

Estudo da obtenção de compósito de Quitosana – Ácido Hialurônico – Biosilicato® (QUI-AH-BS) visando aplicações biomédicas

L. Santos¹, S. M. Malmonge¹, L. R. Santos¹, R. S. Monteiro¹, J. K. M. B. Daguano^{1*}

¹Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC,
Alameda da Universidade, s/n, Anchieta – São Bernardo do Campo/SP

[*juliana.daguano@ufabc.edu.br](mailto:juliana.daguano@ufabc.edu.br)

Resumo: *Buscando um material que possa ser utilizado em aplicações relacionadas à restauração tecidual, com ênfase em tratamentos dermatológicos, o objetivo deste trabalho é a obtenção de um compósito a partir da combinação de materiais bioativos, como o Biosilicato, com biopolímeros naturais, como a Quitosana e o Ácido Hialurônico. Primeiramente, foi criado e avaliado um protocolo para a confecção de compósito QUI-AH-BS pelo método de evaporação de solvente. Posteriormente, os filmes do compósito foram caracterizados pelas técnicas de FTIR, TGA, MEV e avaliados quanto ao grau de intumescimento e bioatividade in vitro. Os resultados mostram que o protocolo permitiu a incorporação de AH na estrutura do compósito QUI-BS, com aumento do grau de intumescimento, mas com redução na bioatividade. Por fim, o protocolo foi validado e a caracterização do material demonstrou que compósitos QUI-AH-BS tem grande potencial para aplicações biomédicas, em especial, para o desenvolvimento de curativos para feridas dérmicas.*

Palavras-chave: *Biosilicato, Quitosana, Ácido Hialurônico, Bioatividade.*

Study of obtaining a composite of Chitosan - Hyaluronic Acid -Biosilicate® (QUI-AH-BS) for biomedical applications

Abstract: *In search of a material that can be used in applications related to tissue restoration, with an emphasis on dermatological treatments, the aim of this work was obtaining a composite from the combination of bioactive materials, such as Biosilicate, with natural biopolymers, as Chitosan and Hyaluronic Acid. Firstly, a protocol for the preparation of composite CHI-HA-BS by the solvent casting was created and evaluated. Subsequently, the films of the composite were characterized by FTIR, TGA, SEM techniques and evaluated for the degree of swelling and in vitro bioactivity. The results showed that the protocol allowed the incorporation of AH in the structure of the composite CHI-BS, with an increase in the degree of swelling, but with a reduction in bioactivity. Finally, the protocol was validated, and the characterization of the material demonstrated that CHI-HA-BS composites have great potential for biomedical applications, especially for the development of dressings for dermal wounds.*

Keywords: *Biosilicate, Chitosan, Hyaluronic Acid, Bioactivity.*

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as queimaduras são responsáveis por cerca de trezentas mil mortes ao ano em todo o mundo e constituem um grave problema de saúde, pois além da grande taxa de mortalidade, deixa sequelas físicas e psicológicas aos sobreviventes. No Brasil, estima-se que ocorram por volta de um milhão de acidentes com queimaduras por ano [1]. Adicionalmente, problemas relacionados à pele, como as úlceras de pressão, envolvem por vezes o tecido muscular e até mesmo ossos e articulações, levando à destruição parcial ou total dessas estruturas [2]. Em estágios avançados, o tratamento das úlceras pode ser demorado e de alto custo, necessitando de intervenção cirúrgica [2]. A análise destes dados justifica a realização de diversos estudos acerca de tratamentos alternativos mais eficientes e com menor custo, para atender essa crescente demanda.

