

PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS POROSOS TRIDIMENSIONAIS DE
POLIHIDROXIBUTIRATO/QUITOSANA PARA APLICAÇÕES EM
ENGENHARIA ÓSSEA

Roberta Helena Mendonça

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira

Thiré

Marysilvia Ferreira da Costa

Rio de janeiro

Setembro de 2012

PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS POROSOS TRIDIMENSIONAIS DE
OLIHIDROXIBUTIRATO/QUITOSANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA
ÓSSEA

Roberta Helena Mendonça

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof^a. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, DSc.

Prof^a. Marysilvia Ferreira da Costa, DSc.

Prof^a. Gloria Dulce de Almeida Soares, DSc.

Prof. Paulo Jansen de Oliveira, DSc.

Prof^a. Ledjane Silva Barreto, DSc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2012

Mendonça, Roberta Helena

Produção de Arcabouços Porosos Tridimensionais de Polihidroxibutirato/ Quitosana para Aplicações em Engenharia Óssea / Roberta Helena Mendonça. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012

IX, 135 p.: Il.; 29,7 cm

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marysilvia Ferreira da Costa

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 106 – 120

1. Polihidroxibutirato. 2. Quitosana. 3 Arcabouços porosos. 4 Engenharia Óssea. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira, *et al.* III Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III.Título.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais Elena e Orlando, ao meu irmão Tiago,
ao meu dedicado esposo Cristian e à Laís minha querida filha que trouxe de volta a força
que pensei ter perdido.*

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do
céu.*

Eclesiastes 3:1

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo
de afastar-se de abraçar;*

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes 3:4-8

Agradecimentos

À Santíssima Trindade.

Ao Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da COPPE/UFRJ.

Às professoras Marysilvia Ferreira da Costa e Rossana Mara da Silva Moreira Thiré pela orientação e por me apoiarem no desenvolvimento desta metodologia.

À PHB Industrial S/A pela doação do polihidroxibutirato.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Caracterização de Superfícies (AFM) do PEMM/ COPPE /UFRJ pela análise de microscopia de força atômica.

À Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital Antônio Pedro/UFF pela análise de citotoxicidade.

Ao Laboratório de Biomateriais do PEMM/COPPE/UFRJ pelo uso do liofilizador.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCM) do PEMM/COPPE/UFRJ pelas análises de Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier e pelo teste de compressão.

Ao Laboratório de Catálise do IT/DEQ/UFRRJ pela análise de difração de raios-X.

Ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo ensaio Immunoblotting/ Quimiluminescência.

Ao LABTeR / LADEQ / EQ / UFRJ pelas análises térmicas.

Aos membros da banca.

À Márcia Soares Sader (Laboratório de Biomateriais do PEMM/COPPE/ UFRJ) e ao Heleno (Laboratório de Caracterização de Superfícies do PEMM/COPPE/UFRJ) pelo apoio técnico.

Aos amigos do Laboratório de Biopolímeros em especial Bruna, Clara, Diogo, Diego, Márcio, Felipe, Tatiana e Taíla por compartilharem alegria, conhecimento, ansiedades e conversas agradabilíssimas.

À Dilma Alves Costa minha orientadora de iniciação científica da qual me tornei filha não só no âmbito acadêmico como no pessoal.

Às minhas queridas amigas, Cláudia Tavares, Cinthya Helena, Daniele Resende, Geórgia da Costa Tavares, Giselle Confort, Giselle Mendes Bezerra, Livia Maria, Tatiana Faria Pereira, Sandra Cristina Dantas e Vanessa Arcenio por tornarem minha vida mais simples e por torcerem, sempre, por mim.

Aos meus pais por ... Por terem me ensinado, nos moldes da Sagrada Família, a ser humana em um sentido amplo... E que o melhor bem não é material. E que nada substitui nossas conversas de domingo ao redor da mesa que une amigos antigos, amigos novos, parentes e quem mais chegar...

Ao meu irmão Tiago por me dar o privilégio de usufruir de sua inteligência admirável.

À minha querida avó Janira e à minha prima Rose Kelly que sempre me falam para meditar no Salmo 40.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde tudo começou

Ao meu amigo, companheiro e marido Cristian pelo apoio incondicional.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS POROSOS TRIDIMENSIONAIS DE
POLIHIDROXIBUTIRATO/QUITOSANA PARA APLICAÇÕES EM
ENGENHARIA ÓSSEA

Roberta Helena Mendonça

Setembro / 2012

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marysilvia Ferreira da Costa

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Uma nova metodologia para produção de arcabouços tridimensionais para aplicação em Engenharia Tecidual foi desenvolvida com base no inchamento e posterior liofilização de uma matriz densa de polihidroxibutirato contendo 25% de quitosana (QUI). Esta matriz foi inchada em água e em solução de fibronectina originando respectivamente, arcabouços porosos de polihidroxibutirato/QUI ($A_{PHB-QUI25\%}$) e polihidroxibutirato/QUI/fibronectina ($A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$). Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que, devido ao inchamento e à posterior eliminação do fluido absorvido da QUI, ocorreu a formação de poros na matriz densa de PHB. Desta forma foram obtidos arcabouços porosos de QUI inseridos na estrutura de poros do PHB, que degrada heterogeneamente, ocorrendo primeiramente a degradação da QUI abrindo um precedente para o estudo da liberação de biomoléculas. A morfologia e a composição dos arcabouços foram afetadas pelo fluido de inchamento. A presença de fibronectina no $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ foi confirmada por quimiluminescência e por FTIR. O $A_{PHB-QUI25\%}$ e o $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ apresentaram módulo de compressibilidade iguais a (13.07 ± 0.01) MPa e (18.0 ± 0.03) MPa respectivamente, próximos ao do osso trabecular. Testes “*in vitro*” para avaliar a citotoxicidade dos arcabouços mostraram que ambos não apresentaram comportamento citotóxico. A composição química, a distribuição do tamanho de poros, o módulo de compressão e a não-toxicidade indicam que os arcabouços produzidos por esta metodologia têm potencial para aplicação na regeneração do tecido ósseo. Além disso, diferentes fluidos biológicos que possuam afinidade com a QUI podem, potencialmente, serem utilizados no inchamento gerando arcabouços com diferentes composições.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PRODUCTION OF 3D POLYHYDROXYBUTYRATE/CHITOSAN SCAFFOLDS
FOR APPLICATION IN BONE TISSUE ENGINEERING

Roberta Helena Mendonça

September / 2012

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marysilvia Ferreira da Costa

Department: Metallurgical and Material Engineering

A new methodology to produce 3D-scaffolds for Tissue Engineering application was developed based on the swelling and further lyophilization of a dense polyhydroxybutyrate matrix contained 25% wt of chitosan. The matrix was swollen in water and in fibronectin solution leading to polyhydroxybutyrate/ chitosan ($A_{\text{PHB-QUI25\%}}$) and polyhydroxybutyrate/ chitosan/ fibronectin ($A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$) scaffolds, respectively. Scanning electron microscopy images showed that the pores formation occurred due the chitosan swelling that promotes pore formation in the dense polyhydroxybutyrate matrix and to the elimination of chitosan adsorbed fluids. Being thus, was obtained chitosan scaffolds into the pore PHB structure and this scaffolds degraded heterogeneously occurring, firstly, chitosan degradation. This fact induces the study of biomolecules delivery. Morphology and scaffolds composition were affected by fluid used in the swelling process. The presence of fibronectin on $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ was confirmed by chemiluminescence and FTIR. The $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ e o $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ showed compressibility modulus equal to (13.07 ± 0.01) MPa and (18.0 ± 0.03) MPa respectively, closed to the cancellous bone. In vitro tests were done to evaluate the cytotoxic behavior of scaffolds and both did not show cytotoxicity. The chemical composition, the distribution of pore size, the compression module and non-toxicity indicates that the scaffolds composed of PHB / chitosan and PHB / chitosan / fibronectin produced by this method have potential application in the regeneration of bone tissue. Furthermore, different biological fluids which have affinity with the chitosan could potentially be used in the swelling step generating scaffolds with different compositions.

SUMÁRIO

Capítulo 1	3
Introdução e Objetivos.....	3
Capítulo 2	8
Revisão da Literatura.....	8
2.1 - Engenharia Tecidual – Engenharia Óssea.....	8
2.2 - Arcabouços porosos	11
2.2.1 - Técnicas de Fabricação de arcabouços porosos	12
2.2.3 - Biossinalização de arcabouços porosos.....	19
2.3 - Polihidroxibutirato	22
2.4 - Quitosana.....	26
2.5 - Polihidroxibutirato e QUI.....	30
Capítulo 3	33
Materiais e Métodos	33
3.1 - Produção dos arcabouços porosos de PHB e QUI ($A_{PHB-QUIx}$) e de arcabouços porosos de PHB e QUI biossinalizados com fibronectina ($A_{PHB-QUIx}^{FN}$)	34
3.2 - Caracterização do PHB, da QUI dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$, dos $A_{PHB-QUIx}$ e do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$	35
3.2.1 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.2.2 - Microscopia de força atômica (AFM).....	35
3.2.3 - Difração de raios X (DRX)	36
3.2.4 - Análises Térmicas	38
3.2.5 - Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	39
3.2.6 - O grau de inchamento (GI).....	40
3.2.7 - Índice de dimensionalidade (d)	41
3.2.8 - Determinação da densidade.....	42
3.2.9 - Porosidade (ASTM D4404)	43
3.2.10 - Ensaio mecânico - Compressibilidade	44
3.2.11 - <i>Immunoblotting</i> / Quimiluminescência	44
3.2.12 - Dessorção de proteína da superfície do $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$	45
3.2.13 - Análise da Citotoxicidade “ <i>in vivo</i> ” dos $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS25\%}$	45
3.2.14 - Estudo da degradação “ <i>in vitro</i> ” dos $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS25\%}$	46
Capítulo 4	48
Resultados e Discussões	48
4.1 - Arcabouços de PHB e QUI ($A_{PHB-QUIx}$).....	48
4.1.1 - Análise da morfológica dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ por MEV.....	49
4.1.2 - Efeito do teor de QUI na cristalinidade dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ por DRX.....	51
4.1.3 - Análise térmica dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ por DSC , TGA e DTG	55
4.1.4 - Análise da interação entre QUI e PHB nos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ por FTIR	59
4.1.5 - Inchamento dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$	64
4.1.6 - Análise da morfologia dos $A_{PHB-QUIx}$	66
4.1.7 - Análise da formação dos poros para o $A_{PHB-QUI 25\%}$	69
4.1.8 - Cinética de inchamento e índice de dimensionalidade do Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$	71
4.1.9 - Análise morfológica das diferentes regiões dos $A_{PHB-QUI25\%}$, determinação do tamanho de poros e da porosidade.....	72
4.1.10 - Efeito do inchamento e posterior liofilização na interação QUI/PHB no $A_{PHB-QUI25\%}$	76
4.1.11 - Módulo de compressibilidade	80
4.1.12 - Degradação do $A_{PHB-QUI 25\%}$	82

4.2 – Arcabouços de PHB e QUI biossinalizados com FN ($A_{\text{PHB-QUI}}^{\text{FN}}$)	85
4.2.1 - Inchamento do Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$	86
4.2.2 - Análise da morfologia dos $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ e distribuição do tamanho de poros.	86
4.2.3 - Efeito do inchamento e posterior liofilização na interação FN/QUI/PHB no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$	88
4.2.4 - Identificação de FN na superfície dos $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ por quimiluminescência e AFM	92
4.2.5 - Dessorção de FN em meio de cultura para osteoblastos	95
4.2.6 - Módulo de compressibilidade	96
4.2.7 - Degradação do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$	97
4.3- Análise da Citotoxicidade do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ e do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$	99
Capítulo 5	104
Sugestões para trabalhos futuros	105
Referências bibliográficas	106

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 - Introdução

Avanços no campo da Engenharia Tecidual têm sido motivados pela necessidade de regenerar tecidos danificados por doenças degenerativas, traumas por acidentes ou mesmo a perda de órgãos ou de suas funções. Atualmente, tecidos osteomusculares, ossos e cartilagem estão sobre intensa investigação em Engenharia Tecidual (HUTMACHER, 2000, O'KEEF, *et al.*, 2011). O uso de técnicas de Engenharia Tecidual, destacando-se as que fazem uso de arcabouços porosos tridimensionais cuja função é prover um suporte inicial para a adesão celular e atuar como molde para as células se organizarem e formarem um tecido funcional, tem sido uma alternativa promissora no reparo/regeneração do tecido ósseo (CANCEDDA *et al.*, 2007, YEATTS *et al.*, 2011, O'KEEFE *et al.*, 2011 ORLANDO *et al.*, 2011, STEVENS *et al.*, 2008 a, OLSON, *et al.*, 2011, GOMES *et al.*, 2011). Quando com esta finalidade, a Engenharia Tecidual pode ser denominada Engenharia Óssea, cujo foco é a formação de um novo osso “*in vitro*” ou “*in vivo*” através da combinação de materiais osteocondutivos, células osteopotentes e fatores de crescimento apropriados (O'KEEFE *et al.*, 2011).

É crescente o interesse em produzir biomateriais bioativos que induzam respostas celulares específicas (GOMES *et al.*, 2011). Neste contexto as proteínas desempenham um papel importante no reconhecimento de biomateriais por células (SHIN, 2007) e muito tem sido feito para adicionar estas à biomateriais (STEVEN, *et al.* 2008 b, GOMES *et al.*, 2011, PATTERSON, *et al.*, 2010).

A seleção do(s) material(s) para a confecção de arcabouços tridimensionais é um dos pontos críticos em Engenharia Tecidual (O'BRIEN, *et al.*, 2011). Os polímeros biodegradáveis como o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e a quitosana (QUI) tem recebido destaque (HUTMACHER, 2000).

O PHB é um poliéster pertencente à família dos polihidroxialcanoatos (PHA). É biocompatível a vários tipos celulares, tais como osteoblastos, células epiteliais e condrócitos ovinos. (CAO *et al.*, 2005, FILIPCZACK *et al.*, 2005, MENDONÇA, *et al.*, 2009, THIRÉ, *et al.*, 2007, SUDESH, *et al.*, 2000, SADER, 2006). Embora apresente boa biocompatibilidade, sua aplicação como biomaterial fica comprometida devido à sua fragilidade (IKEJIMA *et al.*, 2000). De forma geral, a adição de um segundo componente adequado pode melhorar as propriedades dos PHAs (ARKIN *et al.*, 2002). Uma das estratégias utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas do PHB é combiná-lo com o polissacarídeo QUI (SHIH *et al.*, 2007, PESCHEL *et al.*, 2008).

A QUI é biocompatível, biodegradável, não tóxica, possui afinidade com proteínas, é bactericida e possui propriedades osteocondutivas “*in vitro*” (MARTINO, *et al.*, 2005). Seu uso como único material constituinte de arcabouços porosos é limitado devido às suas propriedades mecânicas (TANIGAWA *et al.*, 1992, OKAMOTO *et al.*, 1993, KHNOR *et al.*, 1993, TOKURA *et al.*, 1997, SINGLA & CHAWLA, 2001, KHALID 2002).

Exemplos são encontrados na literatura onde o uso da QUI alterou, positivamente, as propriedades do PHB. Este foi o caso do trabalho desenvolvido por IKEJIMA *et al.* (2000) onde filmes de PHB e QUI foram produzidos por “*casting*”. De acordo com IKEJIMA *et al.* (2000), a presença de QUI diminui a cristalinidade do PHB. PESCHEL *et al.* (2008), que também produziram filmes de PHB e QUI, observaram que as propriedades mecânicas da QUI também são melhoradas devido à presença do

PHB. Além da melhoria nas propriedades mecânicas os filmes de PHB e QUI apresentaram melhor adesão de queratinócitos. CAO *et al.* (2005), compararam, a nível de citocompatibilidade, filmes de QUI e filmes de PHB e QUI e observaram que os filmes de PHB e QUI apresentaram melhores resultados de citocompatibilidade além de melhores propriedades mecânicas. Uma das justificativas para a alteração das propriedades mecânicas está associada às interações intermoleculares entre as cadeias de PHB e de QUI.

O uso do PHB e da QUI, juntos, dá origem a um material anfifílico onde a porção hidrófoba e hidrófila estão associadas, respectivamente, ao PHB e a QUI (CAO *et al.*, 2005). A combinação desses materiais promove melhoria tanto nas propriedades do PHB quanto nas da QUI (IKEJIMA *et al.*, 2000, PESCHEL *et al.* 2008, CAO *et al.*, 2005) e possibilita o desenvolvimento de materiais para liberação controlada de fármacos e/ou fatores de crescimento ((IVANTSOVA *et al.*, 2011). Além disso, o uso da QUI permite a introdução de grupos funcionais, possibilitando a funcionalização do PHB, que posteriormente, podem ser utilizados para conjugar fatores de crescimento (IVANTSOVA *et al.*, 2011). Proteínas como a fibronectina tem sido utilizada na modificação da superfície de dispositivos feitos de QUI ou tratados com QUI com intuito de melhorar a adesão e a proliferação de osteoblastos (GOMES, *et al.*, 2011, AMARAL, *et al.*, 2005, MENDONÇA, *et al.*, 2008).

As propriedades do PHB da QUI e da fibronectina encorajam a produção de arcabouços composto por esses três materiais, pois combinam as seguintes características: biocompatibilidade, osteocondução e biossinalização. Além disso, a adição de FN é feita no arcabouço pronto ficando, geralmente, restrita à superfície do material (LIU *et al.*, 2012, SHIN *et al.*, 2003).

Na literatura há pouca informação a respeito de arcabouços porosos tridimensionais constituídos de PHB e de QUI. Isto pode estar relacionado ao fato de que uma das limitações de se misturar QUI a poliésteres é a utilização de um solvente capaz de solubilizar tanto o poliéster quanto a QUI. De fato existem poucos solventes comuns à QUI e a poliésteres alifáticos podendo-se destacar o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) e o dimetil sulfóxido (DMSO) (Chen *et al.*, 2005) que são solventes caros e difíceis de ser completamente removidos. Outro problema encontrado é a impossibilidade de fundir, simultaneamente, o PHB e a QUI. Isto porque a QUI sofre degradação térmica antes que o processo de fusão ocorra (López *et al.*, 2008).

As principais técnicas utilizadas para produzir arcabouços porosos tridimensionais são: lixiviação de partículas, “*gas foaming*”, “*emulsion freeze drying*”, eletrofiação, prototipagem rápida, e separação de fases induzida termicamente (LIU *et al.*, 2004). A produção de arcabouços porosos de PHB/QUI utilizando boa parte destas técnicas citadas requer uma solução polimérica ou que os polímeros PHB e QUI estejam no estado fundido o que recai nas dificuldades apresentadas.

No presente trabalho uma estratégia nova e simples foi desenvolvida para produzir arcabouços tridimensionais a partir de uma matriz anfifílica de PHB/QUI. Nesta a capacidade de inchamento da QUI em meio aquoso e em fluido biológico foi utilizada para a formação de poros obtendo-se assim um arcabouço poroso tridimensional com poros abertos e interconectados e funcionalizados com potencial aplicação em Engenharia Óssea.

1.1 – Objetivos

1.2.1 - Objetivo geral

Esta tese teve por objetivo a produção arcabouços porosos de PHB / QUI e de PHB/QUI bio-sinalizados com fibronectina para aplicação em Engenharia Óssea a partir do desenvolvimento de uma nova metodologia baseada no inchamento e posterior liofilização de uma matriz anfifílica composta de PHB/QUI inchada em água ou em solução de FN.

1.2.2 - Objetivos específicos

- ✓ Obter uma matriz anfifílica PHB/QUI denominada Pré-arcabouço.
- ✓ Avaliar o efeito da concentração de QUI nas propriedades da matriz anfifílica.
- ✓ Avaliar a morfologia, a cristalinidade e a interação PHB/QUI e PHB/QUI/FN nos Pré-arcabouços e nos arcabouços.
- ✓ Estudar a degradação “*in vitro*” dos arcabouços em tampão acetato.
- ✓ Avaliar o comportamento citotóxico dos arcabouços.

Capítulo 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Engenharia Tecidual – Engenharia Óssea

A Engenharia Tecidual pode ser definida como uma área multidisciplinar que aplica os princípios e métodos da engenharia e da ciência da vida juntos para desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem funções teciduais ou mesmo substituam tecidos degenerados. A Engenharia Tecidual consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos, ou órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes do corpo defeituosas ou danificadas (LANGER, *et al.*, 2004, OLSON, *et al.*, 2011).

As principais técnicas utilizadas em Engenharia Tecidual são (TABATA, 2009):

(i) Uso de arcabouços porosos para promover a proliferação e a diferenciação celular visando a regeneração “*in vivo*”. Neste caso um arcabouço biorreabsorvível pode ser utilizado de quatro formas distintas:

- (a) com células e com fatores de crescimento;
- (b) com células;
- (c) com fatores de crescimento;
- (d) sem células e sem fatores de crescimento.

