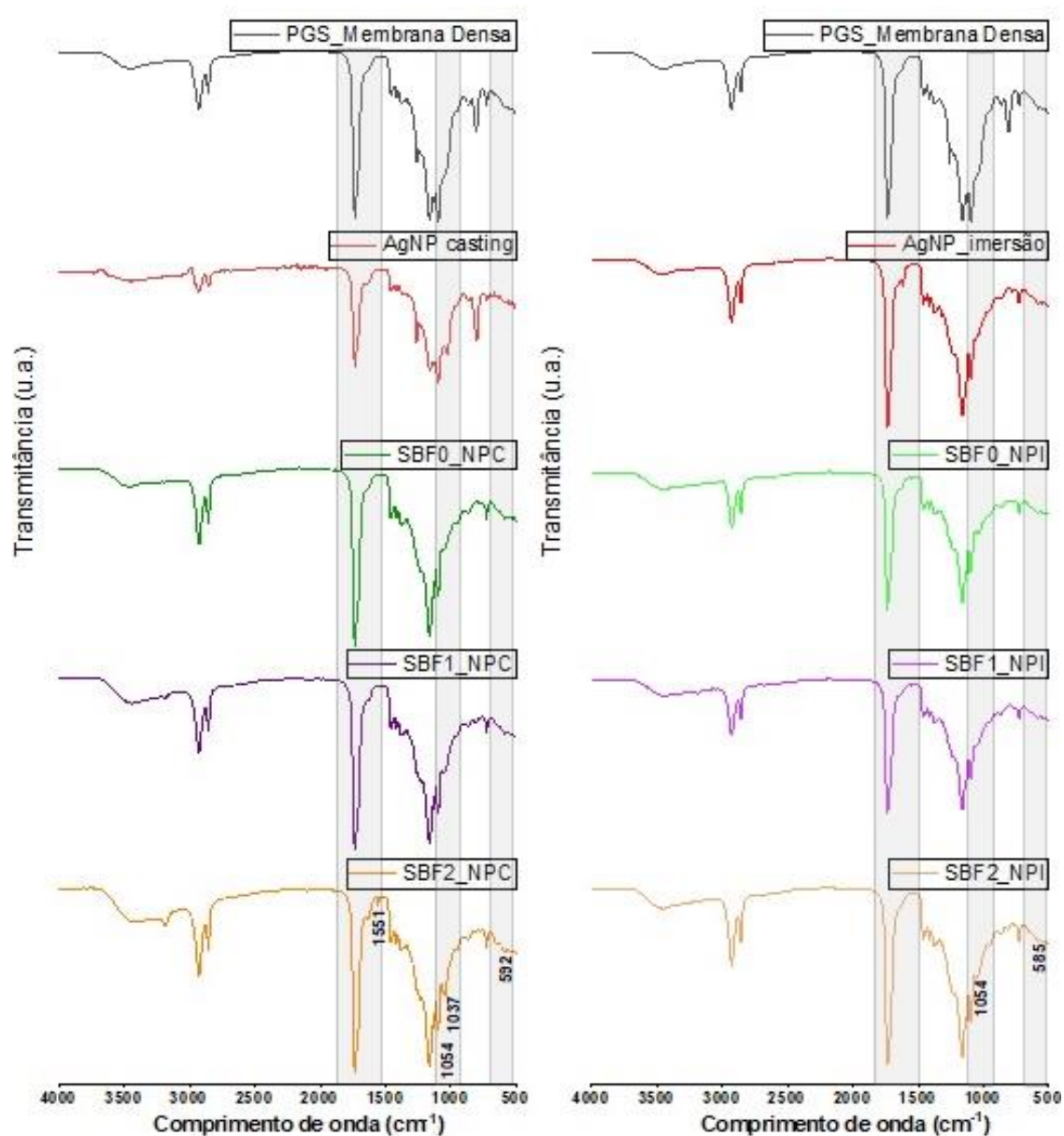
**Figura 19** – Espectros comparativos de ATR-FTIR do pré-polímero de PGS, membrana de PGS densa e membrana de PGS esponja.



**Figura 20** – Espectros comparativos de ATR-FTIR, em que (a) representa a membrana esponja e (b) representa a membrana densa.



**Figura 21** – Espectros de ATR-FTIR das esponjas de PGS tratadas com soluções SBF e AgNPs por método de evaporação de solvente e imersão.



**Figura 22** – Espectros de ATR-FTIR das membranas densas de PGS tratadas com soluções SBF e AgNPs por método de evaporação de solvente e imersão.

Os espectros da Figura 21 apresentam uma banda característica entre 3000 à 3700  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo  $\text{OH}^-$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) em relação à Figura 22, podendo ser caracterizado pela membrana porosa de PGS possuir habilidade mais hidrofílica que a membrana densa. Alguns grupamentos de fosfatos de cálcio podem ser observados nas membranas com incorporadas com solução SBF, como por exemplo  $\text{CO}_3^{2-}$  (substituição do tipo A) na banda 1450  $\text{cm}^{-1}$ . As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os modos de vibração característicos referentes ao pré-polímero de PGS, PGS e fosfatos de cálcio.

**Tabela 4** – Principais frequências de absorção no ATR-FTIR do pre-PGS.

| <b>Grupamento</b> | <b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|----------------------------------------------|
| Ácido alifático   | 926                                          |
| C=O               | 1686                                         |
| -CH <sub>2</sub>  | 2850 e 2916                                  |
| O-H               | 3103 e 3657                                  |

**Tabela 5** – Principais frequências de absorção no ATR-FTIR do PGS.

| <b>Grupamento</b> | <b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|----------------------------------------------|
| Alongamento O-H   | 801                                          |
| Curvamento O-H    | 1378                                         |
| -COOH             | 1732                                         |
| O-C=O             | 1159                                         |
| -CH <sub>2</sub>  | 2856 e 2929                                  |

**Tabela 6** – Frequências de absorção no ATR-FTIR dos fosfatos de cálcio.

| <b>Grupamento</b>                                   | <b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>                       | 474, 562, 580, 640, 960-1200                 |
| P-OH                                                | 527, 870, 910-1040                           |
| CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (substituição tipo A) | 880, 1450, 1514                              |
| CO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> (substituição tipo B) | 870, 1412, 1465                              |
| OH <sup>-</sup> (livre)                             | 630, 3569                                    |

A análise dos espectros de ATR-FTIR auxilia na detecção dos componentes químicos presentes na amostra, sendo assim, a escolha de síntese e tratamentos de modificação se mostraram promissores para integrar o PGS e propor um material com revestimento biomimético e bioativo, porém é necessário a aplicação de técnicas mais precisas para a identificação das fases cristalinas de fosfatos de cálcio (por exemplo, difratometria de raios x) e das propriedades morfológicas.

## 5.5. GRAU DE INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento está diretamente ligado à quantidade de solvente aquoso que é absorvida pela matriz polimérica ao longo do tempo, o que resulta na expansão da estrutura do polímero devido à interação entre o polímero e o solvente. Esse aspecto é de grande importância, especialmente no contexto de biomateriais implantáveis, uma vez que essa característica está profundamente relacionada à capacidade de transferência de nutrientes e metabólitos. No entanto, é importante notar que uma taxa elevada de absorção de água pode acelerar o processo de degradação e comprometer a integridade dos biomateriais (Rai et al., 2012b). A Figura 23 apresenta o grau de intumescimento das membranas densas de PGS após 24 horas de imersão, e a Figura 24 apresenta o grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS pós 24 horas de imersão, ambas em solução PBS, à temperatura ambiente com pH de 7,4.

Observa-se que todas as membranas porosas obtiveram um grau de intumescimento relativamente maiores que as membranas densas, isso pode ser justificado pela quantidade de poros presentes na membrana, esses macro- micro poros tornam a superfície do polímero mais favorável a absorção da solução, onde se obtém um caráter hidrofílico do PGS com a adição de poros em sua superfície. Já a membrana densa de PGS apresenta um caráter hidrofóbico, ou seja, ela está menos propensa à absorção da solução (Asgharnejad-Laskoukalayeh et al., 2022; Wu et al., 2023).

As modificações aplicadas às membranas de PGS não refletiram em seu grau de intumescimento no grupo esponja, uma vez que ele se assemelha ao da membrana controle, que acaba sendo uma vantagem já que por ser um biomaterial com capacidade de reabsorção, a mudança de revestimento deve se adaptar ao processo natural do polímero (Lau et al., 2020; Liu et al., 2019). Já nas membranas densas, pode se observar que ao realizarmos ambos tratamentos (CaP/AgNPs) a membrana se torna mais hidrofílica quando comparada com os grupos controle e tratamentos individuais, refletindo que os tratamentos sobrepostos, podem tornar a superfície da membrana densa mais hidrofílica, um caráter importante quando se fala em uma aplicação biológica do material (Kafouris et al., 2013).

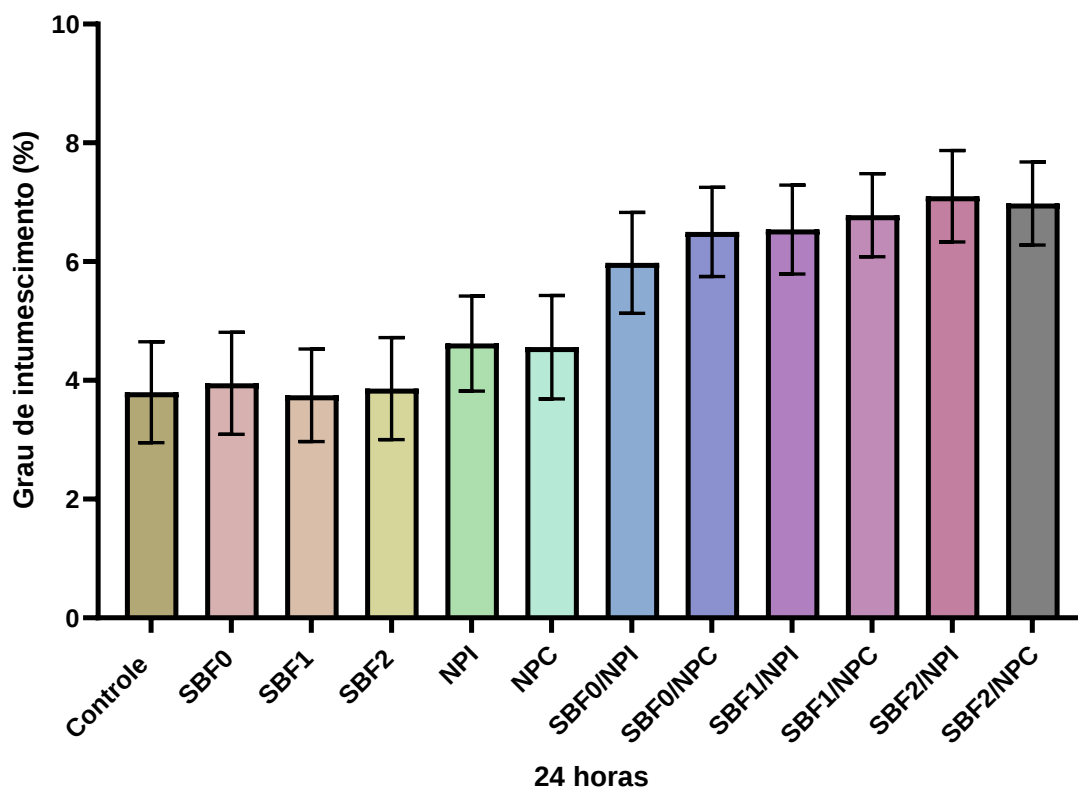
Como o PGS possui baixa solubilidade em água, o grau de intumescimento das membranas densas não se torna tão expressivo, diferentemente das membranas esponjas; porém, segundo estudos apresentados pela literatura, o PGS possui diferentes

comportamentos de intumescimento dependendo do meio aquoso que é adicionado, também interferindo em sua eficiência de carregamento; esses meios aquosos variam entre água deionizada, solução fisiológica, solução PBS, etanol ou acetona (Sencadas; Sadat; Silva, 2020b; Nasiri; Ahmadi; Afshar-Taromi, 2023). As curvas de grau de intumescimento realizadas durante as 24 horas de imersão, podem ser analisadas com mais detalhes no Apêndice A.

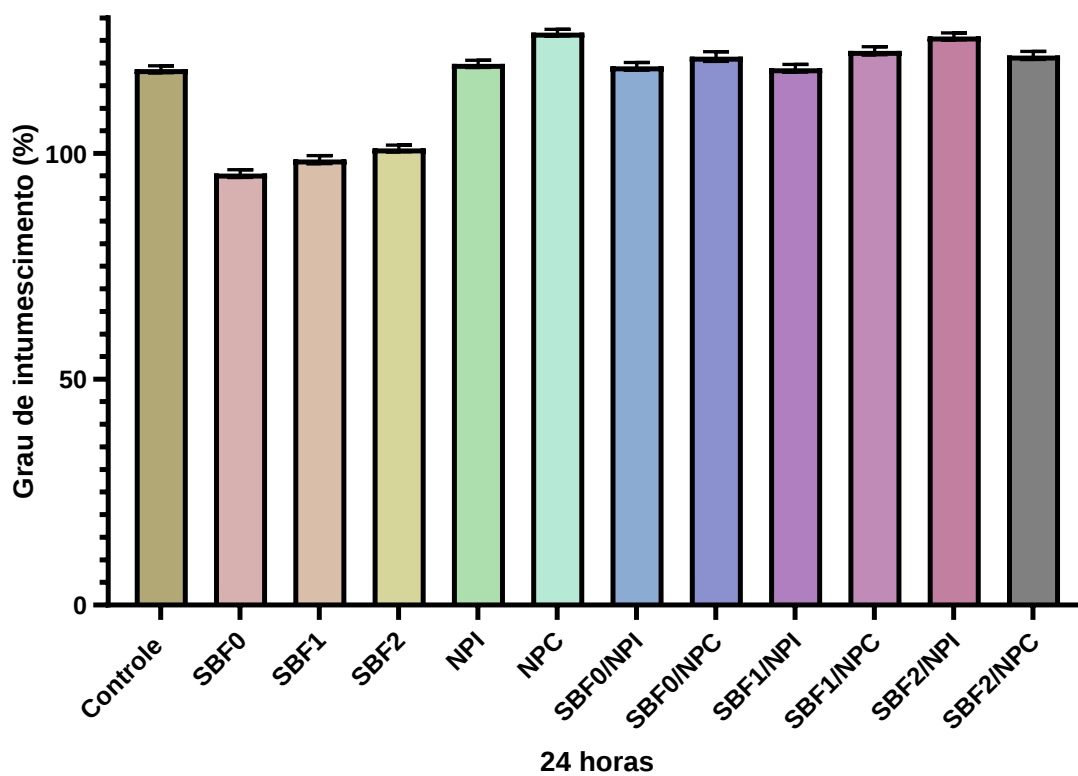
As redes anfifílicas (APCNs) representam uma nova classe de materiais poliméricos reticulados que compreendem segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, compartilhando várias características de hidrogéis e surfactantes (Mespouille; Hedrick; Dubois, 2009). A interconexão dos componentes poliméricos (lineares) para formar as APCNs pode ser realizada de diferentes maneiras, garantindo vários graus de perfeição estrutural (Kafouris; Gradzielski; Patrickios, 2009). Esses componentes são, na maioria das vezes, polímeros de adição, geralmente preparados por polimerização radical livre convencional. No entanto, mais recentemente, também têm sido produzidos por polimerização controlada, resultando em segmentos poliméricos de comprimento bem definido (Kafouris et al., 2013).

Um exemplo de um polímero de condensação que pode representar um interessante sistema APCN é o PGS, preparado a partir da reação do triol glicérol hidrofílico com o ácido dicarboxílico hidrofóbico ácido sebáico (ácido 1,10-decanodioico). O ácido sebáico é produzido a partir da termooxidação alcalina do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico), o principal produto da saponificação do óleo de mamona, extraído da semente da planta tropical *Ricinus communis* (Ogunniyi, 2006). Por outro lado, o glicérol é obtido a partir da saponificação de gorduras e óleos (incluindo o óleo de mamona) (Rai et al., 2012b).

Além disso, um ambiente fisiológico hidratado deve ser considerado ao prever um comportamento mecânico de *scaffolds* (Sencadas; Sadat; Silva, 2020b). Por exemplo, é relatado um efeito de plastificação em *scaffolds* devido à umidade, o que pode alterar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e, subsequentemente, afetar suas propriedades mecânicas e, a permeabilidade e a hidrodinâmica dentro de um material poroso, podem alterar suas propriedades mecânicas devido à incompressibilidade do meio aquoso (Panadero et al., 2013).



**Figura 23** – Grau de intumescimento das membranas densas de PGS após o período de 24 horas imersas em solução PBS.



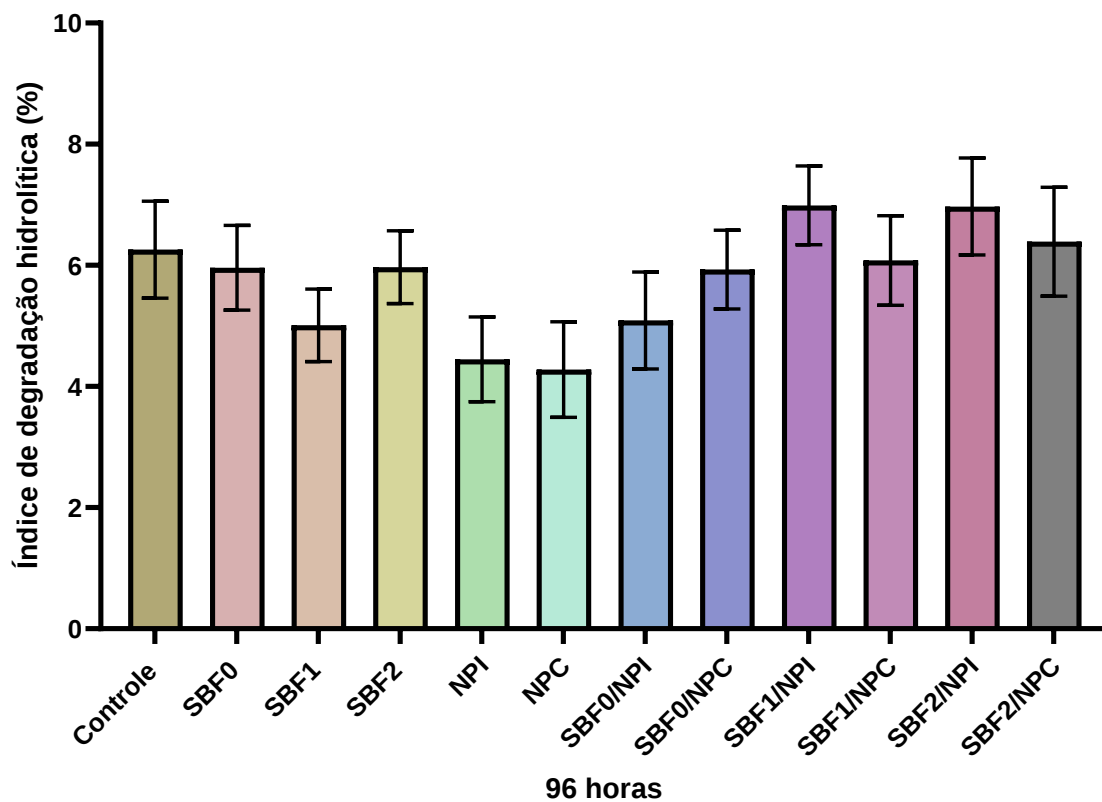
**Figura 24** – Grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS após o período de 24 horas imersas em solução PBS.

## 5.6. DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA

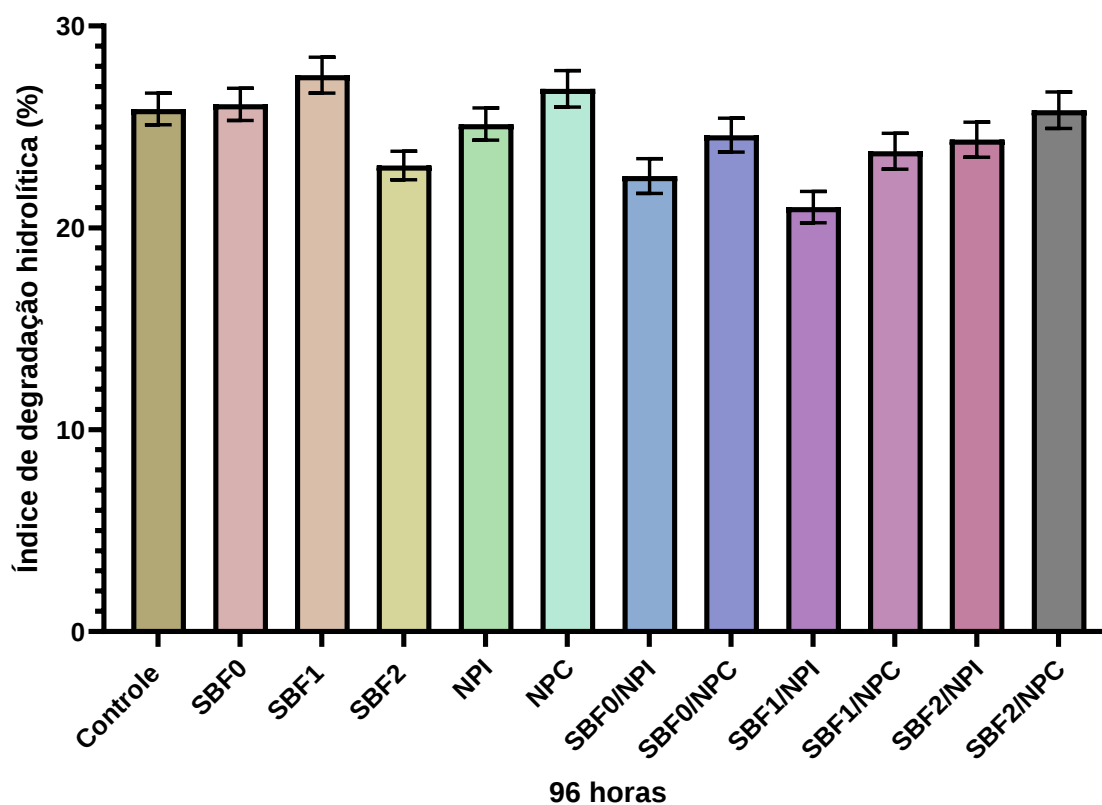
A degradação do elastômero de PGS ocorre principalmente por hidrólise da ligação éster em oligômeros menores e somente depois nos monômeros iniciais, glicerol e ácido sebácico, porém, ele apresenta um perfil de degradação linear ao longo do tempo, com perdas mecânicas controladas. A Figura 25 apresenta os gráficos referentes à degradação hidrolítica das membranas densas de PGS, e a Figura 26 apresenta os gráficos referentes à degradação das membranas esponjas de PGS, em ambos os casos, apresentando todos os grupos de tratamento (CaP, AgNPs, CaP/AgNPs). Como o PGS apresenta uma cadeia polimérica compactada, existe dificuldade de degradação da molécula em solução PBS, devido a isso, os resultados exponenciais não foram tão expressivos (Saudi et al., 2022). Entretanto, observa-se que as membranas tratadas com soluções SBF e AgNPs apresentaram um índice de degradação maior que as demais, isso pode ser justificado devido aos diversos tratamentos que as membranas sofrem, que podem estimular a degradação em um sistema *in vitro* e, o comportamento obtido em todos os gráficos está similar ao teste de intumescimento das membranas; as curvas podem ser analisadas detalhadamente no Apêndice B.

O PGS sofre degradação hidrolítica devido aos *crosslinking* do elastômero, e a taxa de degradação pode ser controlada por esse grau de reticulação. No sentido de biodegradabilidade, o PGS foi desenvolvido nos critérios de: (i) ser capaz de sofrer degradação hidrolítica para minimizar variação cinética de degradação causada pela degradação enzimática (Jaafar; Jedlicka; Coulter, 2023), (ii) possuir ligações éster hidrossolúveis em sua estrutura (Guler et al., 2022) e (iii) possuir reticulações nas cadeias poliméricas e que as ligações químicas sejam hidrolisáveis (Wu et al., 2021). Recentemente, Krook et al., 2020 constatou que a porosidade afeta o mecanismo de degradação, retornando o polímero ao seu estado de pré-polimerização (Jaafar; Jedlicka; Coulter, 2023; Krook et al., 2020).

Em contrapartida, outros estudos apontam que o PGS *in vivo* se degrada principalmente por erosão superficial, onde se encontra uma preservação da geometria e superfície, com retenção integral das propriedades mecânicas, não dependendo do tempo de cura do material (Jaafar; Jedlicka; Coulter, 2023; Wu et al., 2021).



**Figura 25** – Índice de degradação hidrolítica das membranas densas de PGS após o período de 96 horas imersas em solução PBS.



**Figura 26** – Índice de degradação hidrolítica das membranas esponjas de PGS após o período de 96 horas imersas em solução PBS.

As diferentes estruturas poliméricas utilizadas em engenharia de tecidos desenvolvidos devem ser capazes de se adaptar às dinâmicas mecânicas do ambiente e dos tecidos em crescimentos, transmitindo micro tensões ao tecido emergente, portanto, o material deve assemelhar-se à matriz extracelular e apresentar características elastoméricas, além de que, é desejável que o material seja bioabsorvível, biocompatível e que suas propriedades de degradação garantam um aumento na integridade estrutural do tecido em uma taxa semelhante a do material (Pomerantseva et al., 2009).

Embora os polímeros à base de glicolídeos e lactídeos sejam amplamente utilizados em aplicações de engenharia de tecidos, esses materiais são inadequados para implantes de tecidos moles devido às suas limitações em termos de elasticidade (Zhang; Ma, 1999). Desta forma, existe um interesse significativo no desenvolvimento de elastômeros biodegradáveis que causem uma resposta mínima nos tecidos de implante, além de terem propriedades mecânicas e de degradação que possam ser ajustadas para atender às necessidades específicas de cada aplicação (Guan et al., 2002, 2004).