Cerâmicas bioativas e vitrocerâmicas, utilizadas em próteses e restaurações relacionadas a tecidos ósseos, têm sido alvo de experimentos para aplicações em restaurações de tecidos moles. Estudos *in vivo* já demonstraram a eficiência de cerâmicas como o Bioglass 45S5 ao estimular o crescimento celular, além de adquirir uma rápida formação interfacial com colágeno, um dos principais componentes da pele, promovendo uma ligação estável e duradoura, não desencadeando respostas inflamatórias prejudiciais ao organismo [3]. Mais uma característica desses materiais, que mostra sua versatilidade, é a propriedade bactericida, possibilitando seu uso na formulação de cremes e fármacos, aplicados a tecidos moles. Ou então, a manipulação de vidros bioativos na forma de fibras, permitindo fácil aplicação na forma de mantas bioativas, recuperando pacientes com graves úlceras oriundas de diabetes [4].

Os materiais poliméricos também têm sido aplicados na confecção de curativos dérmicos descartáveis, devido a características elásticas, aliado à facilidade e baixo custo de processamento, em substituição aos curativos tradicionais. Esta substituição é bastante vantajosa, uma vez que os curativos tradicionais, que implicam na utilização de curativos à base de fibra sintética, além de algodão hidrófilo e faixa crepe, provocam um desconforto desnecessário em pacientes, principalmente os que sofrem de queimaduras [5,6].

Como alternativa aos tratamentos mencionados, compósitos à base de Biosilicato (BS) e Quitosana (QUI) foram desenvolvidos anteriormente, visando aproveitar o conjunto das características supracitadas, unindo-as em um único material que possa atuar como um dispositivo de elevada bioatividade para regeneração guiada [7]. Porém, as características do compósito QUI-BS ainda podem ser trabalhadas, para um melhor desempenho em aplicações dérmicas. Assim, a motivação deste trabalho é a busca de um protocolo para confecção de

compósito QUI-BS com adição de Ácido Hialurônico (AH), um material amplamente utilizado na indústria dermatológica, realizando a subsequente caracterização do produto final, visando à produção de novos e eficientes materiais para curativos dérmicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foi preparada solução de QUI 1% (m/v), pela adição de quitosana em pó (marca *Polymer*) em solução de Ácido Acético 1% (marca Synth), sob agitação a 500 rpm por 24 h, e subsequente filtragem. Biosilicato®, um vitrocerâmico altamente bioativo desenvolvido e cedido pelo LaMaV/UFSCAR, na forma de pó (tamanho de partícula médio de 20 μm), teve sua superfície funcionalizada, segundo patente BR1020160022240 [8]. Após a funcionalização, foi adicionado 30% (m/m) de Biosilicato em solução QUI 1% (m/v), e mantido em agitação por 24 h. Em placas de Petri silanizadas, a solução de QUI-BS foi despejada e mantida a 37 °C por 72 horas para evaporação do solvente, posterior neutralização com solução de NaOH 0,1 M, com secagem a 37° C por 24 h.

Para a enxertia de Ácido Hialurônico na Membrana de QUI- BS, amostras de 2 x 2 cm foram submersas em solução de Ácido Hialurônico 0,5% (m/m), mantidas sob agitação lenta por 24 h, com excesso de agente reticulante, originando a proporção 1:2, sendo utilizados ADH (Di-hidrazida Adípica, marca Sigma-Aldrich) e EDCI (1-Etil-3-(3-Dimetilamino-Propil)Carbodi-Imida, marca Sigma-Aldrich) [24]. As amostras então intumescidas foram colocadas em solução aquosa de pH entre 3 a 3,5, sendo mantidas em agitação por 2 h, para posterior secagem em estufa a 37 °C.

Para identificação das fases presentes no compósito, amostras do filme resultante foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (PerkinElmer, Spectrum GC), em reflectância difusa, com resolução de 4 cm^{-1} na região de 1800 a 400 cm^{-1} . Ainda, amostras do compósito QUI – BS antes e depois da enxertia do Ácido Hialurônico foram caracterizadas por termogravimétrica (TGA) (TA Instruments, Q500) com aquecimento de 10 °C/min, fluxo de nitrogênio de 90 mL/ min, da temperatura ambiente até 600°C.