(ii) Uso de biomateriais que sirvam como espaçadores e que induzam a angiogênese. Geralmente, para esse caso, membranas são utilizadas;

(iii) Uso de biomateriais para liberação controlada de fármacos, biomoléculas bio-sinalizadoras (fatores de crescimento);

(iv) Uso de biomateriais para manipulação celular “*in vitro*”. Este caso está relacionado à preparação e proliferação eficiente de células utilizando um substrato para cultura celular similar à matriz extracelular. Para este fim, o arcabouço citado no item (i) pode ser utilizado.

A semeadura de células sobre e dentro de arcabouços porosos é um método comumente utilizado em Engenharia Tecidual (SHIN, *et al.*, 2003, OLSON, *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos biomateriais para aplicação em Engenharia Tecidual que sirvam como suporte físico e atuem como substrato adesivo para células durante cultura “*in vitro*” para subsequente implantação. Esses biomateriais deverão viabilizar a regeneração do tecido hospedeiro em termos de morfologia e de atividade. Desta forma à medida que um tecido sadio já estivesse consolidado, não haveria necessidade da presença do biomaterial, o qual poderia ser então, removido ou degradado (ZHAO *et al.*, 2003; MORONI, *et al.*, 2008, TABATA, 2009).

A busca por novas tecnologias e terapias para o tratamento de lesões ósseas constitui uma preocupação mundial. Um encontro realizado no ano de 2010 nos Estados Unidos da América reuniu os principais grupos de pesquisa no setor de Engenharia Tecidual com foco na regeneração do tecido ósseo. Neste encontro ficou claro que avanços no setor foram conquistados na última década. No entanto, problemas ósseos ainda representam um elevado custo para os governos. Dados estatísticos apresentados no referido encontro mostraram que somente nos Estados Unidos da América são gastos

anualmente cerca de 45 bilhões de dólares no tratamento de lesões e doenças relacionadas ao tecido ósseo (OKEEF, *et al.*, 2011).

Devido ao potencial do osso de se regenerar espontaneamente, muitas lesões ósseas como, por exemplo, fraturas podem ser tratadas com terapias convencionais ou cirurgias. Não obstante, enxertos ósseos ou substitutos ósseos são frequentemente necessários em cirurgias ortopédicas e maxilo facial para auxiliar na cura de grandes traumas ou na correção de defeitos pós-cirúrgicos e no tratamento de deformidades ósseas congênitas (CANCEDDA, *et al.* 2003, COSTA-PINTO *et al.*, 2011). Sendo assim, a Engenharia Óssea tem como objetivo prover soluções, através do desenvolvimento de novas tecnologias, para problemas como a falta de osso em condições clínicas destrutivas e deformidades utilizando substitutos biológicos (COSTA-PINTO *et al.*, 2011, STEVEN, 2008 b).

Um elevado número de materiais biodegradáveis e bioreabsorvíveis assim como a confecção de arcabouços porosos, têm sido experimentalmente e/ ou clinicamente estudados (HUTMACHER, 2000, COSTA- PINTO *et al.*, 2011).

Apesar dos desafios enfrentados no desenvolvimento da Engenharia Óssea há, por parte da comunidade científica, um grande otimismo em relação à substituição e / ou regeneração de tecidos danificados. Progressos contínuos em diferentes campos científicos correlatos à Engenharia Óssea poderão melhorar, futuramente, o tratamento de defeitos ósseos. Neste contexto, o desenvolvimento de arcabouços tridimensionais voltados para Engenharia Tecidual tem sido apontado como uma provável solução para problemas ortopédicos (O' KEEF *et al.*, 2011).

2.2 – Arcabouços porosos

A função dos arcabouços porosos tridimensionais aplicáveis à engenharia de tecidos é direcionar o crescimento e a migração de células nas vizinhanças do tecido ou o crescimento de células em sua estrutura de poros. O desenvolvimento de materiais porosos tridimensionais é de interesse particular devido à capacidade destes materiais de mimetizar as condições naturais da matriz extracelular em termos de estrutura, composição química e propriedades mecânicas (HUTMACHER, 2000, FILIPCZAK, 2005, KRETLOW *et al.*, 2007, HUTMACHER *et al.*, 2007).

As características químicas dos arcabouços são essenciais para a adesão e proliferação celular e consequente formação do tecido desejado WIDMER (1998). Um grande número de materiais poliméricos e cerâmicos vem sendo avaliados na produção de arcabouços porosos aplicados à engenharia óssea. Os materiais cerâmicos vem sendo utilizados desde 1982 como cimento ósseo e são biocompatíveis, osteocondutivos e moldáveis. No entanto, materiais cerâmicos são quebradiços e apresentam baixa taxa de degradação (MISTRY & MIKOS, 2005).

Os materiais poliméricos apresentam mais vantagens do que os cerâmicos. Dentre essas vantagens pode-se citar: flexibilidade, as propriedades mecânicas e taxa de degradação podem ser modificadas pela composição e pelo tipo de processamento. Além disso, fatores como hidrofiliabilidade e cristalinidade também são passíveis de serem controlados (MISTRY & MIKOS, 2005). Dentre os materiais poliméricos empregados na produção de arcabouços porosos destacam-se: os compósitos do tipo compósito bioreabsorvível/materiais bioativos; os polímeros naturais tais como proteínas, polissacarídeos, poliésteres de origem microbiana e os polímeros sintéticos (PUPPI *et al.*, 2010).

A biodegradabilidade dos polímeros é passível de modificação através do designer molecular. Alguns polímeros contêm ligações químicas que podem sofrer hidrólise quando expostas a ambientes aquosos, e outros polímeros podem ser degradados por células ou pela ação de enzimas. Por estas razões, materiais poliméricos têm sido extensivamente estudados para serem aplicados na construção de arcabouços aplicados à Engenharia Óssea (LIU, *et al.*, 2005). Exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados em Engenharia de Tecidual são: poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) e seus co-polímeros poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) policaprolactona (PCL), polihidroxibutirato (PHB) e QUI (PUPPI, *et al.*, 2010).

O desenvolvimento destes arcabouços requer que os materiais sejam adequadamente processados para obter matrizes porosas com a morfologia apropriada (FILIPCZAK, 2005). Sendo assim, diferentes técnicas têm sido empregadas na produção de arcabouços porosos.

2.2.1 – Técnicas de Fabricação de arcabouços porosos

Os arcabouços vêm sendo fabricados através de diferentes metodologias para facilitar a distribuição celular e guiar o crescimento destas dentro da estrutura porosa. As principais metodologias empregadas na confecção de arcabouços porosos tridimensionais são:

(i) **Solvente “*casting*”** - Esta metodologia é muito simples e de baixo custo. É extensamente baseada na evaporação do solvente dando origem ao arcabouço através de duas rotas. Uma delas consiste na inserção de um molde em uma solução polimérica. Em seguida aguarda-se até que a solução polimérica seque criando uma membrana polimérica. Na segunda rota a solução polimérica é adicionada a um molde por um período de tempo suficiente para a formação de uma membrana que, em seguida, é

aderida a um molde para formar a estrutura porosa. Um dos inconvenientes desta técnica é que, dependendo da natureza do solvente utilizado para fazer a solução, pode ocorrer a desnaturação de proteínas. Além, disso uma remoção ineficiente do solvente pode fazer com que o produto final seja tóxico (MIKOS *et al.*, 2004).

(ii) **Lixiviação de partículas** – A lixiviação de partículas é uma das técnicas mais utilizadas na fabricação de arcabouços porosos tridimensionais (MA *et al.*, 1999). Sal, cera, ou açúcar podem ser utilizados para a criação de poros ou canais. O agente porogênico (na faixa granulométrica estipulada) é adicionado a um molde contendo a solução polimérica. Após a evaporação do solvente, o agente porogênico é lixiviado dando origem ao arcabouço poroso. O tamanho de poros pode ser controlado alternando as seguintes variáveis, faixa granulométrica, quantidade de agente porogênico utilizada e a morfologia das partículas. Não é necessária uma elevada quantidade de polímero nesta técnica, o que configura uma vantagem. No entanto, esta técnica apresenta alguns pontos críticos como formato e a interconectividade dos poros.

(iii) **“Gas Foaming”** – A maioria das técnicas de produção de arcabouços porosos faz uso de solventes orgânicos que podem, quando não completamente removidos, tornar o arcabouço citotóxico. Visando minimizar este problema, foi desenvolvida a metodologia “*Gas foaming*” que elimina a necessidade da utilização de solventes orgânicos e de altas temperaturas. A produção do arcabouço começa com a formação de um disco polimérico sólido utilizando moldagem por compressão. O disco polimérico é introduzido em uma câmara e é exposto ao gás dióxido de carbono a elevadas pressões por um determinado tempo para que o polímero seja saturado com o gás. Nestas condições, o dióxido de carbono dissolvido se torna instável ocorrendo assim uma separação de fases entre o dióxido de carbono e o polímero. As moléculas de dióxido de carbono formam “*clusters*” para minimizar a energia livre; como resultado

ocorre a nucleação dos poros. A pressão de dióxido de carbono é rapidamente reduzida até a pressão atmosférica. Com esta metodologia obtém-se arcabouços com porosidade acima de 93% e tamanho de poros maiores do que 100 μm (MIKOS *et al.*, 2000, SUBIA, *et al.*, 2010).

(iv) **Separação de fases** – Esta técnica utiliza um sistema homogêneo multicomponente termodinamicamente instável. A produção de arcabouços porosos por esta técnica requer que uma solução polimérica seja separada em duas a uma determinada temperatura. Uma fase com baixa concentração de polímero e a outra com elevada concentração do polímero. A fase pobre em polímero é removida (por liofilização ou extração do solvente) dando origem a uma estrutura porosa (LIU *et al.*, 2007, MIKOS *et al.*, 2000, SUBIA *et al.*, 2010).

(v) **Eletrofiação** – A técnica de eletrofiação para a produção de arcabouços utiliza a força eletrostática para a produção de fibras que podem ser produzidas em nanoescala ou microescala. Este processo é controlado por um campo elétrico formado por dois eletrodos com cargas opostas. Um dos eletrodos é colocado na solução polimérica, ao passo que o outro é posicionado em um coletor. Geralmente, quando a solução polimérica é bombeada, como resultado, tem-se a formação de gotas. No entanto, a ação do campo elétrico favorece a formação de fibras, pois ocorre que a tensão do campo é maior do que a tensão superficial da solução polimérica. Sendo assim, um jato é formado e simultaneamente ocorre a evaporação do solvente havendo assim a formação das fibras as quais são depositadas no coletor (SUBIA *et al.*, 2010).

(vi) **“Melting mold”** – Neste processo, polímero na forma de pó é adicionado, juntamente com um agente porogênico, a um molde e aquecido a uma temperatura superior a temperatura de transição vítrea e submetido a alta pressão. Desta forma as

partículas do polímero se unem. Em seguida o material resultante é removido do molde e o agente porogênico é removido por lixiviação (COSTA-PINTO, *et al.*2011).

(vii) **“Fiber mesh”**- Esta técnica consiste no enovelamento de uma fibra em uma estrutura tridimensional de tamanho de poros variados. As principais vantagens desta técnica é a obtenção de um arcabouço com elevada área superficial para a adesão celular e a difusão de nutrientes favorecida pela arquitetura do arcabouço (CHEN *et al.*, 2001).

(viii) **“Freeze drying”** – Esta técnica é baseada no princípio da sublimação. Primeiramente o polímero é dissolvido em um solvente para que se obtenha uma solução com a concentração desejada. A solução é congelada e o solvente é removido por liofilização a alto vácuo e baixas temperaturas (TSANG *et al.*, 2004).

(ix) **“Wet spinning”** – Nesta metodologia uma solução (a solução pode ser protéica, polimérica ou de um polissacarídeo) é bombeada através de uma fiação (*spinneret*) e é precipitada em um meio contido em um recipiente de dimensões predefinidas. Sendo assim, a medida que a fibra vai precipitando ocorre a formação do arcabouço (DENBAŞ *et al.*, 2000, TUZLAKOGLU *et al.*, 2004).

(x) **Prototipagem rápida** – A técnica de prototipagem é chamada também de técnica **“solid free-form”** (SFF). Esta é a técnica mais avançada para a produção de arcabouços porosos. A construção de um arcabouço por esta técnica é controlada por um sistema computacional e produz, rapidamente, objetos em 3D utilizando um método de fabricação em camada. Geralmente o designer do arcabouço é feito utilizando um **“software”** que **“constrói”** o arcabouço em uma série de camadas (seções transversais). Desta forma, o arcabouço é construído camada por camada (SUBIA *et al.*, 2010). Nos últimos anos mais de 20 sistemas de SFF foram desenvolvidos e comercializados podendo-se citar entre os mais relevantes (LIU *et al.*, 2007):

✓ Esterolitografia (SLA) – Envolve a polimerização de um monômero em estado líquido capaz de sofrer cura pela ação de um laser que atua de acordo com os dados de seção transversal previamente programados em computador. Uma vez que uma camada é construída o processo de cura pela ação do laser é reiniciado para a construção de uma nova camada que será formada sobre a anterior e assim sucessivamente. O processo é repetido até que o modelo seja completamente construído;

✓ Sinterização seletiva a laser (SLS) – É um processo que permite a obtenção de estruturas tridimensionais complexas através da formação de camadas sucessivas (com seção transversal de acordo com a programação computacional) de um material em pó. A formação da estrutura se dá com aplicação do laser em áreas seletivas com intuito de fornecer energia térmica afim de que ocorra a sinterização nos locais onde o feixe incide (KRUTH, *et al.*, 2005).

✓ Deposição no estado fundido (FDM) - Utiliza um bocal móvel aquecido para extrusar o material polimérico em molde para a construção de arcabouços porosos tridimensionais. Dependendo do tipo de máquina uma variedade de biomateriais pode ser utilizada na confecção de arcabouços. Uma grande vantagem desta técnica é a não utilização de solventes orgânicos. Todavia, FDM é restrita ao uso de materiais termoplásticos com viscosidade apropriada inviabilizando a utilização de células e fatores de crescimento durante o processo produtivo (SUBIA *et al.*, 2010) .

✓ Ink jet printing (IJP) – A impressão tridimensional emprega a tecnologia IJP para ejetar uma substância pastosa da cabeça da “*Jet head*”, que se move de acordo com os dados de seção transversal previamente programados. A pasta dissolve e une as partículas adjacentes para a formação de camadas. O inconveniente desta tecnologia é a dificuldade de remover do arcabouço o pó remanescente do processo produtivo e a completa remoção do solvente (LIU *et al.*, 2007).

De acordo com a literatura o método utilizado na produção dos arcabouços afeta as propriedades destes. MASAELI *et al.* (2012) avaliou o efeito da metodologia nas propriedades de arcabouços de PHB. Os arcabouços foram produzidos por lixiviação de sal e por eletrofiação. Os arcabouços apresentaram propriedades mecânicas e morfologias distintas. Além disso, o comportamento de células Vero e de células mesenquimais de camundongo foi avaliado. Não foram observadas diferenças no comportamento de células de camundongo nos arcabouços. Já as células Vero se portaram de formas diferentes nos arcabouços produzidos por lixiviação e eletrofiação. De fato; os arcabouços produzidos por MASAELI *et al.* (2012) devido aos diferentes processos de fabricação, apresentaram propriedades físico-químicas diferentes. Posto isso, foi concluído que a metodologia empregada na produção dos arcabouços afeta a biocompatibilidade do arcabouço.

Algumas vantagens e desvantagens das técnicas de produção de arcabouços são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens de algumas técnicas de produção de arcabouços porosos com potencial aplicação em Engenharia Tecidual (SUBIA et al, 2010).

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Solvente “casting”, <i>lixiviação de partículas</i>	Controle do tamanho de poros, porosidade e cristalinidade	Limitação nas propriedades mecânicas, resíduo de solvente e resíduo de agente porogênico.
Gas foaming	Controle do tamanho de poros, porosidade e ausência de solventes orgânicos	Limitação nas propriedades mecânicas e interconectividade dos poros inadequada
Eletrofiação	Controle do tamanho de poros, do diâmetro da fibra e da porosidade	Limitação nas propriedades mecânicas, o tamanho de poros diminui com o aumento do diâmetro da fibra.
Separação de fases	Não diminui a atividade molecular	É difícil controlar a morfologia dos poros
Prototipagem rápida	Ótimo controle da porosidade e do tamanho de poros	O tipo de polímero é limitado e o equipamento utilizado é caro.
<i>Fiber mesh</i>	Elevada área superficial e rápida difusão de nutrientes	Baixa estabilidade estrutural
<i>Fiber bonding</i>	Elevada razão área volume e alta porosidade	Baixas propriedades mecânicas e o tipo de polímero é limitado.
<i>Melting mold</i>	Controle da porosidade e do tamanho de poros	Requer altas temperaturas para polímeros não amorfos
<i>Freeze drying</i>	Não é necessário o uso de agente porogênico nem elevadas temperaturas	Tamanho de poros pequenos e o processo é demorado.

2.2.3 – Biossinalização de arcabouços porosos

Um dos desafios da utilização de arcabouços porosos tem sido como melhorar a interação entre biomateriais e células visando controlar a adesão celular e a manutenção da expressão fenotípica. Sendo assim, muitos estudos têm sido feitos visando a produção de materiais biomiméticos (CAI *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2003; JIAO & CUI, 2007; LIU *et al.*, 2012).

Materiais poliméricos como, por exemplo, poliésteres de origem bacteriana têm sido amplamente empregados na produção de arcabouços tridimensionais. No entanto, muito se tem feito no intuito de tornar tais materiais biossinalizados através da incorporação de moléculas bioativas. Neste contexto pode-se citar a biossinalização do PHB que ainda precisa ser explorada visto que na literatura são encontrados poucos trabalhos quando comparado aos poli(α -hidroxiácidos) (LIU *et al.*, 2012).

Biomacromoléculas como as proteínas, polissacarídeos, proteoglicanas e seus derivados exercem um papel importante no processo de adesão celular (JIAO *et al.* 2007). O reconhecimento de biomateriais por parte das células é essencialmente baseado em interações mediadas por integrinas (proteínas heterodiméricas e transmembranares que reconhecem proteínas de matriz celular como fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno) e depende também das características físico-químicas do material (ITO *et al.*, 1997). Sendo assim, se essas moléculas bioativas forem imobilizadas na superfície de biomateriais, a biocompatibilidade da superfície pode ser significativamente melhorada (JIAO *et al.* 2007).

Fibronectina denota um conjunto de isoformas de uma glicoproteína dimérica, com pesos moleculares que variam de 440.000 a 500.000 Da. Encontra-se fibronectina

em todos os organismos vertebrados sob duas formas fundamentais: no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais sob uma forma solúvel e compondo a matriz extracelular de diversos tecidos sob uma forma insolúvel. A fibronectina é reconhecidamente uma molécula com funções de adesão, migração e diferenciação celular, bem como organização Tecidual (MENEZES, 2003).

A adsorção de fibronectina, uma das principais proteínas de matriz extracelular (MECs), e/ ou de uma de suas pequenas sequências de peptídeos (arginina – glicina – ácido aspártico ou RGD), à superfície de materiais pode promover a adesão celular mediada por integrinas (SHIN, 2007).

Geralmente componentes bioativos podem ser incorporados a arcabouços funcionalizados (LIU *et al.*, 2012). O reconhecimento biomolecular por células tem sido alcançado através da modificação de superfícies e de volume de biomateriais utilizando biomoléculas via métodos físico-químicos. No entanto, a modificação de superfícies utilizando peptídeos oferece, potencialmente, o controle do comportamento celular somente na superfície do material. Já com a modificação do volume os peptídeos envolvidos na sinalização celular são incorporados no biomaterial resultando em diversos sítios de reconhecimento não só na superfície, mas em todo o volume (SHIN *et al.*, 2003).

Muitas metodologias vêm sendo desenvolvidas para modificar a superfície de poliésteres. Uma delas envolve a incorporação de unidades monoméricas contendo grupos funcionais que, posteriormente, são utilizados para ligar covalentemente moléculas bioativas. Porém esta metodologia é problemática, pois requer o desenvolvimento de uma rota sintética e o peso molecular do polímero pode ser alterado. Todavia, outras metodologias tem sido adotadas para modificar superfície de poliésteres alifáticos. Dentre elas destacam-se as apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Modificação de superfície utilizando biomacromoléculas (JIAO et al. 2007).

Modificação	Mecanismo	Método
Grafitização	Imobilização de peptídeos bioativos, proteínas e polissacarídeos para melhorar a adesão celular e a biocompatibilidade	Grafitização química, grafitização fotoquímica e grafitização por plasma,
Recobrimento de superfície	Imobilização de macromoléculas bioativas e fatores de crescimento para melhorar a afinidade celular	Adsorção física
<i>Entrapment</i>	Imobilização de moléculas bioativas ou biomacromoléculas solúveis em água para melhorar a hidrofiliabilidade e a compatibilidade com o sangue	Inchamento em uma solução e subsequente adição em um não solvente visando a estabilização da superfície.
Eletrostática“self-assembly”	Imobilização de macromoléculas bioativas hidrofílicas e carregadas para controlar a adesão e a diferenciação celular.	Deposição de poliânions e policátions alternadamente

A regeneração do osso pode ser acelerada com a adição de fatores de crescimento apropriados incorporados a carreadores biodegradáveis. Esses carregadores em essência permitem a liberação controlada de fatores de crescimento. Além disso, esses carreadores permanecem no local por um período de tempo suficiente para estimular o processo de cura. A adesão de osteoblastos é mediada por glicoproteínas contendo a sequência de peptídeos RGD, como é o caso da FN. Devido a isso, esforços têm sido feitos para incorporar proteínas, como a FN a biomateriais aplicáveis à engenharia óssea (LEE, *et al.*, 2007).