Os materiais poliméricos com ampla variedade de rigidez mecânica e propriedades viscoelásticas podem ser desenvolvidos, permitindo um design de *scaffolds* poliméricos que se adequem às propriedades mecânicas do tecido de aplicação (Puppi et al., 2010). O comportamento mecânico, propriedades mecânicas e resistência à fadiga de polímeros para aplicação em um sistema biológico é algo de extrema importância para seu funcionamento, porém não tanto explorado na literatura (Panadero et al., 2013).

As características do *scaffold* seco não refletem suas propriedades mecânicas quando preenchidos por um líquido ou tecido em crescimento. Nesses casos, as propriedades mecânicas dependem principalmente da morfologia interna, tamanho de poros, geometria e interconectividade (Spiller et al., 2008). Entretanto, os *scaffolds* em meio líquido dependem de outros fatores, como hidrodinâmica e permeabilidade, que também influenciam diretamente as propriedades mecânicas do material. Devido à baixa compressibilidade da água, qualquer restrição à permeação através do material tende a aumentar a rigidez aparente do material. Já a resistência do material à fadiga mecânica é afetada por diversos fatores, incluindo seu histórico de carga mecânica, condições ambientais, composição do polímero e aspectos de tensão-deformação (Mars; Fatemi, 2004).

Quando se tem como estudo materiais termoplásticos, dois regimes de falha podem ser discernidos. Existe um regime de ciclo baixo, dominado termicamente, onde o material falha após um número reduzido de ciclos, com o principal mecanismo de falha sendo o calor gerado durante o ciclo de carga e recuperação. O segundo regime ocorre em tensões mais elevadas ou em regimes de ciclo mais longos com baixas tensões, onde o polímero pode suportar muitos ciclos antes da falha (Janssen et al., 2008).

Nos estudos de (Atari; Labbaf; Javanmard, 2023), onde foram desenvolvidos *scaffolds* de PGS porosos para aplicação em válvulas cardíacas, a degradação do material em solução PBS com pH de 7,4 degradou entre 31% à 35% nos primeiros 60 de teste, satisfazendo a necessidade de aplicação, visto que a taxa de degradação é um fator importante para a engenharia de tecidos, visto que um material que se degrada muito rápido logo sofrerá falhas em sua estrutura, enquanto um material que se degrada mais lentamente, pode agir por tempo suficiente para a criação do novo tecido (Atari; Labbaf; Javanmard, 2023).

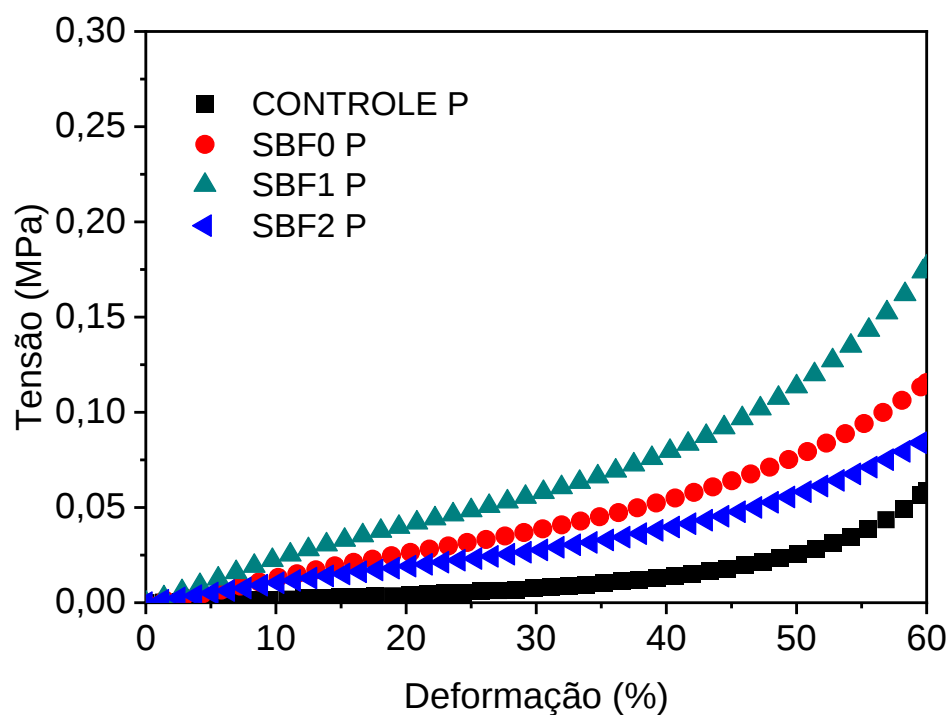
Embora o PGS tenha mostrado com potencial na engenharia de tecidos moles devido à sua alta biocompatibilidade e natureza elastomérica, seu rápido tempo de reabsorção *in vivo* restringiu seu potencial uso em tecidos que requerem suporte mecânico de longo prazo. Atualmente, é conhecido que o PGS se degrada por meio de erosão superficial, exibindo uma perda de massa linear e manutenção da resistência mecânica. Pomerantseva et al., 2009 tentaram caracterizar as propriedades de degradação do PGS ao propor que seu tempo de degradação está correlacionado com a densidade de reticulação. Os resultados mostraram que, com implantação *in vivo* e digestão enzimática, as taxas de perda de massa do PGS (processo comumente correlacionado à degradação por erosão superficial) não estavam relacionadas ao tempo de cura. Além disso, o PGS foi demonstrado consistentemente se degradar por meio de um processo de erosão superficial, independentemente das densidades de reticulação (Loh; Abdul Karim; Owh, 2015).

## 5.7. ENSAIOS MECÂNICOS

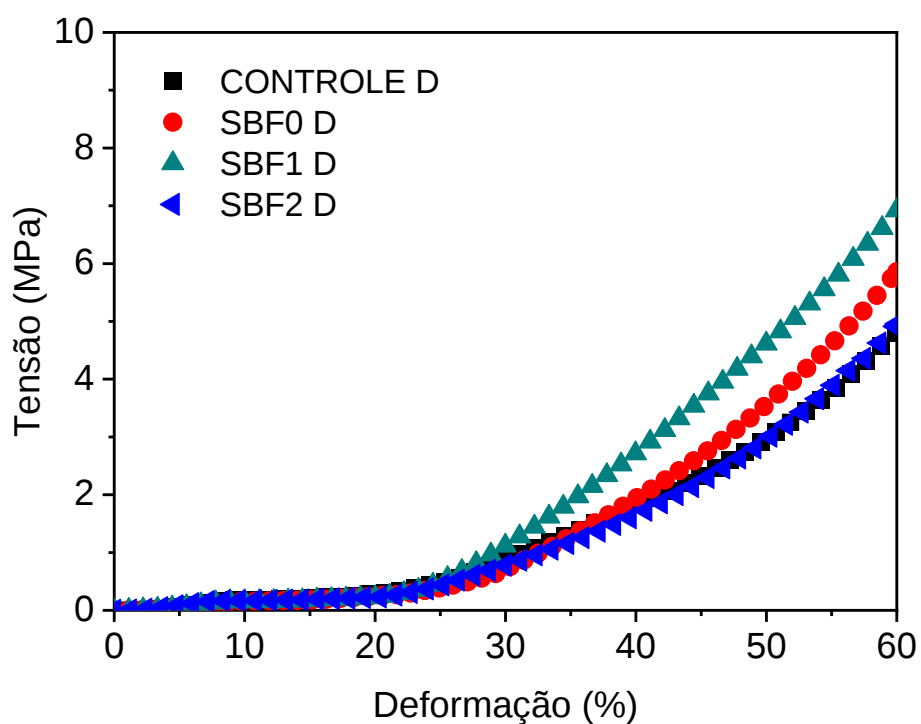
Os ensaios mecânicos realizados nas membranas esponjas (Figura 27) e densas (Figura 28) de PGS, apresentam uma curvatura característica de um material elastômero (Kemppainen; Hollister, 2010a). Os módulos elásticos da membrana esponja controle encontra-se entre  $\pm 0,05$  MPa, a esponja tratada com SBF0 entre  $\pm 0,20$  MPa, a tratada com SBF1 entre  $\pm 0,25$  MPa e a tratada com SBF entre  $\pm 0,18$  MPa, que podem ser analisadas com os devidos desvios padrões na Figura 29. Os módulos elásticos da membrana densa controle encontra-se entre  $\pm 11$  MPa, a densa tratada com SBF0 entre  $\pm 13$  MPa, a tratada com SBF1 entre  $\pm 15$  MPa e a tratada com SBF2 entre  $\pm 10$  MPa, que podem ser analisadas com os devidos desvios padrões na Figura 30.

O módulo de elasticidade bem como o comportamento do PGS sobre ensaios de compressão são dependentes das condições de fabricação do material, especialmente da quantidade molar de glicerol e ácido sebácico utilizada durante a reação, também como as temperaturas de processamento do pré-polímero, sendo por método convencional ou assistido por forno micro-ondas, e temperatura e tempo da etapa de cura final do material (Lee et al., 2018a). A análise das propriedades mecânicas do PGS é uma etapa importante para avaliar sua viabilidade para aplicações em engenharia de tecidos, já que suas propriedades mecânicas influenciam a adesão e proliferação celular (Ifkovits et al., 2009). O PGS tem sido objeto de estudo para diversas aplicações, desde tecido cardíaco (Marsano et al., 2010; Park et al., 2011), até cartilaginoso (Kemppainen; Hollister, 2010b) e adiposo (Patrick, 2001; Stacey et al., 2009). Este interesse pelo PGS reside pela facilidade de ajustar essas propriedades mecânicas do material em sua forma densa e porosa. Outros estudos sobre as propriedades mecânicas do PGS examinaram apenas uma condição de cura ou analisaram o efeito de variar estas condições, sem caracterizar o comportamento elástico não linear do PGS (Sundback et al., 2005).

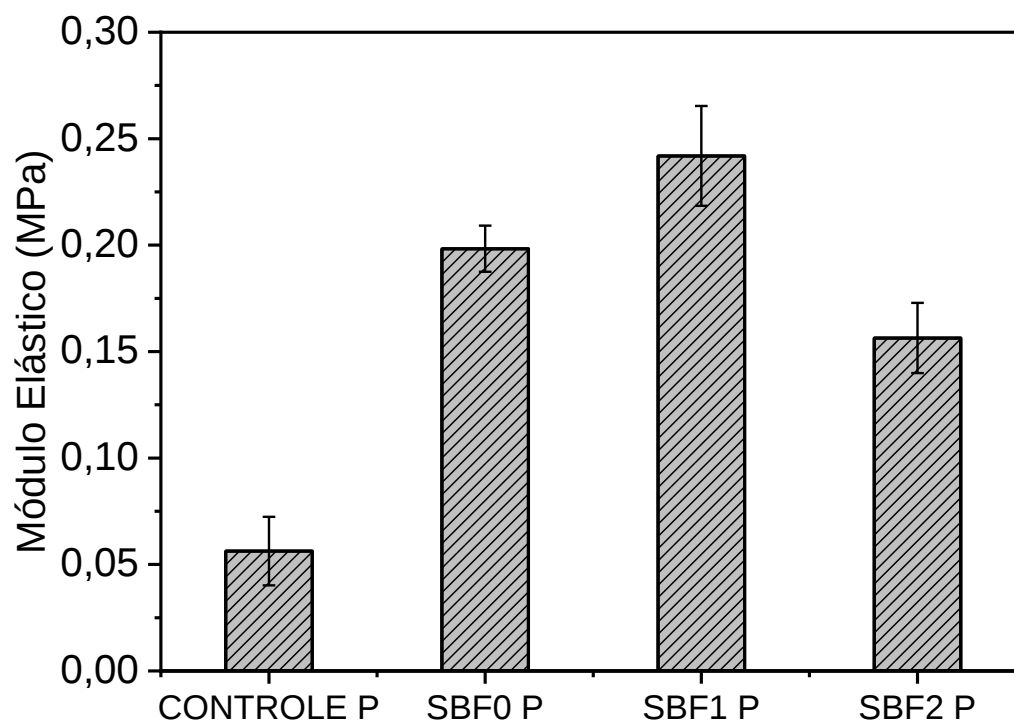
Os estudos de compressão do PGS com a adição de nano hidroxiapatita apresentados por (Wang et al., 2019) apresentam o mesmo padrão de um elastômero e com deformação de 5 kPa com 40% de deformação. Já os estudos de (Krook et al., 2020a) apresentam diferentes tempos de cura e porosidade do material, onde fica claro que ambos os processos podem afetar diretamente a resistência do material, deformando a partir de 50% de aplicação de tensão. Da mesma forma, (Guler et al., 2022a) apresentou que o PGS com tecido ósseo descelularizado, apresenta uma maior resistência à compressão.



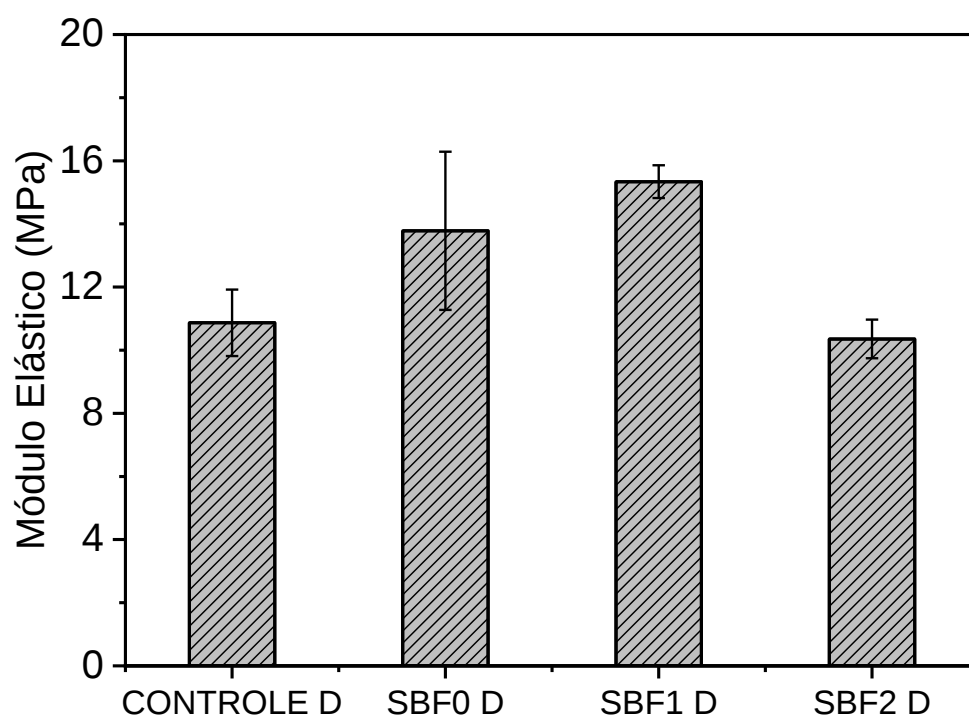
**Figura 27** – Gráfico de tensão vs. deformação dos ensaios de compressão das membranas esponjas de PGS controle e tratadas com solução SBF.



**Figura 28** – Gráfico de tensão vs. deformação dos ensaios de compressão das membranas densas de PGS controle e tratadas com solução SBF.



**Figura 29** – Gráfico referente ao módulo de elasticidade das membranas esponjas de PGS controle e tratadas com solução SBF.



**Figura 30** – Gráfico referente ao módulo de elasticidade das membranas densas de PGS controle e tratadas com solução SBF.

Foi demonstrado por (Mitsak; Dunn; Hollister, 2012) que as propriedades de tração e compressão do PGS dependiam da temperatura do pré-polímero. Uma variedade de propriedades elásticas não lineares, como módulo tangencial e deformação na ruptura foram obtidas apenas alterando as condições de cura. O PGS curado a uma temperatura mais baixa por um período mais curto de tempo resultou em um módulo elástico de 0,11 MPa, próximo ao encontrado em vasos sanguíneos e miocárdio (Patrick et al., 2002). Já quando curado por mais tempo com uma temperatura maior, o módulo elástico encontrado foi de 2,26 MPa, similar ao colágeno presente em tendões (Engelmayr et al., 2008).

Os materiais poliméricos e seus devidos compósitos têm sido amplamente utilizados em aplicações de engenharia e engenharia de tecidos devido ao seu relativo baixo custo de produção e pouco peso. Esses materiais estão sujeitos a carregamentos dinâmicos e deformações em altas taxas, em diversas aplicações. Os polímeros são conhecidos por apresentar respostas mecânicas distintas sob tensão e compressão em condições de carga quase estática (Jian et al., 2019).

As propriedades mecânicas dos polímeros estão intrinsicamente ligadas à mobilidade molecular, qual é influenciada pela natureza química das macromoléculas, pela massa molar, pela presença de ramificações e ligações cruzadas, pelo grau de cristalinidade, pela presença de plastificantes, cargas, aditivos, orientação molecular e outros fatores relacionados à história térmica da amostra e às condições de processamento. Um aspecto crucial a ser considerado na determinação das condições e na análise dos resultados dos ensaios mecânicos dos polímeros é o seu comportamento viscoelástico, o qual pode ser notavelmente pronunciado em certos materiais (Kim et al., 2014; Li et al., 2013b).

## 5.8. ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada a fim de identificar as propriedades térmicas do PGS e para determinar as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) dos materiais, apresentadas na Tabela 7. A  $T_g$  do PGS denso foi de  $-34,77\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a do PGS esponja foi de  $-32,06\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que se correlaciona muito bem com a literatura (Liu et al., 2007a; Xu et al., 2015).

**Tabela 7** – Valores de  $T_g$  das membranas de PGS submetidas a análise de calorimetria exploratória diferencial.

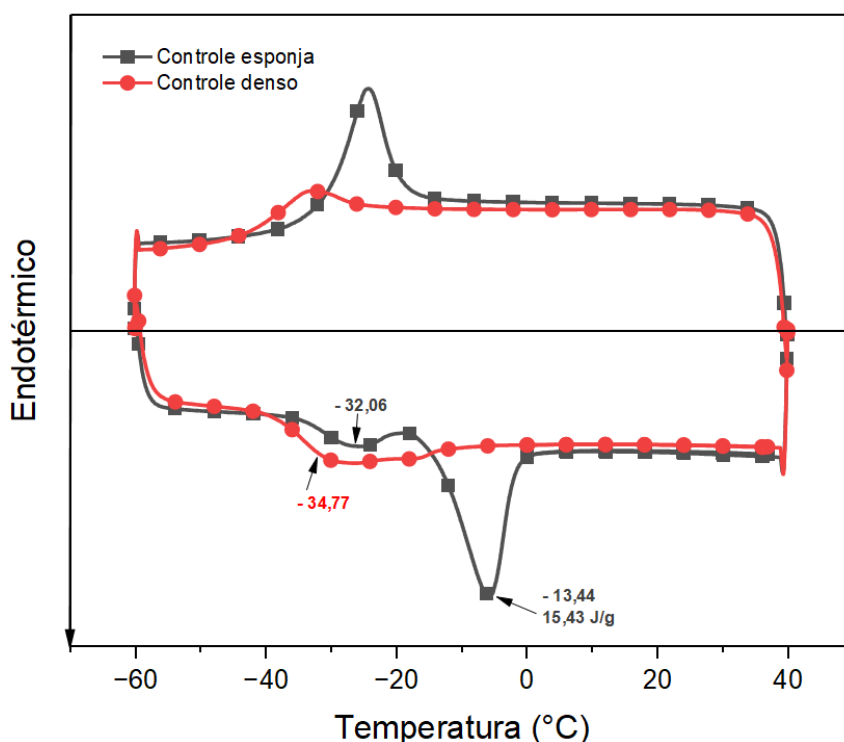
| Material             | $T_g\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ |
|----------------------|---------------------------------|
| PGS/denso/controle   | - 34,77                         |
| PGS/esponja/controle | - 32,06                         |
| PGS/denso/SBF0       | - 27,86                         |
| PGS/esponja/SBF0     | - 24,04                         |
| PGS/denso/SBF1       | - 27,64                         |
| PGS/esponja/SBF1     | - 19,27                         |
| PGS/denso/SBF2       | - 29,65                         |
| PGS/esponja/SBF2     | - 29,78                         |

As Figuras 31, 32 e 33 apresentam as curvas de DSC das membranas de PGS densas e esponjas com os devidos tratamentos com solução SBF. Nestas curvas é possível realizar a comparação das  $T_g$  nas diferentes composições do material, que novamente possuem um comportamento satisfatório quando comparado com a literatura (Wu et al., 2021a; Xu et al., 2015; Yu et al., 2023).

Aliado as características mecânicas apresentadas no item 5.7 e os demais exemplos encontrados na literatura (Gultekinoglu et al., 2019; Takahashi et al., 2016), pode-se concluir que o PGS apresenta potencial de aplicação em engenharia de tecidos moles, como aplicação dérmica, músculos e ligamentos. Nos últimos anos, a giração pressurizada emergiu como uma ferramenta inovadora e eficaz na fabricação de *scaffolds*, eliminando a condutividade elétrica (Souza et al., 2017). No entanto, os principais desafios no design com o PGS são a dissolução e fabricação do material, pois uma vez reticulado, o PGS torna-se impraticável de dissolver e processar. Embora os *scaffolds* à

base de PGS possam ser fabricados a partir do pre-polímero, eles tendem a derreter e perder sua forma física durante a reticulação térmica (Leblon et al., 2013b).

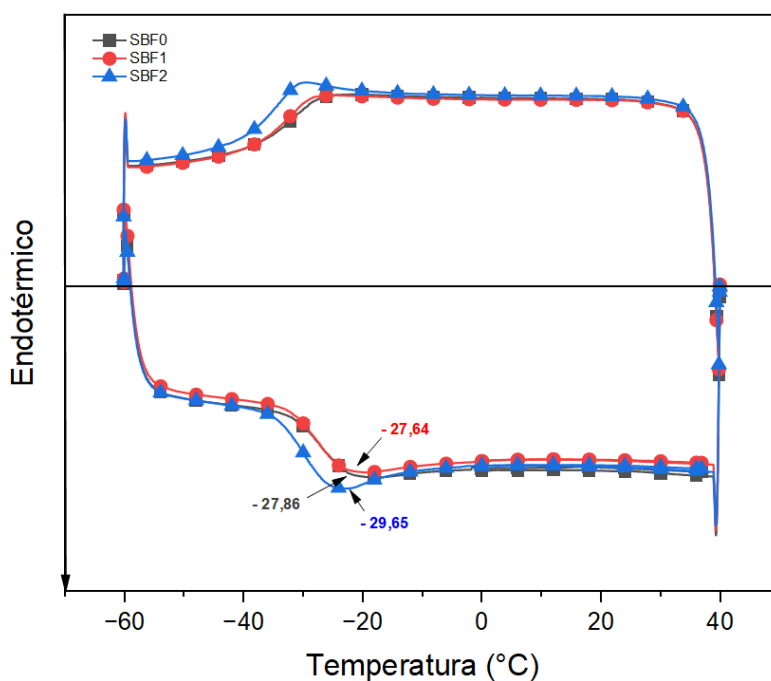
A Tg representa um fenômeno térmico muito importante para a caracterização de materiais poliméricos ou outros materiais que exibem características amorfas ou semicristalinas (Li et al., 2013a). A Tg é a temperatura na qual ocorre a transição do estado vítreo para um estado mais “maleável” do material, sem provocar mudanças estruturais significativas. Essa propriedade está relacionada à região amorfa do material, onde as cadeias moleculares estão desordenadas (Kemppainen; Hollister, 2010a). A região abaixo da Tg é caracterizada pela falta de energia interna suficiente para permitir o deslocamento das cadeias moleculares por meio de mudanças conformacionais, desta forma, a Tg é inversamente proporcional à cristalinidade do material (Guler et al., 2022a).



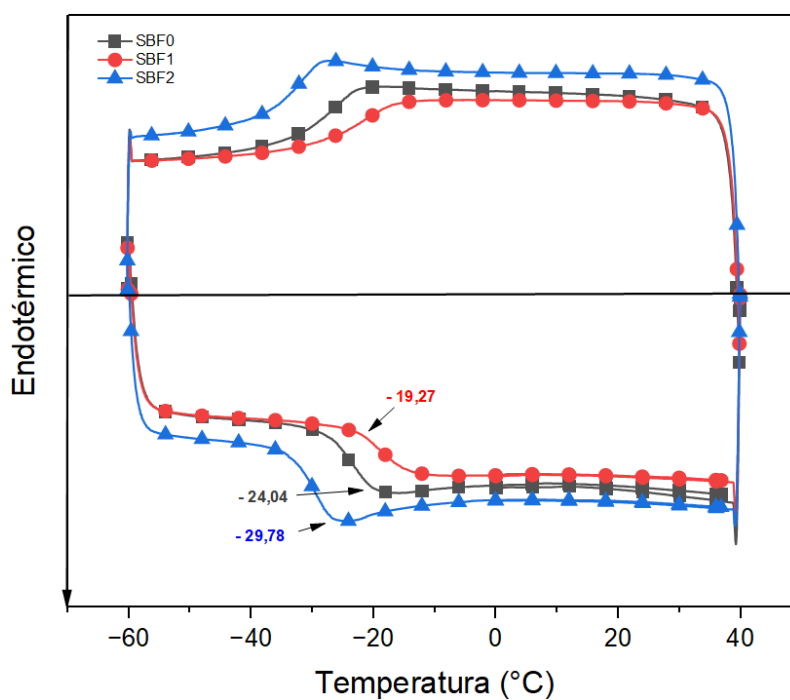
**Figura 31** – Curvas de DSC das membranas controle densa e esponja de PGS, com o ponto de Tg indicado.

As curvas de Tg podem ser acompanhadas por uma relaxação entálpica, que pode ser observada na Figura 31, na curva da membrana esponja, que é identificada por um pico endotérmico, logo após a Tg (Piszko et al., 2023a). Essa relaxação é sensível à história térmica da amostra, ou seja, ao tempo em que a amostra é submetida a um

tratamento térmico de envelhecimento abaixo da  $T_g$  (Rai et al., 2012a; Sha et al., 2021), neste caso, o valor de entalpia em nossa amostra é de 15,43 J/g.