Para avaliação do grau de intumescimento, amostras da membrana QUI-AH-BS (n = 10) com 1 cm^2 de área, foram pesadas e imersas em 20 mL de Solução Tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) a 37 °C. Após períodos previamente determinados (1 e 6 horas, 1, 3, 5, e 7 dias), as amostras foram novamente pesadas. O grau de intumescimento foi determinado pela Equação A:

$$I(\%) = \frac{M_i - M_s}{M_s} * 100 \quad (A)$$

Onde I (%) é o grau de intumescimento em %, M_i é a massa da amostra intumescida no fluido, em gramas, e M_s é a massa seca da amostra, em gramas.

O teste de bioatividade seguiu a norma ISO 23317-07 [9]. Amostras de QUI-AH-BS (n = 3) foram imersas em solução SBF (*Solution Blody Fluid*), a qual foi renovada a cada 24 h, permanecendo as amostras por períodos de 5 e 7 dias. Após estes tempos, foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (FEI, Quanta 250).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes de QUI-AH-BS obtidos pelo protocolo proposto foram caracterizados por FTIR, TGA, quanto ao grau de intumescimento e bioatividade. Esta avaliação garante a efetividade do protocolo no que diz respeito a aspectos físico-químicos do material desenvolvido. A Figura 1 (a e b) ilustra o filme de QUI-AH-BS, onde foram observadas diferenças na superfície do material. Uma face do filme (lado A) se mostrou mais lisa e homogênea, enquanto que na outra face (lado B) puderam ser identificados aglomerados, supostamente de Biosilicato, deixando essa superfície mais rugosa.

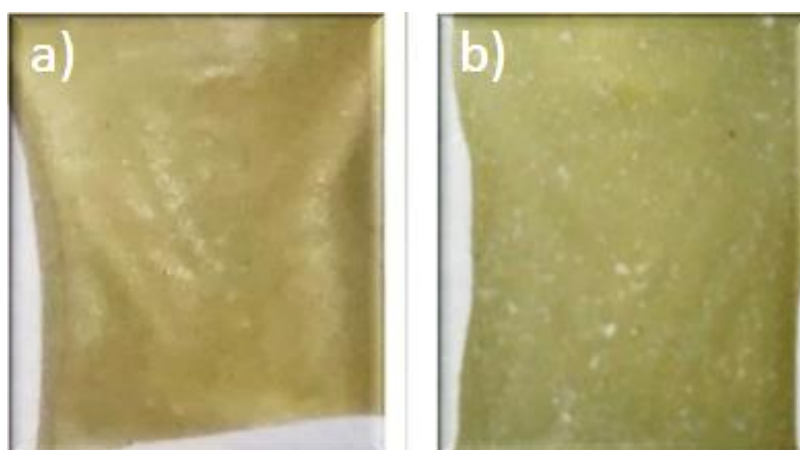


Figura 1. Amostra de compósito QUI-AH-BS. (a) Lado “A”, (b) Lado “B”.

A Figura 2 apresenta os espectros de FTIR dos compósitos QUI-BS e QUI-AH-BS. Pela Figura 2a, pode-se observar a presença de bandas características ao Biosilicato, em 470 cm^{-1} (Si-O-Si), 575 cm^{-1} (P-O) e 600 cm^{-1} (P-O). Em relação à Quitosana, foram identificadas três bandas que seriam referentes a este material, em 889 cm^{-1} (ligação glicosídica), 1060 cm^{-1} (C-O) e 1152 cm^{-1} (C-O-C). Bandas referentes ao Ácido Hialurônico não foram analisadas, pois não há a presença do material nessa etapa. Os dois lados das amostras foram analisados e os

espectros resultantes foram idênticos, demonstrando a homogeneidade do material e eficiência da etapa de funcionalização do Biosilicato. Uma vez que a presença de Quitosana e Biosilicato foi garantida no compósito, o material seguiu para a etapa de enxertia de Ácido Hialurônico.