2.3 Polihidroxibutirato

O PHB (Figura 2.1) é um poliéster isotático de origem bacteriana que pode ser produzido por um número variável de diferentes bactérias como, por exemplo, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, e outras. O PHB pertence à família dos polihidroxicanoatos (PHA) e é membro mais produzido.

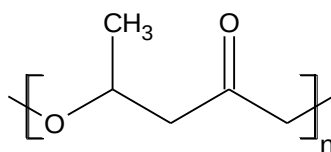


Figura 2.1- Estrutura do polihidroxibutirato

A alta pureza do PHB resulta em um baixo grau de nucleação heterogênea, conduzindo ao crescimento de grandes esferulitos, os quais são responsáveis pelo comportamento quebradiço desse polímero. O PHB forma cristais lamelares extremamente finos que são organizados em cristais simples e alongados quando crescem a partir de soluções diluídas ou esferulitos quando crescem a partir do estado

fundido. A espessura lamelar nos esferulitos é em torno de 50 Å e em cristais crescidos de soluções podem ser menores. A velocidade de cristalização do PHB puro é relativamente baixa quando comparada com os polímeros sintéticos comuns, mostrando um máximo em temperaturas na faixa de 55 a 60°C (RENSTAD, *et al.*, 1997).

De acordo com a literatura o PHB fornece um micro-ambiente favorável à cultura de células e por esta razão tem um elevado potencial para aplicação em Engenharia Tecidual. O desempenho do PHB tem sido avaliado em diferentes cenários incluindo nervos e tratamento do tecido ósseo (AHMED *et al.* 2010).

O uso de PHB na forma de filme (AHMED *et al.* 2010), arcabouços porosos (PEREIRA *et al.* 2012), materiais compósitos (ALVES *et al.*, 2011), nanocompósitos (KHASIM *et al.*, 2010) e materiais de liberação controlada (IVANTSOVA *et al.*, 2011) tem sido avaliado por diversos grupos de pesquisa. De acordo com PUPPI *et al.* (2010) dispositivos feitos de PHB tem demonstrado uma adaptação consistente no que tange a regeneração de tecidos ósseos não induzindo respostas inflamatórias indesejáveis um ano após a implantação.

Diversas metodologias vêm sendo empregadas na produção de arcabouços porosos de PHB. MENDONÇA *et al.* (2009), SADER, *et al.* (2003) e WANG, *et al.* (2004) produziram arcabouços porosos de PHB utilizando a técnica de lixiviação de sal. MENDONÇA *et al.* (2008) avaliaram a adesão de osteoblastos humanos à superfície de arcabouços porosos de PHB e observaram que a adesão de osteoblastos humanos à superfície do arcabouço foi de 49%. WANG *et al.*, (2004) avaliaram a interação entre osteoblastos e arcabouços de PHB e encontraram depósitos de fosfato de cálcio na superfície dos arcabouços. Segundo WANG *et al.*, (2004) ensaios utilizando alcalino fosfatase indicaram atividade de osteoblastos na superfície dos arcabouços. Além disso, foi observada proliferação celular na superfície do arcabouço de PHB. Os arcabouços

produzidos por SADER, *et al.* (2003) promoveram a deposição espontânea de camada de fosfato de cálcio, o que é um indicativo de bioatividade. Além disso, estudos da interação de células ósseas de camundongo com os arcabouços porosos de PHB mostraram que os mesmos são biocompatíveis, não-citotóxicos e que propiciaram a adesão e a proliferação de células osteoblásticas de camundongo.

Arcabouços de PHB produzidos por prototipagem (PEREIRA *et al.*, (2012), “*casting*” (KHASIM *et al.*, 2010); *freeze-drying* (CAO *et al.*, 2005), separação de fases (PEREIRA, 2009), “*fiber mesh*” (ZONARI *et al.*, 2012) tem sido avaliados em engenharia de tecidos.

É comum o estudo de arcabouços compostos por PHB acrescido de um outro material, como por exemplo pode-se citar o trabalho desenvolvido por KHASIM *et al.*, (2010) que desenvolveram arcabouços de PHB e hidroxiapatita e o desenvolvido por CAO *et al.* (2005) que combinaram PHB e QUI. Embora o PHB apresente bons resultados como material aplicável à Engenharia de tecidos (KROEZE *et al.*, 2009) alguns problemas como pobre estabilidade térmica e o fato de ser um material quebradiço (IKEJIMA *et al.*, 1999, ARKIN *et al.*, 2002), limitam sua utilização como biomaterial. No entanto, esses problemas podem ser solucionados combinando o PHB com diferentes materiais (ARKIN *et al.*, 2002, KROEZE *et al.*, 2009). De acordo com IKEJIMA *et al.* (1999) o caráter quebradiço do PHB pode ser alterado através da combinação deste com o polissacarídeo QUI.

MISRA *et al.* (2010) produziram arcabouços contendo 70% de PHB e 30% de Bioglass® (*Bioactive glass*) utilizando a técnica de lixiviação. O arcabouço assim produzido apresentou bioatividade após dez dias em solução simuladora do fluido corpóreo (SBF (*sorological body fluid*)). O arcabouço foi submetido a um ensaio “*in vivo*” por uma semana sendo implantado subcutaneamente em ratos obtendo resultados

positivos. Ainda nesta pesquisa conduzida por MISRA *et al.* (2010), foi produzido um arcabouço multifuncional contendo além do Bioglass[®], vitamina E e/ou nanotubos de carbono. Com esta composição foram obtidos arcabouços com atividade bactericida, bioativo, antioxidante e capaz de conduzir corrente elétrica. A aquisição dessas propriedades mostra a versatilidade do PHB quando combinado a outros materiais.

ALVES *et al.* (2011) avaliaram o desempenho de um implante ósseo compósito com a seguinte composição: 70% de PHB e 30% de hidroxiapatita. O compósito foi implantado em gatos. Os resultados mostraram que os compósitos provocaram uma inflamação local crônica apesar de sua aceitação clínica (ALVES, *et al.* 2011).

O efeito da modificação de superfície de arcabouços porosos de PHB também tem sido estudado visando melhorar o desempenho deste polímero como biomaterial. Neste contexto, estratégias biomiméticas como aquelas descritas no item 2.2.3 vem sendo empregadas. A imobilização de proteínas na superfície de materiais poliméricos requer, frequentemente, a presença de grupos funcionais específicos, tais como carboxil, amino e epóxi. Por esta razão, dispositivos de PHB vem sendo modificados para introduzir grupamentos que melhorem a afinidade deste com proteínas (MENDONÇA 2008, THIRÉ *et al.* 2007, MEIGA, 2010).

MENDONÇA (2008) avaliou o efeito do tratamento prévio da superfície de arcabouços porosos de PHB com etilenodiamina e com QUI na adsorção de FN. A modificação da superfície de arcabouços porosos de PHB também foi avaliada por MEIGA (2010) que além de avaliar a adsorção de FN avaliou metodologias para imobilizar, covalentemente, FN na superfície de arcabouços de PHB. Tanto MENDONÇA, 2008 quanto MEIGA, 2010 constataram que o tipo de tratamento dado à superfície do biomaterial afeta a interação FN/biomaterial. De acordo com

MENDONÇA *et al.*, 2009 a presença de FN na superfície de arcabouços porosos de PHB aumentou adesão de osteoblastos humanos.

Recentemente, uma nova geração de materiais vem sendo desenvolvida com intuito de incorporar substâncias como antibióticos em polímeros visando a liberação controlada destes. Combinar as funções dos arcabouços porosos tridimensionais com sistemas de liberação controlada tem sido um dos grandes potenciais de polímeros biodegradáveis não só para a liberação de antibióticos como também na liberação de fatores de crescimento (como por exemplo, fatores de crescimento para vascularização e proteínas envolvidas na formação do osso). Neste cenário o PHB aparece como um material promissor (KROEZE *et al.*, 2009).

2.4 Quitosana

A QUI, $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicose (Figura 2.2) é um polissacarídeo linear obtido a partir da desacetilação da quitina pelo processo de hidrólise básica (JUSTI, *et al.*, 2004, COSTA-PINTO *et al.*, 2011). A quantidade de glucosamina remanescente na QUI é chamada de grau de desacetilação (EUGENE *et al.*, 2003). A QUI tem, geralmente, três grupos funcionais reativos, um amino grupo e grupos hidroxil primários e secundários (MADIHALLY *et al.*, 1999). A solubilidade da QUI depende dos grupos amino e N-acetil, que são solúveis em pH ácido. Em meio ácido a QUI se torna um polieletrólito (RINAUDO *et al.*, 1999). É o único polímero pseudonatural de caráter catiônico e por esta razão interage com espécies aniônicas como as glicosaminoglicânicas (GAG) e proteoglicanas e com outras espécies negativamente carregadas presentes no sangue (COSTA-PINTO *et al.*, 2011).

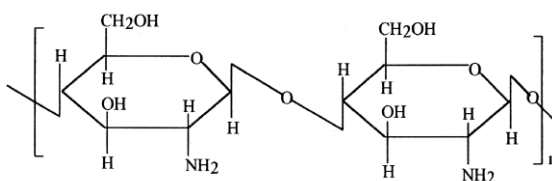


Figura 2.2 – Estrutura da QUI

Dentre as propriedades da QUI que a torna propícia para aplicação em Engenharia Tecidual destacam-se a biodegradabilidade, a biocompatibilidade, a atividade bactericida, a característica bioadesiva e o fato da QUI auxiliar a cicatrização (COSTA-PINTO *et al.*, 2011). Além disso, a QUI se torna atraente por ser moldável em diferentes estruturas tais como: micro-esferas, pastas, membranas, esponjas, fibras e arcabouços porosos.

Uma propriedade interessante da QUI é a capacidade de formar hidrogéis que, de acordo com a literatura, podem possuir diferentes definições. A mais usual é que um hidrogel é uma rede macromolecular capaz de inchar em meio aquoso ou em meio biológico (BERGER *et al.*, 2004 a,b). Dependendo da forma como as macromoléculas se ligam, os hidrogéis podem ser classificados em três classes: redes interpenetrantes, redes ligadas covalentemente e redes formadas por interações físicas. No caso de hidrogéis de QUI, BERGER *et al.*, (2004 a,b), sugerem que estes sejam classificados em hidrogéis químicos, formados por ligações covalentes e hidrogéis físicos, formados por ligações reversíveis. Do ponto de vista estrutural, os hidrogéis podem ser constituídos por uma ou mais redes poliméricas, formadas por cadeias interligadas (MOURA *et al.*, 2008).

A formação de hidrogéis de QUI através da formação de complexo é uma alternativa à formação de hidrogéis utilizando ligações covalentes. Hidrogéis formados ionicamente podem ser formados a partir de QUI e de outro polímero, que deve apresentar cargas negativas (BERGER, 2004a).

Hidrogéis de QUI podem ser formados por: cadeias de QUI ligadas por moléculas de baixa massa molar; por uma rede híbrida de polímeros ligada através de ligações covalentes; semi-interpenetração de moléculas de QUI com a cadeia de um outro polímero e por interações iônicas (BERGER, 2004a).

As principais estratégias para produção de arcabouços porosos de QUI são: “*freeze –drying*” , separação de fases e “*wet spinning*” (que permite a produção de fibras). A QUI também pode ser moldada na forma de nanofibras para a formação de arcabouços (COSTA-PINTO *et al.*, 2011).

Devido às forças intra-cadeias e aos grupos hidroxil e amino a QUI tende a degradar antes de fundir (COSTA-PINTO *et al.*, 2011). Geralmente a QUI é combinada com outros materiais em arcabouços aplicáveis à Engenharia Tecidual devido às suas pobres propriedades mecânicas (CHEUNG *et al.*, 2002).

A QUI tem sido utilizada na modificação de superfície de arcabouços protéticos por ser capaz de induzir a adesão de osteoblastos (LEE *et al.*, 2002). Segundo, KLOKKEVOLD *et al.* (1996) e LAHIJI *et al.* (2000) a QUI apresenta potencial osteocondutivo “*in vitro*”. BUMGARDNER *et al.* (2003) mostraram que a superfície de titânio recoberta com QUI via modificação química aumentou a adesão e a proliferação de osteoblastos.

LEE *et al.*, 2002 avaliaram o uso de matrizes porosas de QUI e de QUI/ poli(L-ácido láctico) (PLLA) produzidas pela técnica “*freeze drying*”. As matrizes porosas de PLLA com QUI apresentaram maior valor de adesão de osteoblastos quando comparadas ao PLLA puro. Os resultados mostraram que a presença de QUI induz a regeneração de tecidos.

CAI *et al.* (2007), modificaram a superfície de arcabouços porosos de poli(D-L, ácido láctico) (PDLLA) recobrindo-a com QUI. Ensaios mostraram que, os arcabouços

recobertos com QUI apresentaram melhor biocompatibilidade e, maior potencial para a formação de osso.

FAKHRY, *et al.* (2004), avaliaram o comportamento de osteoblastos e fibroblastos em filmes de QUI. Os resultados mostraram que osteoblastos aderiram e espalharam sobre a superfície do suporte confeccionado com QUI. Um resultado importante encontrado por FAKHRY, *et al.* (2004) foi que a QUI induz, preferencialmente, a adesão e o espalhamento de osteoblastos em relação a fibroblastos.

Devido à natureza da QUI, alguns pesquisadores têm avaliado sua interação com proteínas para alcançar respostas celulares específicas. Proteínas, como por exemplo, a fibronectina, tem sido utilizada na modificação de superfícies de dispositivos contendo QUI ou tratados com QUI visando melhorias na adesão e na proliferação celular (GOMES, *et al.*, 2011, MENDONÇA, *et al.*, 2008, AMARAL, *et al.*, 2005). AMARAL *et al.* (2009) avaliaram a interação de QUI com fibronectina e relacionaram os resultados ao grau de acetilação da QUI. Foi observado que QUI com grau de desacetilação igual 96 % foi mais eficiente para a imobilização de fibronectina do que a QUI com grau de desacetilação igual a 85%.

A literatura relata que peptídeos foram imobilizados na superfície de membranas de QUI e PLA. Os resultados das culturas demonstraram que a imobilização de peptídeos pôde, efetivamente, melhorar a adesão e a mineralização de osteoblastos no arcabouço poroso. Os resultados deste estudo indicam que, com a imobilização de peptídeos específicos para osteoblastos, é possível obter arcabouços porosos contendo osteoblastos que terão potencial para serem utilizados na construção de tecidos ósseos (HO *et al.*, 2006).

MIRANDA, *et al.*(2011), produziram arcabouços de QUI – gelatina com objetivo de investigar o efeito do arcabouço no comportamento de células

mesenquimais de ratos (BMMSCs) em cultura tridimensional. Este biomaterial promoveu a adesão e o espraio das BMMSCs “*in vitro*”. Além disso, foi observada viabilidade celular. O biomaterial foi avaliado “*in vivo*” e, após 21 dias, o osso alveolar e o tecido epitelial foram completamente estabelecidos (MIRANDA *et al.*, 2011).

2.5 Polihidroxibutirato e QUI

Atualmente existem vários polímeros biodegradáveis aplicáveis à Engenharia Tecidual e estes podem ser divididos em duas categorias: poliésteres hidrofóbicos como, por exemplo, o PHB e biopolímeros hidrofílicos, como por exemplo, a QUI. De acordo com a literatura esses polímeros possuem propriedades inferiores quando utilizados individualmente. O uso simultâneo de polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos pode dar origem a materiais com propriedades melhoradas. A incorporação de biopolímeros hidrofílicos (como por exemplo, polissacarídeos), em poliésteres pode dar origem a materiais com grupos funcionais que, posteriormente, podem ser utilizados em modificações podendo-se citar a conjugação de fatores de crescimento. Em contrapartida a adição de poliésteres pode controlar a taxa de inchamento dos biopolímeros hidrofílicos (CAO *et al.*, 2005).

O uso de misturas de PHB e QUI é encorajado devido ao fato dos dois materiais serem biocompatíveis e passíveis de sofrer degradação enzimática e hidrolítica (IVANTSOVA *et al.* 2011).

Misturas de PHB e QUI têm sido estudadas no desenvolvimento de materiais para liberação controlada devido à sua natureza anfifílica (IVANTSOVA *et al.* 2011). IVANTSOVA *et al.* (2011), avaliaram o comportamento de filmes de PHB e QUI como materiais de liberação controlada para utilização do antibiótico rifampicina. Na

produção do filme foram utilizadas diferentes concentrações de PHB e QUI. O caráter hidrofílico /hidrofóbico dos filmes variou de acordo com a proporção de PHB e QUI na mistura influenciando diretamente na liberação do fármaco. Sendo que, o processo de liberação foi controlado por dois processos distintos: o primeiro relacionado á difusão do fármaco e o segundo devido à degradação do PHB. De acordo com IVANTSOVA *et al.* (2011) o material produzido pode ser utilizado como material de liberação controlada. ZAN *et al.* (2006) desenvolveram um material para liberação controlada de fármacos utilizando PHB e QUI. PHB foi utilizado como suporte para capturar 5-fluoracil e em seguida o suporte de PHB contendo 5- fluoracil foi combinado com micro-partículas de QUI.

Quando dois polímeros são combinados para a produção de um novo material é desejável que as propriedades de pelo menos um deles sejam melhoradas (IVANTSOVA *et al.*, 2011). Trabalhos são encontrados na literatura onde PHB e QUI são combinados dando origem a filmes com propriedades mecânicas melhores do que as observadas para os materiais constituintes individualmente. Como exemplo tem-se o trabalho desenvolvido por CAO *et al.* (2005) que produziram filmes de PHB e QUI utilizando a técnica de emulsão. Foi observada a formação de micro-esferas de PHB aprisionadas em uma matriz de QUI. Os filmes de PHB/ QUI apresentaram menor módulo de elasticidade, maior elongação à quebra, e elevado módulo de tensão quando comparado à QUI. Alterações em propriedades mecânicas utilizando PHB e QUI também foram observadas por PESCHEL *et al.* 2008 que produziram filmes de PHB e QUI misturando QUI dissolvida em ácido acético a uma solução de PHB em clorofórmio.

Mudanças no comportamento térmico ocorrem quando PHB e QUI são combinados. CHEN *et al.* (2005) estudaram o comportamento térmico e as interações

intermoleculares das misturas PHB/CTS e verificaram que a temperatura e a entalpia de fusão, e a cristalinidade diminuíram com o aumento da proporção de QUI na mistura. Foi observado que PHB e QUI fazem ligações hidrogênio. IKEJIMA *et al.* (1999) produziram blendas de PHB e QUI e observaram que a presença de QUI reduz a cristalização do PHB a medida que a proporção de QUI aumenta. Segundo IKEJIMA, QUI e PHB efetuam ligações hidrogênio entre o amino grupo da QUI e o grupo carbonila do PHB.

Além de alterações nas propriedades mecânicas e térmicas, tem sido observado que o uso concomitante de PHB e QUI da origem à materiais que interagem, em ensaios biológicos, de forma diferente dos seus materiais constituintes. PESCHEL *et al.* (2008) avaliaram a interação de filmes de PHB/QUI frente a queratinócitos e verificaram que filmes de PHB/QUI foram mais citocompatíveis do que o filme de PHB. CAO *et al.* (2005) avaliaram a citocompatibilidade de filmes de PHB/QUI frente a fibroblastos. Foi observado que o filme de PHB/ QUI foi mais citocompatível do que o filme puro de QUI.

O uso de QUI na modificação de superfície de arcabouços porosos de PHB também tem sido avaliado (MENDONÇA *et al.*, 2008). YU *et al.* (1998) mostraram que QUI pode ser graftizada com PHB. MENDONÇA (2008) modificaram a superfície de arcabouços porosos de PHB utilizando QUI. Foi observado que a presença de QUI na superfície dos arcabouços promoveu um aumento na adesão de osteoblastos humanos além disso, ao adicionar fibronectina na superfície dos suportes modificados com QUI observou-se uma maior adesão de osteoblastos humanos.