**Figura 32** – Curvas de DSC das membranas densas de PGS tratadas com solução SBF, com o ponto de  $T_g$  indicado.



**Figura 33** – Curvas de DSC das membranas esponjas de PGS tratadas com solução SBF, com o ponto de  $T_g$  indicado.

Os estudos de (Guler et al., 2022a) apresentam que o PGS com a adição de material ósseo descelularizado possui uma Tg entre -3,9 °C, porém seus resultados indicam que o PGS é amorfo em 37°C. Em contrapartida, os estudos de (Wang et al., 2019) apresentam uma Tg entre - 25 °C à - 30 °C com a adição de nano hidroxiapatita. Esses diferentes resultados indicam que a Tg do PGS pode variar de acordo com as modificações de estrutura do material e seus respectivos tempos de cura.

Como este trabalho visa a aplicação das membranas de PGS em tecido ósseo, para contornar essas desvantagens do material, é possível formar misturas ou blendas com polímeros que sejam solúveis em um solvente comum ao pre-polímero de PGS, que tenham uma temperatura de fusão superior à temperatura de reticulação e que possam ser removidos da estrutura após o processo de reticulação (Frydrych; Chen, 2013; Lee et al., 2013). Um polímero candidato adequado para formar uma mistura com o PGS, é o acetato de polivinila (PVA), que atende a esses critérios e já foi adaptado anteriormente na literatura para a eletrofiação de PGS (Khosravi et al., 2016).

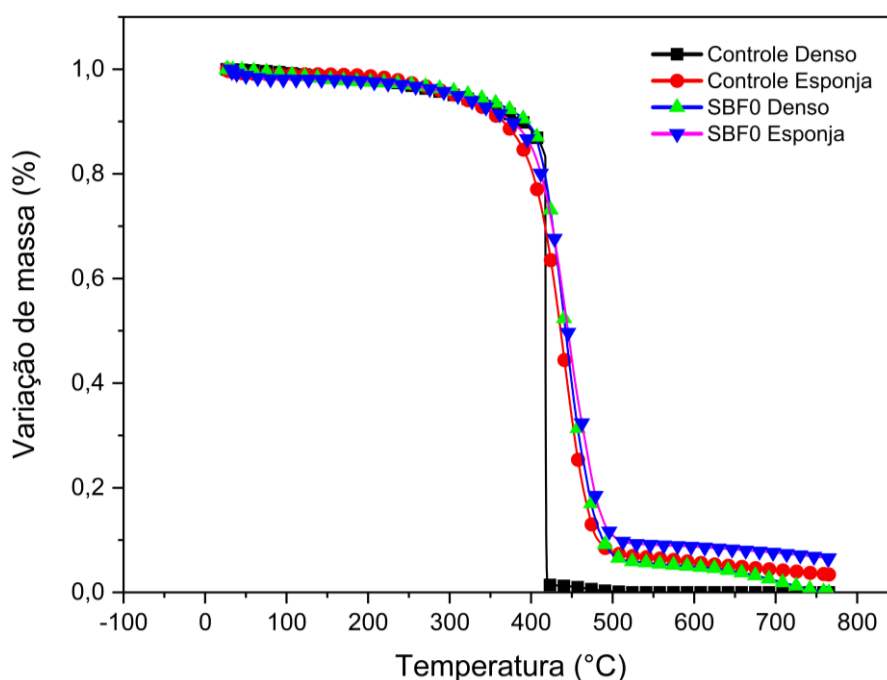
A reticulação é conhecida por suprimir a cristalinidade em materiais poliméricos, visto que a degradação do material, resultando na quebra da estrutura reticulada, pode levar a um fenômeno de recristalização. Nas regiões reticuladas do PGS, as cadeias poliméricas estão ligadas entre si, e não podem fluir uma sobre a outra. No entanto, devido à heterogeneidade na estrutura, existem regiões que não estão reticuladas e são capazes de sofrer fusão durante o aumento da temperatura (Conejero-García et al., 2017). A Tabela 8 apresenta algumas comparações de Tg de materiais poliméricos que vêm sendo reportados em estudos na literatura, a fim de comparação com o PGS.

**Tabela 8** – Tabela de transição vítrea (Tg) de alguns materiais poliméricos que vem sendo reportados na literatura.

| <b>Material</b>      | <b>Abreviação</b> | <b>Tg (°C)</b> |
|----------------------|-------------------|----------------|
| Polipropileno        | PP                | - 30           |
| Poliamida 12         | PA12              | 40             |
| Poliamida 11         | PA11              | 40             |
| Polivinil acetato    | PVAC              | 30             |
| Polivinil clorídrico | PVC-U             | 80-85          |
| Poliestireno         | PS                | 90-100         |
| Policarbonato        | PC                | 155            |

## 5.9. ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA

A degradação térmica das estruturas poliméricas de PGS denso e esponja controle ou após tratamento com solução SBF0 foram realizadas pela análise de termogravimetria (TGA). A partir dos termogramas (Figura 34), pode-se observar que o PGS denso controle sofre degradação térmica em uma única etapa, por volta de 417 °C, já as demais amostras também sofrem a degradação térmica em uma única etapa, porém por volta de 444 °C. Esse resultado está associado ao alto nível de reticulação do material, comprovada por um único ponto de degradação térmica (Gultekinoglu et al., 2019). A Tabela 9 apresenta os picos de temperatura de degradação térmica das amostras analisadas.

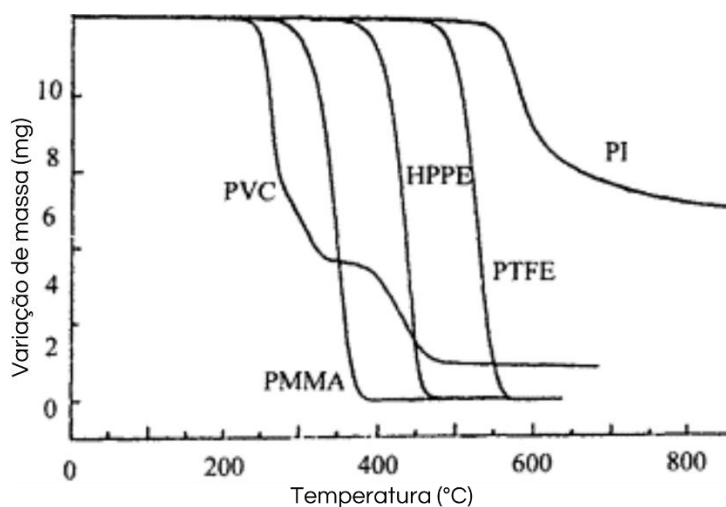


**Figura 34** – Termogramas de TGA das amostras de PGS, onde podem ser observados os perfis de degradação térmica das amostras.

**Tabela 9** – Picos de temperatura de degradação térmica das amostras analisadas, onde *Tonset* é a temperatura de início de degradação e *Tpeak* é a temperatura máxima de degradação.

|                  | <i>Tonset</i> (°C) | <i>Tpeak</i> (°C) | Resíduo (%) à 750 °C |
|------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Controle Denso   | 417                | 418,9             | 0                    |
| Controle esponja | 393,4              | 441,2             | 3,67                 |
| SBF0 Denso       | 405,04             | 441,3             | 0,25                 |
| SBF0 Esponja     | 406,1              | 444,8             | 7,1                  |

As análises de TGA oferecem oportunidades significativas para a caracterização da estabilidade térmica de polímeros e fibras. Essa técnica proporciona dados tanto qualitativos quanto quantitativos sobre a cinética das perdas de massa térmicas das amostras, geralmente associadas à degradação, a Figura 35 apresenta exemplos de curvas de TGA de alguns materiais poliméricos. Além disso, possibilita a avaliação da influência de aditivos e modificações químicas em fibras e materiais têxteis, a compreensão do comportamento de copolímeros ou blendas poliméricas (Jing; Zhang; Wu, 2002).



**Figura 35** – Termogramas de TGA de materiais poliméricos, dentre eles o policloreto de vinila (PVC). Traduzido e reutilizado com permissão de Jing; Zhang; Wu. 2002. Copyright © 2002 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

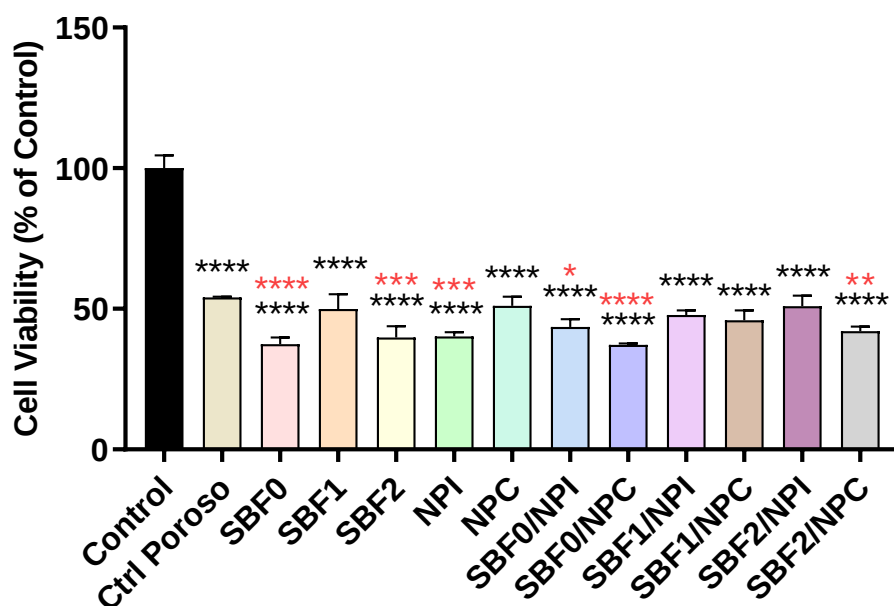
Os estudos de (Guler et al., 2022a) apresentam que somente o PGS e o PGS incorporado com material ósseo descelularizado para a regeneração óssea apresentam também somente uma curva de decaimento em aproximadamente 380 – 470 °C. Em contrapartida, os estudos de (Krook et al., 2020a) apresentam o PGS em diferentes temperaturas de cura, variando entre 120 °C até 165 °C, e os resultados de TGA para todas as temperaturas apresentaram também um único decaimento entre 380 – 395 °C.

Por outro lado, os estudos de (Wang et al., 2019) utilizam o PGS com nano hidroxiapatita a fim de aplicação em regeneração óssea, e as curvas de TGA apresentam também um único pico de decaimento, porém não tão rápido, mas consistente entre 400 – 500 °C.

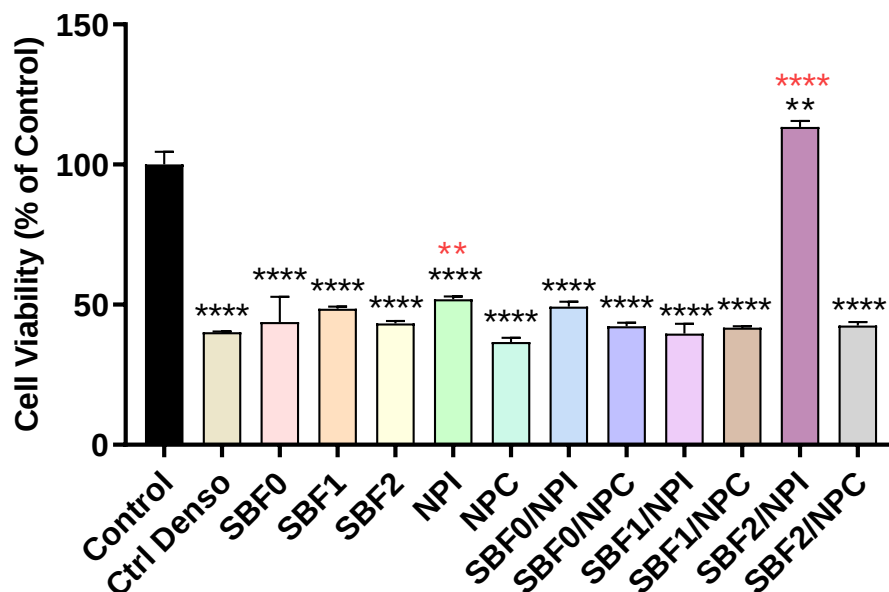
## 5.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Analisando a porcentagem de viabilidade celular das membranas porosas de PGS apresentadas na Figura 36, pode-se observar que a viabilidade celular diminuiu relativamente após 24h de análise, juntamente com as membranas densas, que pode ser observado na Figura 37, onde também apresentarem uma baixa viabilidade celular quando comparadas com o meio controle ideal. Este resultado pode ser justificado pela taxa de degradação do PGS, em que neste processo ocorrem liberação de componentes ácidos no meio de cultura celular, acidificando o meio de cultura e não viabilizando o crescimento e proliferação celular (Conejero-García et al., 2017).

Aliado a liberação de componentes ácidos no meio de cultura, o baixo grau de reticulação do PGS, podendo interferir diretamente na porcentagem de viabilidade celular das membranas (Jian et al., 2019). Nota-se que mesmo a porcentagem caindo entre 50%, ainda existe viabilidade celular, onde o problema de acidificação do meio de cultura pode ser resolvido por métodos de esterificação do material e/ou mudanças no processo de síntese das membranas, visto que a membrana densa, tratada com solução SBF2 e AgNPs por método de imersão, apresentou a viabilidade celular maior que o meio controle, evidenciado ainda mais a biocompatibilidade e citotoxicidade do material, necessitando apenas de modificações em processo de síntese e pós-tratamentos.



**Figura 36** – Porcentagem de viabilidade celular realizado por MTT das membranas esponjas de PGS, com os tratamentos controle, PGS/CaP, PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs.



**Figura 37** – Porcentagem de viabilidade celular realizado por MTT das membranas densas de PGS, com os tratamentos controle, PGS/CaP, PGS/AgNPs e PGS/CaP/AgNPs.

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular têm sido amplamente baseados na redução de sais de tetrazolio incolores para formazanos coloridos (Stockert et al., 2018). Enquanto a maioria das aplicações histológicas tem se concentrado em sais de ditetrazólio, como o tetrazolio azul de nitro (NBT) que originam formazanos insolúveis, em aplicações celulares vem sendo escolhido a aplicação de sais de monotetrazólio, com destaque para o MTT. A grande maioria das aplicações celulares desses corantes envolve ensaios em microplacas que medem a proliferação celular, com a premissa de que a redução do corante será proporcional ao número de células viáveis em fase de crescimento exponencial (Grela; Kozłowska; Grabowiecka, 2018). Embora essa seja geralmente uma boa aproximação para condições de crescimento definidas com um tipo celular específico, considerando a média ao longo do ciclo celular, frequentemente surgem problemas quando as condições de crescimento não são ideais ou quando utilizados agentes modificadores de crescimento (Berridge; Herst; Tan, 2005).

O MTT é o mais utilizado em estudos de viabilidade celular, proliferação, citotoxicidade e sensibilidade a tratamentos químicos e radioterápicos *in vitro* (Berridge; Herst; Tan, 2005b). Em comparação aos ensaios alternativos, ele se destaca pela simplicidade e eficiência, permitindo uma avaliação semiautomatizada através de placas multi poços e leitores fotométricos. Embora tenha sido sugerido que a carga positiva líquida em sais de tetrazolio, como MTT e NBT, seja o principal fator na sua captação

por células vivas, é mais provável que o caráter lipofílico desses sais desempenhe um papel mais significativo, uma vez que diretamente influencia a permeabilidade da membrana celular (Stockert et al., 2012).

No que se diz respeito à avaliação da viabilidade celular, após a redução catalisada por desidrogenases e agentes redutores presentes em células metabolicamente ativas, o MTT amarelo é transformado em um produto formazan violeta-azul insolúvel em água, com um pico de absorção em 562 nm (Wang et al., 2014). Após a redução do MTT, o meio de cultura é removido, os depósitos de formazan são extraídos e a avaliação é realizada por técnica colorimétrica (Stockert et al., 2018).

A interação entre cadeias de polímeros solúveis e células tem sido explorada em diversas aplicações biomédicas. Por exemplo, polímeros catiônicos, como poli-L-lisina e poli(etilenoimina) têm sido empregados como transportadores de DNA plasmidial para a transferência de genes para dentro das células. Utilizando interações eletrostáticas, membranas multicamadas de complexos poliônicos podem ser desenvolvidas na superfície celular carregada negativamente, visando a imunoisolação de transplantes celulares. O PEG tem sido utilizado para induzir a fusão celular, resultando na formação de hibridomas durante a produção de anticorpos monoclonais (Andrew L. Niles et al., 2013; Chanana et al., 2005; Stefanowicz-Hajduk; Ochocka, 2020).

Neste sentido, podemos dizer que polímeros catiônicos estabelecem interações intensas com a superfície negativamente carregada das células, resultando em efeitos citotóxicos significativos por meio de atração eletrostática. Por outro lado, polímeros aniônicos, como o ácido poli-L-glutâmico, não apresentam interações com a superfície celular (Chanana et al., 2005; Teramura et al., 2008).

Previamente, um estudo investigou a morfologia de células mesenquimais humanas e a organização do citoesqueleto de actina em substrato de PGS (Piszko et al., 2023b). Nas superfícies mais macias, as células exibiram uma morfologia ramificada com ricos filopódios, apresentando um corpo celular contraído, levantado e arredondado. Em contraste, as células cultivadas nos filmes mais rígidos tornaram-se confluentes e demonstraram crescimentos estriado e alinhado. As fibras de f-actina foram mais evidentes e esticadas em lâminas de vidro e filmes mais rígidos em comparação com o filme mais macio, onde o citoesqueleto era difuso (Li et al., 2013b). O marcador de células-tronco inicialmente expresso pelas células mesenquimais controle,

progressivamente desapareceu nos diversos substratos do material. Esses resultados indicam que a mecânica do PGS influencia tanto a morfologia das células mesenquimais quanto a organização do citoesqueleto de actina, sugerindo que as propriedades do material e a elasticidade do substrato podem afetar o comprometimento das células-tronco em linhagens específicas (Li et al., 2013b; Liu et al., 2007).

No que se diz respeito à cultura celular, é importante observar que o PGS curado a baixa temperatura (120 °C por 24h), resultando em um módulo de elasticidade de 0,07 Mpa, resulta em um elastômero pegajoso. Isso pode ser atribuído à presença de monômeros não reagidos no material, os quais podem ser removidos mediante lavagem do elastômero, com soluções decrescentes de etanol em água deionizada (Kim et al., 2014). Essa abordagem visa extrair as moléculas não reagidas da rede, alguns estudos sugeriram que a quantidade de oligômeros e monômeros não reagidos é inversamente proporcional ao tempo de cura, e o etanol pode ser utilizado como agente de lixiviação (Mitsak; Dunn; Hollister, 2012). No entanto, essa estratégia pode resultar em encolhimento e deformação dos substratos, outras abordagens para lidar com esse problema incluem aumentar a proporção molar de glicerol para ácido sebácico, embora isso possa reduzir a recristalização não reagida do ácido sebácico durante o resfriamento (Ding et al., 2020).

Para a cultura celular, a lixiviação de monômeros não reagidos pode ser realizada pré-condicionando o material por imersão prolongada em meios de cultura celular antes do cultivo celular (Kim et al., 2014; Li et al., 2013b; Liu et al., 2007).

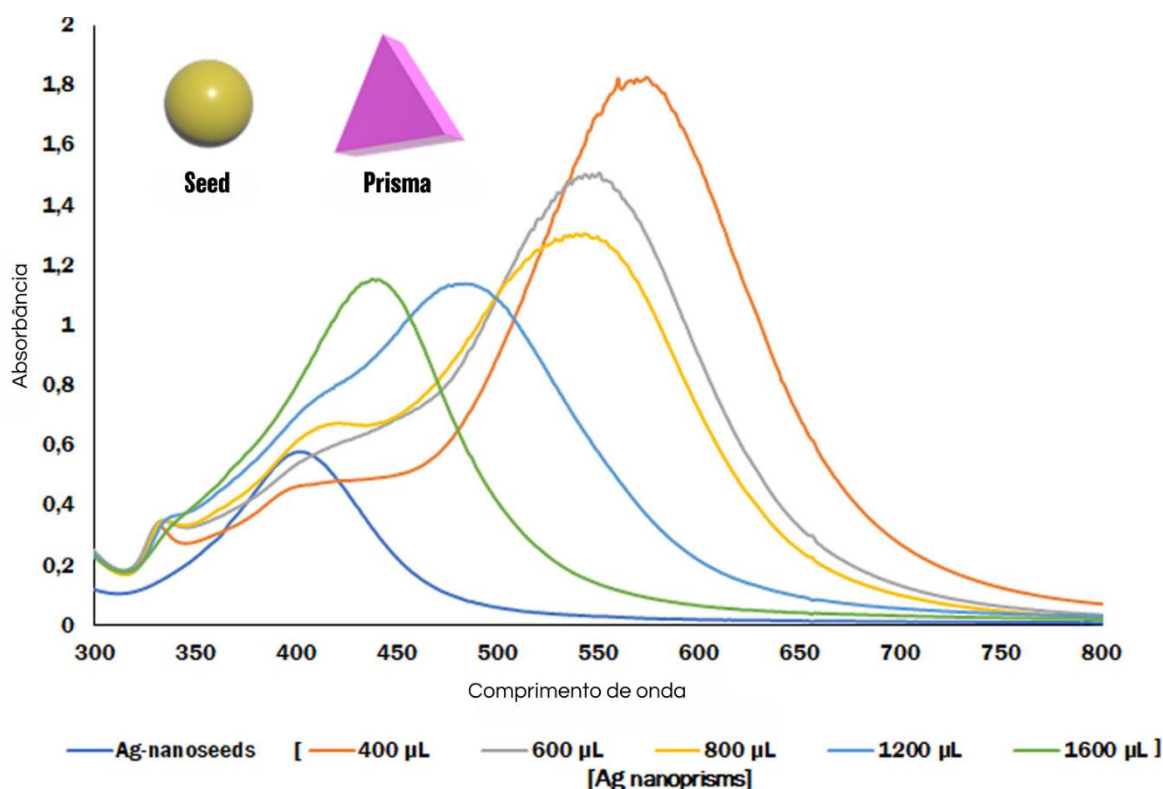
### 5.11. CARACTERIZAÇÕES DAS AgNPs

A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica de caracterização que engloba tanto a espectroscopia de absorção quanto a espectroscopia de refletância, operando na faixa espectral UV-visível. Moléculas que possuem elétrons  $\pi$  ou elétrons não ligantes têm a capacidade de absorver energia luminosa na região ultravioleta ou visível, sendo excitadas para orbitais moleculares antiligantes superiores. Vale destacar, que a espectroscopia UV-vis difere da espectroscopia no infravermelho (IR) nos comprimentos de ondas de excitação, já que, enquanto a UV-vis as moléculas passam por transições eletrônicas na região ultravioleta ou visível, na IR as transições são vibracionais (Torres-Rivero et al., 2021).

Esta técnica é comumente empregada para a determinação quantitativa das concentrações de elementos em uma solução, conforme previsto pela lei de Beer-Lambert. Neste contexto, as moléculas absorvem a radiação incidente, e a intensidade dessa absorção é proporcional à concentração da espécie analisada (Faraji; Yamini; Salehi, 2021)

A UV-vis também é utilizada para caracterizar NPs, pois ela permite confirmar a formação de NPs medindo a Ressonância Plasmática de Superfície (SPR), que pode fornecer informações sobre o tamanho, estabilidade e agregação das NPs. Comprimentos de onda na faixa de 200-700 nm são geralmente utilizados para caracterizar NPs de metal e óxido metálico. Por exemplo, AgNPs exibem um pico de absorção específico entre 400 e 450 nm, NPs de ouro (AuNPs) entre 500-550 nm, a Figura 38 apresenta um exemplo de corridas espectrais de UV-vis obtidas para diferentes tamanhos de AgNPs (Wang; Chu, 2013).

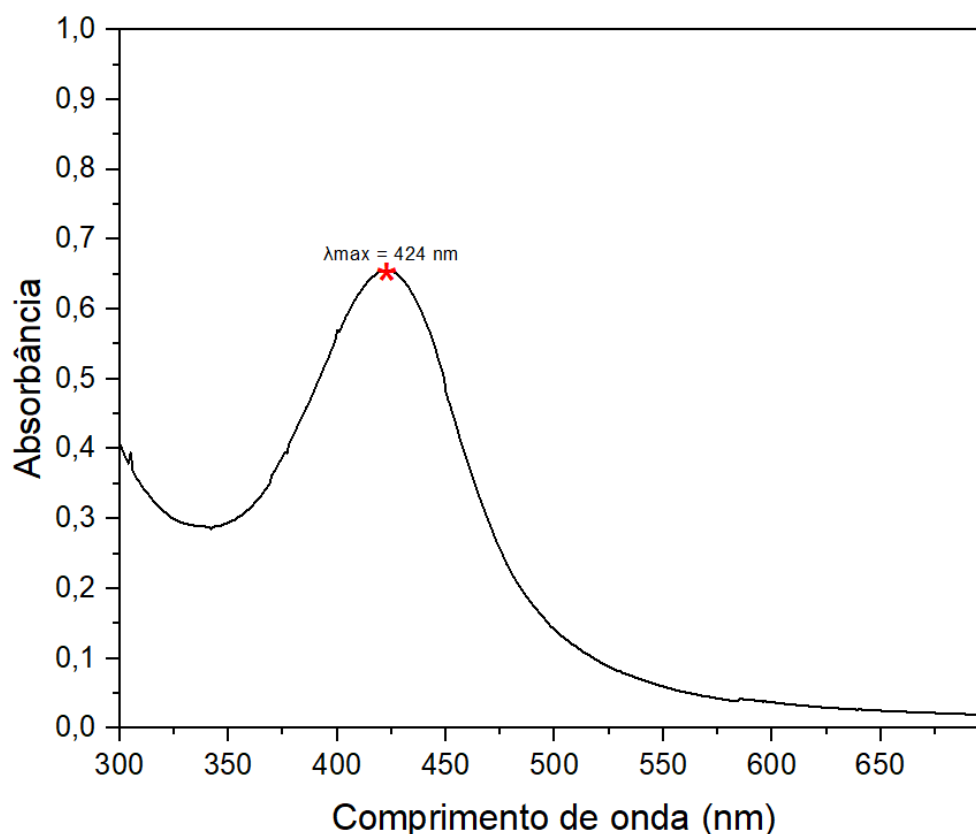
As NPs menores, (tamanho médio entre 10 nm), denominadas Ag-nanoseeds, são preparadas como modelos de nucleação para NPs maiores (entre 15 à 25 nm) que são denominados nanocristais com estrutura definida, os Ag-nanoprisms. A diferença de tamanhos explicam o fato destas NPs possuírem diferentes propriedades de absorção de luz (Faraji; Yamini; Salehi, 2021; Torres-Rivero et al., 2021; Wang; Chu, 2013).