A Figura 2 (b e c) mostra os espectros de FTIR para o material após protocolo de enxertia do Ácido Hialurônico. Os espectros de FTIR das duas faces das amostras estão apresentados individualmente, devido às diferenças entre os lados. Por meio da Figura 2b, é possível observar os picos referentes ao Biosilicato em 560 cm^{-1} (P-O), 575 cm^{-1} (P-O) e 600 cm^{-1} (P-O). Em relação à Quitosana, foram identificadas bandas características em 889 cm^{-1} (Glicosídica); 1152 cm^{-1} (C-O-C); 1315 cm^{-1} (C-H); 1377 cm^{-1} (C-H₂). Como esperado, foram identificados bandas características do Ácido Hialurônico em 891 , 1044 , 1077 e 1150 cm^{-1} , confirmando a presença do material no compósito. Na Figura 2c, por outro lado, nota-se a ausência de picos relacionados à Quitosana. Pode-se observar a presença das bandas referentes ao Biosilicato (em 570 e 600 cm^{-1}) e ao Ácido Hialurônico em 891 , 946 , 1150 e 1237 cm^{-1} [10-12]. Assim, o estudo revela que o Ácido Hialurônico foi incorporado ao material, entretanto tal incorporação não ocorreu de forma homogênea, uma vez que não foi possível visualizar bandas características da Quitosana em uma das faces da membrana, podendo afirmar que nesta face houve uma maior concentração de Ácido Hialurônico. Acredita-se que esta incorporação preferencial esteja relacionada à técnica de evaporação de solvente.

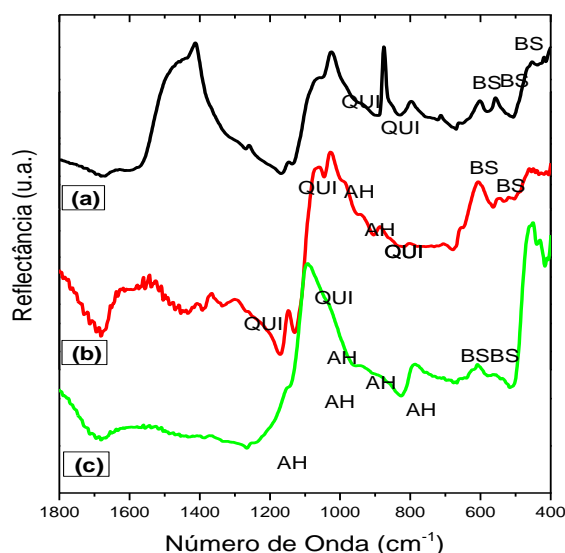


Figura 2. Espectro de FTIR dos compósitos (a) QUI-BS, (b) QUI-AH-BS – Lado A e (c) Lado B.

O comportamento térmico dos compósitos QUI-BS e QUI-AH-BS foi analisado por termogravimetria, para verificar possíveis efeitos relacionados à adição do Ácido Hialurônico. Uma vez que os materiais cerâmicos possuem temperaturas de degradação térmica superiores a 1000 °C , o foco do estudo foi entender o efeito da inserção do Biosilicato em compostos

poliméricos, pois variações na temperatura de degradação dos polímeros seriam indícios de comprovação da formação do material composto. A Figura 3 exibe os resultados da análise TGA para os compostos estudados.