De acordo com exposto acima se infere que há muito a ser desvendado em relação à utilização conjunta de PHB e QUI de forma a viabilizar a utilização desses materiais em engenharia de tecidos em particular em engenharia óssea.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência experimental conduzida no desenvolvimento da nova metodologia para a produção de arcabouços porosos de PHB/QUI e PHB/QUI/FN baseada na capacidade de inchamento de uma matriz densa de PHB/QUI é esquematicamente representada na Figura 3.1

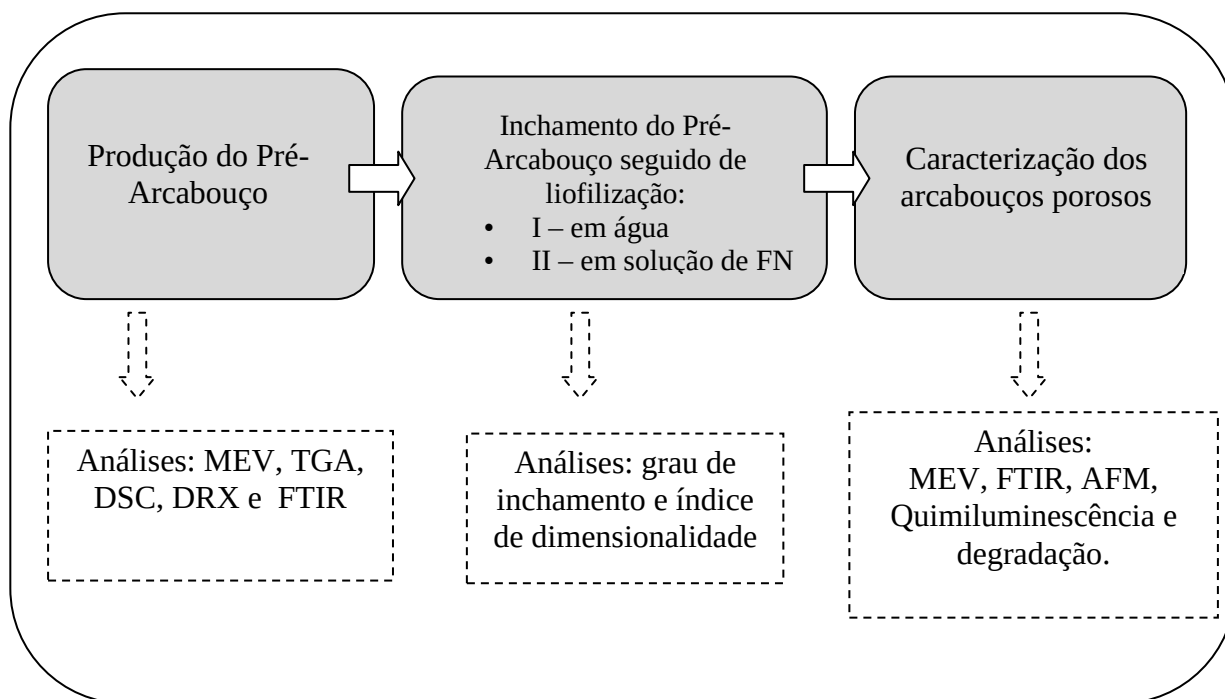


Figura 3.1 - Representação Esquemática da sequência experimental realizada para a produção de arcabouços porosos de PHB/QUI e PHB/QUI/FN

3.1 - Produção dos arcabouços porosos de PHB e QUI ($A_{\text{PHB-QUI}_x}$) e de arcabouços porosos de PHB e QUI bio-sinalizados com fibronectina ($A_{\text{PHB-QUI}_x}^{\text{FN}}$)

Para a produção dos arcabouços foram utilizados os seguintes polímeros como recebidos: QUI na forma de pó (Polymar SA (Ceará, Brasil) grau alimentício) e PHB na forma de pó com massa molar ponderal média (M_w) igual a 524.000g.mol^{-1} , fornecido pela PHB Industrial S/A (São Paulo, Brasil).

A produção dos arcabouços porosos foi conduzida em três etapas:

✓ **ETAPA 1:** 10g de uma mistura na forma de pó de PHB e QUI nas proporções 2%, 5 %, 10 % e 25% (p/p) foram adicionados a um balão volumétrico de fundo chato contendo 100mL de uma mistura de clorofórmio e ácido acético na proporção de 96:4 (v/v). A mistura foi aquecida sob refluxo a temperatura de 63°C por 2h sob agitação magnética. A solução resultante foi distribuída em moldes de vidro de geometria cilíndrica, com capacidade para 5mL e secas a 25°C por 72h. Nesta etapa foram produzidos pré-arcabouços denominados $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ onde x é o percentual de QUI utilizado no preparo do pré-arcabouço. Sendo assim, foram produzidos: Pré- $A_{\text{PHB-QUI}2\%}$ (com 2% de QUI), Pré- $A_{\text{PHB-QUI}5\%}$ (com 5 % de QUI), Pré- $A_{\text{PHB-QUI}10\%}$ (com 10% de QUI) e Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ (com 25% de QUI).

✓ **ETAPA 2:** Esta etapa pode ser compreendida como a etapa de inchamento, onde os pré-arcabouços são imersos em um líquido para promover o inchamento da QUI distribuída na matriz de PHB. Para a produção dos $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ o inchamento foi feito em água destilada. Para a produção dos $A_{\text{PHB-QUI}_x}^{\text{FN}}$ o inchamento foi feito em solução de FN em tampão PBS (0,145M NaCl tamponado

com 0,01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em ambos os casos, os arcabouços ficaram imersos por 12h e, em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido.

✓ **ETAPA 3:** Nesta etapa os Pré-arcabouços submetidos à etapa 2 foram liofilizados originando os seguintes arcabouços porosos: $A_{\text{PHB-QUIx}}$ (etapa 2 utilizando água) e $A_{\text{PHB-QUI}}^{\text{FN}}$ (etapa 2 utilizando solução de FN). A neutralização dos referidos arcabouços foi feita lavando-se, exaustivamente, o arcabouço em água destilada até a estabilização do pH da água de lavagem em 7.

3.2 – Caracterização do PHB, da QUI dos Pré- $A_{\text{PHB-QUIx}}$, dos $A_{\text{PHB-QUIx}}$ e do $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$

3.2.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Visando a compreensão da morfologia as superfícies de fratura dos Pré- $A_{\text{PHB-QUIx}}$, dos $A_{\text{PHB-QUIx}}$ e do $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM modelo 6460 LV – Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise do PEMM/COPPE/UFRJ). Para a análise da seção transversal, os pré-arcabouços e os arcabouços porosos foram imersos em nitrogênio líquido e fraturados. Todas as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos) e observadas na faixa de 10 KV a 15 KV, sendo os campos de interesse documentados por micrografias

3.2.2 - Microscopia de força atômica (AFM)

Visando avaliar a influência do fluido utilizado na etapa de inchamento na topografia dos arcabouços os mesmos foram avaliados por AFM. O princípio de funcionamento do AFM é baseado na varredura da superfície da amostra por uma

ponteira de formato piramidal de comprimento na ordem de alguns micra (100 a 200 μm) e com diâmetro na ordem de nanômetros, integrada em uma viga flexível. A sonda de um AFM exerce sobre a amostra uma força da ordem das forças interatômicas. Quando a superfície de uma amostra é varrida por uma sonda, esta pode se afastar ou se aproximar da mesma. As diferenças de deflexão são captadas por um detector, armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (HUMPHRIS *et al.*, 2005).

As análises de AFM foram conduzidas no microscópio de força atômica (AFM – JPK Instruments, modelo Nanowizard® - Laboratório de Caracterização de Superfícies (AFM) do PEMM/ COPPE /UFRJ). A topografia das superfícies dos arcabouços porosos foram analisadas em modo de contato intermitente utilizando agulhas de nitreto de silício (MikroMasch™ NSC16) montadas em uma haste com constante de mola igual a 40 N/m e frequência de ressonância de 170 kHz. Os arcabouços porosos foram fixados em suporte de vidro com fita dupla face e as imagens de AFM foram obtidas ao ar.

3.2.3 – Difração de raios X (DRX)

A cristalinidade de materiais poliméricos interfere em suas propriedades físico-químicas e pode ser influenciada pela presença de um segundo material, por fatores estruturais e pelas condições de processamento (CANEVAROLO, 2010 (CANEVARALLO, 2004).

Visando avaliar o efeito da metodologia no grau de cristalinidade (X_c), o PHB, a QUI, os Pré- $A_{\text{PHB-QUIX}}$ e os $A_{\text{PHB-QUIX}}$ foram analisados por difração de raios-X. A análise foi conduzida em difratômetro de raios X (Rigaku, modelo Mini Flex II – Laboratório de Catálise IT/DEQ/UFRJ) operado com a fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 15,2 \text{ nm}$), sob as seguintes condições de análise:

✓ velocidade: 2°/ min.;

- ✓ Passo: 0,02 grau;
- ✓ Tempo presente: 1 segundo;
- ✓ Faixa de varredura: $2\theta = 2 - 60^\circ$.

Com base nos difratogramas obteve-se o grau de cristalinidade (X_c) pela Equação 1 e o tamanho aparente dos cristalitos pela Equação 2 (OLIVEIRA, *et al.*, 2006):

Equação 1:

$$X_c = \frac{\text{área dos picos cristalinos}}{\text{área total}}$$

Equação 2:

$$t = \frac{0,9 \lambda}{B \cos \theta}$$

Onde:

- ✓ t é o tamanho aparente do cristalito;
- ✓ λ é o comprimento de onda do raio-X;
- ✓ B é a largura a meia altura dos picos;
- ✓ θ é o ângulo (em radianos) onde a intensidade do pico é máxima.

De acordo com a literatura o PHB apresenta célula ortorrômbica (SKRBIC *et al.*, 1996). Os difratogramas de DRX foram também utilizados para calcular os parâmetros de célula do PHB com base nos planos cristalográficos (020), (021) e (110) (Equação 3).

Equação 3:

$$d = \left(\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

3.2.4 – Análises Térmicas

As matérias-primas utilizadas na confecção dos arcabouços foram submetidas à análise térmica a fim de se obter dados referentes às temperaturas de cristalização (T_c), de fusão (T_m) e de degradação dos polímeros PHB e QUI. Visando investigar o efeito da concentração de QUI nos Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$, estes também foram submetidos às análises térmicas, sob as mesmas condições de análise dos seus materiais constituintes, para avaliar possíveis mudanças nas propriedades térmicas.

Análise termogravimétrica (TGA) e DTG

A análise termogravimétrica permite a determinação da variação da massa da amostra em função da temperatura. As amostras supracitadas foram analisadas em analisador termogravimétrico (Perkin Elmer, modelo PYRIS 1 – LABTeR / LADEQ / EQ / UFRJ). A análise foi conduzida em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min até atingir 700°C. Foram obtidas curvas de TGA e de sua derivada, DTG.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Dados referentes à cristalinidade de um material polimérico bem como dados referentes às suas propriedades térmicas (T_g , T_c e T_m) podem ser obtidos utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

PHB, QUI e Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ foram caracterizados por DSC em um calorímetro diferencial de varredura (Perkin-Elmer, modelo Pyris Diamond - LABTeR / LADEQ /

EQ / UFRJ). As amostras foram mantidas a -20°C durante 1 minuto e aquecidas até 210°C a uma taxa de taxa de 10 °C/min. As amostras foram mantidas a 210°C por 1 minuto, resfriadas até -20°C a uma taxa de -200°C e aquecidas até 210°C a uma taxa de 10 °C/min.

Os valores de cristalinidade baseados na análise de DSC foram obtidos pela Equação 4.

Equação 4:

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{f100\%} \times w_{PHB}}$$

Onde:

- ✓ X_c é o grau de cristalinidade mássico;
- ✓ ΔH_f é a variação de entalpia envolvida no processo de fusão;
- ✓ w_{PHB} é a fração mássica de PHB na amostra.

3.2.5 - Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho (espectroscopia IR) utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Basicamente, o que se mede nesta análise é a fração da energia transmitida ou absorvida em relação à incidente em determinado comprimento de onda ou número de onda. A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados, nesse caso, de níveis

vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície, da energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibrônico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

Para investigar possíveis interações entre o PHB e a QUI nos Pré- $A_{\text{PHB-QUIx}}$, $A_{\text{PHB-QUIx}}$ e $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$, estes, o PHB e a QUI, foram analisados em espectrômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho (FTIR) (Perkin-Elmer, modelo 1720X - Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCM) do PEMM/COPPE/UFRJ). A análise das amostras foi realizada sob as seguintes condições operacionais:

- ✓ resolução do equipamento: 4cm^{-1} ;
- ✓ número de varreduras: 20;
- ✓ faixa de número de onda: $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$.

3.2.6 - O grau de inchamento (GI)

O grau de inchamento (GI) dos Pré- $A_{\text{PHB-QUIx}}$ e do $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ arcabouços foi determinado utilizando a Equação 5 medindo-se a massa dos pré-arcabouços (produzidos na etapa 1) antes (M_0) e após o inchamento (M_t) (no final da etapa 2).

Equação 5:

$$GI(\%) = \left(\frac{M_t - M_0}{M_0} \right) \times 100$$

Onde:

- ✓ GI é o grau de inchamento;
- ✓ M_0 é a massa inicial;
- ✓ M_t é a massa do arcabouços após o inchamento.

3.2.7 - Índice de dimensionalidade (d)

O índice de dimensionalidade (d) permite analisar o comportamento do inchamento possibilitando avaliar se o processo é ou não isotrópico. O índice de dimensionalidade, d, é definido como o número de direções em que a expansão completa e desobstruída ocorre (PEPPAS *et al.*, 1997). Para obter o valor de d os Pré-arcabouços (em formato cilíndrico) foram inchados em água destilada e o diâmetro (D) e a espessura (h) dos arcabouços foram medidos a cada duas horas por um período de 12h. Os valores obtidos para D e h foram utilizados para calcular volume e a área dos arcabouços inchados a partir das Equações 6 e 7 respectivamente. O valor de d foi obtido baseado no trabalho desenvolvido por PEPPAS *et al.* (1997). De acordo com PEPPAS *et al.* (1997) o valor de d pode ser obtido plotando $\ln[A_{gel}/A_{dry}]$ (onde A_{gel} é a área do arcabouço inchado e A_{dry} é área do arcabouço seco) versus Q que é a razão entre o volume do arcabouço inchado (V_{gel}) e o volume do arcabouço seco (V_{dry}). Com isso obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é igual a $(d-1)/3$.

Equação 6:

$$A = \pi \left(\frac{D^2}{4} + Dh \right)$$

Onde:

- ✓ A é a área do arcabouço
- ✓ D é o diâmetro do arcabouço
- ✓ h é a altura do arcabouço

Equação 7:

$$V = \pi x h x \frac{D^2}{4}$$

Onde V é o volume do arcabouço.

3.2.8 - Determinação da densidade

De acordo com o princípio de Arquimedes "Todo corpo mergulhado num fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, cuja intensidade é igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo. Num corpo que se encontra imerso em um líquido em repouso, atuam duas forças, ambas com mesmo centro de ação, são elas: a força peso (devido à interação com o campo gravitacional terrestre) e a força de impulsão (devido a sua interação com o líquido)" (CARVALHO, 1997).

A balança hidrostática tem seu funcionamento baseado no princípio de Arquimedes e pode ser utilizada para determinar a densidades de sólidos e líquidos. Com base no exposto, a densidade dos arcabouços porosos foi determinada utilizando-se a balança de Arquimedes. Para tal os arcabouços porosos foram pesados a seco em balança analítica e com a balança de Arquimedes foram obtidos os valores de massa aparente dos mesmos. Os valores de massa e massa aparente foram utilizados para determinar a densidade de acordo com a Equação 8.

Equação 8:

$$\rho_A = \frac{Pol_{seco} \rho_{água}}{Pol_{seco} - Pol_{úmido}}$$

Onde:

- ✓ Pol_{seco} é a massa do polímero seco;
- ✓ Pol_{úmido} é massa do polímero úmido;
- ✓ ρ_A é a densidade do arcabouço;
- ✓ $\rho_{água}$ é a densidade da água a 25°C.

3.2.9 - Porosidade (ASTM D4404)

Sendo a porosidade um parâmetro fundamental na caracterização do arcabouço, no presente trabalho, determinou-se a porosidade do A_{PHB-QUI25%} de acordo com procedimento descrito na norma ASTM D 4404. A porosidade foi obtida calculando-se razão entre o volume de vazios (volume de poros (V_p)) e o volume total (V_T) como descrito na norma ASTM D4404 para intrusão de líquido. Os arcabouços porosos foram imersos em etanol e pesados periodicamente até massa constante. A massa total de etanol absorvida foi obtida pela diferença entre os valores de massa do arcabouço poroso seco (massa inicial) e a massa do arcabouço poroso contendo etanol (massa final). O volume de etanol (V_p) absorvido foi obtido pela Equação 9.

Equação 9:

$$V_p = \frac{V_P - m_s}{\rho_s}$$

Onde:

- ✓ V_p é o volume de poros;
- ✓ V_T é o volume total do arcabouço;
- ✓ m_s é a massa do arcabouço após a imersão em etanol
- ✓ ρ_s é a densidade do arcabouço.

A porosidade foi calculada pela Equação 10:

Equação 10:

$$Porosidade = \frac{100 \times V_p}{V_T}$$

3.2.10 - Ensaio mecânico - Compressibilidade

As propriedades mecânicas iniciais do arcabouço poroso é um dos parâmetros essenciais para sua utilização em Engenharia de Tecidual, pois este deve suportar a carga imposta pela aplicação pretendida (CORDONNIER *et al.*, 2011). No presente trabalho o $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ e o $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ (com diâmetro igual 12 mm e altura igual a 3,6 mm) foram submetidos a ensaios de compressão. Os arcabouços foram posicionados em uma máquina universal de ensaios Instron 5567 com uma célula de carga de 2KN e velocidade do travessão igual 1,3mm/min. Os dados de deformação da amostra em função da carga aplicada foram coletados e tratados para a obtenção do módulo de compressão.

3.2.11 – Immunoblotting/ Quimiluminescência

Esta análise foi realizada para verificar se FN foi adsorvida à superfície dos arcabouços $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$. Os arcabouços $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS}$ foram previamente lavados com etanol por 2 minutos, depois, lavados 3 vezes com tampão TBS (*Tris-saline buffer*) (por 10 minutos, e bloqueadas por 12 horas em solução de MBS (*N-hydroxysuccinimide ester*) a 4°C). Após 2 lavagens com tampão TBS acrescido de Tween 20 (T-TBS) por 10 minutos, os arcabouços foram incubados com anticorpo primário (anti-fibronectina produzido em ratos (SIGMA ALDRICH)) diluído 1: 250 em solução T-TBS por 2 horas. Em seguida, foram lavados 3 vezes com solução T-TBS por 10 minutos e incubado com anticorpos secundários conjugados à fosfatase alcalina (IgG de coelho anti-IgG humano) diluído 1:5000 em solução T-TBS por 1hora. Após 2 lavagens sucessivas com T-TBS por 10 minutos e 2 com TBS por 10 minutos, os arcabouços foram incubados com substrato quimiluminescente para ser revelado.

Os arcabouços foram varridos em um Fotodocumentador (MF ChemBis 3.2 – DNR, Bio-imaging Systems, Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Fiocruz) capaz de obter imagens digitais de reações de quimioluminescência sucedidas sobre os arcabouços.

3.2.12 – Dessorção de proteína da superfície do $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$

Os $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ foram incubados em meio de cultura para osteoblastos (meio modificado de Dulbecco (DMEM; GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF)) por 24h para avaliar a dessorção da FN. Depois de lavados em meio de cultura para osteoblastos os mesmos foram submetidos a um ensaio de ligação com anticorpo anti-fibronectina (descrito no item 3.2.9) para verificar a presença de FN ou não no arcabouço após a incubação em meio de cultura.

3.2.13 – Análise da Citotoxicidade “*in vivo*” dos $A_{PHB-CTS25\%}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS25\%}$

A análise de citotoxicidade dos $A_{PHB-CTS}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS}$ foi realizada com base no teste multiparamétrico de viabilidade celular por kit *In Cytotox* (Xenometrix) onde três parâmetros são avaliados: atividade mitocondrial (XTT), integridade membrana (vermelho neutro) e quantificação do material genético (cristal violeta) (DE-DEUS *et al.*, 2009). Os parâmetros foram quantificados fazendo-se medidas de absorbância em Leitor de Microplacas Synergy 2 BioTek, disponível na Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), instalada no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP-UFF).

Os $A_{PHB-CTS}^{FN}$ e $A_{PHB-CTS}$ foram incubados por 24 h em meio de cultura (Alpha MEM) (sem soro, em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂ para obtenção do extrato. Os extratos produzidos foram incubados em cultura (osteoblastos murinos (MC3T3)) em placa com 96 poços por um período de 24h em estufa a 37°C com

atmosfera de 5 % de CO₂. Ao final das 24h o sobrenadante foi descartado. Na sequência o ensaio de XTT o qual quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja) foi realizado. A absorbância foi medida em 480 nm. A análise da sobrevivência/viabilidade foi realizada com base na capacidade das células incorporarem o corante vermelho neutro em seus lisossomos, acumulados na sua membrana íntegra. No final deste teste as células foram fixadas, o corante presente no seu citoplasma foi liberado por ação da solução de solubilização para o sobrenadante e a absorbância foi lida em 540 nm. A densidade celular foi avaliada por coloração do DNA com cristal violeta; após eliminação do excesso do corante, a absorbância a 540 nm é proporcional à quantidade de células no poço. Na realização dos testes foram utilizados como controle positivo (citotóxico) solução de fenol a 2% e como controle negativo (não citotóxico) extrato de poliestireno. Todos os extratos foram avaliados em réplicas de 6 poços.