**Figura 38** – Espectros de absorção de AgNPs, exemplificando os comprimentos de onda característicos de um Ag-nanoseed e um Ag-nanoprism. Traduzido e reutilizado com permissão de Torres-Rivero et al., 2021. Copyright © 2021 Elsevier B. V. Todos os direitos reservados.

Por outro lado, a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é uma técnica que utiliza a flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento Browniano das partículas para medir seus tamanhos. De acordo com a teoria do espalhamento de luz, o estado de polarização da luz dispersa contém informações sobre a morfologia das partículas. Atualmente, existem adaptações para medir o tamanho e forma de nanobastões, como espalhamento de polarização vertical e espalhamento de polarização vertical (Pan et al., 2023; Wang et al., 2024).

O perfil de caracterização no UV-Vis das suspensões de AgNPs sintetizadas por rota biogênica é apresentado na Figura 39, onde o  $\lambda_{\text{max}}$  é observado em 424 nm, comprovando então a síntese das AgNPs pelo extrato alcoólico de própolis vermelha. A análise por DLS é apresentada na Figura 40, onde apresentou partículas com raio médio de 9 nm com 10-15% de polidispersão, o gráfico de correlação é apresentado na Figura 41, onde indica que as AgNPs formadas então dentro dos parâmetros propostos pela literatura, e a tabela x apresenta os dados coletados na análise das NPs (Kischkel et al., 2020).

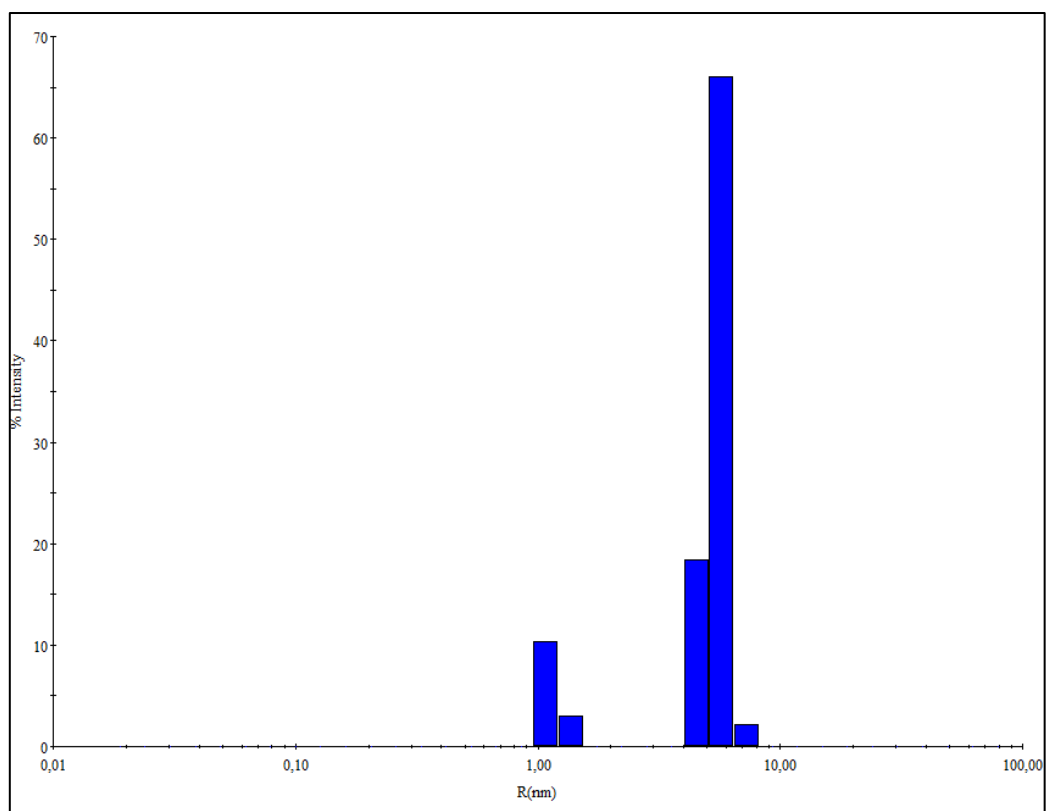


**Figura 39** – Espectro de absorção na região do UV-Vis da suspensão de AgNPs, onde pode ser observado o pico de absorção em 424 nm.

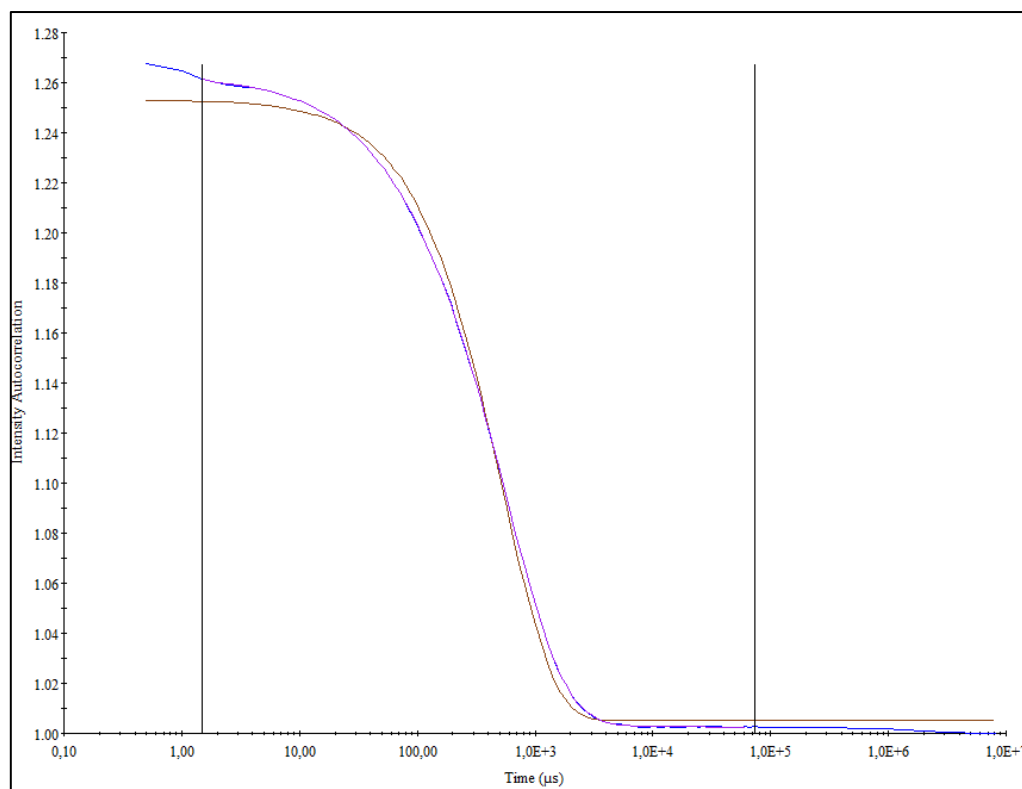
A Tabela 10 apresenta os dados coletados sobre as AgNPs durante o teste de DLS, apresentando o raio médio das NPs e polidispersão das mesmas, sendo uma polidispersão e raio satisfatórios quando comparadas com as sínteses biogênicas de AgNPs por própolis vermelha desenvolvidas na literatura (Câmara; Viana; Viana, 2021; Duran; Seabra, 2018; Orbaek; Mchale; Barron, 2015).

**Tabela 10** – Dados coletados pela técnica de DLS que informam principalmente o raio médio e a polidispersão das AgNPs.

| Item   | R (nm) | Polidispersão (%) | MW-R (kDa) | Intensidade (%) | Massa (%) |
|--------|--------|-------------------|------------|-----------------|-----------|
| Pico 1 | 1,1    | 10,6              | 5          | 13,3            | 5,7       |
| Pico 2 | 9,0    | 16,9              | 184        | 86,7            | 94,3      |



**Figura 40** – Gráfico de regularização da presença de AgNPs na suspensão. Fonte: Software DYNAMICS V6.



**Figura 41** – Gráfico de correlação da suspensão de AgNPs. Fonte: Software DYNAMICS V6.

### 5.12. CURVA ANALÍTICA DE AgNPs E PRÓPOLIS VERMELHA

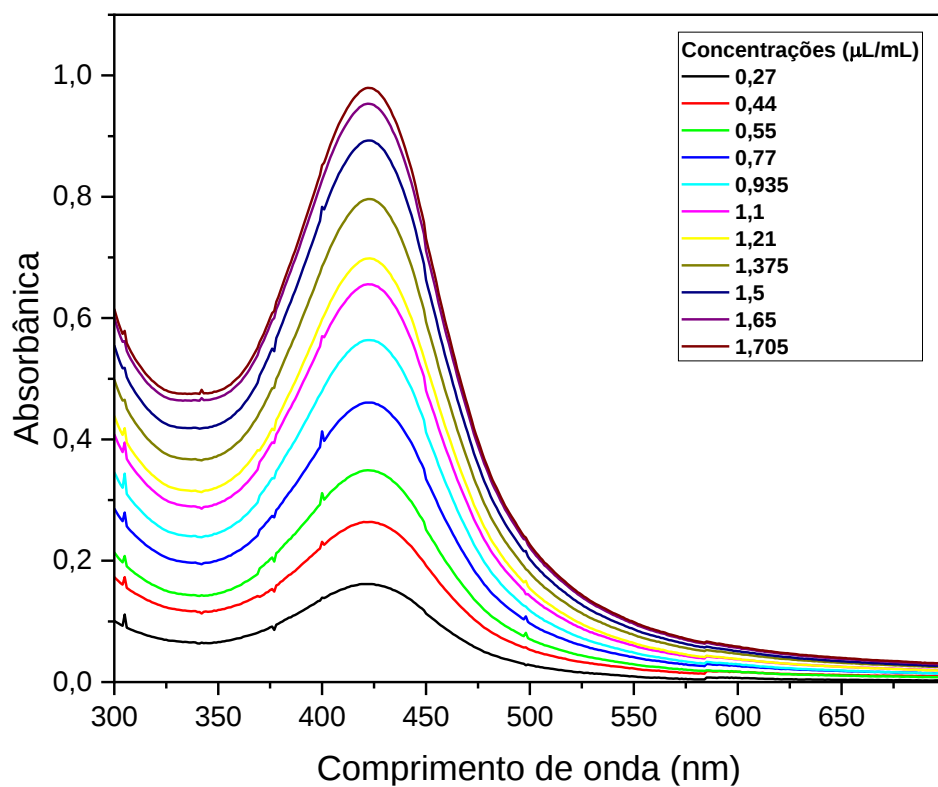
A validação analítica pode ser caracterizada como o levantamento e avaliação de dados gerados a partir do processo ou método utilizado na fabricação de um produto, seja ele comercial ou experimental. Essa validação busca estabelecer evidências experimentais de que um processo, método ou estudo é capaz de proporcionar resultados consistentemente reproduzíveis, precisos e exatos, utilizando metodologias estabelecidas e amplamente aceitas (Grant; Rappold, 2018).

Neste sentido, curva de calibração ou curva analítica define a relação entre a resposta do detector e a concentração do analito na matriz da amostra. Para ajustar a curva, o algoritmo mais simples que descreve a relação concentração/resposta é utilizado, desta forma, ele pode ser linear ou não linear, mas deve obrigatoriamente minimizar o erro relativo. A curva de calibração deve ser constituída em cinco a nove pontos que cubram toda a faixa de concentrações do analito esperadas, ou seja, de 0 a 200% do teor teórico (Mcmillan, 2016).

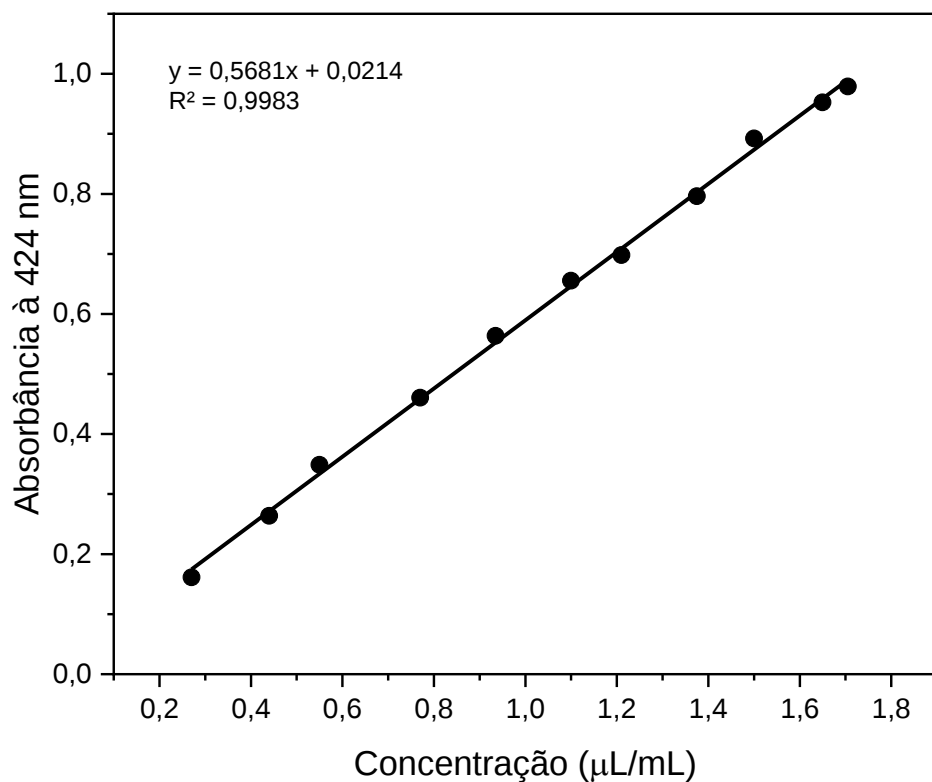
A menor concentração deve ser considerada como o menor limite de quantificação (LLOQ) e a maior concentração deve ser considerada o maior limite de quantificação (ULOQ). Se a leitura da amostra estiver fora das margens LLOQ-ULOQ, a amostra deve ser diluída e uma nova leitura deve ser realizada (Grant; Rappold, 2018; Mcmillan, 2016).

A Figura 42 apresenta os espectros na região UV-Vis no intervalo de concentração de 0,27 a 1,7 µl/ml das soluções de AgNPs. Uma banda de absorção em 424 nm foi registrada, sendo esse o valor de comprimento de onda utilizado para o delineamento da curva analítica, apresentada na Figura 43.

Sendo assim, a linearidade do método foi avaliada pela curva analítica. A equação da reta foi obtida por regressão linear ( $y = 0,5681 \cdot x - 0,0214$ ) onde x quantificação e y é a absorbância, e obtendo um coeficiente de correlação  $R^2 = 0,998$ . Esse valor está de acordo com as diretrizes da RDC 166/2017 que estabelece critério mínimo aceitável do coeficiente como  $R^2 = 0,994$ .

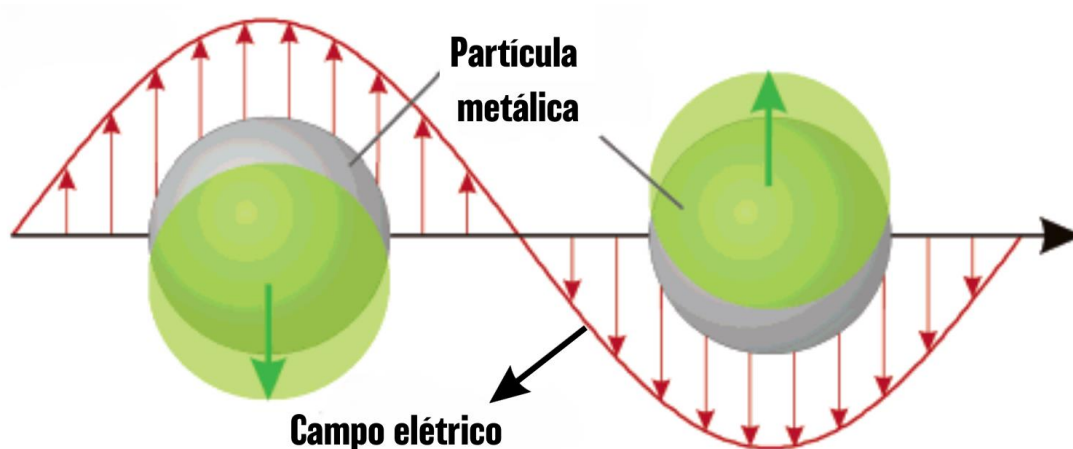


**Figura 42** – Espectros de absorção na região do UV-Vis das suspensões de AgNPs, em diferentes concentrações, evidenciando LLOQ e ULOQ em 424 nm.



**Figura 43** – Curva analítica obtida por regressão linear, contendo 11 pontos que será utilizada para a quantificação de liberação das AgNPs.

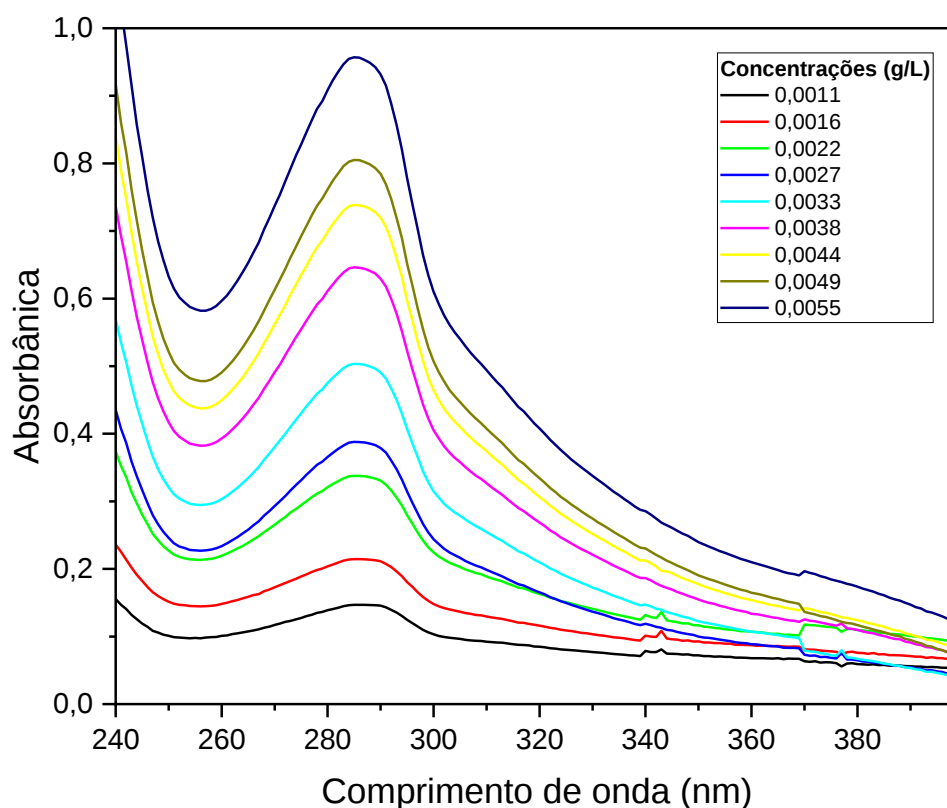
A interação entre a radiação eletromagnética na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e as nanopartículas metálicas ocorre predominantemente devido ao acoplamento entre os elétrons de valência do metal e o campo elétrico da radiação. Essa interação pode ser identificada pela polarização da densidade eletrônica da nanopartícula. A frequência da radiação necessária para excitar os modos plasmônicos em um nanomaterial metálico é influenciada por fatores como a composição química (tanto do metal quanto do meio em que se encontra), tamanho e forma da nanopartícula (Grasseschi; Dos Santos, 2020; Kelly et al., 2003). A Figura 44 apresenta de forma esquemática este processo:



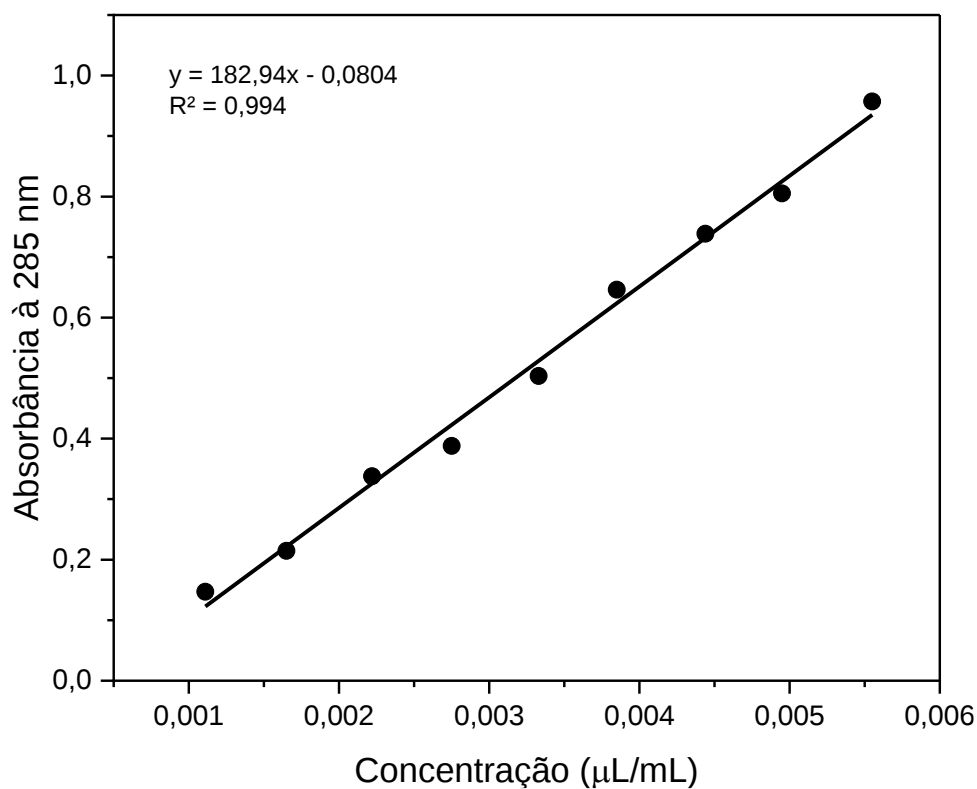
**Figura 44** – Perturbação da densidade eletrônica de uma nanoesfera provocada pela interação com o campo elétrico da radiação excitante. Traduzido e reutilizado com permissão de Kelly et al., 2003. Copyright © 2003 American Chemical Society. Todos os direitos reservados

A Figura 45 apresenta os espectros na região UV-Vis no intervalo de concentração de 0,001 a 0,005 g/l das soluções de própolis vermelha. Uma banda de absorção em 285 nm foi registrada, sendo esses os valores de comprimento de onda utilizados para o delineamento da curva analítica, apresentada na Figura 46.

Sendo assim, a linearidade do método foi avaliada pela curva analítica. A equação da reta foi obtida por regressão linear ( $y = 182,94 \cdot x - 0,0804$ ) onde  $x$  quantificação e  $y$  é a absorbância, e obtendo um coeficiente de correlação  $R^2 = 0,994$ . Esse valor está de acordo com as diretrizes da RDC 166/2017 que estabelece critério mínimo aceitável do coeficiente como  $R^2 = 0,994$ .



**Figura 45** – Espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções de própolis vermelha, em diferentes concentrações, evidenciando LLOQ e ULOQ em 285 nm.



**Figura 46** – Curva analítica obtida por regressão linear, contendo 9 pontos que será utilizada para a quantificação de liberação de própolis vermelha.

A atividade biológica da própolis vermelha está relacionada à sua composição química, composta por fitoquímicos e outros metabólitos secundários de plantas obtidas a partir de resinas e exsudatos vegetais. A maior parte dos constituintes bioativos da própolis é composta por resinas e/ou bálsamos vegetais, como os compostos polifenólicos e seus derivados; recentemente vem sendo estudada sua composição fitoquímica, destacando os elementos de forma individual, como os ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, benzofenonas preniladas, monoterpenos, diterpenos, terpenoides, hidrocarbonetos, compostos voláteis e suas variantes (Pant et al., 2024).

As colorações e composições químicas da própolis podem variar conforme a flora no local de coleta. Nos últimos anos, uma variedade de própolis vermelha brasileira tem sido identificada, e os extratos alcoólicos mostram-se ricos em isoflavonas, especialmente formononetina, daidzeína e biochanina. Além dos compostos fenólicos geralmente extraídos com solventes altamente polares, também foram identificados constituintes químicos de baixa polaridade, como terpenos e outros, além de que, algumas destas substâncias, como metil eugenol e sesquiterpenos, apresentam capacidade de atividade antitumoral, a Figura 47 apresenta uma imagem do extrato cru da própolis vermelha (De Carvalho et al., 2020).



**Figura 47** – Fotografia do extrato cru e seco da própolis vermelha, extraída do sul do Brasil. Fonte: Adaptado de (Martins et al., 2020).

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha foi verificada contra diversos microrganismos relacionados à cavidade oral, como *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus spp* e *Staphylococcus aureus*. Outra pesquisa revelou que vestitol e neovestitol, isoflavonoides purificados isolados de um extrato de própolis vermelha, demonstraram melhor atividade antimicrobiana do que os extratos brutos, clorofórmicos e hexânicos (De Carvalho et al., 2020; Martins et al., 2020; Pant et al., 2024).

### 5.13. TESTES DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A Figura 48 apresenta a porcentagem de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, e a Figura 49 das membranas densas de PGS, no tempo de 144 horas, realizados em solução fisiológica de NaCl. Pode-se notar que após o período de análise, não ocorreram liberações significativas de AgNPs no meio, tal fato pode ser justificável por talvez, o meio de liberação escolhido não foi adequado para uma liberação eficiente da NP, ou os métodos de incorporação não foram adequados para a fixação das NPs na membrana de PGS, desta forma, novos estudos de liberação devem ser realizados para o ajuste destes parâmetros, visando a maior eficiência de fixação e liberação das AgNPs.