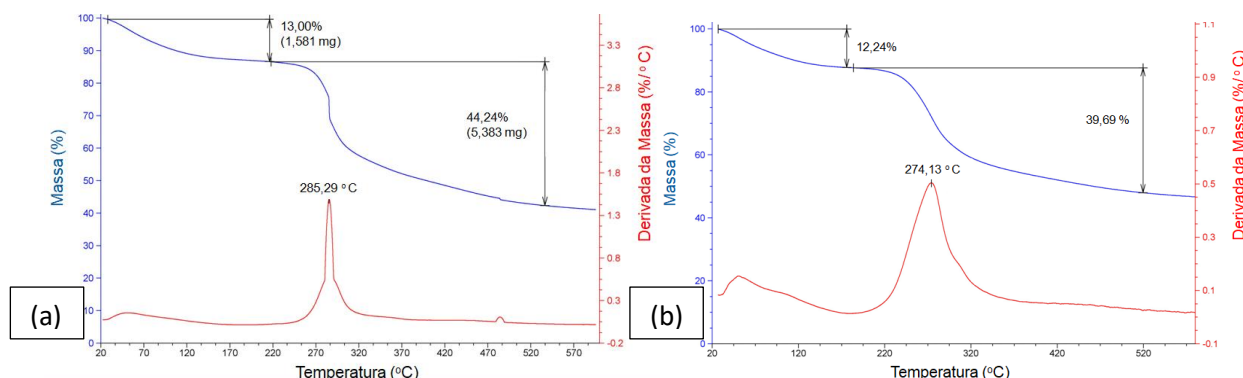


Figura 3. Análise Termogravimétrica dos compostos (a) QUI-BS e (b) QUI-AH-BS.

A primeira perda de massa (em torno de 13%) ocorre entre 20 e 70 °C e está associada à perda de moléculas de água. Tais moléculas são associadas a grupos aminos e hidroxilas presentes na QUI, através de pontes de hidrogênio [13,14]. Já a segunda perda de massa (quase 45%), com início próximo a 220 °C, está associada à degradação da QUI, uma vez que a degradação de biocerâmicas ocorre somente a temperaturas superiores. O pico de intensidade da derivada da massa, bem definida na temperatura de 285 °C, indica a degradação de uma substância pura, confirmando que somente a QUI foi degradada. A ligeira diminuição da temperatura de degradação do composto QUI-BS (285 °C) em relação à QUI pura (298 °C) pode estar associada ao preenchimento de sítios de alta polaridade presentes na estrutura da QUI por cristais de BS, que por consequência, diminuem as interações intermoleculares entre as moléculas de QUI. O BS presente em filmes de QUI promove a reticulação do material, uma vez que ligações iônicas são realizadas entre o polímero e a vitrocerâmica [8]. Assim, acredita-se que a presença de íons provenientes da ligação entre QUI e BS seja responsável pelo favorecimento das reações de degradação, pois para polímeros é muito comum que a degradação ocorra em temperaturas inferiores quando há presença de radicais livres [15].

Ainda, é interessante notar que até a temperatura de 600 °C não há total degradação do material em análise, restando uma massa próxima a 40% em relação à massa inicial. Este comportamento pode ser justificado pela presença de carga de BS, a qual foi adicionada em 30% (m/m), e pela presença de quitina residual. Conforme indicação do fabricante, o material estudado é considerado um copolímero, pois o grau de desacetilação é de 80%, ou seja, o material é composto por Quitina (20%) e Quitosana (80%).

Estudos térmicos realizados por Polexe e Delair [16] com polímeros puros demonstraram que a QUI possui temperatura de degradação térmica em torno de 298 °C, enquanto o AH em 241 °C. Estudos com blendas poliméricas, em especial compostas de QUI-AH, evidenciaram que a temperatura de degradação térmica possuía um valor intermediário entre os valores dos componentes puros. Deste modo, uma blenda QUI-AH apresentaria a temperatura de degradação térmica entre 241 e 298 °C, sendo dependente da proporção de cada material [14].

Pela Figura 3 é possível notar uma mudança no perfil de degradação do novo material, sendo que a segunda perda de massa, relacionada à degradação polimérica, não é tão bem definida como foi observada para o compósito QUI-BS, caracterizando uma substância composta que seria originada pelas presenças de AH e QUI. Outra mudança observada é que o início da taxa de degradação ocorre em torno de 180 °C, valor próximo à de degradação do AH (241 °C), atingindo seu ápice em 274 °C, valor intermediário entre as temperaturas de degradação dos dois polímeros, gerando fortes indícios da incorporação do AH ao compósito.