3.2.14 – Estudo da degradação “*in vitro*” dos A_{PHB-CTS25%}^{FN} e A_{PHB-CTS25%}

A resposta local “*in vivo*” dos tecidos aos arcabouços depende da biocompatibilidade do material constituinte e da degradação. O mecanismo de erosão da superfície dos arcabouços pode afetar o pH das vizinhanças e consequentemente a resposta do organismo hospedeiro ao material. De acordo com literatura, os poliésteres absorvíveis tendem a sofrer hidrólise não só na superfície como também no volume. Para prolongados tempos de exposição pode haver um decréscimo no pH o que pode afetar também a degradação do material (BURG *et al.*, 2000). No presente trabalho os A_{PHB-CTS}^{FN} e A_{PHB-CTS} foram imersos em tampão acetato (0,1M a pH 5,0) para avaliar a degradação em meio ácido. A formação do tecido ósseo envolve as fases de inflamação, proliferação e remodelagem. A escolha do meio ácido foi feita com base no pH

associado à processos inflamatórios (MISTRY & MIKOS, 2005). A degradação foi avaliada por um período de 90 dias. O processo de degradação foi acompanhado por MEV sendo as amostras removidas após 10, 30, 60 e 90 dias.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A produção dos arcabouços porosos foi conduzida em três etapas. Na primeira matrizes anfifílicas de PHB/QUI (Pré-arcabouços) contendo 2%, 5%, 10% e 25% de QUI foram produzidas. Na segunda as matrizes foram submetidas ao inchamento em água ou em solução de FN. Na terceira as matrizes inchadas foram liofilizadas.

No presente trabalho, as amostras foram caracterizadas em todas as etapas do processo visando avaliar o efeito da concentração de QUI na formação dos poros e nas propriedades do PHB nos diferentes estágios de produção. Sendo assim, neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização dos Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$, dos $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ e dos $A_{\text{PHB-QUI}}^{\text{FN}}$. É importante ressaltar que os resultados obtidos para os $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ serviram como fator determinante para a seleção da quantidade de QUI utilizada na produção do Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ (etapa 2 item 3.1) a ser utilizado na produção de arcabouços biossinalizados com FN.

4.1 - Arcabouços de PHB e QUI ($A_{\text{PHB-QUI}_x}$)

Visto que os Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ são precursores dos arcabouços porosos, o efeito da concentração de QUI nas propriedades físico-químicas destes foi avaliado por MEV, FTIR, DRX, DSC e TGA.

4.1.1 - Análise da morfológica dos Pré-APHB-QUIx por MEV

A Figura 4.1 mostra imagens de MEV da seção de fratura dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ formados na etapa 1.

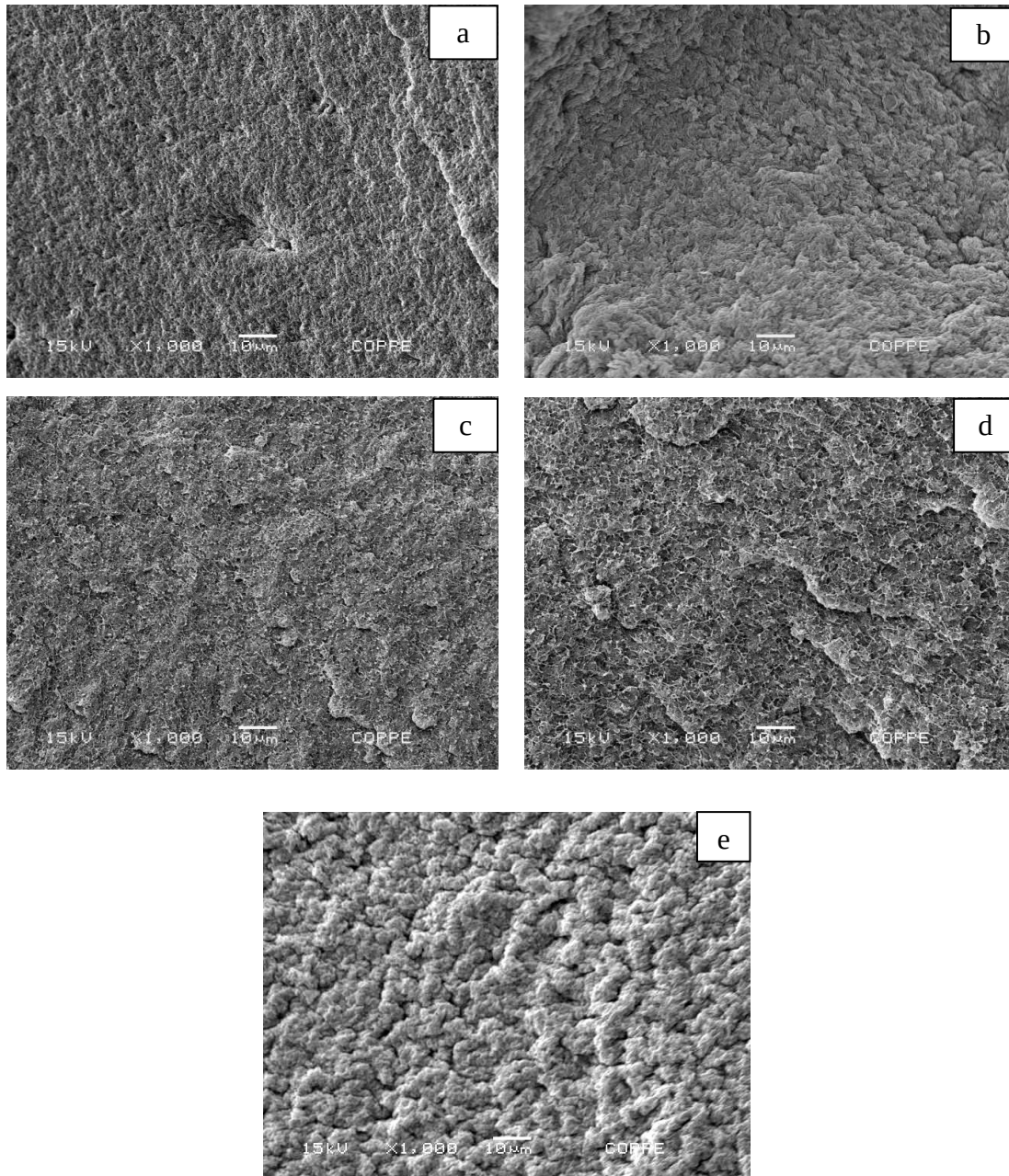


Figura 4.1- Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos Pré-arcabouços ao final da etapa1: (a) Pré- A_{PHB} (branco sem QUI); (b) Pré- $A_{PHB-QUI2\%}$; (c) Pré- $A_{PHB-QUI5\%}$; (d) Pré- $A_{PHB-QUI10\%}$ e (e) Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$. Os Pré-arcabouços não apresentam estrutura de poros característica de arcabouços porosos tridimensionais com potencial aplicação em Engenharia Tecidual.

As imagens revelam que o Pré- A_{PHB} (Figura 4.1 (a)) utilizado como branco (não contém QUI) e os Pré- $A_{PHB-QUIx}$ (Figura 4.1 (b) a (e)) não possuem estrutura porosa característica de arcabouços porosos tridimensionais imediatamente após a evaporação do solvente. As superfícies de fratura dos Pré-arcabouços são formadas por aglomerados que diferem entre si por seus tamanhos não sendo possível fazer distinção entre o PHB e a QUI nas Figuras 4.1 (b) a (e). No entanto, com o aumento da concentração de QUI é possível observar a presença de estruturas arredondadas na superfície de fratura do material.

A Figura 4.2 mostra imagens de AFM da seção de fratura do Pré-PHB_{25%}. É possível observar na Figura 4.2 (a) a presença de estruturas arredondadas que podem estar relacionadas à QUI. De acordo com a Figura 4.2 (b) a superfície de fratura apresenta contraste de fase mostrando que a superfície é composta por dois materiais distintos onde a parte mais escura pode ser atribuída à QUI (material em menor quantidade) e a parte mais clara é atribuída ao PHB. Nota-se que não houve uma distribuição homogênea de QUI na matriz de PHB.

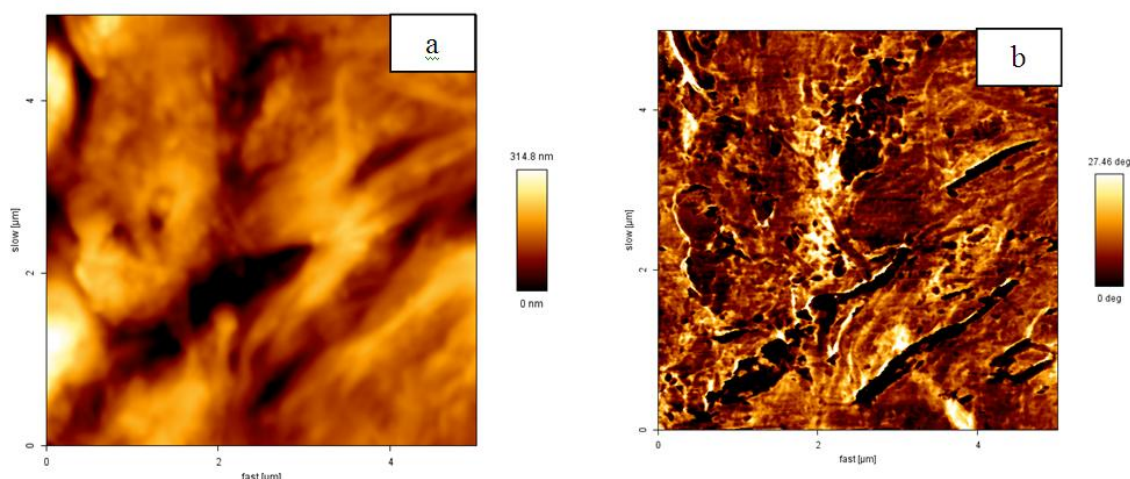


Figura 4.2 - Imagens de microscopia de força atômica da superfície do Pré-

$A_{PHB-QUI25\%}$: não imersos em água (a) topografia e (b) fase.

4.1.2 -Efeito do teor de QUI na cristalinidade dos Pré-A_{PHB-QUIx} por DRX

Os Pré-A_{PHB-QUIx}, o PHB e a QUI foram analisados por DRX e os difratogramas e os valores de cristalinidade calculados pela Equação 1 são apresentados na Figura 4.3.

Os principais picos do PHB estão identificados na Figura 4.3 (a) por I ($2\theta = 13,75^\circ$), II ($2\theta = 17,0^\circ$), III ($2\theta = 22^\circ$), IV ($2\theta = 25,5^\circ$), V ($2\theta = 27,35^\circ$) e VI ($2\theta = 30^\circ$), correspondendo, respectivamente aos planos (020), (110), (021), (111), (121) e (040) (SKRBIC, *et al.*, 1996). Comparando-se os difratogramas dos Pré-A_{PHB-QUIx}, fica clara a presença de picos característicos do PHB. No entanto, a intensidade do pico cristalino do PHB originalmente em 2θ igual a $13,75^\circ$ (I) diminui em relação ao do pico cristalino originalmente em 2θ igual a $17,0^\circ$ (II). A redução do pico cristalino do PHB em 2θ igual a $13,75^\circ$ (I) acentuou-se com o aumento da proporção de QUI indicando que a mesma interferiu no processo de cristalização do PHB. Além disso, observa-se um deslocamento dos picos cristalinos I e II do PHB com a adição de QUI, o que pode indicar uma possível interação entre o PHB e a QUI. O difratograma da QUI (item (f) da Figura 4.3) apresenta dois picos característicos em 2θ igual a 10° (VII) e $20,4^\circ$ (VIII).

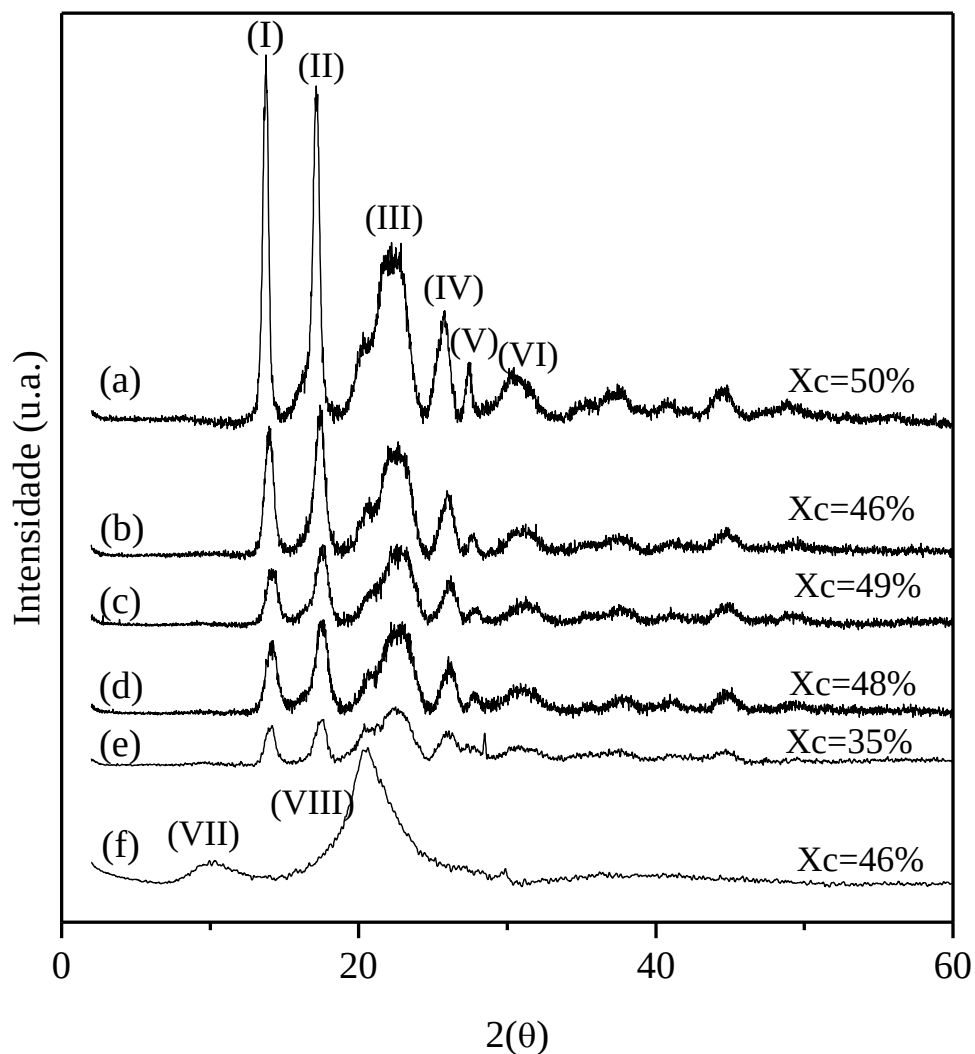


Figura 4.3 – Difratoograma de raios X: (a) amostra de PHB; (b) Pré- $A_{PHB-QUI2\%}$; (c) Pré- $A_{PHB-QUI5\%}$; (d) Pré- $A_{PHB-QUI10\%}$; (e) Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$ e (f) QUI. X_c é grau de cristalinidade da amostra obtido através do difratograma utilizando a Equação 1.

O pico característico da QUI em 2θ igual a 10° (VII) não foi observado em nenhum dos arcabouços. Já o pico em 2θ igual 20.4° (VIII) foi, provavelmente sobreposto pelo pico III do PHB visto que, mudanças expressivas também foram observadas no pico III cuja forma foi progressivamente alterada com o aumento do teor de QUI. O pico IV além de sofrer redução na intensidade, o que está relacionado ao decréscimo da concentração relativa de PHB, apresentou uma base mais larga em

função da presença de QUI. O aumento na proporção de QUI resultou no desaparecimento do pico V do PHB, como mostrado no difratograma (Figura 4.3 (e)).

A composição dos Pré- $A_{\text{PHB-QUI}_x}$ teve influência na cristalinidade da amostra. Os valores de cristalinidade dos Pré-arcabouços contendo de 2 a 10% de QUI variou muito pouco em relação à cristalinidade do PHB (Figura 4.3). A redução da cristalinidade foi mais acentuada para o Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ indicando que o teor de QUI afeta a cristalinidade do PHB. O tamanho aparente dos cristalitos (t) calculado pela Equação 2 relacionado ao plano cristalográfico 020 é apresentado na Tabela 4.1. Todos os Pré-arcabouços contendo QUI apresentaram tamanho aparente dos cristalitos menor do que o do A_{PHB} . No entanto, esta redução foi aleatória, provavelmente devido ao fato da amostra ser heterogênea como mostrou a análise de AFM (Figura 4.2).

Tabela 4.1 - Tamanho aparente dos cristalitos de PHB nos Pré-arcabouços

Amostra	t (Å)
Pré - A_{PHB}	174.1
Pré- $A_{\text{PHB-QUI}2\%}$	91.0
Pré- $A_{\text{PHB-QUI}5\%}$	116.1
Pré- $A_{\text{PHB-QUI}10\%}$	88.0
Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$	102.7

Embora o tamanho de cristalitos e a cristalinidade tenham sofrido alteração, não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros de célula e nas distâncias interplanares do PHB (Tabela 4.2), o que significa que a célula unitária do PHB não foi afetada pela presença de QUI e que os segmentos de QUI são eliminados do cristal de

PHB. Comportamento similar foi observado por CHEN *et al.* 2005 que estudou o comportamento de blendas de PLLA e QUI.

De acordo com a literatura, dispositivos feitos de PHB e QUI apresentam valores de cristalinidade associados tanto ao PHB quanto a QUI. Além disso, a cristalinidade pode ser afetada tanto pelo teor de QUI quanto pela metodologia adotada na produção desses dispositivos (SHIH, *et al.*, 2007).

Tabela 4.2 – Valores dos parâmetros de célula unitária do PHB e das interplanares (Equação 3).

	a	b	c	d (020)	d (021)	d (110)
Pré -A _{PHB}	5,70	12,87	5,20	6,44	4,04	5,22
Pré-A _{PHB-QUI2%}	5,73	12,60	5,27	6,30	4,04	5,22
Pré-A _{PHB-QUI5%}	5,58	12,39	5,34	6,19	4,04	5,09
Pré-A _{PHB-QUI10%}	5,51	12,54	5,29	6,27	4,04	5,04
Pré-A _{PHB-QUI25%}	5,63	12,56	5,22	6,28	4,01	5,14

IKEJIMA *et al.* (2000) avaliaram a cristalinidade de filmes de PHB e QUI e constataram que a interação intermolecular entre os materiais componentes torna as cadeias de PHB mais rígidas dificultando o processo de cristalização. Acredita-se que a redução no tamanho aparente dos cristalitos observada para os Pré-A_{PHB-QUIx} em relação ao PHB (Tabela 4.1) possa ser causada por essa interação.

SHIH *et al.* (2007) avaliaram a cristalinidade de microesferas de PHB e QUI. Embora, a metodologia de obtenção das microesferas sejam diferentes da metodologia empregada na confecção dos arcabouços, vale ressaltar que os resultados obtidos por SHIH *et al.* (2007), utilizando a técnica de difração de raios-X, foi similar ao aqui apresentado nos seguintes aspectos: quanto maior a proporção de PHB mais

perceptíveis são os picos cristalinos atribuídos a este; a QUI afeta a cristalização do PHB.

4.1.3 - Análise térmica dos Pré-APHB-QUI_x por DSC , TGA e DTG

Os Pré-APHB-QUI_x foram avaliados, também, por DSC (as curvas são apresentadas no Anexo I) e os resultados relacionados ao segundo aquecimento são apresentados na Tabela 4.3. Todos os Pré-APHB-QUI_x apresentaram valores similares de T_m os quais foram menores quando comparados à T_m do PHB puro. Os valores obtidos para o ΔH_f dos Pré-APHB-QUI_x diminuí em relação ao PHB nos arcabouços contendo 10% e 25% de QUI. Este resultado indica que foram produzidos cristais de PHB mais finos na presença de QUI como resultado da interação entre os polímeros corroborando os resultados apresentados na Tabela 4.2. Além disso, a análise do grau de cristalinidade mássico em relação ao PHB (Tabela 4.3) mostrou redução expressiva no grau de cristalinidade somente na amostra contendo 25% de QUI. Este resultado está de acordo com o observado na análise de DRX (Figura 4.7).