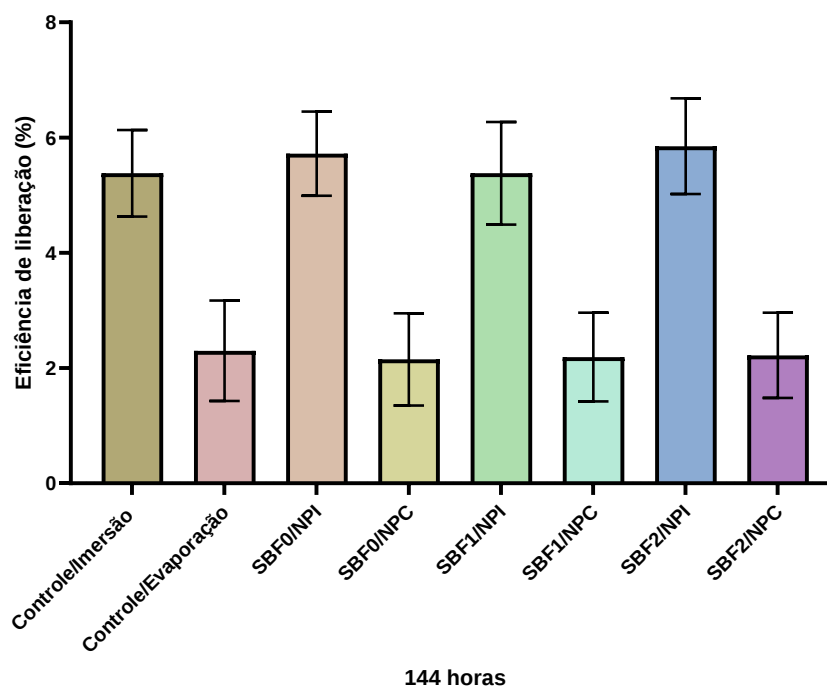
O crescente interesse em sistemas de entrega de medicamentos baseados em nanotecnologia tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de forma de dosagens e terapias de entrega de fármacos complexas, como por exemplo, aplicações como lipossomas, nanoemulsões, nanocristais, NPs, NPs poliméricas, NPs lipídicas sólidas, nanofibras e dendrímeros (D'Souza, 2014).

Devido ao seu tamanho reduzido, as formas de dosagem em nanoescala apresentam uma relação superfície-volume elevada, modificando suas propriedades químicas, físicas e biológicas no momento da dosagem. Essa característica se destaca, pois possibilita a transposição de barreiras celulares e teciduais, resultando em alterações na farmacocinética e farmacodinâmica do agente terapêutico. Neste contexto, os testes de liberação *in vitro* são ferramentas analíticas para investigar e compreender o comportamento de um produto em diferentes estágios de seu desenvolvimento farmacêutico. Quando devidamente elabora, um perfil de liberação *in vitro* pode fornecer informações fundamentais sobre a forma de dosagem, seu comportamento, além de detalhes sobre o mecanismo e a cinética de liberação (Uhljar et al., 2021).

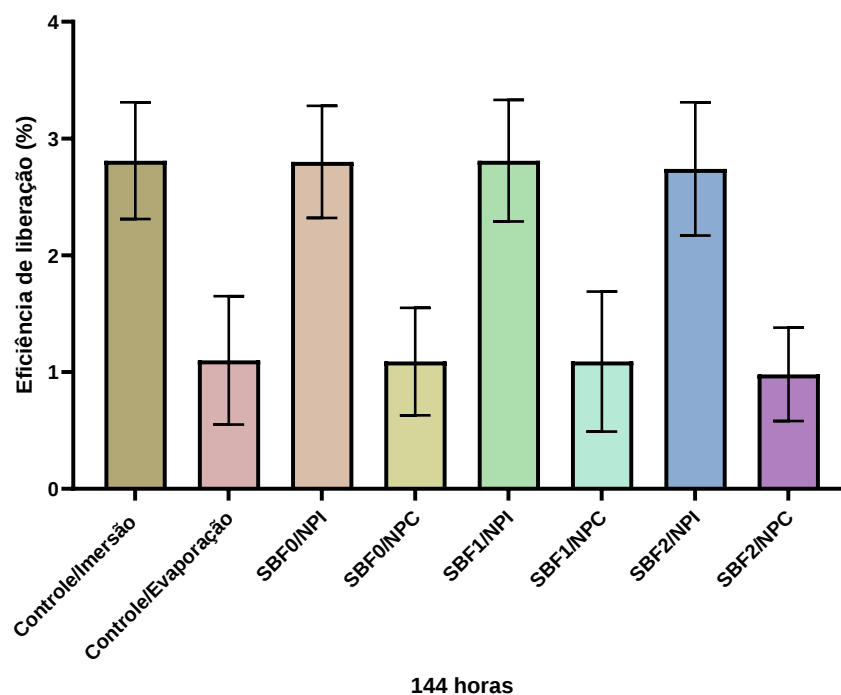
Sendo assim, vem sendo estudado os instrumentos adequados para avaliar corretamente um perfil de liberação *in vitro* de NPs. Entretanto, devem ser levados em consideração algumas tomadas de decisão, como meio de liberação, agitação e outros fatores. Ao contrário de dosagem oral, em que o meio de liberação geralmente replica o pH do trato gastrointestinal, a seleção do meio para dosagens em nanoescala variará de acordo com o local de administração e o local de ação da formulação, tornando a simulação das condições *in vivo* desafiadoras (D'Souza, 2014; Weng; Tong; Chow, 2020).

De maneiras gerais, a escolha do meio de liberação para preparações nanoparticuladas é fundamentada na solubilidade e estabilidade do fármaco, sensibilidade do ensaio e o método utilizado. Portanto, a avaliação da liberação de fármacos a partir de formas de dosagem em nanoescala por ser realizada utilizando uma das seguintes categorias: amostrar e separar (SS), fluxo contínuo (CF) e membrana de diálise (DM) mas, recentemente discutem-se métodos inovadores que empregam voltametria, turbidimetria, entre outros (D'souza, 2014; Uhljar et al., 2021).

Quando se fala em modelos matemáticos para o auxílio de descrição de perfis de liberação, se é notado uma escassez de referências na literatura. No entanto, alguns autores destacaram a importância desses modelos, por exemplo, Barzegar-Jalali et al. 2008, propuseram o uso do tempo elevado à potência recíproca como um modelo geral para analisar a natureza intrínseca da liberação de medicamentos a partir de NPs, com abordagens alternativas incluindo os modelos de Weibull e log-probabilidade. A utilização destes modelos oferece diversas vantagens, possibilitando a compreensão destes mecanismos e servir como guia para suas formulações. Além disso, os parâmetros do modelo podem ser empregados para representar e comparar diferentes perfis de liberação *in vitro* (Barzegar-Jalali, 2008; D'Souza, 2014).



**Figura 48** – Eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.



**Figura 49** – Eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

Como já citado na seção anterior, a própolis vermelha demonstra atividade antimicrobiana significativa contra bactérias e microrganismos, e possui citotoxicidade contra alguns tipos de células cancerígenas, além de ser constituída por uma grande classe de isoflavonoides. Apesar desta notável bioatividade, e grande potencial em formulações alimentares e farmacêuticas, a ingestão em larga escala de própolis é limitada devida a sua baixa solubilidade em água, características sensoriais indesejáveis e baixa biodisponibilidade. A fim de superar esses desafios, vêm sendo desenvolvidos veículos de entrega, como micelas poliméricas, lipossomas, nanocomplexos e criogéis (Gomes Sá et al., 2023).

Os componentes hidrofóbicos presentes da própolis vermelha estão associados às proteínas, possivelmente por meio de interações não covalentes, como forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. A natureza hidrofóbica das proteínas desempenha um papel crucial como transportadoras para a própolis; um exemplo é a significativa melhoria na eficácia da  $\beta$ -lactoglobulina como transportadora para a curcumina mediante desnaturação induzida pelo calor (Zhang et al., 2018).

Além disso, é conhecido que os polifenóis interagem com proteínas ricas em prolina, (por exemplo, zeína, que contém 12% de resíduos de prolina) por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Taylor et al., 2009).

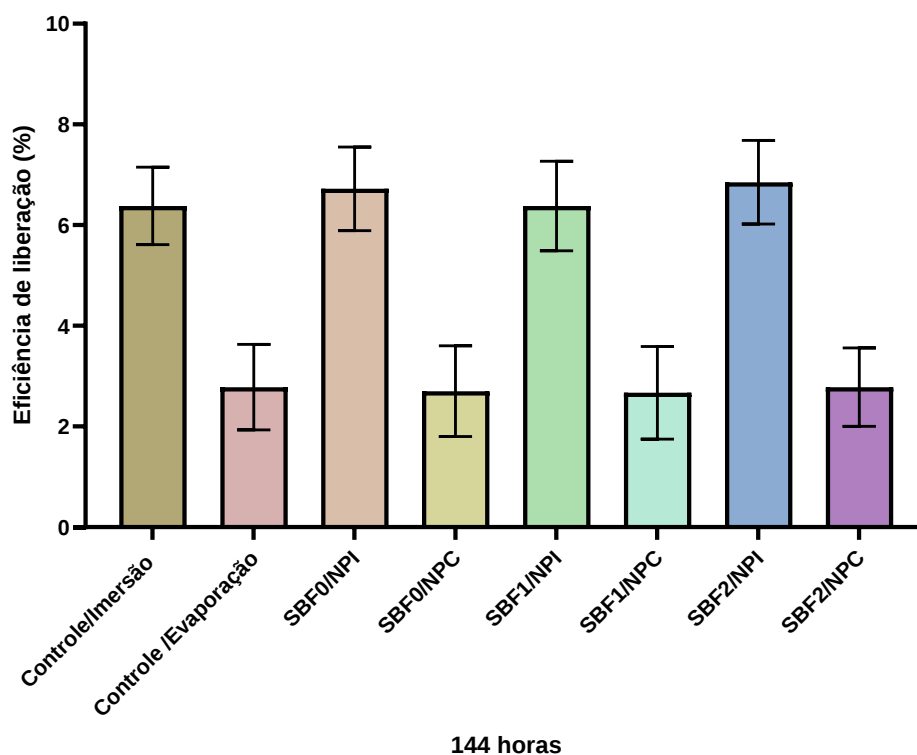
Para contornar o problema relacionado a hidrofobicidade, diversas abordagens nanotecnológicas são empregadas no desenvolvimento de novos dispositivos de entrega de medicamentos para a melhor biodisponibilidade. Sendo assim, existe um paradigma e transição da própolis convencional para a nanoprópolis, que vem se tornando evidentes na literatura, onde existe uma variedade de estudos aprimorando sua biodisponibilidade. Essas estratégias incluem a fabricação de AuNP, AgNP, NPs magnéticas, lipossomas, formulações cristalinas líquidas, NPs de sílica, entre outras (Javed; Mangla; Ahsan, 2022).

As Figuras 50 e 51, apresentam as eficiências de liberação de partículas de própolis das membranas densas e esponjas de PGS, após 144 horas de análise, por imersão em solução fisiológica de NaCl. Vale ressaltar, que o objetivo do trabalho não foi a incorporação de partículas de própolis vermelha sobre as membranas, o extrato alcoólico de própolis agiu como agente extrator das AgNPs por rota biogênica, mas como durante o processo de purificação as AgNPs estavam sendo perdidas, foi tomado a decisão de incorporar no meio com partículas de própolis, que também foi possível realizar sua quantificação a partir das leituras no espectrofotômetro UV-vis e utilização da curva de calibração.

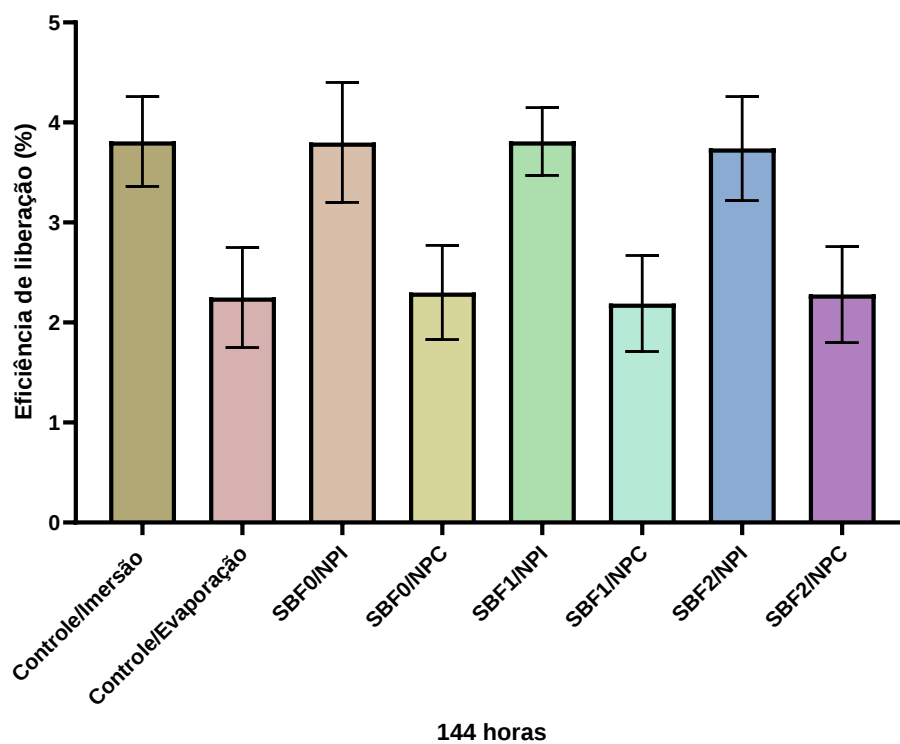
Porém, mesmo que o objetivo inicial não fosse a incorporação das partículas de própolis, devido a sua grande atividade antimicrobiana já comprovada e descrita anteriormente, se tornou de interesse estudar o sinergismo entre essas partículas e as AgNPs, porém, a eficiência de liberação também não foi realizada em grande escala, da mesma forma que para as AgNPs.

Novamente, tal fator pode ser justificado por conta de o meio de liberação não ser o mais favorável para a própolis vermelha, devida a sua grande hidrofobicidade, e o método de incorporação nas membranas de PGS também pode não estar sendo o mais eficiente, porém, existe a incorporação de ambas as partículas e existe o início de uma liberação, em que o *burst* inicial acontece nas primeiras 3 horas de análise.

A curva de liberação das AgNPs e partículas de própolis vermelha podem ser mais bem analisadas nos gráficos presentes no Apêndice C.



**Figura 50** – Eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.



**Figura 51** – Eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, quantificadas por meio da curva analítica, após 144 horas de ensaio.

## 6. CONCLUSÕES

As análises macrovisuais das membranas densas e esponjas de PGS mostraram ser compatíveis com a literatura demonstrando que a rota de síntese com as adaptações de processos foi conclusiva para o polímero. Nos resultados de MEV, podemos observar a estrutura reticulada da membrana densa e o grande nível de porosidade da esponja, cuja estrutura inicial já é semelhante ao tecido ósseo; além disso, ficou evidente a presença de microporos, ocasionada pela remoção do glicerol durante o processo de transesterificação. Também foi possível observar a presença de CaPs na estrutura da membrana densa, representando o sucesso da incorporação biomimética das soluções SBF sobre o PGS, porém para uma análise de fase dos CaPs e quantificação, serão necessários mais estudos com base em técnicas de caracterização, como EDX a fim de verificar a proporção Ca:P e DRX para comprovar a fase depositada.

As caracterizações referentes à composição química do PGS realizadas por ATR-FTIR apresentam com sucesso o processo de polimerização do material, uma vez que as principais bandas do pre-PGS estão localizadas em  $1686\text{ cm}^{-1}$  referentes ao grupo carbonil, em  $1415\text{ cm}^{-1}$  referente ao dobramento do grupo hidroxila e entre  $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  referente as ligações O-H. Em contrapartida, após o processo de cura, o material apresenta a banda carbonila em  $1733\text{ cm}^{-1}$ , o surgimento de uma nova banda da ligação C-O em  $1159\text{ cm}^{-1}$  e a diminuição de intensidade nas bandas em  $3445\text{ cm}^{-1}$  referentes ao consumo de hidroxilas para a formação de reticulação. Bandas de CaP também podem ser observadas em  $640\text{ cm}^{-1}$ ,  $580\text{ cm}^{-1}$ ,  $870\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ . A presença destas bandas representam com sucesso o processo de polimerização do PGS e a deposição dos CaP nas membranas.

Os testes de intumescimento apresentaram um valor correspondente com o reportado pela literatura, onde as membranas densas intumescem entre 4% e 6%, e as esponjas entre 100% e 120%. Neste contexto, os testes de degradação hidrolítica também apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com a literatura, apresentando taxas de degradação entre 20% e 30% em solução PBS, indicando que o PGS possui uma taxa de degradação relativamente aceitável para aplicação em engenharia de tecidos, porém indicam que o processo de síntese escolhido pode não ser o ideal para um grande nível de reticulação do material, já que a literatura reporta 35% de degradação em um período de 60 dias.

Os ensaios biológicos realizados por contato indireto pelo método de MTT apresentaram que o PGS possui biocompatibilidade celular, por mais que os níveis de proliferação decaíram 50% durante as primeiras 24 horas. Isto se dá a liberação de componentes ácidos no meio durante o processo de degradação do material, que pode ser corrigido por uma etapa de esterificação ou mudanças no processo de síntese envolvendo controle de pH, mas existe viabilidade celular.

Os ensaios mecânicos de compressão apresentaram uma curvatura característica de um elastômero, que satisfaz o esperado pelo PGS, além de possuir módulos de elasticidade interessantes para aplicação em regeneração óssea, porém, a deformação do material ocorre rapidamente podendo se tornar um empecilho durante esta aplicação. Os resultados de DSC apresentaram os valores de transição vítrea do material, alinhado com o reportado anteriormente pela literatura, com valores de  $T_g$  entre  $-19,27\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-34,77\text{ }^{\circ}\text{C}$ , concluindo que o PGS possui uma estrutura semi-cristalina e que é amorfo em  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A análise de TGA apresenta que o PGS sofre degradação térmica em uma única etapa, entre  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , representando que a estabilidade do material está de acordo com o reportado recentemente pela literatura.

A síntese biogênica das AgNPs foi realizada e caracterizada com sucesso por método de UV-vis que apresentou um  $\lambda_{\text{máx}}$  em 424 nm, e pela técnica de DLS foi possível observar que as NPs possuem em média 9 nm de raio e estão com uma polidispersão de 10-15% em solução. Sendo assim, foram realizados os testes de cinética de liberação das AgNPs pelas membranas de PGS; em princípio, estes testes não caracterizam uma cinética de liberação, já que a quantidade quantificada está em 6%, em média, e acontecendo somente durante as primeiras 3 horas de teste. Uma maneira de otimizar essa liberação seria mudar as concentrações de incorporação de AgNPs nas membranas e selecionar o meio ideal de liberação.

Sendo assim, com os resultados expressos, pode-se concluir que o PGS apresenta capacidade e potencial de ser um biomaterial para a regeneração do tecido ósseo, visto que suas vantagens elastoméricas e facilidade de síntese e incorporação de bioativos atraem bastante atenção, porém, ele apresenta baixo índice de reticulação, acarretando em uma rápida degradação e possui rápidas taxas de deformação quando aplicado tensão, dificultando sua aplicação em regeneração óssea, porém pode-se aliar com outros polímeros formando blendas poliméricas e corrigindo tais problemas mecânicos.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A seguir, são apresentadas algumas sugestões de trabalhos para dar continuidade ao estudo de membranas de PGS modificadas com solução SBF e incorporadas com AgNPs:

- Aprofundar o estudo em relação ao alto nível de porosidade do material relacionando sua capacidade mecânica, e avaliar um grau de porosidade ideal para aplicação em regeneração óssea;
- Alinhado ao tópico anterior, identificar quantitativamente o grau de reticulação do material, com propósito de aprimorar o processo de síntese e outros mecanismos envolvidos;
- Aprimorar a síntese do material e/ou realizar processos de esterificação a fim de aumentar a viabilidade celular;
- Otimizar o processo de deposição de CaP sobre as membranas, a fim de possuir apenas um grupo ideal que apresente as fases e proporções necessárias para a aplicação;
- Otimizar o processo de purificação das AgNPs para que não ocorra a degradação das NPs e, juntamente, aprimorar o processo de incorporação delas nas membranas a fim de obter uma maior cinética de liberação das NPs, para que eles possam desenvolver suas funções com êxito;
- Realizar testes *in vivo* a fim de estudar as propriedades do material em contato com um tecido a ser regenerado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine I**, p. 233–238, 1990.
- AGARWAL, R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 94, p. 53–62, nov. 2015.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **nt. J. Morphol.**, v. 27, p. 1105–1110, 2009.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, set. 2007.
- ANDREW L. NILES et al. **High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing**. [s.l.] Wiley, 2013.
- AOKI, K.; SAITO, N. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone Regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 95, 24 jan. 2020.
- APARECIDA, A. H. et al. Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 892–896, ago. 2007.
- ASGHARNEJAD-LASKOUKALAYEH, M. et al. Preparation and characterization of a new sustainable bio-based elastomer nanocomposites containing poly(glycerol sebacate citrate)/chitosan/n-hydroxyapatite for promising tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 33, n. 18, p. 2385–2405, 12 dez. 2022.
- ATARI, M.; LABBAF, S.; JAVANMARD, S. H. Fabrication and characterization of a 3D scaffold based on elastomeric poly-glycerol Sebacate polymer for heart valve applications. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 102, p. 350–364, set. 2023.
- AYDIN, H. M. et al. Microwave-assisted rapid synthesis of poly(glycerol-sebacate) elastomers. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 5, p. 503, 2013.
- BADAWY, A. M. EL et al. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 4, p. 1260–1266, 15 fev. 2010.
- BARBOSA, V. T. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, 16 nov. 2019.
- BARRETO, G. DE A. et al. Evaluation of the Potential of Brazilian Red Propolis Extracts: An Analysis of the Chemical Composition and Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 12, n. 22, p. 11741, 18 nov. 2022.

BARSOLA, B.; KUMARI, P. Green synthesis of nano-propolis and nanoparticles (Se and Ag) from ethanolic extract of propolis, their biochemical characterization: A review. **Green Processing and Synthesis**, v. 11, n. 1, p. 659–673, 11 jul. 2022.

BARZEGAR-JALALI, M. Kinetic Analysis of Drug Release From Nanoparticles. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 167, 7 maio 2008.

BATISTA, L. L. V. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 39, p. 515–520, 2012.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 127–152.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 127–152.

BONNET, P. et al. Thermal properties and percolation in carbon nanotube-polymer composites. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 20, 12 nov. 2007.

BOSE, R. J. C. et al. Lipid–polymer hybrid nanoparticle-mediated therapeutics delivery: advances and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1258–1265, ago. 2017.

CAI, W.; LIU, L. Shape-memory effect of poly (glycerol–sebacate) elastomer. **Materials Letters**, v. 62, n. 14, p. 2171–2173, maio 2008.

CÂMARA, N. L. A. DA S.; VIANA, D. DOS S. F.; VIANA, V. G. F. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata estabilizada em extrato de *Struthanthus Flexicaulis* Mart. (Erva-de-Passarinho). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e146101421983, 29 out. 2021.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, v. 37, n. 3, 2014.

CANILLAS, M. et al. Calcium phosphates for biomedical applications. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 56, n. 3, p. 91–112, maio 2017.

CHANANA, M. et al. Interaction of Polyelectrolytes and Their Composites with Living Cells. **Nano Letters**, v. 5, n. 12, p. 2605–2612, 1 dez. 2005.

CHANG, P.-Y. et al. Biodegradable Polymeric Membranes for Organic Solvent/Water Pervaporation Applications. **Membranes**, v. 11, n. 12, p. 970, 9 dez. 2021.

CHEN, Z.-Y. et al. Antibacterial biomaterials in bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 11, p. 2594–2612, 2021.

CHOCHOLATA, P.; KULDA, V.; BABUSKA, V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 568, 14 fev. 2019.

CONEJERO-GARCÍA, Á. et al. Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). **European Polymer Journal**, v. 87, p. 406–419, fev. 2017.

CORCIOVĂ, A. ANTIOXIDANT, antimicrobial and photocatalytic activities of silver nanoparticles obtained by bee propolis extract assisted biosynthesis. **Farmacia**, v. 67, n. 3, p. 482–489, 19 maio 2019.

CROSS, L. M. et al. Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 42, p. 2–17, set. 2016.

DAVOODI, B. et al. Design and manufacturing a tubular structures based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) / poly(glycerol-sebacic acid) biodegradable nanocomposite blends: suggested for applications in the nervous, vascular and renal tissue engineering. **Journal of Polymer Research**, v. 29, n. 2, p. 54, 24 fev. 2022.

DE BARTOLO, L.; SALERNO, S. Nanotechnology and Biomaterials for Cell and Drug Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 36, p. 3757–3758, 2017.

DE BRITO, E. et al. quantificação de nanopartículas de prata em um produto farmacêutico por espectrofotometria e potenciometria: uma proposta para aulas práticas de química analítica. **Química Nova**, 2020.

DE CARVALHO, F. M. DE A. et al. Brazilian Red Propolis: Extracts Production, Physicochemical Characterization, and Cytotoxicity Profile for Antitumor Activity. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 726, 6 maio 2020.

DE VILLIERS, T. J.; GOLDSTEIN, S. R. Bone health 2022: an update. **Climacteric**, v. 25, n. 1, p. 1–3, 2 jan. 2022.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 66, 31 dez. 2011.

DING, X. et al. Control the Mechanical Properties and Degradation of Poly(Glycerol Sebacate) by Substitution of the Hydroxyl Groups with Palmitates. **Macromolecular Bioscience**, v. 20, n. 9, 20 set. 2020.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 301, 17 dez. 2016.

D'SOUZA, S. A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–12, 20 nov. 2014.

DURÁN, N. et al. nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, 2018.