Um estudo realizado por Liverani et al. [13], ao combinar o *Bioglass 45S5* com os polímeros Quitosana e Policaprolactona gerou resultados semelhantes. A temperatura de degradação do PCL puro é de 400 °C, e da blenda PCL – QUI estudada foi de 370 °C, valor intermediário entre a temperatura de ambos os polímeros. Com a inserção do *Bioglass 45S5*, a temperatura de degradação do composto reduziu para cerca de 300 °C, demonstrando o efeito de diminuição da temperatura devido à presença do material cerâmico.

A absorção e retenção de fluídos é essencial para materiais cuja aplicação seja destinada a áreas que estejam em contato com fluidos corporais, pois tal habilidade propicia além da absorção de fluidos corpóreos, a transferência de nutrientes e metabólitos. Entretanto, uma alta taxa de absorção de fluidos pode comprometer a estabilidade do material, acelerando a degradação de suas fibras e proporcionando a instalação de microrganismos [17].

A literatura mostra que uma blenda composta por dois polímeros geralmente possui um valor de intumescimento intermediário entre o valor esperado para cada um dos polímeros individualmente [18,19]. Desse modo, espera-se que um compósito QUI-AH-BS possua como característica um grau de intumescimento ligeiramente inferior ao obtido pela blenda (AH-QUI), uma vez que o material cerâmico deverá preencher parte dos sítios de alta polaridade gerados pela blenda polimérica.

Os Graus de Intumescimento para “tempo infinito” tanto para a blenda, compósitos e quanto individualmente para cada polímero podem ser visualizados na Tabela I. Como esperado, o grau de intumescimento do compósito foi inferior ao da blenda polimérica. Ainda, o valor obtido é bem próximo à QUI pura (188%), garantindo uma maior estabilidade estrutural

ao compósito, sem comprometer os efeitos benéficos da capacidade de intumescimento. Estudos realizados por com compósitos de QUI com 30% de reforço de BS, confeccionados pela técnica de evaporação de solvente, assim como neste trabalho, mostraram grau de intumescimento para longos períodos da ordem de 90%. Além disso, foi demonstrado que uma diminuição no reforço de BS de 30 para 15% gerou um aumento no grau de intumescimento de 90 para 130%, pois um aumento da carga no sistema implica em uma menor disponibilidade de grupos funcionais de QUI com afinidade por moléculas polares, sendo esse um fator responsável pela diminuição do grau de intumescimento [8].

Tabela I: Grau de Intumescimento de diferentes em tempo infinito [7,19].

Material	Grau de Intumescimento (%)
Ácido Hialurônico (AH)	2928 ± 281
Quitossana (QUI)	187 ± 14
Blenda (AH-QUI)	303 ± 4
QUI com 30% de Reforço de BS	90
Compósito QUI-AH-BS	179 ± 28

A comparação entre os diferentes materiais demonstra a importante influência do AH para o grau de intumescimento do compósito. A enxertia do AH possibilitou o aumento do grau de intumescimento em compósitos de QUI com 30% BS, sendo que a adição do AH gerou resultados superiores mesmo quando comparado a compósitos com 15% BS.

A Figura 4 apresenta as micrografias do material antes e após período de imersão em SBF por 5 e 7 dias. Primeiramente, na Figura 4(a), não é possível notar a presença de HCA, a qual se espera ser visualizada somente após o início do ensaio. O fato de não ser observada a formação HCA nesta etapa também é um bom indicativo de que o BS não reagiu com o meio aquoso durante o preparo do compósito. Quanto às partículas do BS, estas não estão evidentes na superfície do material, indicando que as mesmas foram englobadas pela matriz polimérica. Ainda, é possível observar as cadeias poliméricas organizadas e uma parcial miscibilidade dos polímeros AH e QUI. Lewandowska et al. [14] demonstraram que blendas binárias de QUI-AH e ternárias de QUI-AH-Col podem ser obtidas em diferentes graus de miscibilidade, variando a composição da blenda e o tipo de solvente. Pela técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) foi mostrado que a blendas tinham morfologia bastante diferente dos componentes puros, podendo ser identificados microdomínios e aglomerados globulares.