A presença de QUI em blendas de QUI/PLA (CHEN *et al.* (2005)) por exemplo, apresentou o comportamento térmico similar a estes observados para o Pré-APHB-QUI_x. No estudo conduzido por CHEN *et al.* (2005) foi observado que a T_m das blendas de QUI/PLA diminuí com o aumento da concentração de QUI. Tal fato também pode ser observado para os Pré-APHB-QUI_x (vide Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Resultados de DSC referentes ao segundo aquecimento para o PHB e os Pré-A_{PHB-QUIx} e valores de cristalinidade (Xc)

Amostra	T _c (°C)	T _m (°C)	ΔH_c (J.g ⁻¹)	ΔH_f (J.g ⁻¹)	X _c (%)
PHB	40,8	173,5	-30,63	56,69	38,8
Pré-A _{PHB-QUI2%}	51,5	158,49	-43,97	66,7	46,6
Pré-A _{PHB-QUI5%}	40,84	151,5	-40,84	59,77	48,2
Pré-A _{PHB-QUI10%}	46,37	153,36	-38,34	47,09	35,8
Pré-A _{PHB-QUI25%}	47,58	154,42	-17,11	23,96	21,9

* X_c da mistura PHB e QUI obtido utilizando os valores de ΔH da amostra (Equação 4).

Os Pré-A_{PHB-QUIx} foram analisados por TGA/ DTG e as curvas são apresentadas na Figura 4.4. Os valores de temperatura onde a degradação térmica é máxima são apresentados na Tabela 4.4.

As curvas de TGA apresentaram comportamento similar para os Pré-A_{PHB-QUIx} com x variando de 2 a 10% (Figura 4.4 (a) e (b)). Sutis diferenças entre as *Tonset* (temperatura que indica o início extrapolado do evento térmico (CANEVAROLO, 2004)) (Figura 4.4) foram observadas à medida que a concentração de QUI aumentou sendo, portanto a *Tonset* inversamente proporcional ao teor de QUI no arcabouço (Figura 4.4 (b)).

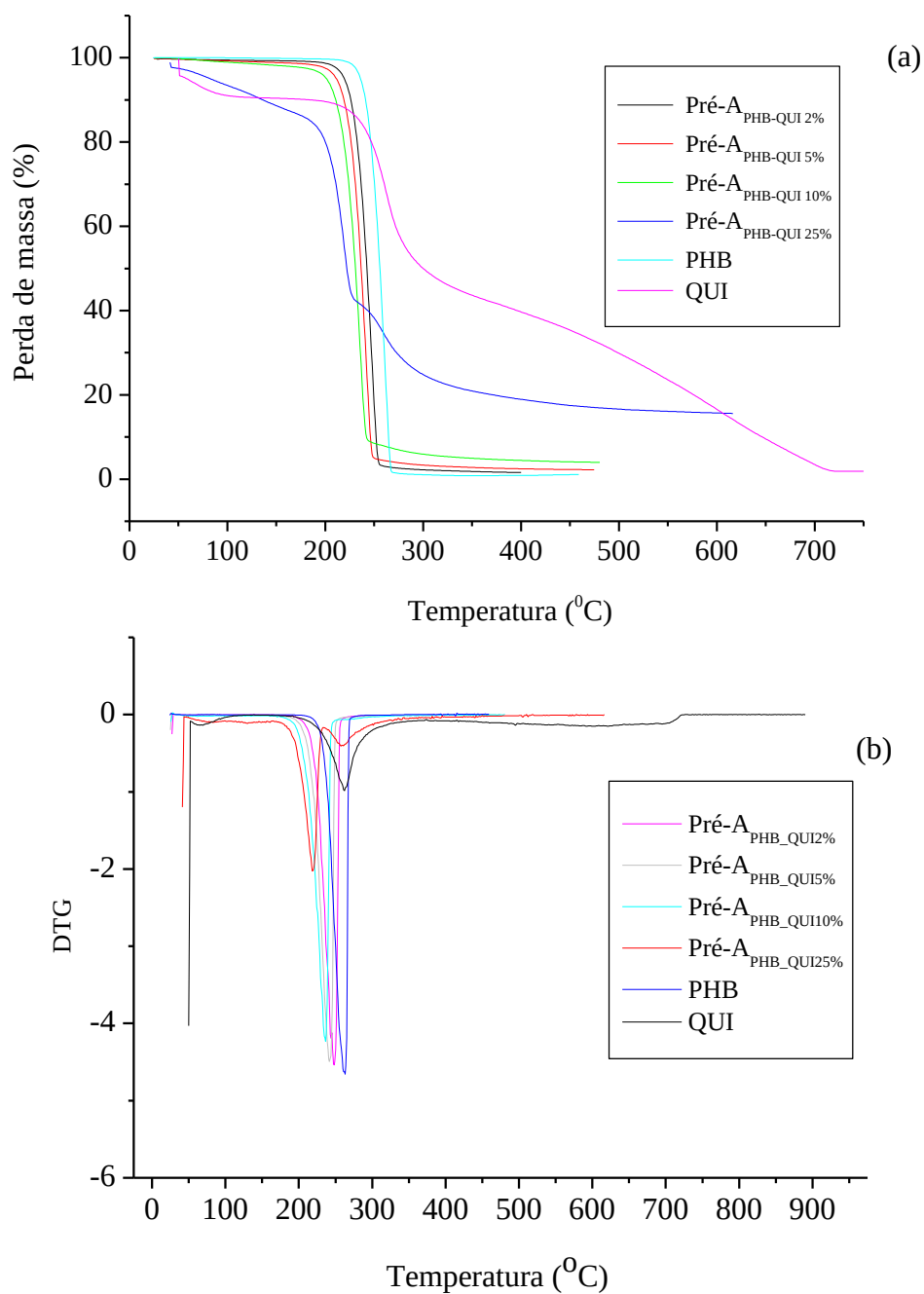


Figura 4.4 – Termograma de TGA do PHB da QUI e dos Pré-APHB-QUIx: (a) TGA e (b) DTG.

Tabela 4.4 – Valores de temperatura onde a degradação térmica é máxima obtidos com base na curva de DTG.

Amostra	T (°C)
PHB	266,11
Pré-A _{PHB-QUI2%}	247,98
Pré-A _{PHB-QUI5%}	241,75
Pré-A _{PHB-QUI10%}	236,48
Pré-A _{PHB-QUI25%}	218,47
QUI	262,08

A curva de TGA do Pré-A_{PHB-QUI25%} apresentou quatro regiões de degradação. A primeira perda de massa, de 10,6%, pode estar relacionada à água contida na QUI e ao resíduo de solvente (ácido acético) presente na amostra e ocorre na faixa de 50° C a 201°C. A segunda região, na faixa de 201°C a 244,57° C apresenta máxima degradação em 233,47° C (Figura 4.4 (b)). A terceira região está compreendida entre 244,57° C e 282,44° C e apresenta um máximo de degradação a 260,47° C. É possível que a segunda e a terceira região abriguem degradação tanto do PHB quanto da QUI visto que o PHB puro degrada na faixa de 216° C a 276° C e a QUI na faixa de 197° C a 324° C. Comportamento similar foi observado por CHEN *et al.* (2008) que avaliaram blendas de QUI.

De acordo com RAJAN, *et al.*, (2012), que estudaram o comportamento térmico de compósitos de PHB e QUI, a natureza da degradação depende da quantidade de QUI presente na amostra. RAJAN, *et al.*, (2012) associam a perda de massa à evaporação da água presente na QUI. No entanto, essa perda de água não foi observada para os Pré-arcabouços contendo 2 a 10% de QUI. Já no Pré-A_{PHBQUI25%} essa perda é perceptível. No presente trabalho, além da presença de água oriunda da QUI há a possibilidade da

perda de massa está relacionada à evaporação de solvente residual oriundo da etapa 1 da produção do arcabouço.

4.1.4 - Análise da interação entre QUI e PHB nos Pré-APHB-QUIx por FTIR

As moléculas de QUI possuem grupos amino e hidroxil disponíveis para a formação de ligações hidrogênio com moléculas que possuem grupos carbonil como é o caso do PHB (IKEJIMA, *et al.*, 2000, CHEN, *et al.*, 2005, BERGER, *et al.*, 2004a, BERGER, *et al.*, 2004b). Visando investigar possíveis interações intermoleculares entre o PHB e a QUI os Pré-arcabouços foram analisados por FTIR e os espectros podem ser observados na Figura 4.5 (Detalhes dos espectros da Figura 4.5 são apresentados na Figura 4.6).

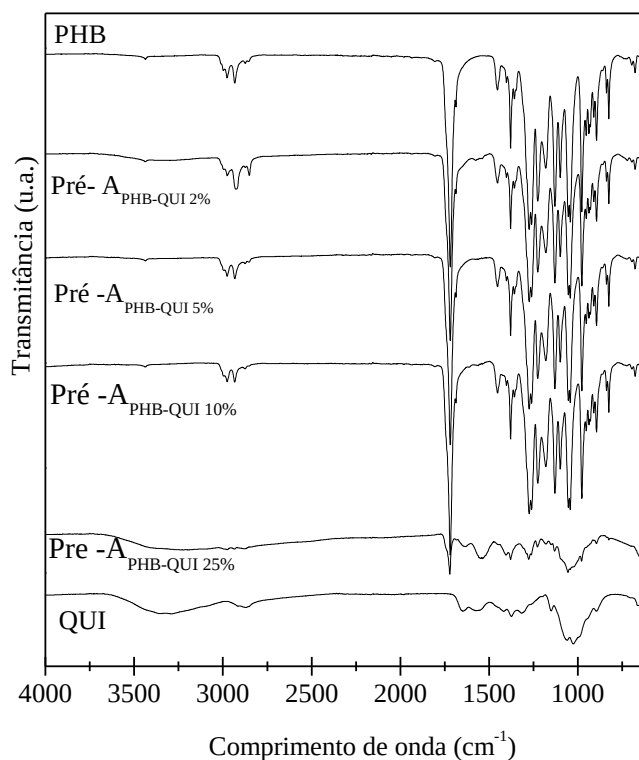


Figura 4.5 – Espectros de FTIR dos Pré-A_{PHB-QUIx}, do PHB e da QUI

A Tabela 4.5 apresenta a provável atribuição das principais absorções de FTIR da QUI e do PHB com base no espectro apresentado na Figura 4.5.

Tabela 4.5 – Atribuição provável das principais absorções FTIR da QUI e do PHB baseadas em BARBOSA (2007), IKEJIMA et al. (1999), BLOEMBERGEN et al. (1986).

QUI	
1655 cm ⁻¹	C = O de amida
1599 cm ⁻¹	deformação angular de N-H
1421 cm ⁻¹	deformação axial de –CN de amida
1379 cm ⁻¹	deformação angular simétrica de CH ₃
de 1323 cm ⁻¹ a 1379 cm ⁻¹	deformação axial de -CN de grupos amino
de 897cm ⁻¹ a 1153 cm ⁻¹	bandas de estruturas polissacarídicas
1377 cm ⁻¹	deformação simétrica do CH ₃
de 3250 cm ⁻¹ e 3500 cm ⁻¹	bandas referentes aos grupos OH e à amida
PHB	
de 1275,3 cm ⁻¹ e a 1720 cm ⁻¹	estiramento das ligações C = O do grupo carbonila
de 1453 cm ⁻¹ a 1380 cm ⁻¹	deformação assimétrica da ligação C-H dos grupos etileno e metileno, CH ₂ e CH ₃ ,
de 978 cm ⁻¹ a 1300 cm ⁻¹	estiramento da ligação C – O do grupo éster
2922 cm ⁻¹	grupamentos CH ₂
2972 cm ⁻¹	grupamentos CH ₂

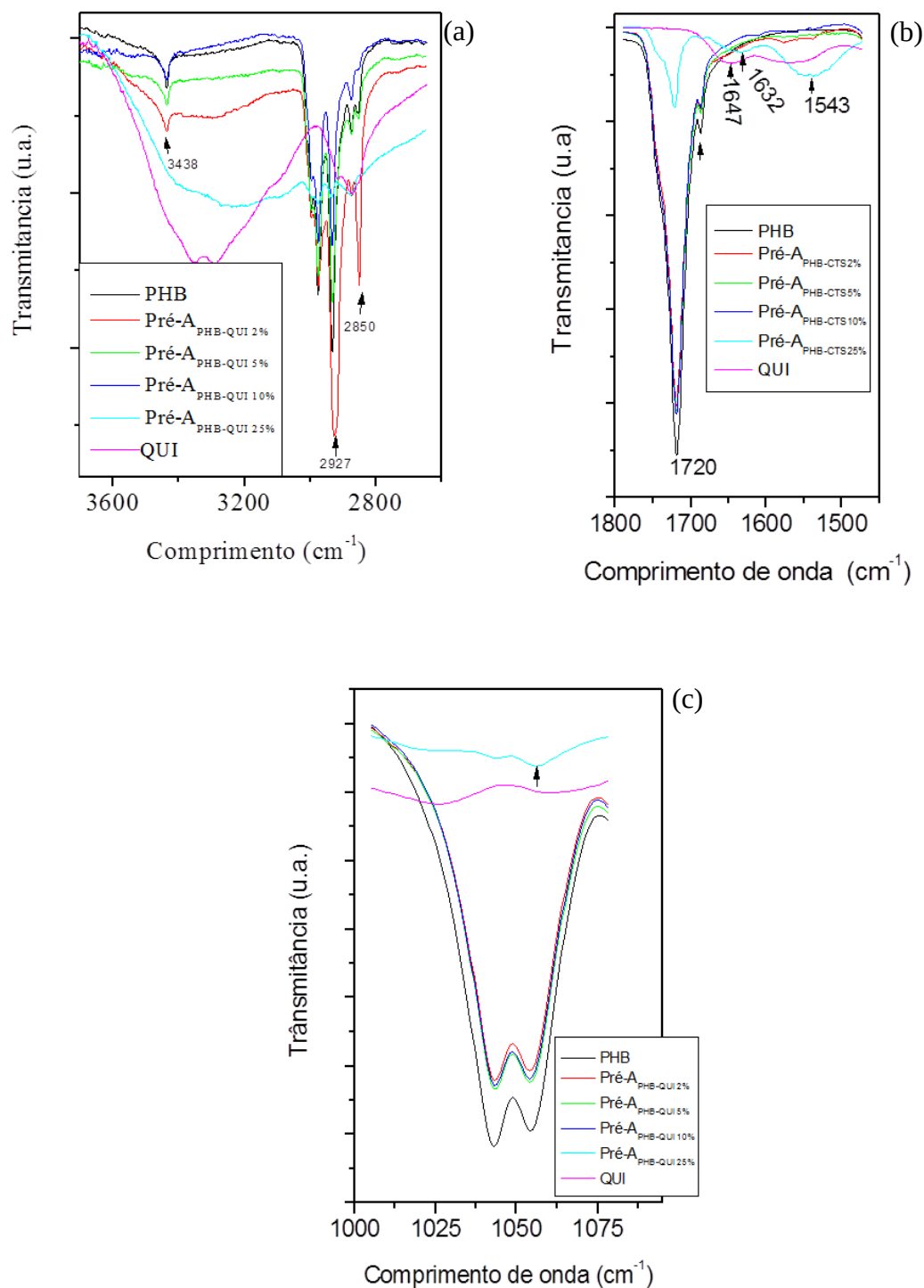


Figura 4.6 – Espectros de FTIR dos Pré-A_{PHB-QUIx}, do PHB e da QUI:(a) região de 3700 cm^{-1} a 2600 cm^{-1} ; (b) região de 1800 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} e (c) região de 1490 a 1000 cm^{-1} .

Os espectros dos Pré-arcabouços com teor de QUI variando de 2% a 10% apresentaram algumas alterações em relação aos espectros do PHB e da QUI, principalmente na região compreendida entre 3700 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} (apresentada na Figura 4.6 (a)). No entanto, o efeito da concentração de QUI foi mais pronunciado no Pré- $A_{\text{PHBCTS25\%}}$.

Na região de entre 3700 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} (Figura 4.5 e Figura 4.6 (a)) encontram-se bandas de amida a aproximadamente 3500 cm^{-1} e de grupos hidroxila por volta de 3250 cm^{-1} pertencentes à QUI (GUPTA *et al.*, 2006). Bandas características de grupos éster podem ser encontradas na faixa de 2922 cm^{-1} e 2972 cm^{-1} . Na Figura 4.6 (a) observa-se que os Pré- $A_{\text{PHB-QUI2\%}}$, Pré- $A_{\text{PHB-QUI5\%}}$, Pré- $A_{\text{PHB-QUI10\%}}$, apresentaram uma banda por volta de 3580 cm^{-1} que pode ser atribuída ao resíduo de ácido acético nos Pré-arcabouços após a etapa 1. Esta banda é sobreposta pela banda de QUI no Pré- $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$. A presença do resíduo de ácido acético é importante pois afeta o comportamento da QUI na matriz de PHB. A Figura 4.7 mostra a QUI inserida na matriz de PHB na ausência do ácido. É possível observar que não houve interação entre a partícula de QUI e a matriz de PHB, uma vez que não houve inchamento da QUI.

A banda relacionada ao grupamento amino da QUI ocorre por volta de 1655 cm^{-1} (CHEN *et al.*, 2005). Quando esta banda é deslocada para um comprimento de onda menor é um indicativo de que ligações hidrogênio foram formadas. A Figura 4.6 (b) mostra a região do espectro de 1800 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} . Esta região abriga as bandas C=O de amida primária a aproximadamente 1646 cm^{-1} e de NH_2 por volta de 1593 cm^{-1} (LÓPEZ *et al.*, 2008). É possível observar na Figura 4.6 (b) que somente o Pré- $A_{\text{PHBCTS25\%}}$ apresenta bandas características da QUI e que estas ocorrem em comprimentos de onda menores do que na QUI pura indicando formação de ligações

hidrogênio entre o PHB e a QUI. Comportamento similar foi observado por CHEN *et al.* (2005) para blendas de PLLA e QUI.

Os Pré-arcabouços com teor de QUI variando de 2 a 25% apresentaram banda de carbonila por volta de 1720 cm^{-1} , menos intensa do que a do PHB (Figura 4.6 (b)). Esta redução foi mais acentuada no Pré- $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ onde, além da banda de carbonila podem ser observadas bandas de C = O de amida e de CN (indicadas por setas na Figura 4.6 (b))

A análise do espectro na região de 1000 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} (Figura 4.6 (c)) mostrou uma redução da banda atribuída à região cristalina do PHB em 1055 cm^{-1} . Houve um alargamento das bandas características do PHB na região que vai de 1000 cm^{-1} a 1490 cm^{-1} (Figura 4.6 (c)) relacionadas às vibrações das ligações C-O-C. O alargamento das bandas pode estar associado às mudanças na cristalinidade do PHB já que houve uma redução das bandas 1227 cm^{-1} e 1275 cm^{-1} relacionadas à cristalinidade do PHB. A variação na proporção entre as bandas 1186 cm^{-1} e 1227 cm^{-1} sugere, assim como a análises de DRX, o aumento da fase amorfa. Resultado similar foi observado por XU *et al.* (2005) que avaliou o comportamento da mistura QUI / amido.

As bandas relacionadas à porção cristalina do PHB não foram observadas no espectro do $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$, como observado na análise de DRX a cristalinidade deste arcabouço foi bem menor do a que a do PHB. Este fato pode justificar a redução dessas bandas no $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$.

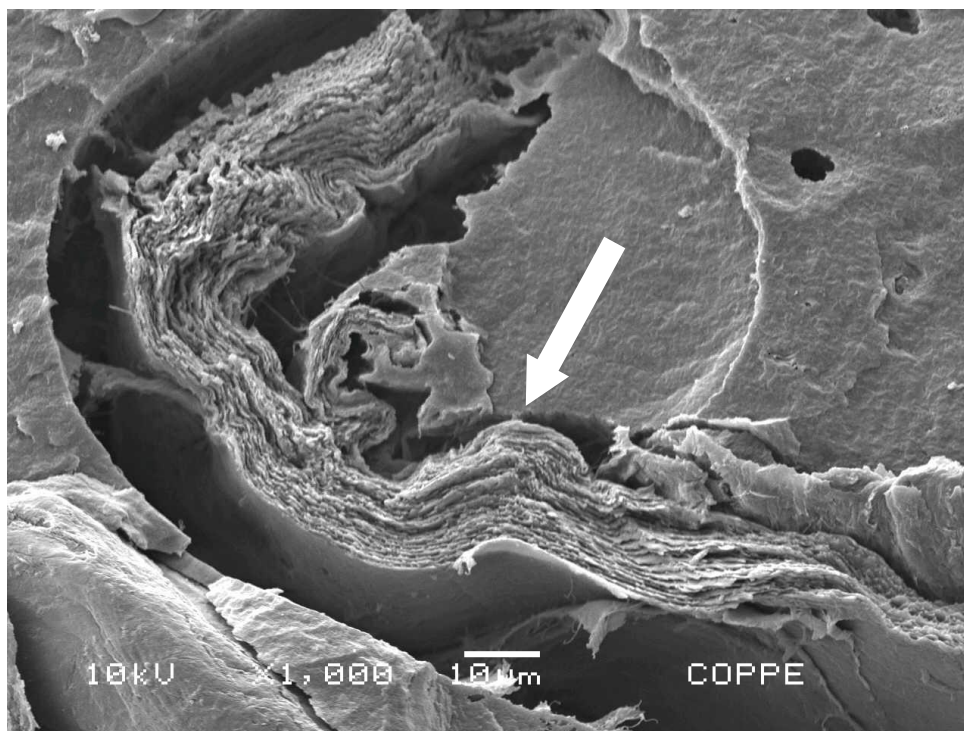


Figura 4.7 – Imagem de MEV da capa densa de um arcabouço de PHB e QUI produzido na ausência de ácido utilizando somente clorofórmio na etapa de solubilização. Note que há um espaço entre a partícula de QUI (indicada por seta) e de PHB.