DURAN, N.; SEABRA, A. B. Biogenic Synthesized Ag/Au Nanoparticles: Production, Characterization, and Applications. **Current Nanoscience**, v. 14, n. 2, p. 82–94, 1 fev. 2018.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334, 24 mar. 2017.

ENGELMAYR, G. C. et al. Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. **Nature Materials**, v. 7, n. 12, p. 1003–1010, 2 dez. 2008.

- FARAJI, M.; YAMINI, Y.; SALEHI, N. Characterization of magnetic nanomaterials. Em: **Magnetic Nanomaterials in Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 39–60.
- FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 8 ago. 2017.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- FOWLES, J. et al. A review of the toxicological and environmental hazards and risks of tetrahydrofuran. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 811–828, 22 nov. 2013.
- FRAGA, A. F. et al. Synthesis of chitosan/hydroxyapatite membranes coated with hydroxycarbonate apatite for guided tissue regeneration purposes. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p. 3888–3892, fev. 2011.
- FRYDRYCH, M.; CHEN, B. Large three-dimensional poly(glycerol sebacate)-based scaffolds – a freeze-drying preparation approach. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 48, p. 6650, 2013.
- FURKO, M. et al. Biomimetic mineralized amorphous carbonated calcium phosphate-polycaprolactone bioadhesive composites as potential coatings on implant materials. **Ceramics International**, v. 49, n. 11, p. 18565–18576, jun. 2023.
- GAO, J.; CRAPO, P. M.; WANG, Y. Macroporous Elastomeric Scaffolds with Extensive Micropores for Soft Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 917–925, 2016.
- GARCÍA, J. R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial-mediated strategies targeting vascularization for bone repair. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 2, p. 77–95, 27 abr. 2016.
- GODINHO, B.; GAMA, N.; FERREIRA, A. Different methods of synthesizing poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 30 nov. 2022.
- GOMES SÁ, S. H. et al. Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. **Food Research International**, v. 164, p. 112423, fev. 2023.
- GRANJA, P. L. et al. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 9, p. 785–791, 2001.
- GRANT, R. P.; RAPPOLD, B. A. Development and Validation of Small Molecule Analytes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Em: **Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 115–179.
- GRASSESCHI, D.; DOS SANTOS, D. NANOMATERIAIS PLASMÔNICOS: PARTE I. FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA DE NANOPARTÍCULAS E SUA RELAÇÃO COM O EFEITO SERS. **Química Nova**, 2020.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, maio 2018.

GSIB, O. et al. Engineering a macroporous fibrin-based sequential interpenetrating polymer network for dermal tissue engineering. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 24, p. 7106–7116, 2020.

GUAN, J. et al. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 3, p. 493–503, 5 set. 2002.

GUAN, J. et al. Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, n. 1, p. 85–96, jan. 2004.

GULER, S. et al. Biofabrication of Poly(glycerol sebacate) Scaffolds Functionalized with a Decellularized Bone Extracellular Matrix for Bone Tissue Engineering. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 30, 25 dez. 2022a.

GULER, S. et al. Biofabrication of Poly(glycerol sebacate) Scaffolds Functionalized with a Decellularized Bone Extracellular Matrix for Bone Tissue Engineering. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 30, 25 dez. 2022b.

GULTEKINOGLU, M. et al. Preparation of poly(glycerol sebacate) fibers for tissue engineering applications. **European Polymer Journal**, v. 121, p. 109297, dez. 2019.

HABIBOVIC, P.; BARRALET, J. E. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 8, p. 3013–3026, ago. 2011.

HABRAKEN, W. et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? **Materials Today**, v. 19, n. 2, p. 69–87, mar. 2016.

HAIDER, A. et al. Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: A technical and statistical review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 186–215, fev. 2020.

HENCH, L. L.; ROKI, N.; FENN, M. B. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. **Journal of Molecular Structure**, v. 1073, p. 24–30, set. 2014.

HONG, L. et al. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13–14, p. 1710–1713, jun. 2006a.

HONG, L. et al. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13–14, p. 1710–1713, jun. 2006b.

HO-SHUI-LING, A. et al. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. **Biomaterials**, v. 180, p. 143–162, out. 2018.

I COMISSÃO EUROPEIA. [s.d.].

IAQUINTA, M. et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 618, 31 jan. 2019.

IFKOVITS, J. L. et al. Biodegradable Fibrous Scaffolds with Tunable Properties Formed from Photo-Cross-Linkable Poly(glycerol sebacate). **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 9, p. 1878–1886, 30 set. 2009.

JAAFAR, I. H.; JEDLICKA, S. S.; COULTER, J. P. Poly(glycerol sebacate) – a revolutionary biopolymer. **Physical Sciences Reviews**, v. 8, n. 3, p. 363–383, 17 mar. 2023.

JANSSEN, R. P. M. et al. Fatigue Life Predictions for Glassy Polymers: A Constitutive Approach. **Macromolecules**, v. 41, n. 7, p. 2520–2530, 1 abr. 2008.

JAVED, S.; MANGLA, B.; AHSAN, W. From propolis to nanopropolis: An exemplary journey and a paradigm shift of a resinous substance produced by bees. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 5, p. 2016–2041, 8 maio 2022.

JIAN, B. et al. Microporous elastomeric membranes fabricated with polyglycerol sebacate improved guided bone regeneration in a rabbit model. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 2683–2692, abr. 2019.

JING, A. J.; ZHANG, A.; WU, Z. Thermal analysis of polymer fibers. Em: [s.l: s.n.]. p. 409–490.

KAFOURIS, D. et al. Biosourced Amphiphilic Degradable Elastomers of Poly(glycerol sebacate): Synthesis and Network and Oligomer Characterization. **Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 622–630, 12 fev. 2013.

KAFOURIS, D.; GRADZIELSKI, M.; PATRICKIOS, C. S. Semisegmented Amphiphilic Polymer Conetworks: Synthesis and Characterization. **Macromolecules**, v. 42, n. 8, p. 2972–2980, 28 abr. 2009.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 1 jan. 2003.

KEMPPAINEN, J. M.; HOLLISTER, S. J. Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94A, n. 1, p. 9–18, jul. 2010a.

KEMPPAINEN, J. M.; HOLLISTER, S. J. Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94A, n. 1, p. 9–18, 20 jul. 2010b.

KEPA, K.; COLEMAN, R.; GRØNDAHL, L. In vitro mineralization of functional polymers. **Biosurface and Biotribology**, v. 1, n. 3, p. 214–227, set. 2015.

KHALIL, M.; MOHAMED, S.; EL-NAGGAR, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Egyptian Propolis Extract and its Antimicrobial Activity. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 12 dez. 2021.

KHAN, MD. R. et al. Green synthesis of silver nanoparticles with its bioactivity, toxicity and environmental applications: A comprehensive literature review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 20, p. 100872, dez. 2023.

- KHOSRAVI, R. et al. Long-Term Functional Efficacy of a Novel Electrospun Poly(Glycerol Sebacate)-Based Arterial Graft in Mice. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 44, n. 8, p. 2402–2416, 21 ago. 2016.
- KIM, M. J. et al. Biodegradable and Elastomeric Poly(glycerol sebacate) as a Coating Material for Nitinol Bare Stent. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- KISCHKEL, B. et al. Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. **Future Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 521–539, maio 2020.
- KOKUBO, T. SURFACE CHEMISTRY OF BIOACTIVE GLASS-CERAMICS. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 120, p. 138–151, 1990.
- KOKUBO, T. et al. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 99–107, fev. 2004.
- KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, jun. 2003.
- KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Growth of Novel Ceramic Layers on Metals via Chemical and Heat Treatments for Inducing Various Biological Functions. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 27 out. 2015.
- KROOK, N. M. et al. In vitro examination of poly(glycerol sebacate) degradation kinetics: effects of porosity and cure temperature. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 8, p. 535–543, 23 maio 2020a.
- KROOK, N. M. et al. In vitro examination of poly(glycerol sebacate) degradation kinetics: effects of porosity and cure temperature. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 8, p. 535–543, 23 maio 2020b.
- KUMAR, S. et al. Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, p. 110154, jan. 2020.
- LAU, C. C. et al. Advanced biocomposites of poly(glycerol sebacate) and  $\beta$ -tricalcium phosphate by in situ microwave synthesis for bioapplication. **Materials Today Advances**, v. 5, p. 100023, mar. 2020a.
- LAU, C. C. et al. Advanced biocomposites of poly(glycerol sebacate) and  $\beta$ -tricalcium phosphate by in situ microwave synthesis for bioapplication. **Materials Today Advances**, v. 5, p. 100023, mar. 2020b.
- LEBLON, C. E. et al. *In vitro* comparative biodegradation analysis of salt-leached porous polymer scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 2701–2712, 5 jun. 2013a.
- LEBLON, C. E. et al. *In vitro* comparative biodegradation analysis of salt-leached porous polymer scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 2701–2712, 5 jun. 2013b.

- LEE, K.-W. et al. Human progenitor cell recruitment via SDF-1 $\alpha$  cocervate-laden PGS vascular grafts. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 9877–9885, dez. 2013.
- LEE, S. H. et al. Microwave-assisted facile fabrication of porous poly (glycerol sebacate) scaffolds. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 7–9, p. 907–916, 13 jun. 2018a.
- LEE, S. H. et al. Microwave-assisted facile fabrication of porous poly (glycerol sebacate) scaffolds. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 7–9, p. 907–916, 13 jun. 2018b.
- LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clinical Materials**, v. 14, n. 1, p. 65–88, 1993.
- LEONG, Q. L. et al. Synthesis of silver nanoparticles with long-term storability for SERS applications using aqueous extracts of rice bran: A rapid and green photochemical approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1254, p. 132338, abr. 2022.
- LEONOR, I. B. et al. Surface potential change in bioactive polymer during the process of biomimetic apatite formation in a simulated body fluid. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 38, p. 4057, 2007.
- LEVARD, C. et al. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 12, p. 5260–5266, 15 jun. 2011.
- LI, J. J.; KAPLAN, D. L.; ZREIQAT, H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. **J. Mater. Chem. B**, v. 2, n. 42, p. 7272–7306, 2014.
- LI, X.; LENHART, J. J. Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 5378–5386, 15 maio 2012.
- LI, Y. et al. Synthesis, characterization and properties of biocompatible poly(glycerol sebacate) pre-polymer and gel. **Polymer International**, v. 62, n. 4, p. 534–547, abr. 2013a.
- LI, Y. et al. A comparative study on poly(xylitol sebacate) and poly(glycerol sebacate): mechanical properties, biodegradation and cytocompatibility. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 3, p. 035006, 5 abr. 2013b.
- LIANG, B. et al. Poly (Glycerol Sebacate)-Based Bio-Artificial Multiporous Matrix for Bone Regeneration. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 23 nov. 2020.
- LIU, Q. et al. Structure and properties of thermoplastic poly(glycerol sebacate) elastomers originating from prepolymers with different molecular weights. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 2, p. 1131–1137, 15 abr. 2007a.
- LIU, Q. et al. Structure and properties of thermoplastic poly(glycerol sebacate) elastomers originating from prepolymers with different molecular weights. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 2, p. 1131–1137, 15 abr. 2007b.

- LIU, Y. et al. Biomimetic poly(glycerol sebacate)/polycaprolactone blend scaffolds for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 5, p. 53, 29 maio 2019.
- LOH, X. J.; ABDUL KARIM, A.; OWH, C. Poly(glycerol sebacate) biomaterial: synthesis and biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 39, p. 7641–7652, 2015.
- MAJIDINIA, M.; SADEGHPOUR, A.; YOUSEFI, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937–2948, 3 abr. 2018.
- MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 8, p. 1617–1633, 31 ago. 2020.
- MARS, W. V.; FATEMI, A. Factors that Affect the Fatigue Life of Rubber: A Literature Survey. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 77, n. 3, p. 391–412, 1 jul. 2004.
- MARSANO, A. et al. Scaffold stiffness affects the contractile function of three-dimensional engineered cardiac constructs. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 5, p. 1382–1390, 13 set. 2010.
- MARTINS, M. L. et al. Propolis Benefits in Oral Health. Em: **Natural Oral Care in Dental Therapy**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 211–228.
- MARX, R. E. Bone and Bone Graft Healing. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 4, p. 455–466, nov. 2007.
- MCMILLAN, J. Principles of Analytical Validation. Em: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 239–251.
- MESPOUILLE, L.; HEDRICK, J. L.; DUBOIS, P. Expanding the role of chemistry to produce new amphiphilic polymer (co)networks. **Soft Matter**, v. 5, n. 24, p. 4878, 2009.
- MESTRES, G.; LE VAN, C.; GINEBRA, M.-P. Silicon-stabilized  $\alpha$ -tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 3, p. 1169–1179, mar. 2012.
- MIRI, A. K. et al. Ectopic bone formation in rapidly fabricated acellular injectable dense collagen-Bioglass hybrid scaffolds via gel aspiration-ejection. **Biomaterials**, v. 85, p. 128–141, abr. 2016.
- MITSAK, A. G.; DUNN, A. M.; HOLLISTER, S. J. Mechanical characterization and non-linear elastic modeling of poly(glycerol sebacate) for soft tissue engineering. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 11, p. 3–15, jul. 2012.
- MONTE, J. P. et al. Recent advances in hydroxyapatite/polymer/silver nanoparticles scaffolds with antimicrobial activity for bone regeneration. **Materials Letters**, v. 338, p. 134027, maio 2023a.

- MONTE, J. P. et al. Recent advances in hydroxyapatite/polymer/silver nanoparticles scaffolds with antimicrobial activity for bone regeneration. **Materials Letters**, v. 338, p. 134027, maio 2023b.
- MÜLLER, F. A. et al. Accelerated Biomimetic Deposition of Bonelike Apatite on Fibrous Cellulose Templates. **Key Engineering Materials**, v. 284–286, p. 183–186, abr. 2005.
- NASIRI, S. S.; AHMADI, Z.; AFSHAR-TAROMI, F. Design and characterization of bio-elastomers containing biomaterials for tissue engineering application. **Life Sciences**, v. 312, p. 121203, jan. 2023.
- NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137–1158, 6 out. 2008.
- OGUERI, K. S. et al. Polymeric Biomaterials for Scaffold-Based Bone Regenerative Engineering. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 5, n. 2, p. 128–154, 20 jun. 2019.
- OGUNNIYI, D. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 9, p. 1086–1091, jun. 2006.
- ORBAEK, A. W.; MCHALE, M. M.; BARRON, A. R. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles for an Undergraduate Laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 92, n. 2, p. 339–344, 10 fev. 2015.
- PAL, S. et al. Silver-Functionalized Bacterial Cellulose as Antibacterial Membrane for Wound-Healing Applications. **ACS Omega**, v. 2, n. 7, p. 3632–3639, 31 jul. 2017.
- PAN, Z. Y. et al. Plasmonic single nanoparticle for resonance light scattering imaging analysis and applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 164, p. 117090, jul. 2023.
- PANADERO, J. A. et al. Fatigue prediction in fibrin poly- $\epsilon$ -caprolactone macroporous scaffolds. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 28, p. 55–61, dez. 2013.
- PANDA, S.; BISWAS, C. K.; PAUL, S. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 47, n. 20, p. 28122–28144, out. 2021.
- PANT, K. et al. Impact of biodiversification on propolis composition, functionality, and application in foods as natural preservative: A review. **Food Control**, v. 155, p. 110097, jan. 2024.
- PARK, H. et al. The significance of pore microarchitecture in a multi-layered elastomeric scaffold for contractile cardiac muscle constructs. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1856–1864, mar. 2011.
- PARK, J.-W. et al. Toxicity of Citrate-Coated Silver Nanoparticles Differs According to Method of Suspension Preparation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 53–59, 20 jul. 2014.

PATRICK, C. W. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. **The Anatomical Record**, v. 263, n. 4, p. 361–366, 11 ago. 2001.

PATRICK, C. W. et al. Long-Term Implantation of Preadipocyte-Seeded PLGA Scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 283–293, abr. 2002.

PÉREZ, R. A. et al. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 471–496, abr. 2013.

PHIPPS, M. C. et al. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 524–534, jan. 2012.

PISZKO, P. et al. Brief review on poly(glycerol sebacate) as an emerging polyester in biomedical application: Structure, properties and modifications. **Polymers in Medicine**, v. 51, n. 1, p. 43–50, 29 jul. 2021.

PISZKO, P. et al. The effect of filler content on mechanical properties and cell response of elastomeric PGS/apatite foam scaffolds. **Ceramics International**, v. 49, n. 15, p. 25353–25363, ago. 2023a.

PISZKO, P. et al. The effect of filler content on mechanical properties and cell response of elastomeric PGS/apatite foam scaffolds. **Ceramics International**, v. 49, n. 15, p. 25353–25363, ago. 2023b.

POMERANTSEVA, I. et al. Degradation behavior of poly(glycerol sebacate). **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 91A, n. 4, p. 1038–1047, 15 dez. 2009.

PUPPI, D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 4, p. 403–440, abr. 2010.

RAI, R. et al. Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 8, p. 1051–1078, ago. 2012a.

RAI, R. et al. Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 8, p. 1051–1078, ago. 2012b.

RAI, R. et al. Biomimetic poly(glycerol sebacate) (PGS) membranes for cardiac patch application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 3677–3687, out. 2013.

RASTOGI, A. et al. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. **Photosynthetica**, v. 57, n. 1, p. 209–216, 30 jan. 2019.

RATNER, B. D. **A History of Biomaterials. In: (Ed.). Biomaterials Science (Third Edition): Academic Press.** [s.l: s.n.]. v. Terceira Edição

RHEE, S.-H. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. **Biomaterials**, v. 23, n. 4, p. 1147–1152, fev. 2002.

RICCARDI, C. S.; GASTALDI, A. C. Nanoregulação: avaliação dos cenários internacional e brasileiro. **R. Laborativa**, v. 2, p. 135–162, out. 2013.

ROSMAN, N. S. R. et al. Biogenic Silver Nanoparticles (AgNPs) from *Marphyssa moribidii* Extract: Optimization of Synthesis Parameters. **International Journal of Technology**, v. 12, n. 3, p. 635, 19 jul. 2021.

ROY, N. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 317–325, mar. 2010.

SALHOTRA, A. et al. **Mechanisms of bone development and repair**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Research, , 1 nov. 2020.

SAUDI, A. et al. Promoting neural cell proliferation and differentiation by incorporating lignin into electrospun poly(vinyl alcohol) and poly(glycerol sebacate) fibers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 110005, nov. 2019.

SAUDI, A. et al. Assessing physicochemical, mechanical, and in vitro biological properties of polycaprolactone/poly(glycerol sebacate)/hydroxyapatite composite scaffold for nerve tissue engineering. **Materials Chemistry and Physics**, v. 275, p. 125224, jan. 2022.

SENCADAS, V.; SADAT, S.; SILVA, D. M. Mechanical performance of elastomeric PGS scaffolds under dynamic conditions. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 102, p. 103474, fev. 2020a.

SENCADAS, V.; SADAT, S.; SILVA, D. M. Mechanical performance of elastomeric PGS scaffolds under dynamic conditions. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 102, p. 103474, fev. 2020b.

SHA, D. et al. Development of modified and multifunctional poly(glycerol sebacate) (PGS)-based biomaterials for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 161, p. 110830, dez. 2021.

SHAABAN, M. T.; ZAYED, M.; SALAMA, H. S. Antibacterial Potential of Bacterial Cellulose Impregnated with Green Synthesized Silver Nanoparticle Against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. **Current Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 75, 17 fev. 2023.

SHENG, D. et al. Electrospun PCL/Gel-aligned scaffolds enhance the biomechanical strength in tendon repair. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 31, p. 4801–4810, 2019.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, maio 2016.

SIEGEL, J. et al. Optomechanical Processing of Silver Colloids: New Generation of Nanoparticle–Polymer Composites with Bactericidal Effect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 312, 30 dez. 2020.

SINGH, J. et al. ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 84, 30 dez. 2018.

SLADE, J. F.; CHOU, K. H. Bony tissue repair. **Journal of Hand Therapy**, v. 11, n. 2, p. 118–124, abr. 1998.

SOUZA, M. et al. Bioactive Glass Fiber-Reinforced PGS Matrix Composites for Cartilage Regeneration. **Materials**, v. 10, n. 1, p. 83, 20 jan. 2017.

SPILLER, K. L. et al. Superporous hydrogels for cartilage repair: Evaluation of the morphological and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 1, p. 17–25, jan. 2008.

STACEY, D. H. et al. *In vitro* Adipogenic Differentiation of Preadipocytes Varies with Differentiation Stimulus, Culture Dimensionality, and Scaffold Composition. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 11, p. 3389–3399, nov. 2009.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J.; OCHOCKA, J. R. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 335–344, 2020.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, dez. 2012.

STOCKERT, J. C. et al. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159–167, abr. 2018.

SUN, X.-F. et al. Graphene oxide–silver nanoparticle membrane for biofouling control and water purification. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 53–59, dez. 2015.

SUNDBACK, C. et al. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5454–5464, set. 2005.

TAKAHASHI, H. et al. Human Neural Tissue Construct Fabrication Based on Scaffold-Free Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 15, p. 1931–1938, 22 ago. 2016.

TAKEUCHI, A. et al. Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 65A, n. 2, p. 283–289, 1 maio 2003.

TANAHASHI, M.; MATSUDA, T. **Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid.** [s.l: s.n.].

TARIQ, M. et al. Biological Synthesis of Silver Nanoparticles and Prospects in Plant Disease Management. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4754, 25 jul. 2022.

TAS, A. C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 373C in synthetic body fluids. **Biomaterials**, v. 21, p. 1429–1438, 2000.

TAYLOR, J. et al. Kafirin Microparticle Encapsulation of Catechin and Sorghum Condensed Tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7523–7528, 26 ago. 2009.

TERAMURA, Y. et al. Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane. **Biomaterials**, v. 29, n. 10, p. 1345–1355, abr. 2008.

- TEVLEK, A.; AGACIK, D. T.; AYDIN, H. M. Stretchable poly(glycerol-sebacate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate composites with shape recovery feature by extrusion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 20, 20 maio 2020.
- TORRES-RIVERO, K. et al. Metal and metal oxide nanoparticles: An integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 94, p. 433–469, 1 jan. 2021.
- UHLJAR, L. É. et al. In Vitro Drug Release, Permeability, and Structural Test of Ciprofloxacin-Loaded Nanofibers. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 556, 15 abr. 2021.
- VALLET-REGÍ, M.; SALINAS, A. J. **Ceramics as bone repair materials**. [s.l.: s.n.].
- VALTANEN, R. S. et al. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? **Injury**, v. 52, p. S72–S77, jun. 2021.
- VENKATESH, R. B. et al. Polymer-Infiltrated Nanoparticle Films Using Capillarity-Based Techniques: Toward Multifunctional Coatings and Membranes. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 12, n. 1, p. 411–437, 7 jun. 2021.
- VOGT, L. et al. Poly(Glycerol Sebacate) in Biomedical Applications—A Review of the Recent Literature. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 9, 17 maio 2021.
- WANG, B. et al. Polarized imaging dynamic light scattering for simultaneous measurement of nanoparticle size and morphology. **Particuology**, v. 85, p. 213–223, fev. 2024.
- WANG, H.; CHU, P. K. Surface Characterization of Biomaterials. Em: **Characterization of Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 105–174.
- WANG, J. et al. Silver Nanoparticles Coated Poly(L-Lactide) Electrospun Membrane for Implant Associated Infections Prevention. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 8 abr. 2020.
- WANG, X. et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. **International Orthopaedics**, v. 37, n. 12, p. 2491–2498, 15 dez. 2013.
- WANG, X.-D. et al. Modification of MTT Assay for Precision and Repeatability and Its Mechanistic Implication. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 8015–8018, 2014.
- WANG, Y. et al. A tough biodegradable elastomer. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 602–606, 2002.
- WANG, Y. et al. Enhanced osteogenic proliferation and differentiation of human adipose-derived stem cells on a porous n-HA/PGS-M composite scaffold. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7960, 28 maio 2019.
- WENG, J.; TONG, H. H. Y.; CHOW, S. F. In Vitro Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 732, 4 ago. 2020.
- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, jul. 2008.

WILLIAMS, D. F. The Language of Biomaterials-Based Technologies. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 53–60, 18 mar. 2019.

WU, Z. et al. A Review: Optimization for Poly(glycerol sebacate) and Fabrication Techniques for Its Centered Scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 9, 12 set. 2021a.

WU, Z. et al. A Review: Optimization for Poly(glycerol sebacate) and Fabrication Techniques for Its Centered Scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 9, 12 set. 2021b.

WU, Z. et al. A novel biomimetic nanofibrous cardiac tissue engineering scaffold with adjustable mechanical and electrical properties based on poly(glycerol sebacate) and polyaniline. **Materials Today Bio**, v. 23, p. 100798, dez. 2023a.

WU, Z. et al. A novel biomimetic nanofibrous cardiac tissue engineering scaffold with adjustable mechanical and electrical properties based on poly(glycerol sebacate) and polyaniline. **Materials Today Bio**, v. 23, p. 100798, dez. 2023b.

XU, B. et al. Fabrication, mechanical properties and cytocompatibility of elastomeric nanofibrous mats of poly(glycerol sebacate). **European Polymer Journal**, v. 64, p. 79–92, mar. 2015.

XU, L. Q. et al. A poly(vinylidene fluoride)-graft-poly(dopamine acrylamide) copolymer for surface functionalizable membranes. **RSC Advances**, v. 3, n. 47, p. 25204, 2013.

YANG, G. et al. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 107, n. 6, p. 782–789, jun. 2009.

YANG, K. et al.  $\beta$ -Tricalcium phosphate/poly(glycerol sebacate) scaffolds with robust mechanical property for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 37–47, nov. 2015a.

YANG, K. et al.  $\beta$ -Tricalcium phosphate/poly(glycerol sebacate) scaffolds with robust mechanical property for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 37–47, nov. 2015b.

YU, L. et al. Development of Poly(Glycerol Sebacate) and Its Derivatives: A Review of the Progress over the past Two Decades. **Polymer Reviews**, v. 63, n. 3, p. 613–678, 3 jul. 2023.

YU, Y. et al. Purifying water with silver nanoparticles (AgNPs)-incorporated membranes: Recent advancements and critical challenges. **Water Research**, v. 222, p. 118901, ago. 2022.