Em amostras após 5 dias de imersão em SBF, Figura 4(b), não foi possível visualizar indícios da formação de HCA na superfície, indicando a necessidade de um maior período de imersão para inferências. Porém, após 7 dias de imersão, há a formação de cristais com

geometria característica dos cristais de HCA (Figura 4c), ou seja, pequenas estruturas globulares nucleadas de forma dispersa sobre a superfície do material, sendo este um indicativo da bioatividade do compósito. Por vez, é importante destacar que o compósito QUI-BS apresentou bioatividade já no período de 1 dia de imersão. A reduzida bioatividade do novo compósito QUI-AH-BS pode estar relacionada com o processamento do material, onde possivelmente a etapa de enxertia de AH esteja alterando a superfície do BS, levando a uma menor reatividade do mesmo, apesar desse material ser um vitrocerâmico altamente bioativo. O conceito envolvido no teste de bioatividade *in vitro* é o de dissolução-lixiviação de materiais em meio SBF, promovendo troca iônica com esta solução e então a formação de uma camada de HCA, com composição e estrutura similar àquela encontrada no tecido ósseo [20].

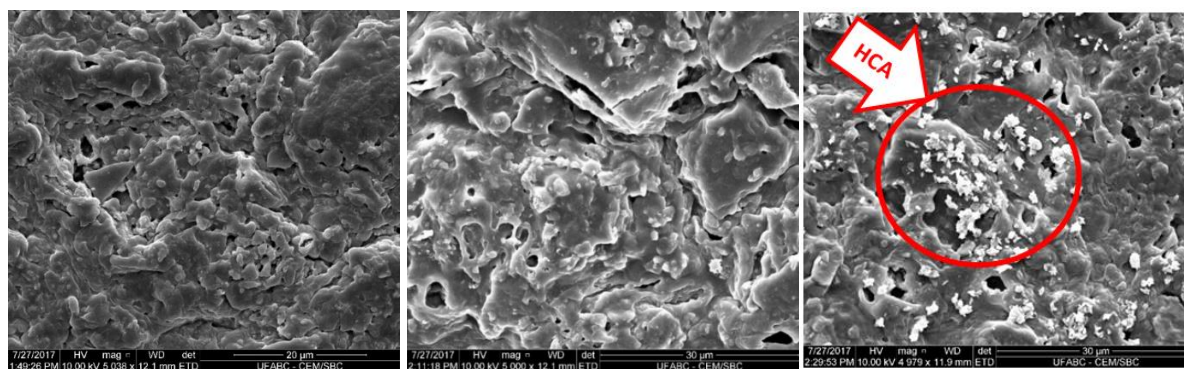


Figura 4. Micrografias do compósito QUI-AH-BS (a) pré-ensaio de Biotividade, (b) após 5 dias, (c) após 7 dias de imersão em SBF. Aumento de 5000x.

Embora o ensaio de bioatividade de 7 dias seja suficiente para notar a presença da HCA na superfície do material, é recomendável um estudo *in vitro* com maiores tempos a fim de se obter melhores resultados. Embora tenha sido identificado o início da formação de HCA nas micrografias, os resultados de trabalhos anteriores [21,23] justifiquem a bioatividade dos materiais, a análise por FTIR ainda se faz necessária.