4.1.5 - Inchamento dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$

A metodologia de obtenção de arcabouço aqui proposta foi baseada na observação do inchamento de partículas de QUI impregnada com clorofórmio e ácido acético na ausência de PHB. Foi observado que a QUI tende a inchar na presença de água formando uma estrutura gelatinosa como apresentado na Figura 4.8.

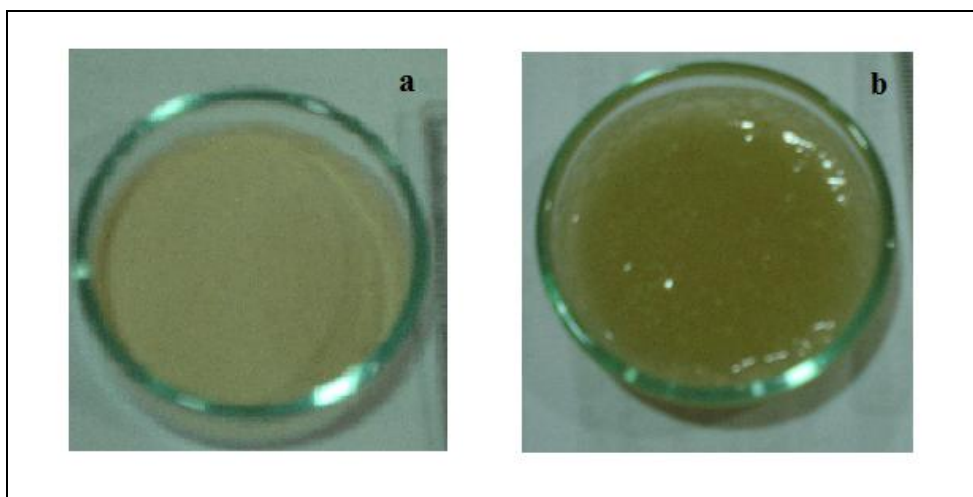


Figura 4.8 – Fotografia da QUI impregnadas com clorofórmio e ácido acético (a) e após a adição de água (b). Note a diferença de cor e aspecto brilhoso referentes à formação da estrutura gelatinosa.

A capacidade de inchamento da QUI em água e em fluidos biológicos tem sido explorada por muitos grupos de pesquisa que avaliam a formação de hidrogéis. A QUI tende a formar hidrogéis físicos (formados por ligações reversíveis oriundas de interações secundárias), hidrogéis graftizados ou simplesmente hidrogéis entrelaçados. Este último pode ser formado simplesmente pela solubilização de QUI em meio aquoso e ácido, o que configura a forma mais simples para a produção de hidrogéis de QUI (KHALID, *et al.*, 2002, BERGER, *et al.*, 2004a, BERGER, *et al.*, 2004b).

A construção dos Pré-Arcabouços foi realizada com intuito de promover este comportamento da QUI dentro da matriz de PHB. De acordo com a literatura o PHB é um material hidrofóbico e tende a absorver 1% de água (IVANTOSA *et al.*, 2011) sendo assim, o inchamento do arcabouço é atribuído à presença de QUI. Desta forma, após a evaporação do solvente os Pré-A_{PHB-QUIx} foram imersos em água para promover o inchamento da QUI em água ou em solução de FN, visando a formação do hidrogel. O grau de inchamento dos Pré-A_{PHB-QUIx} foi determinado medindo-se a massa do

arcabouço seco e a massa do arcabouço imerso em água de acordo com a Equação 5 e os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Grau de inchamento dos Pré-arcabouços.

Pré-Arcabouço	Grau de inchamento (%)
Pré-A _{PHB-QUI 2%}	51,50
Pré-A _{PHB-QUI 5%}	48,64
Pré-A _{PHB-QUI 10%}	53,09
Pré-A _{PHB-QUI 25%}	203

Os arcabouços contendo de 2 a 10% de QUI apresentaram baixo grau de inchamento quando comparados ao Pré-A_{PHB-QUI 25%}. Pela análise de DRX e de DSC o Pré-A_{PHB-QUI 25%} apresentou menor grau de cristalinidade quando comparado aos demais Pré-A_{PHB-QUIx} o que pode ter culminado em um maior grau de inchamento. A difusão de água para o interior do arcabouço pode ter sido prejudicada pela matriz de PHB. Devido ao fato do A_{PHB-QUI25%} possuir maior concentração de QUI e apresentar maior quantidade de fase amorfa o inchamento deste foi mais pronunciado. Isto porque, o efeito de barreira imposto pelo PHB foi menor devido à dispersão da QUI no arcabouço. O grau de inchamento obtido para o Pré-A_{PHB-QUI25%} é comparável ao de dispositivos de QUI (KHALID *et al.*, 2002).

4.1.6 - Análise da morfologia dos A_{PHB-QUIx}

A Figura 4.9 mostra imagens da seção de fratura dos arcabouços após a imersão em água por um período de 12 h e subsequente liofilização, ou seja, ao final da etapa 3.

Para avaliar o efeito da concentração de QUI na formação de poros foi realizado um ensaio em branco (sem QUI) onde um arcabouço denso de PHB (A_{PHB}) produzido sob as mesmas condições dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ foi imerso em água e liofilizado. Imagem de MEV da seção de fratura do A_{PHB} (Figura 4.9 a) mostrou que este não apresentou poros. Já a análise das seções de fratura dos Pré- $A_{PHB-QUIx}$ mostrou que a metodologia proposta foi eficiente na obtenção de arcabouços porosos e que a formação de poros está vinculada à presença de QUI.

De acordo com a literatura a estrutura porosa formada é consequência da técnica de produção de arcabouço empregada (PEREIRA, 2009). A estrutura porosa obtida por liofilização é similar à apresentada por ZAN *et al.* (2006) que estudou o comportamento de formulações de QUI contendo micropartículas de PHB / fluorouracil como materiais de liberação controlada de fármacos.

A morfologia dos $A_{PHB-QUI\ 2-10\%}$ é diferente da morfologia do $A_{PHB-QUI25\%}$ como pode ser observado nas Figuras 4.9 (b) a (e). Os arcabouços contendo de 2 a 10% de QUI apresentaram regiões densas (indicadas por setas), o que indica que a formação de poros nestes arcabouços foi limitada pela distribuição de QUI na matriz de PHB. A presença dessas regiões densas configura uma desvantagem para a Engenharia Tecidual uma vez que uma estrutura porosa é desejada para que ocorra difusão de nutrientes e colonização por parte das células. Desta forma, o Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$ é o mais adequado para a obtenção de arcabouços porosos de PHB/ QUI aplicáveis à Engenharia Tecidual produzidos por esta nova metodologia.

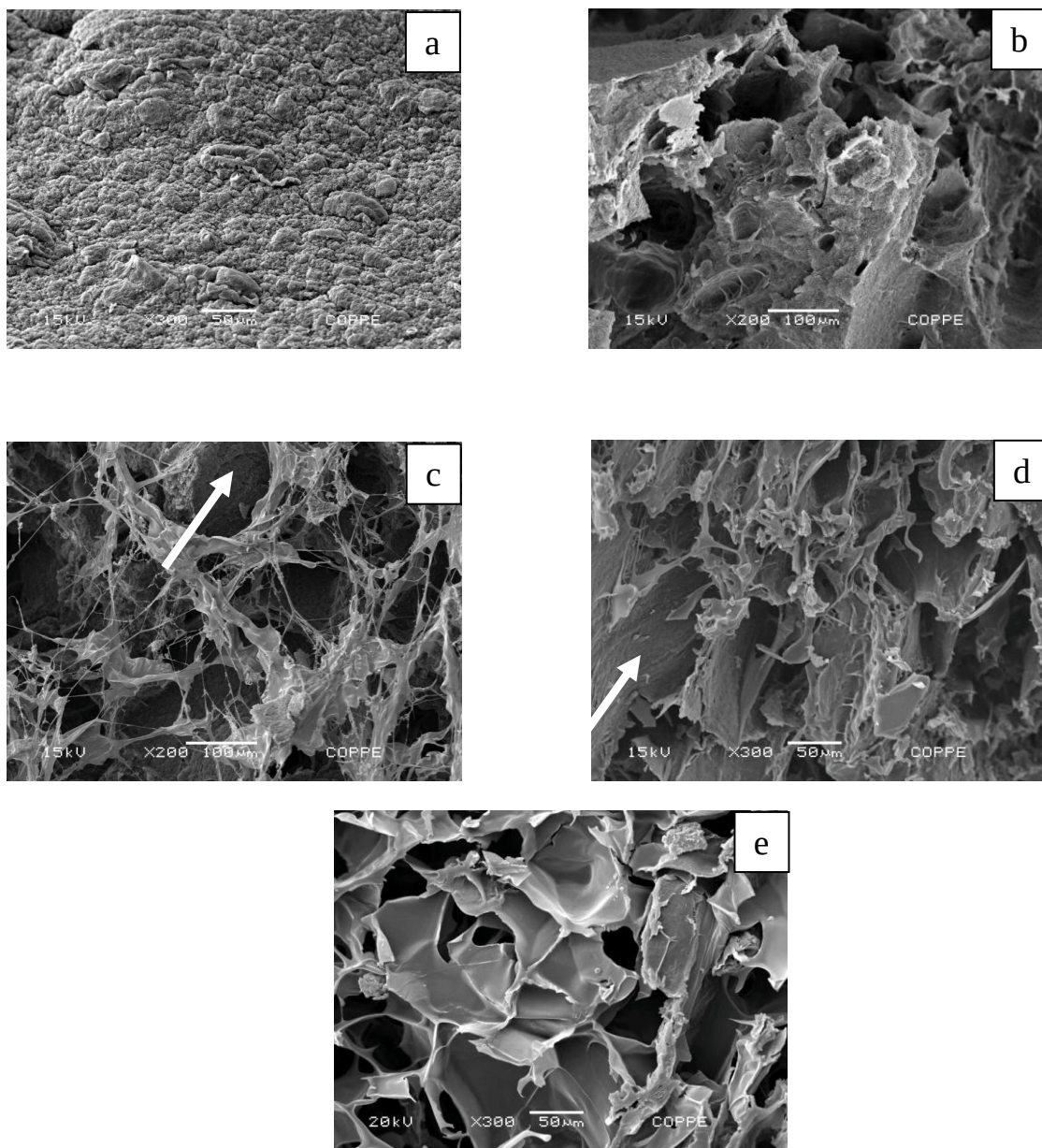


Figura 4.9 – Imagens de MEV da seção de fratura dos arcabouços: (a) A_{PHB} ; (b) $A_{PHB-QUI2\%}$; (c) $A_{PHB-QUI 5\%}$; (d) $A_{PHB-QUI 10\%}$ e (e) $A_{PHB-QUI 25\%}$. Note que o A_{PHB} não apresenta poros após a liofilização. Já as amostras contendo QUI apresentam poros.

4.1.7 - Análise da formação dos poros para o A_{PHB-QUI 25%}

Visando avaliar o processo de formação dos poros dos arcabouços contendo 25% de QUI visto que estes apresentaram estrutura porosa mais definida e menos regiões densas (Figura 4.9), os mesmos foram liofilizados após diferentes tempos de inchamento, tempos estes menores do que o estipulado nesta metodologia. O resultado pode ser observado na Figura 4.10 que apresenta as micrografias eletrônicas de varredura dos arcabouços em diferentes estágios de inchamento.

A Figura 4.10 (a) traz informações importantes a cerca do processo de formação dos poros. É possível notar a presença de QUI dispersa na matriz de PHB (assinaladas por setas) como consequência do inchamento visto que na análise de MEV do Pré-arcabouço (Figura 4.1) não é possível fazer distinção entre QUI e PHB. Nota-se que o inchamento da QUI promove a abertura da matriz de PHB. Entende-se então que ocorrem dois processos de formação de poros: o primeiro, decorrente da abertura da matriz de PHB devido ao inchamento da QUI presente no arcabouço, e o segundo formado pela eliminação da água absorvida pela QUI no processo de inchamento. A Figura 4.10 (b) apresenta uma região mais densa (indicada por setas) envolvendo uma região porosa (circunscrita) após 3 horas de inchamento. Após 6 h de inchamento a região já é quase toda tomada por estruturas porosas, no entanto, é possível observar um vazio entre essas estruturas (Figura 4.10 (c) e (d)) devido à separação das partículas de QUI por fronteiras de PHB. Na Figura 4.10 (e) é possível observar uma região densa que é atribuída ao PHB (indicada por setas). A fronteira dos poros de PHB pode ser visualizada na Figura (f). A presença dessas fronteiras delimita o crescimento da região porosa formada pela QUI.

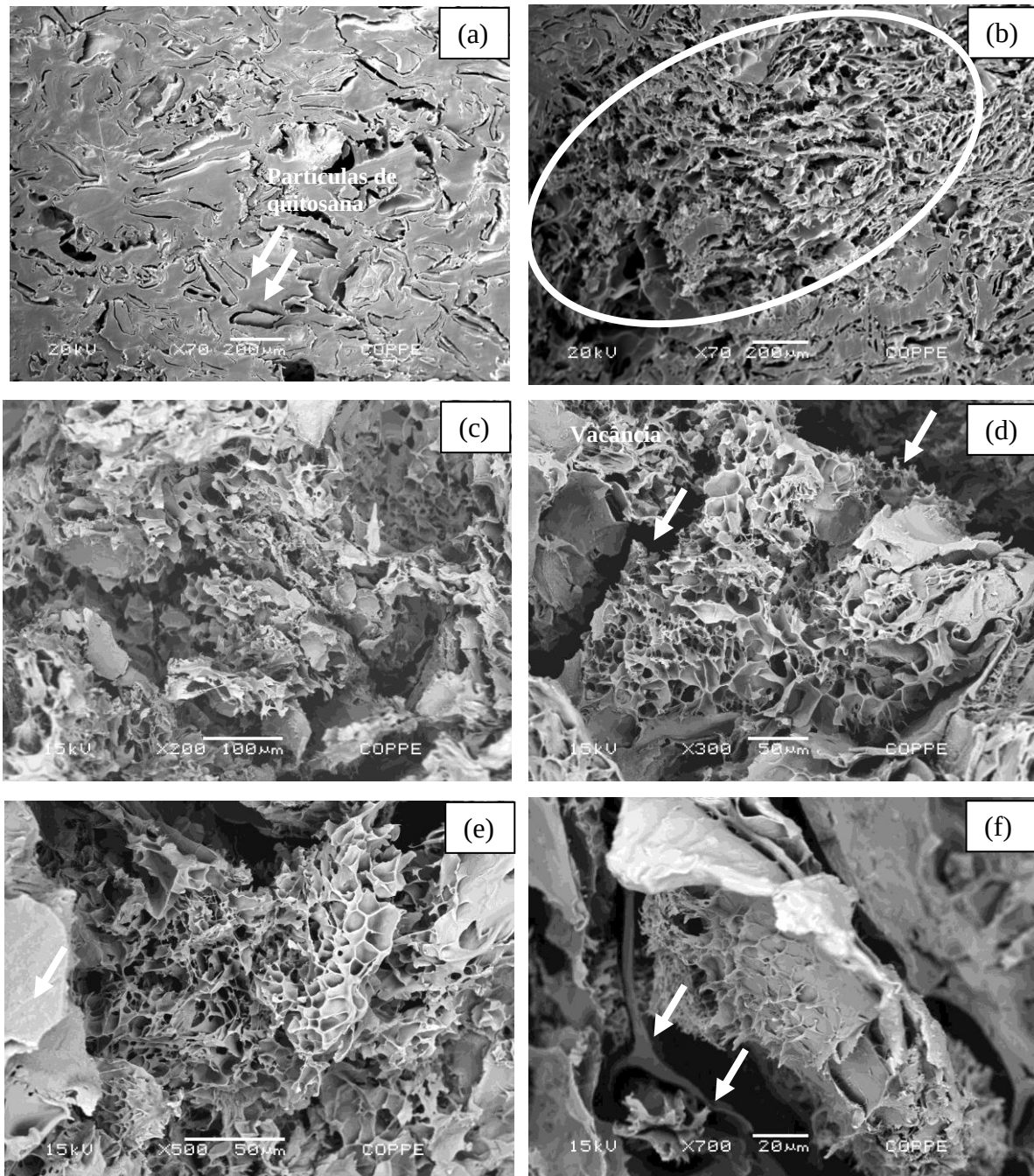


Figura 4.10 – Imagens de MEV de arcabouços de PHB e QUI liofilizados após um período de inchamento igual a: (a)2h - Note a presença de partículas inseridas na matriz de PHB (indicadas por setas) provavelmente atribuídas à QUI (material em menor quantidade); (b) 3 h- A região circunscrita apresenta um estrutura porosa circundada por uma região mais densa; (c)6h; (d) 6h – As setas indicam um

espaçamento entre duas regiões porosas e (f) 6h – Note uma estrutura porosa inserida em um poro de PHB.

4.1.8 - Cinética de inchamento e índice de dimensionalidade do Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$

QUI25%

A Figura 4.11 mostra a cinética de inchamento dos Pré- $A_{PHB-QUI25\%}$. Foi observado que o grau de inchamento aumenta em função do tempo durante o período estudado. Comportamento similar foi observado por KHALID *et al.* (2002) que estudou a cinética de inchamento de hidrogéis de QUI. Porém, no intervalo de 10 a 12h, neste trabalho, o aumento no GI foi maior do que o observado por KHALID *et al.* (2002). É possível que esse aumento no GI seja devido à abertura da matriz de PHB (Figura 4.10). De acordo com a literatura o inchamento da QUI atinge um determinado limite. No presente trabalho o limite de inchamento não foi alcançado visando não fragilizar o Pré-arca-bouço.

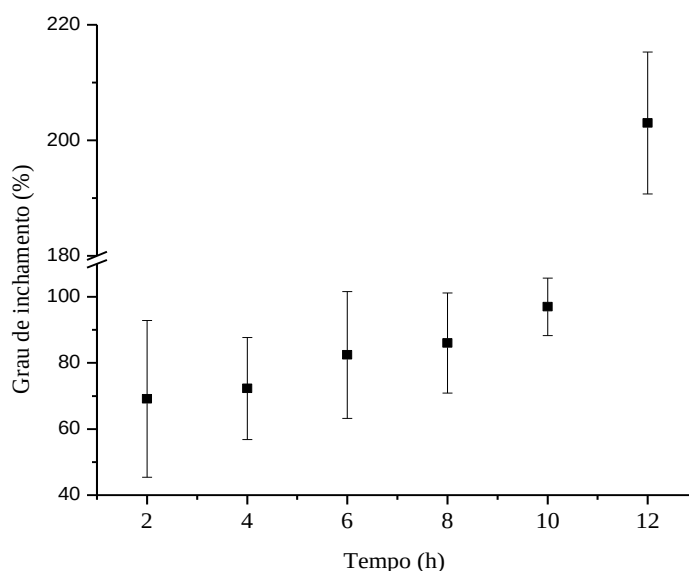


Figura 4.11 – Cinética de inchamento do Pré- $A_{PHB-QUI 25\%}$

O índice de dimensionalidade d obtido (cálculo apresentado no Anexo 2) para o período de 12 h foi igual a 2,4. De acordo com PEPPAS *et al.*, o índice d é um indicativo do comportamento anisotrópico do sistema e pode ser afetado pela presença de “barreiras” (restrições ao inchamento). Tipicamente valores de d compreendidos entre 2 e 2,5 são observados para sistemas que incham lentamente ou sistemas moderadamente hidrofílicos. O Pré- $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ constitui um sistema anfifílico onde a porção hidrofílica é atribuída à QUI e hidrofóbica ao PHB. Neste caso, o PHB restringe o inchamento devido ao seu caráter hidrofóbico como sugere a imagem de MEV apresentada na Figura 4.10 (f) que mostra arcabouços de QUI inseridos nos poros dos arcabouços de PHB.

4.1.9 - Análise morfológica das diferentes regiões dos $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$, determinação do tamanho de poros e da porosidade.

O $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ apresentou regiões com poros que diferem entre si no tamanho e na morfologia como pode ser observado nas imagens de MEV apresentadas na Figura 4.12. A diferença dos tamanhos de poros pode estar relacionada à difusão de água no arcabouço em consequência da distribuição de QUI na matriz de PHB. De acordo com HOFFMAN, (2002), hidrogéis físicos não são homogêneos devido à formação de “clusters” moleculares que causam heterogeneidades. Além disso, a diferença no tamanho de poros e na morfologia pode estar relacionada à anisotropia do inchamento.