ZAKY, S. H. et al. Poly (glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone. **Acta Biomaterialia**, v. 54, p. 95–106, maio 2017.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Biological behavior of pre-osteoblasts on natural hydroxyapatite: A study of signaling molecules from attachment to differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 97A, n. 2, p. 193–200, maio 2011.

ZHANG, H. et al. Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 104–112, ago. 2018.

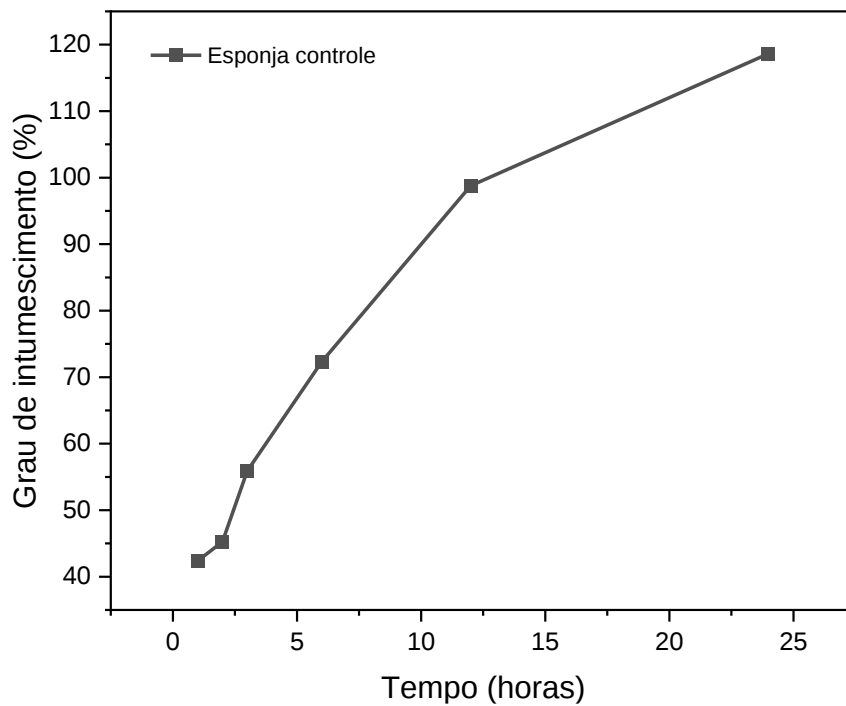
ZHANG, R.; MA, P. X. Poly(?-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 44, n. 4, p. 446–455, 15 mar. 1999.

ZHAO, J. et al. Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method. **Ceramics International**, v. 40, n. 2, p. 3379–3388, mar. 2014.

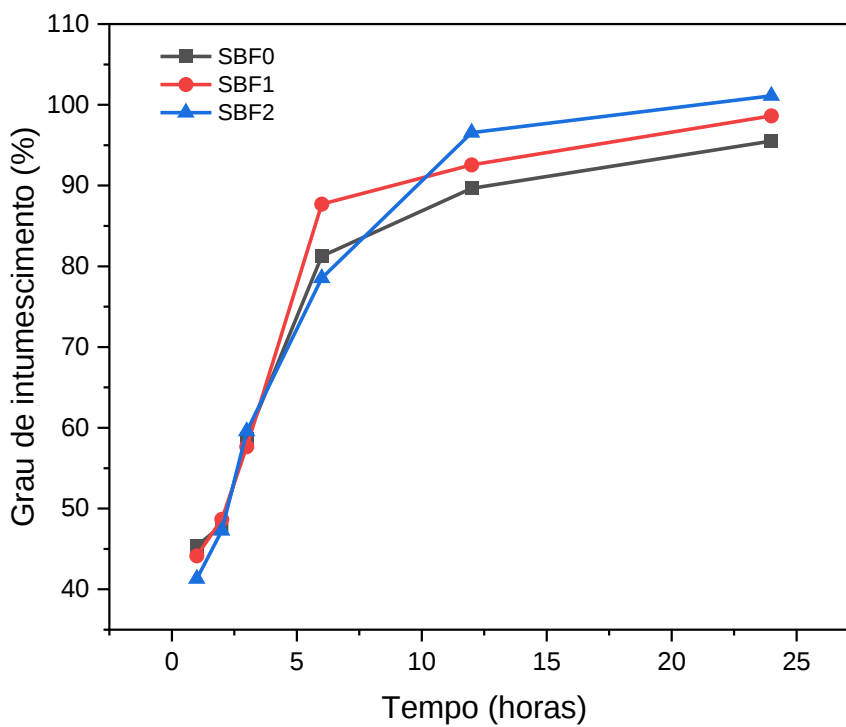
ZHAO, L. et al. Multifunctional g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag NPs intercalated GO composite membrane for SERS detection and photocatalytic degradation of paraoxon-ethyl. **Chemical Engineering Journal**, v. 402, p. 126223, dez. 2020.

ZULKIFLI, Z. et al. Shape memory poly (glycerol sebacate)-based electrospun fiber scaffolds for tissue engineering applications: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 22, 10 jun. 2022.

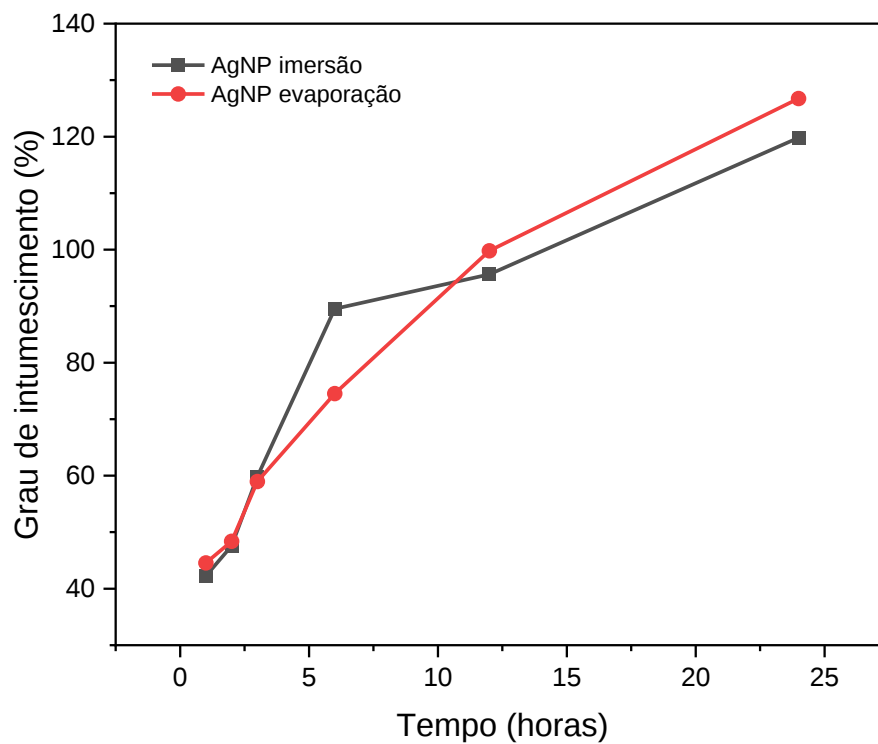
## APÊNDICE A



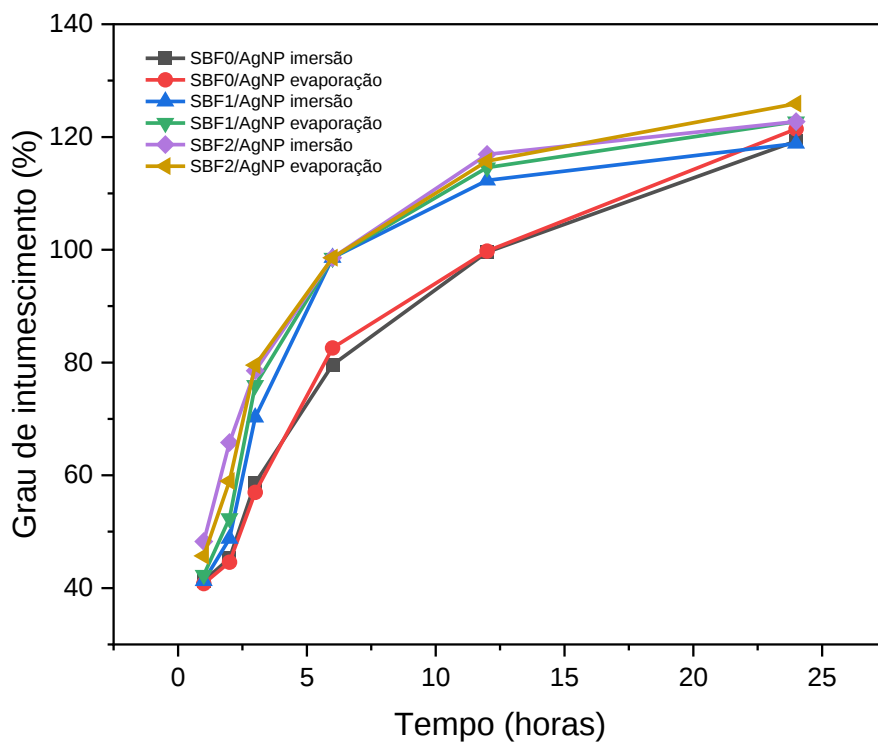
**Figura A1** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento da membrana esponja controle de PGS.



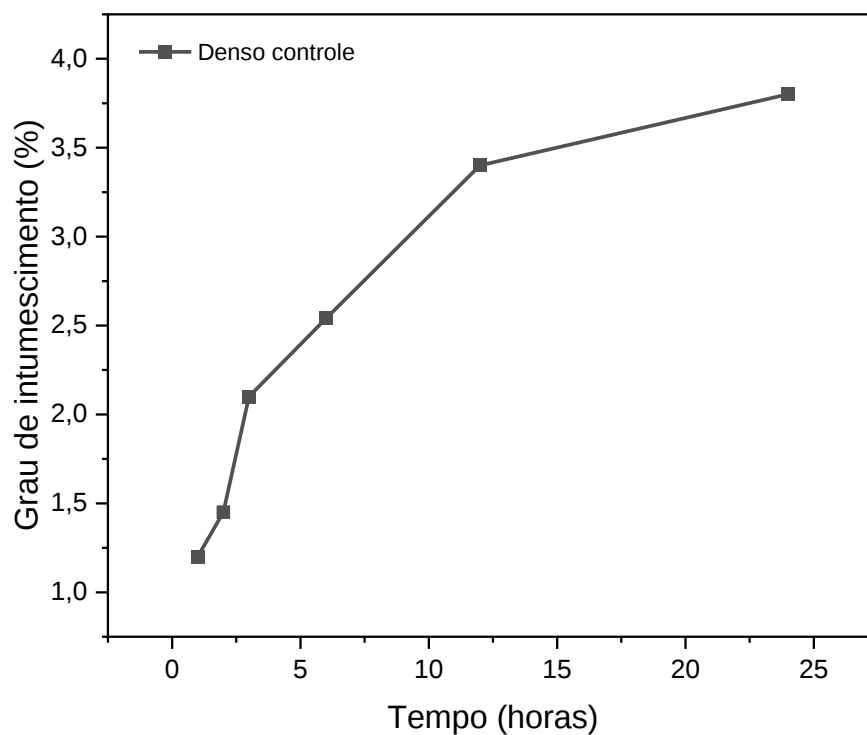
**Figura A2** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com SBF.



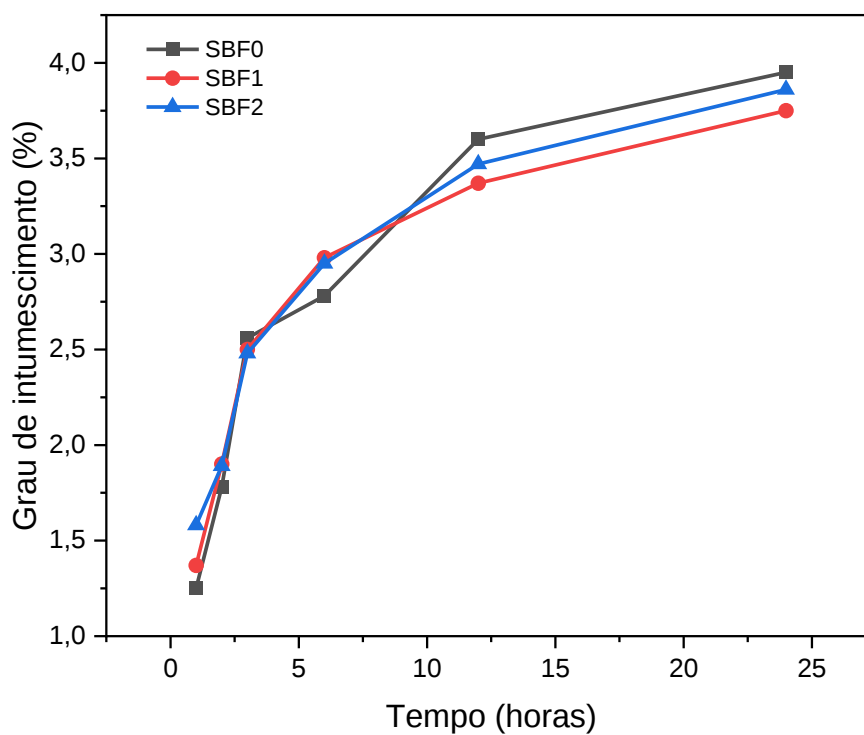
**Figura A3** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com AgNPs.



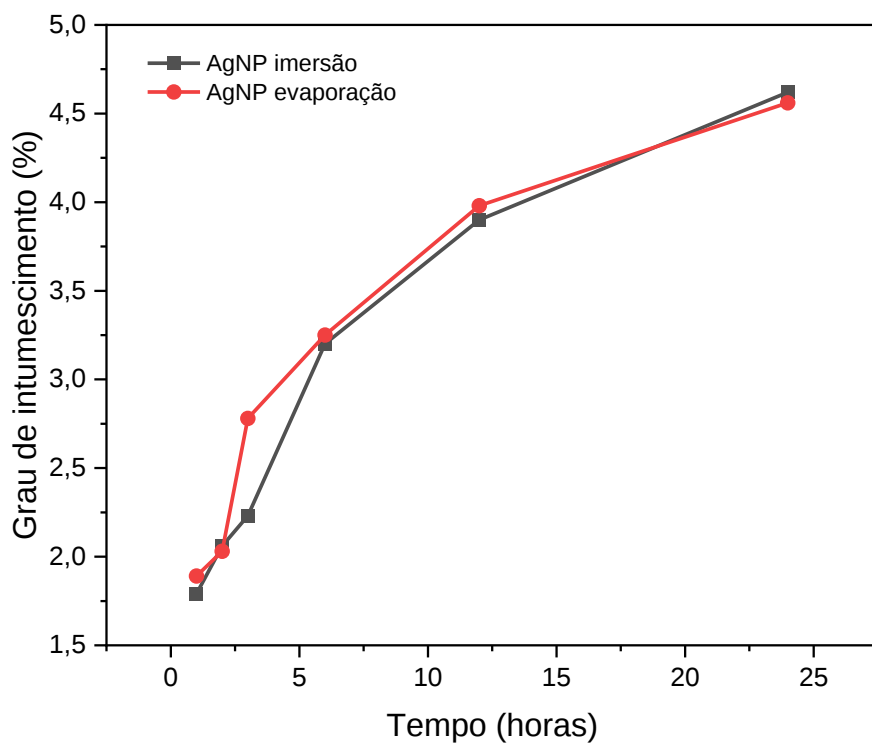
**Figura A4** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas esponjas de PGS tratadas com SBF e AgNPs.



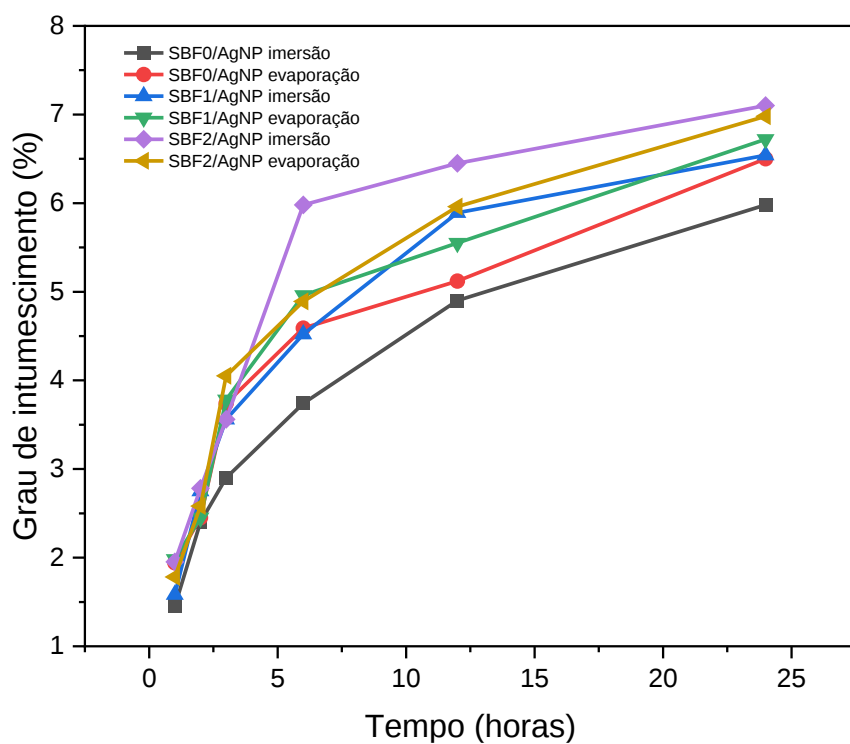
**Figura A5** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento da membrana densa controle de PGS.



**Figura A6** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com SBF.

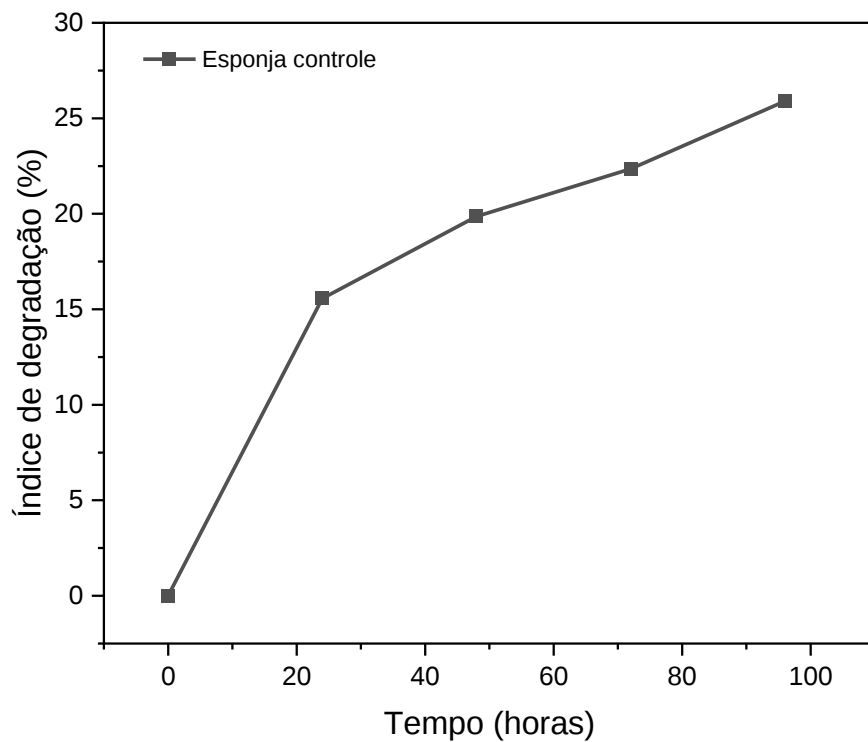


**Figura A7** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com AgNPs.

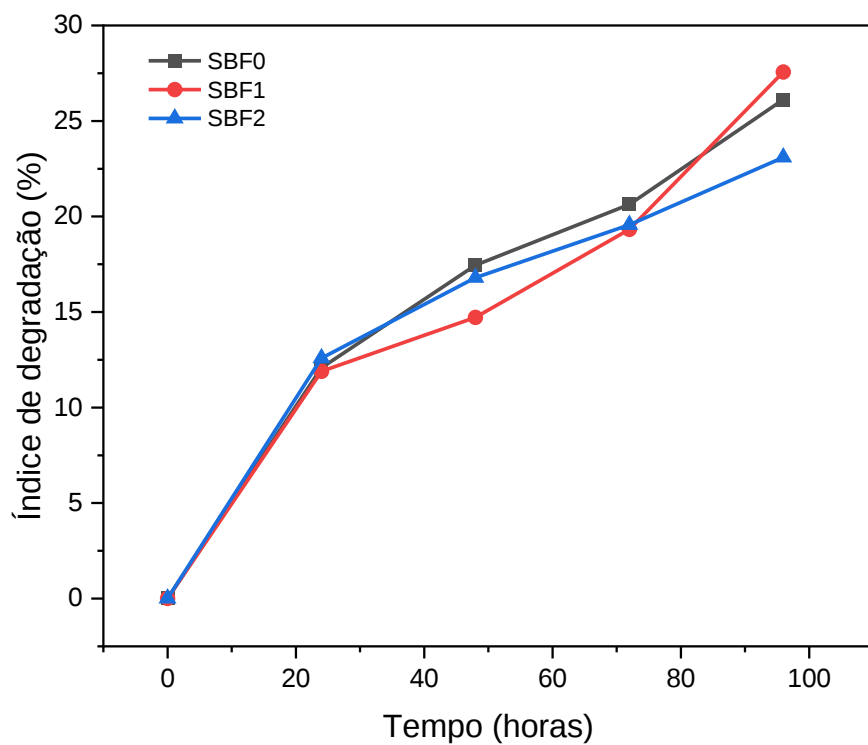


**Figura A8** – Curva referente ao comportamento do grau de intumescimento das membranas densas de PGS tratadas com SBF e AgNPs.

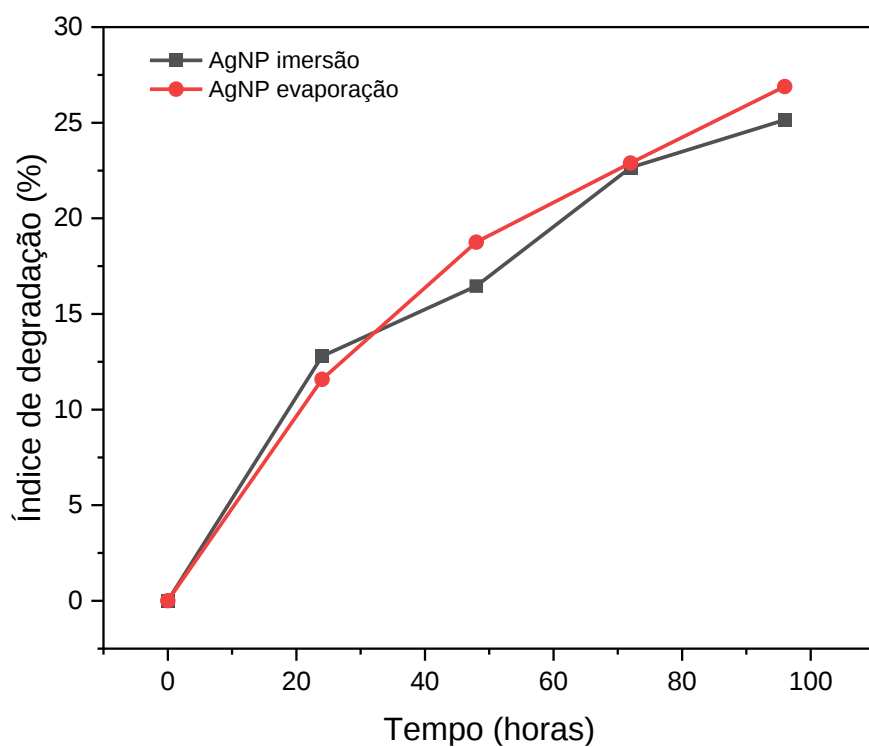
## APÊNDICE B



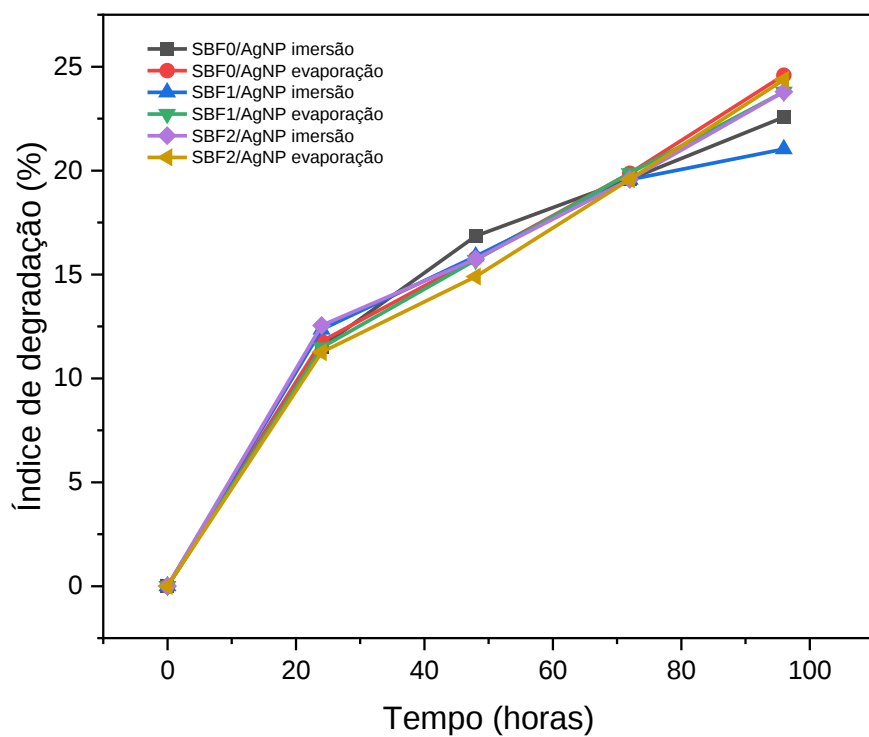
**Figura B1** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja controle de PGS.