Conclusão

Neste trabalho foi possível desenvolver e avaliar, em relação a características físico-químicas, um protocolo para obtenção de compósito à base de Quitosana (QUI), Biosilicato (BS) e Ácido Hialurônico (AH) e estudar os benefícios que a inserção do AH proporciona a filmes de QUI-BS. As análises verificaram a presença do AH na composição do material confeccionado, bem como demonstraram a diminuição da temperatura de degradação térmica do novo compósito em relação a filmes de QUI-BS, devido à sua inserção. O grande benefício

que o AH gera à estrutura do filme de QUI-BS, está relacionado ao maior intumescimento do material, pois o torna mais maleável, característica importante para o desenvolvimento de curativos. Apesar da formação de HCA na superfície do material não ter ocorrido de forma homogênea, esta foi observada após 7 dias, comprovando a sua bioatividade, e indicando que o protocolo embora eficiente, pode ser aperfeiçoado de modo a melhor controlar a enxertia do AH em filmes de QUI-BS, proporcionando maior caráter bioativo. Por fim, o protocolo desenvolvido pôde ser validado em relação às propriedades físico-químicas e demonstrou que compósitos à base de QUI-AH-BS têm grande potencial para aplicações biomédicas, em especial, para o desenvolvimento de curativos para feridas dérmicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFABC pela concessão do projeto Recém-doutor, à Central Multiusuário de São Bernardo do Campo pelas facilidades e ao Laboratório de Materiais Vítreos da UFSCar pela doação de Biosilicato.

REFERÊNCIAS

- [1] M. L. Takejima, R. F. B. Netto, B. L. Toebe, et. al, Rev. Bras. Queimaduras. Cap. 10. (2011) 85.
- [2] D. A. S. Soares, F. S. Vendramin, L. M. D. Pereira, et. al, Ver. Bras. Cir. Plást. 26. (2011) 578.
- [3] V. Miguez-Pacheco, L.L. Hench, A. R. Boccaccini, Acta Biomaterialia. 13 (2015) 1.
- [4] P. Wray, Am. Ceram. Soc. Bulletin 90(4) (2010) 25.
- [5] M. J. Silva, E. M. Menezes, Y. L. Souza, N. C. Gimenez, Ver. Bras. Enferm. 43 (1990) 117.
- [6] H. Moser, R. R. Pereima, M. J. L. Pereima, Rev Bras Queimaduras 12(2)(2013) 60.
- [7] L. R. Santos, M. M. Roloff, R. L. Siqueira, et. al, Anais do 11º Anais do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, Campina Grande, PB, 2015, v. 1, p. 1.
- [8] L. R. Santos, R. L. Siqueira, S. M. Malmonge, et. al, Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160022240, INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/02/2016.
- [9] ISO DOCUMENT 23317, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2007.
- [10] ASTM F2347-11, American Society for Testing and Materials, EUA 2013.
- [11] H. Staroszyk, K. Sztuka, J. Wolska, et. al, Spectroc. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 117 (2014) 707.
- [12] R. L. Siqueira, E. D. Zanotto, Química Nova 34 (7) (2011) 1231.
- [13] L. Liverani, J. Lacina, J. A. Roether, et. al, Bioact. Mater. 1 (2017) 1.
- [14] K. Lewandowska, A. Sionkowska, S. Grabska, et. al, J. Mol. Liq. 220 (2016) 726.
- [15] E. S. Dragan, Chem. Eng. J. 243 (2014) 572.
- [16] R. C. Polexe, T. Delair, Mol. 18 (2013) 8563.
- [17] L. Y. W. Bourguignon, M. Ramez, E. Gilad, et. al, J. Investigative Dermatol. 126 (2006) 1356.
- [18] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. S. Kumar, et. al, Biotechnol. Advances. 29 (3) (2011) 322.
- [19] M. H. M. Nascimento, M. Ferreira, S. M. Malmonge, et. al, J. Mater Sci. Mater. Med. 28 (2017) 68.
- [20] I. Rehman, W. Bonfield, J. Mater Sci. Mater. Med. 8 (1)(1997) 1.
- [21] J. Moura, L.N. Teixeira, C. Ravagnani, et. al, J. Biomed. Mater. Res. 82A (2007) 545.
- [22] J.R. Jones, Acta Biomater. 9 (2013) 4457.
- [23] M. C. Crovace, M. T. Souza, C. R. Chinaglia, O. Peitl, E. D. Zanotto, Journal of Non-Crystalline Solids 432 (2016) 90.