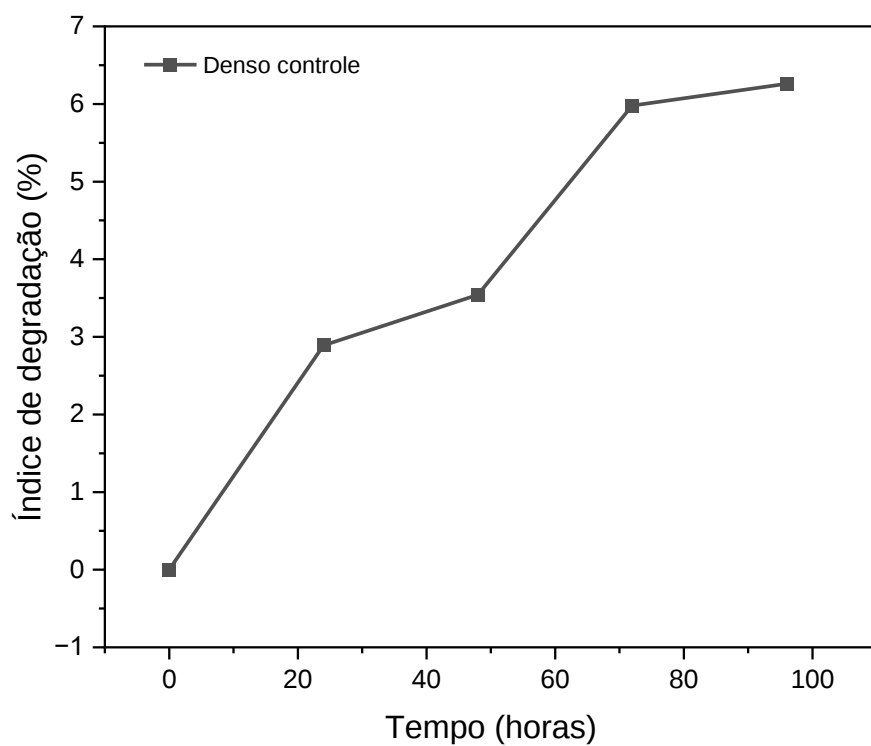
**Figura B2** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com SBF.



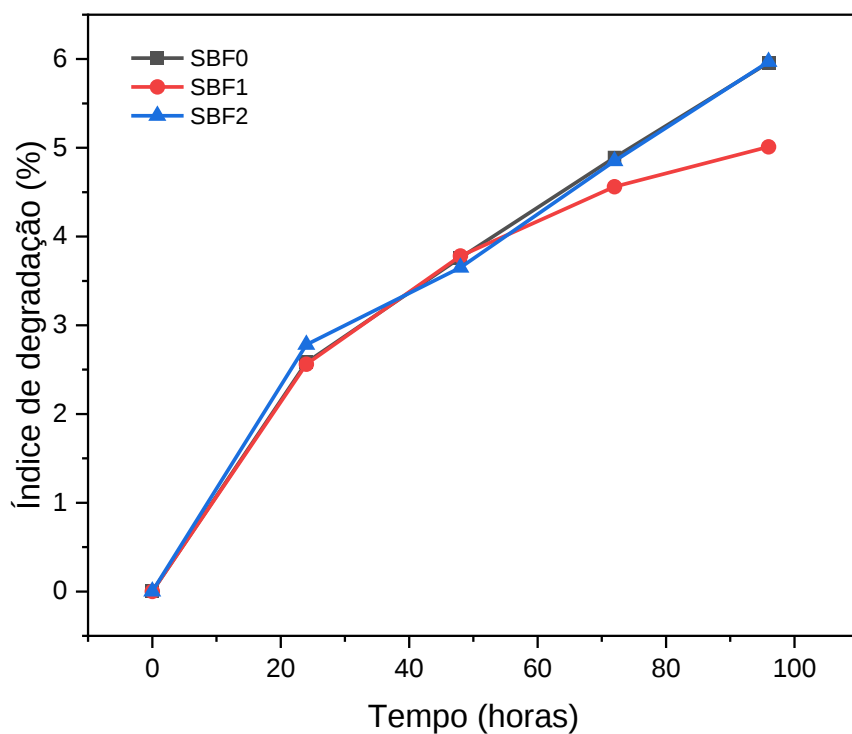
**Figura B3** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com AgNPs.



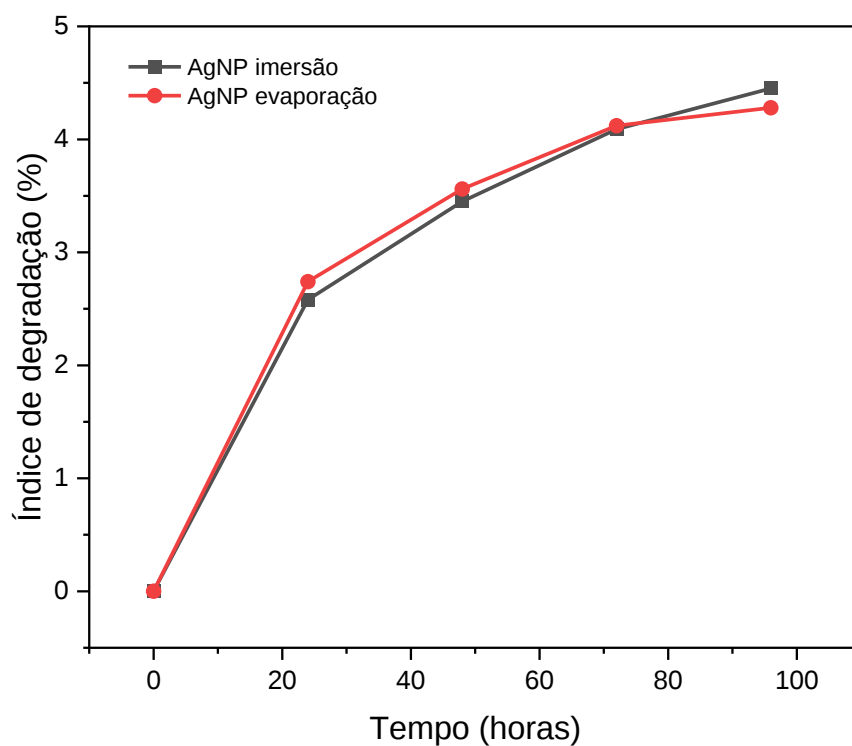
**Figura B4** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana esponja de PGS tratada com SBF e AgNPs.



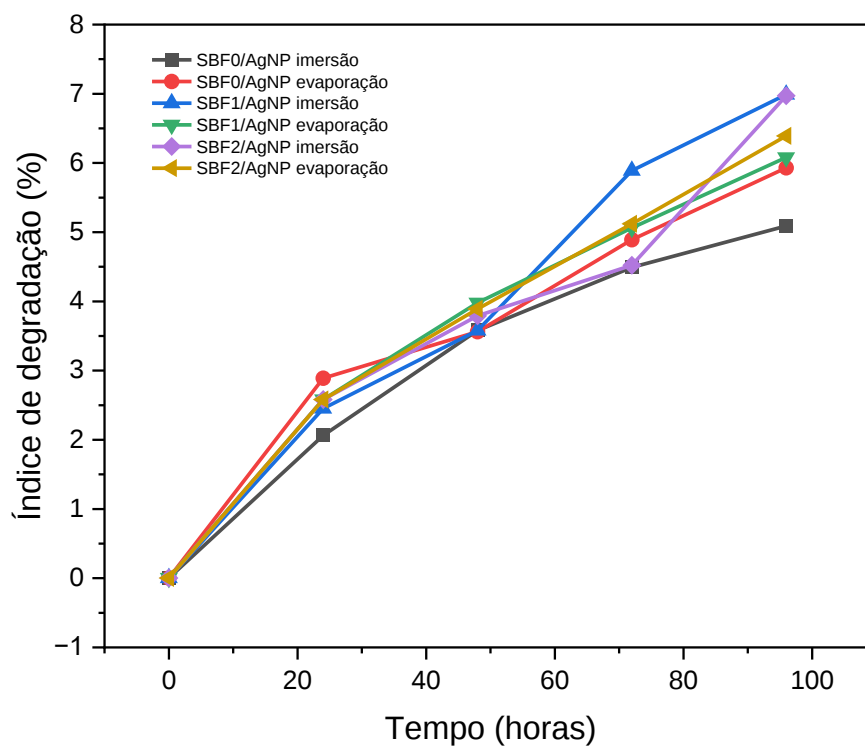
**Figura B5** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa controle de PGS.



**Figura B6** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com SBF.

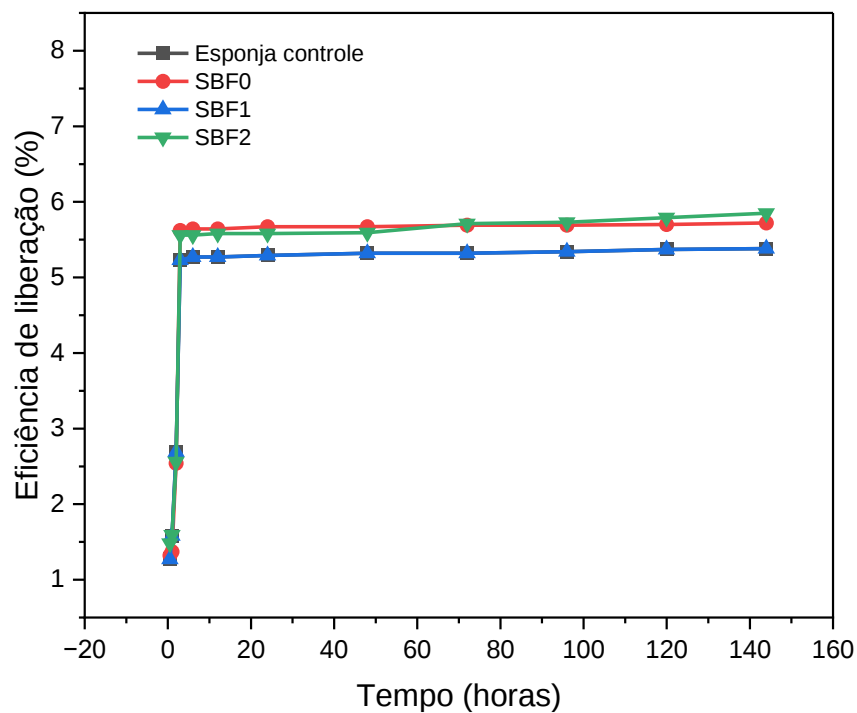


**Figura B7** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com AgNPs.

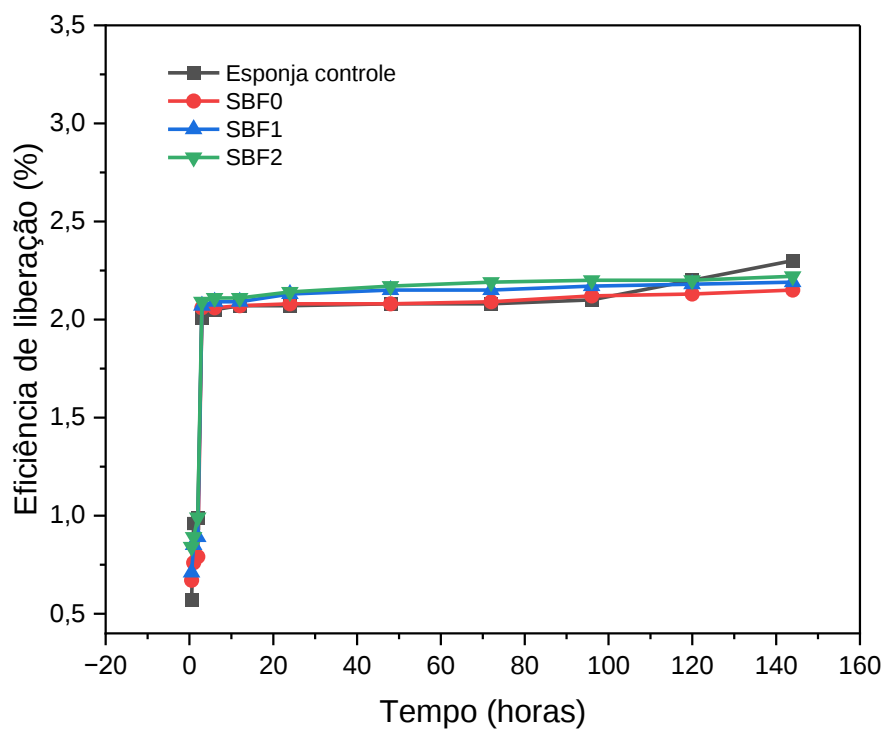


**Figura B8** – Curva referente ao comportamento do índice de degradação hidrolítica da membrana densa de PGS tratada com SBF e AgNPs.

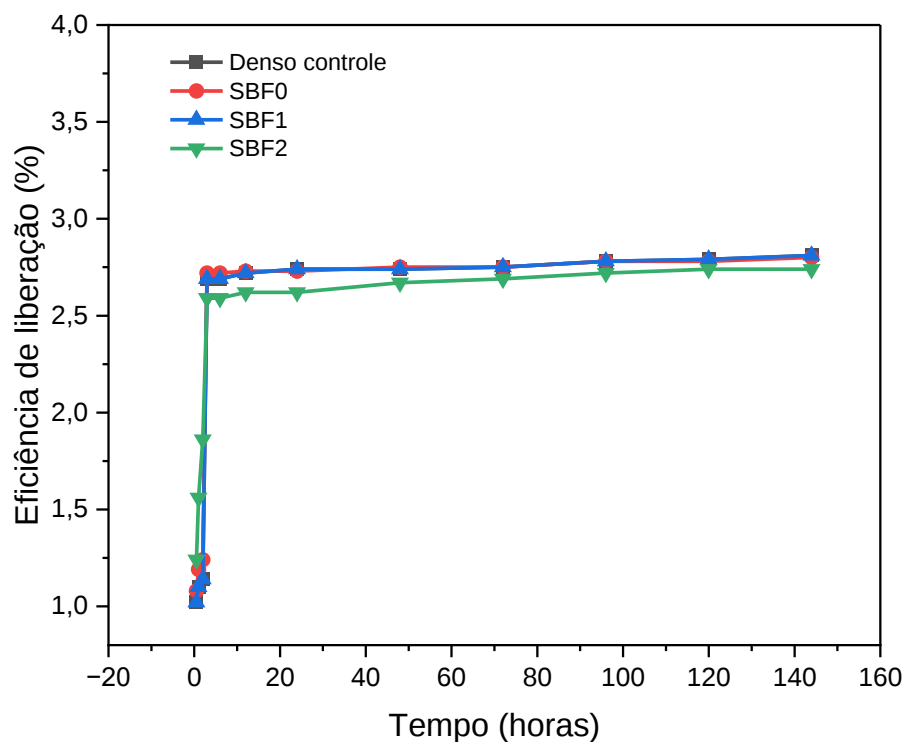
## APÊNCIDE C



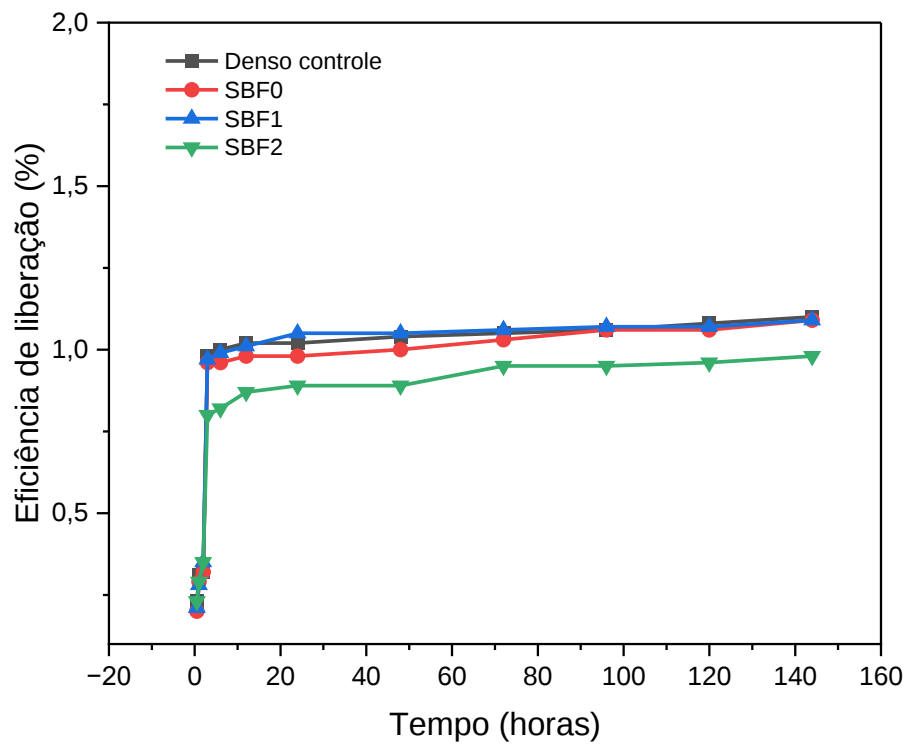
**Figura C1** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de imersão.



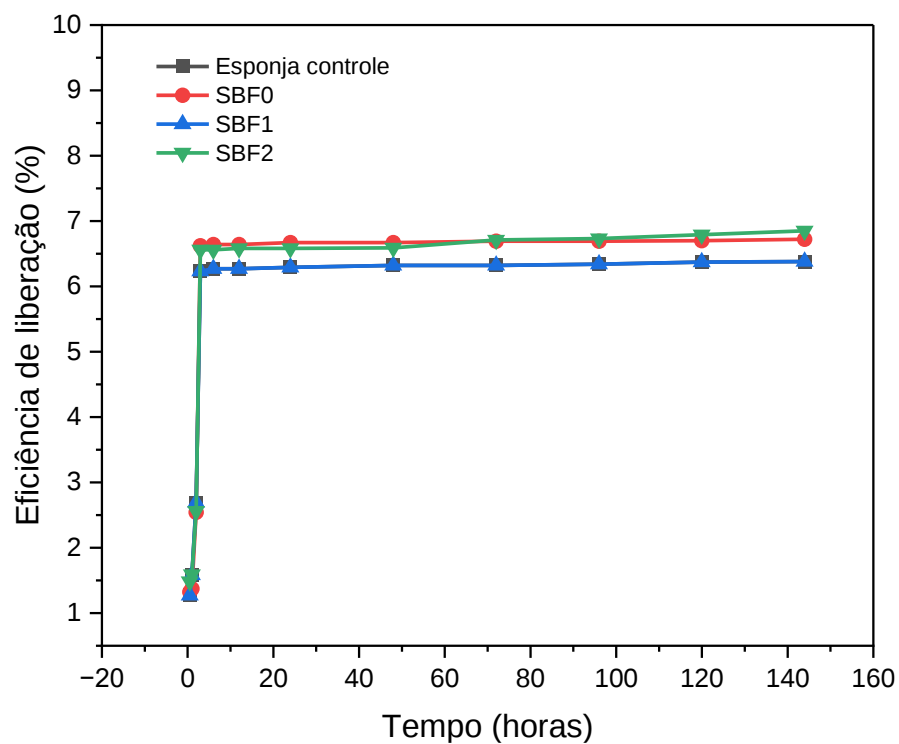
**Figura C2** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.



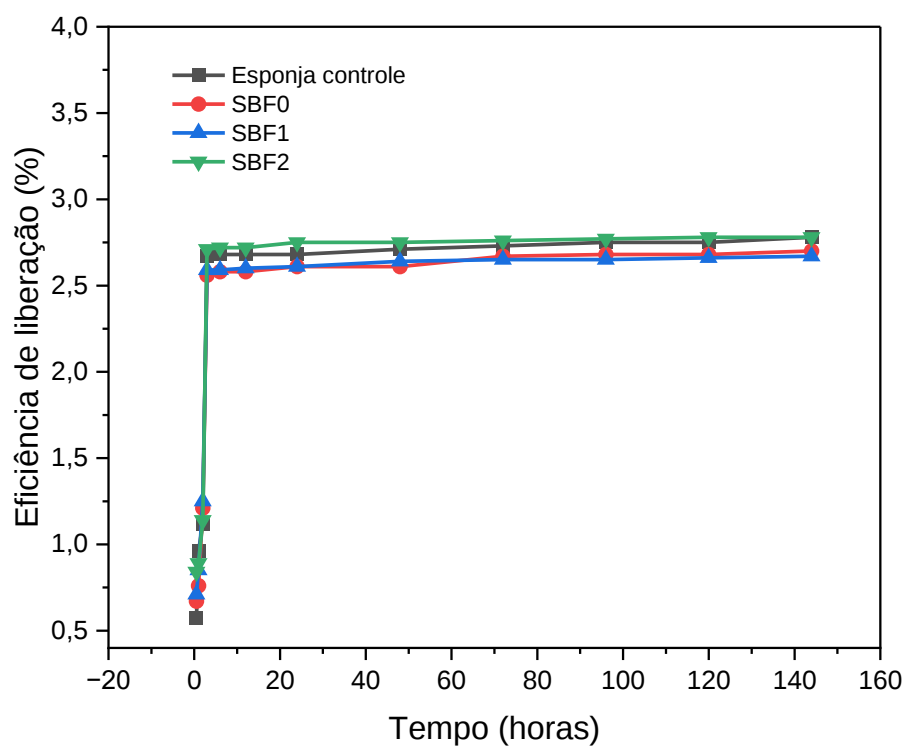
**Figura C3** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de imersão.



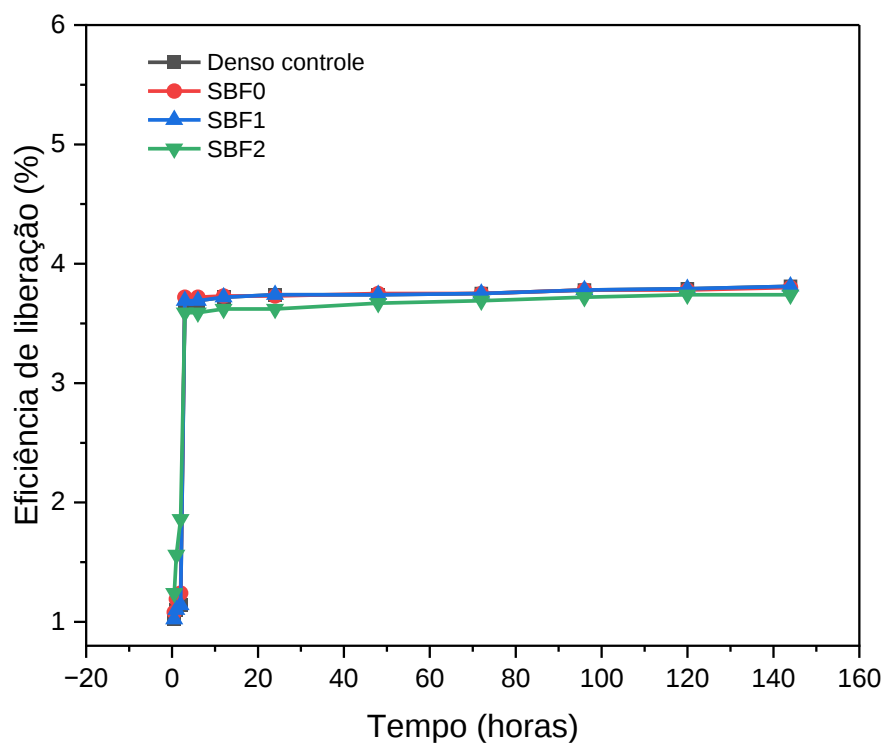
**Figura C4** – Curva referente a eficiência de liberação de AgNPs das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.



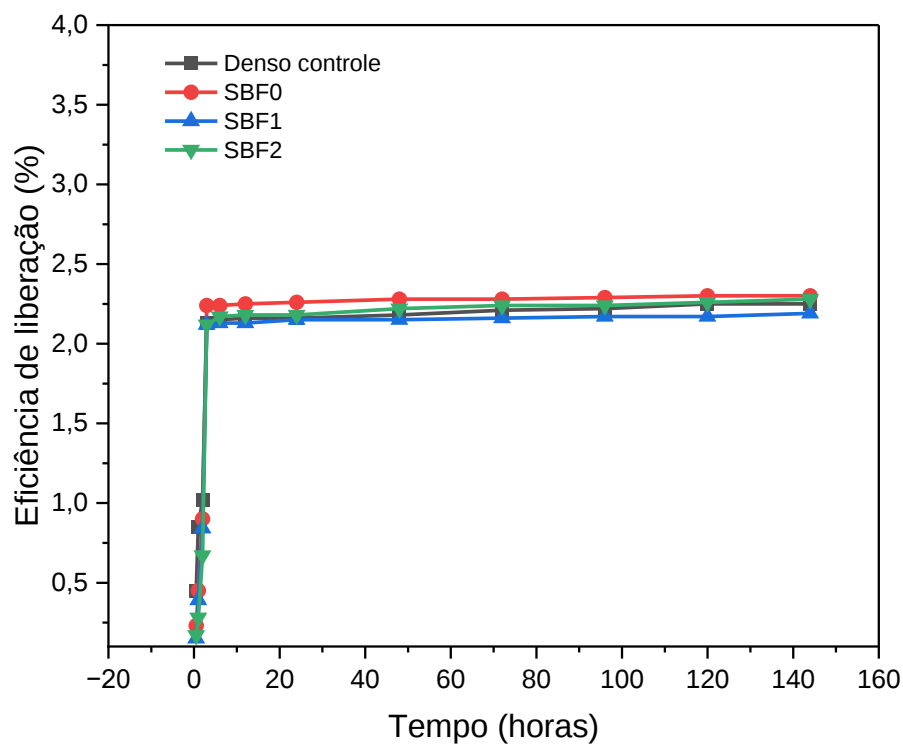
**Figura C5** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de imersão.



**Figura C6** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas esponjas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.



**Figura C7** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de imersão.



**Figura C8** – Curva referente a eficiência de liberação de própolis vermelha das membranas densas de PGS, tratadas pelo método de evaporação.