A determinação da distribuição de tamanho de poros dos arcabouços foi realizada por análise de imagens utilizando o software Image – Pro[®] Plus 6.0 e os resultados são apresentados na Figura 4.13. Cerca de 80% dos poros são menores do que 50 μm .

As dimensões macroscópicas e microscópicas dos arcabouços bem como o tamanho de poros dos mesmos têm influência no comportamento celular. Esses fatores afetam o transporte de nutrientes e consequentemente, a formação do tecido. Diferentes tamanhos de poros são aplicáveis à Engenharia Tecidual (PATEL *et al.*, 2008).

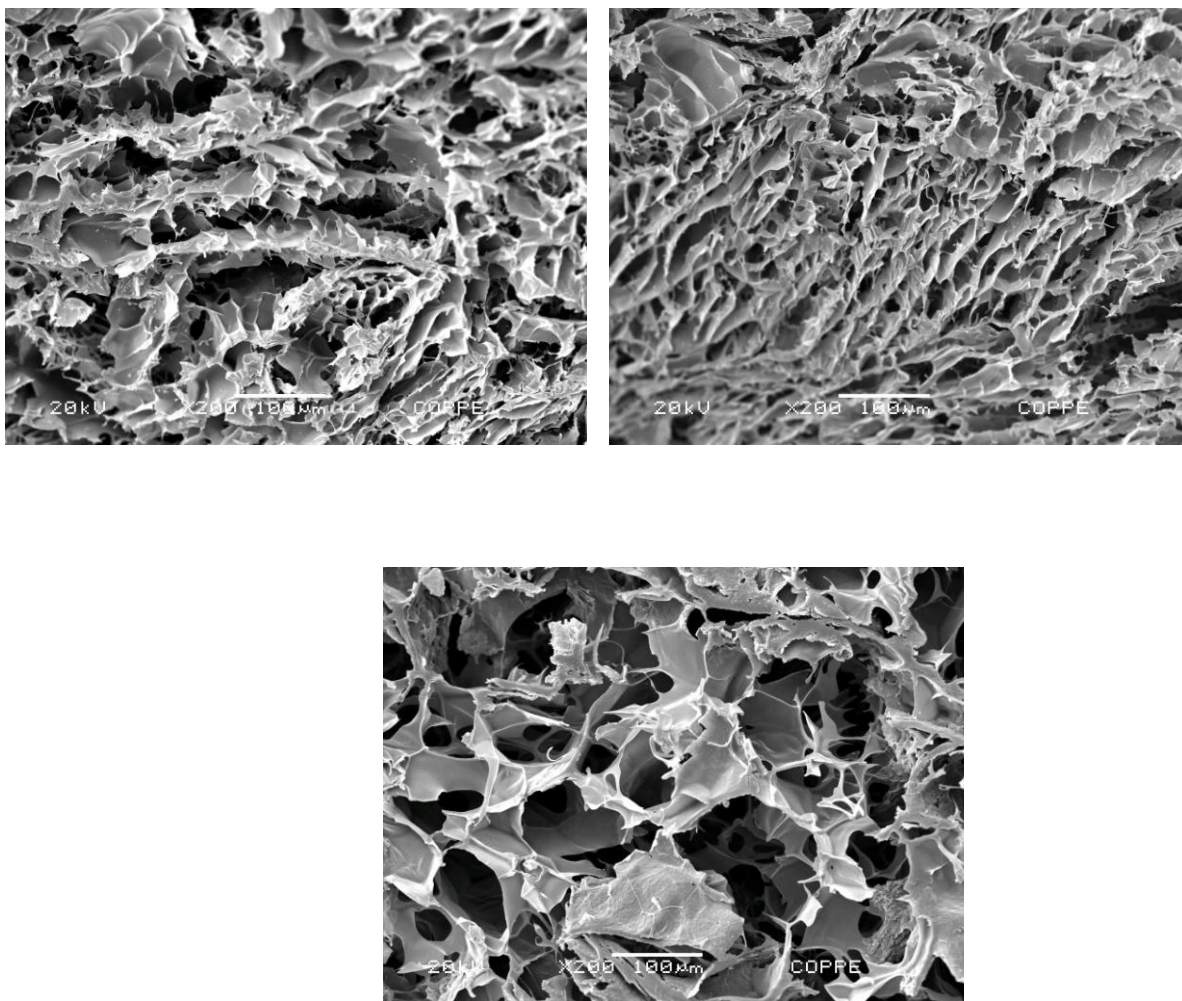


Figura 4.12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de diferentes regiões da superfície de fratura de $A_{PHB-QUI}$ 25% com diferentes aumentos ao microscópio. Note que poros com diferentes tamanhos e morfologias podem ser observados.

De acordo com ROOSA *et al.* (2009) tamanho de poros na faixa de 10 a 2250 μm tem sido utilizado em engenharia óssea resultando em diferentes graus de “*tissue in-growth*”. No caso da engenharia óssea, o tamanho de poros afeta a resposta de osteoblastos. No entanto, não há na literatura, um consenso a cerca do tamanho de poros adequados à formação do osso.

Tamanho de poros na faixa de 5 a 10 μm está relacionado ao crescimento de fibroblastos (OH *et al.*, 2007). Segundo SANTOS *et al.* (2010) células endoteliais tendem a crescer em estruturas tridimensionais com tamanho de poros na faixa de (5–20 μm) e com uma pequena distância entre os poros. O A_{PHB-QUI25%} apresentou porosidade igual 70%. De acordo com a literatura o osso apresenta porosidade na faixa de 50 a 90% (STEVENS *et al.*, 2007). Com base nesses dados é possível dizer que o A_{PHB-QUI25%} é, potencialmente, apropriado à engenharia óssea, ao crescimento de fibroblastos e a neo-vascularização.

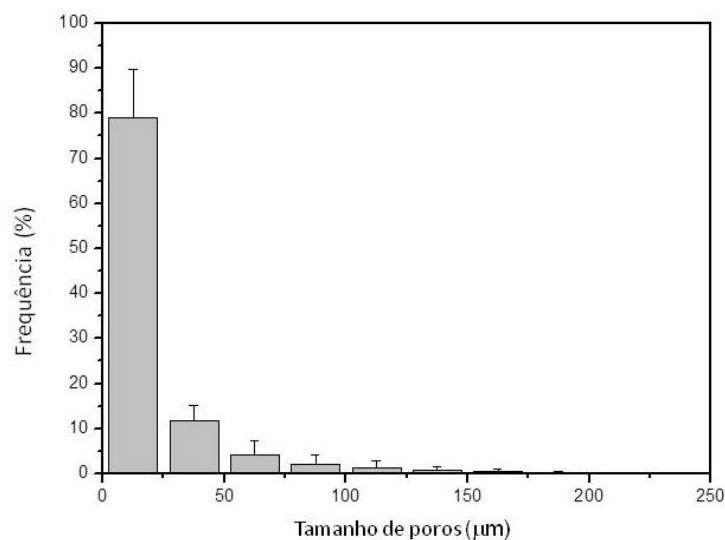


Figura 4.13 – Distribuição do tamanho de poros para o A_{PHB-QUI25%}.

4.1.10 - Efeito do inchamento e posterior liofilização na interação QUI/PHB no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$

Embora, o $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$, tenha características mais apropriadas para a aplicação em Engenharia Tecidual, visando observar o efeito do inchamento e posterior liofilização na interação QUI/PHB, análise de FTIR foi conduzida para todos os $A_{\text{PHB-QUI}x}$. Os espectros de FTIR são apresentados na Figura 4.14.

Os espectros dos arcabouços contendo de 2 a 10 % de QUI apresentaram bandas características tanto do PHB quanto da QUI o que confirma a presença de QUI nos arcabouços ao final da etapa 3, porém esses espectros diferem entre si quanto a intensidade das referidas bandas.

A presença de QUI no arcabouço após a liofilização reforça a hipótese de que a formação dos poros está associada à eliminação da água absorvida pela QUI durante a etapa de inchamento dos Pré- $A_{\text{PHB-QUI}x}$. Os arcabouços contendo de 5 a 25% de QUI apresentaram bandas atribuídas à QUI na região assinalada na Figura 4.14 (b) (banda (A)) referente ao grupamento amino. Comportamento similar foi observado para blendas de PLA/QUI (CHEN *et al.* 2005). Para o $A_{\text{PHB-QUI} 25\%}$, esta banda é mais acentuada. Além disso, no espectro do $A_{\text{PHB-QUI} 25\%}$ a banda do PHB que normalmente ocorre em 1720 cm^{-1} parece ter sido deslocada e se tornado menos aguda (Figura 4.14 (a) e Figura 4.14(b) indicada por (B)). No mesmo espectro nota-se que a banda referente ao grupo amino é mais intensa do que a observada para os demais arcabouços e para a própria QUI podendo ser, também, um indicativo da formação de um novo composto.

A comparação dos espectros de FTIR do PHB, do $A_{\text{PHB-QUI} 25\%}$ e da QUI na faixa de 2400 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (Figura 4.14), mostrou a redução das bandas características de regiões cristalinas do PHB.

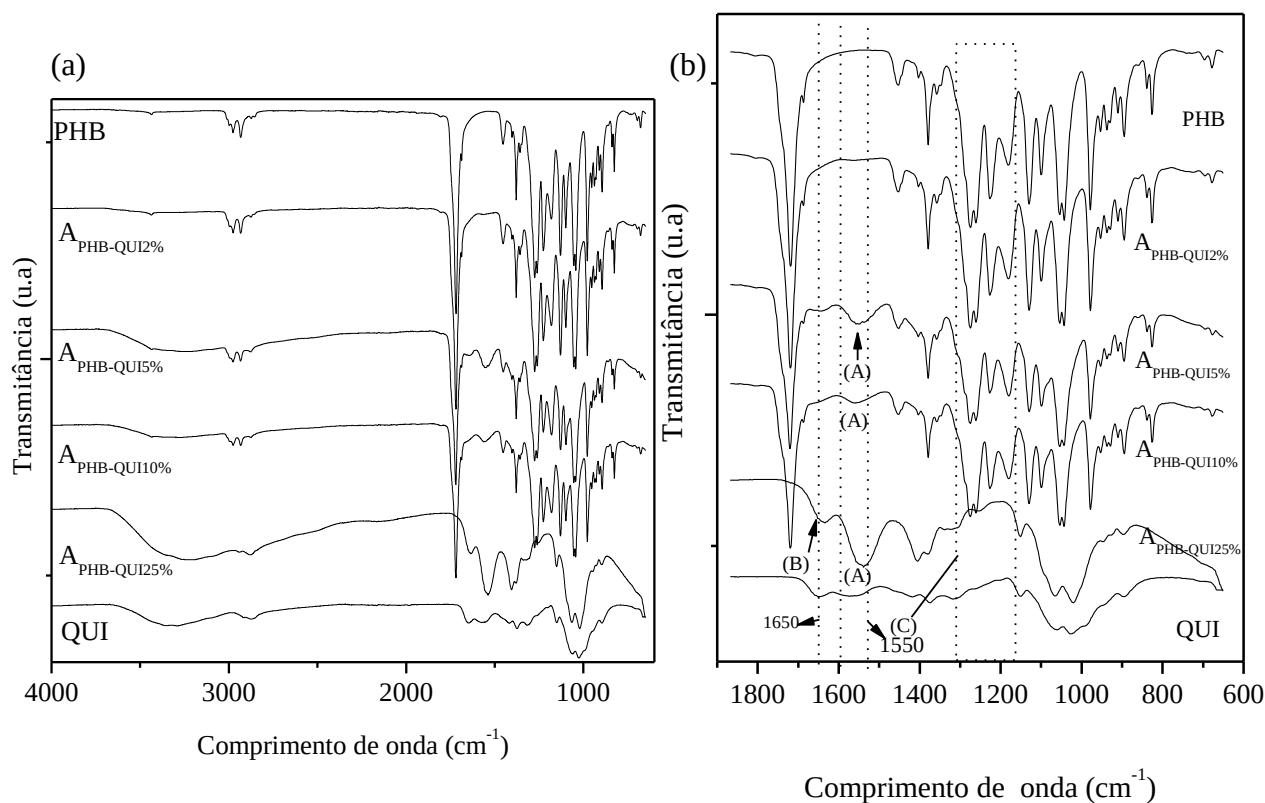


Figura 4.14- Espectros de FTIR dos A_{PHB-QUI x} (a) região de 4000 a 600cm⁻¹; (b) Detalhe de (a) onde as (A) indica variações no grupamento amino, (B) indica um possível deslocamento da banda de carbonila e (C) mostra bandas características de regiões cristalinas do PHB.

As bandas a 1279 cm⁻¹ e 1228 cm⁻¹ (indicadas na Figura 4.14 (b) (região (C))) foram suprimidas e/ou sobrepostas por bandas de QUI no A_{PHB-QUI25%}, o que pode indicar uma redução da cristalinidade do PHB (XU *et al.*, 2005) devido a interações entre a cadeia de PHB e da QUI. CHEN *et al.* (2005) avaliaram blends de PCL e QUI e observaram que as bandas associadas às regiões cristalinas da PCL também diminuíram com o aumento da concentração de QUI na mistura.

A QUI, por possuir grupos NH₂ e grupos OH livres tende a formar ligações hidrogênio com polímeros que contenham o grupo carbonila como é o caso do PHB e

da PCL (CHEN, *et al.* 2005). Uma das formas de obter informações sobre ligações hidrogênio é analisar a banda referente ao grupo amino por volta de 1650 cm^{-1} . Quando o grupo amino está envolvido em ligações hidrogênio, o número de onda da referida banda diminui (CHEN, *et al.*, 2005). Comparando o espectro dos $A_{\text{PHB-QUIx}}$ com o espectro da QUI pura (Figura 4.14), observa-se uma redução no número de onda da banda do grupo amino por volta de 1655 cm^{-1} .

No espectro da QUI (Figura 4.14) pode-se observar uma banda a 3354 cm^{-1} e outra a 3291 cm^{-1} relacionadas, respectivamente, a hidroxila e ao grupamento amino. A análise dos espectros dos $A_{\text{PHB-QUIx}}$ sugere que houve uma sobreposição das bandas associadas aos grupos citados devido a presença de água.

A Figura 4.15 apresenta o difratograma do $A_{\text{PHB-QUI 25\%}}$. A análise de DRX do $A_{\text{PHB-QUI 25\%}}$ mostrou que a redução de cristalinidade observada para os Pré-arcabouços se confirma e se intensifica após as etapas 2 e 3 do processo, quando a cristalinidade do material passou de 39% no Pré- $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ para 20% no $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$. Como apresentado na Figura 4.10, o inchamento promove a abertura de poros na matriz de PHB o que pode ter afetado as regiões cristalinas do material. Estas observações levam a uma discussão muito abrangente que será brevemente citada neste trabalho que é a formação de redes semi-interpenetrantes. A análise de FTIR também é utilizada para identificar a formação de redes semi-interpenetrantes (LEE, *et al.*, 1999). A banda entorno de 1550 cm^{-1} (Figura 4.13 (b)) pode ser atribuída à presença de grupos NH_3^+ indicando a formação de um sal de QUI que é amorfo quando comparado à QUI pura. Isto porque a formação do sal quebra as ligações hidrogênio entre os grupos amino e hidroxil da QUI. Tal fato justifica a redução da cristalinidade observada para o $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$.

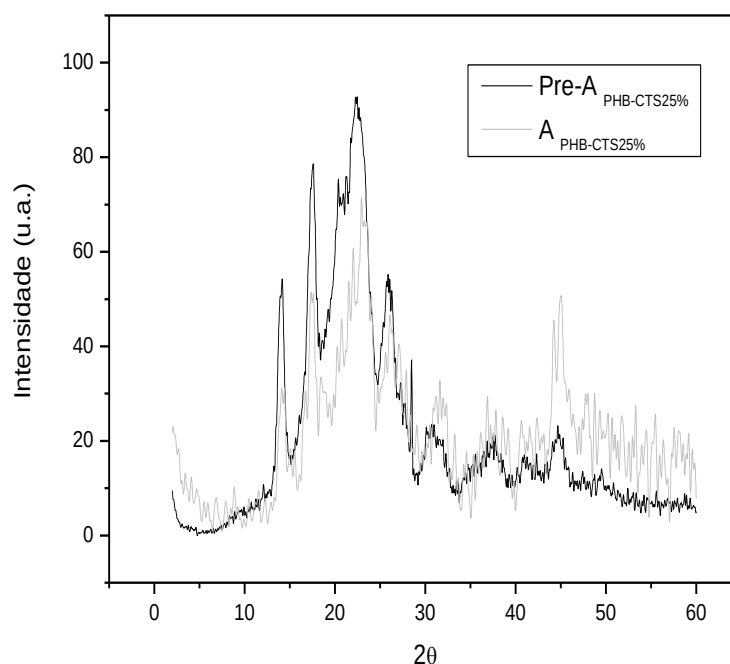


Figura 4.15 - Difratoograma de raio X do Pré-A_{PHB-QUI25%} e do A_{PHB-QUI25%}.

O A_{PHB-QUI 25%} foi também avaliado por DSC (Figura 4.16). A curva de DSC do A_{PHB-QUI 25%} diferiu da do Pré- A_{PHB-QUI 25%} e dos seus materiais constituintes. A curva do A_{PHB-QUI 25%} apresentou uma transição térmica na faixa de 25°C a 110°C que pode estar vinculada à formação de uma nova estrutura e à presença de água após o processo de liofilização.

De acordo com a literatura tanto o PHB (ZALDIVAR, *et al.*, 2011) quanto a QUI podem ser utilizados na formação de redes semi-interpenetrantes (BERGER, *et al.*, 2004a, BERGER, *et al.*, 2004b).

Como dito anteriormente, hidrogéis são estruturas capazes de inchar na presença de água e de fluidos biológicos (BERGER *et al.*, 2004 a,b). O A_{PHB-QUI 25%} apresentou GI máximo de aproximadamente 402% após 2h de inchamento. Esse valor foi maior do que o obtido para o Pré-A_{PHB-QUI25%}. Esta diferença deve-se, provavelmente, à presença de poros no arcabouço.

A análise do espectro de FTIR do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ (Figura 4.14) acrescida da acentuada redução da cristalinidade e da formação de uma nova estrutura com base na análise de DSC indica a formação de um novo composto que pode ter sido gerado a partir da formação de um hidrogel físico de QUI dentro da matriz de PHB.

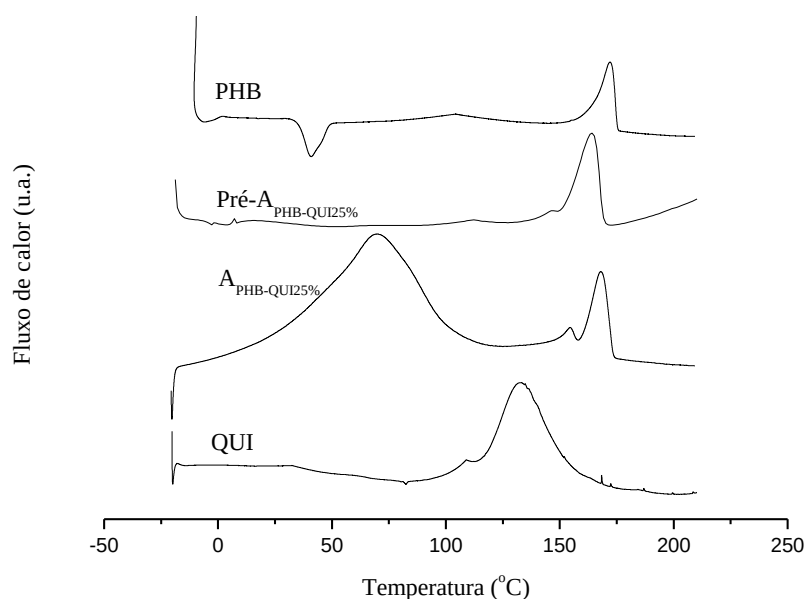


Figura 4.16- Curva de DSC referente ao primeiro aquecimento do PHB, da QUI, do Pré-
 $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ e do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$

4.1.11 - Módulo de compressibilidade

Os arcabouços porosos devem apresentar propriedades mecânicas similares as dos tecidos a serem tratados durante o período de regeneração tecidual por esta razão, o $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ foi submetido a um ensaio de compressão e a curva tensão compressiva versus deformação é apresentada na Figura 4. A curva obtida é típica de arcabouços porosos e apresenta três regiões: A primeira é definida como a região de elasticidade linear e foi com base nesta região, através da utilização de um FIT linear, que obteve-se o módulo de compressibilidade do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ que foi igual a $(13,07 \pm 0,014)$ MPa. De

acordo com a literatura (SULTANA & WANG 2008), a região de elasticidade linear é controlada pela estrutura da parede de poros. A segunda região está associada ao colapso dos poros. Já a terceira região está relacionada à densificação e ocorre quando, praticamente, todos os poros foram colapsados.

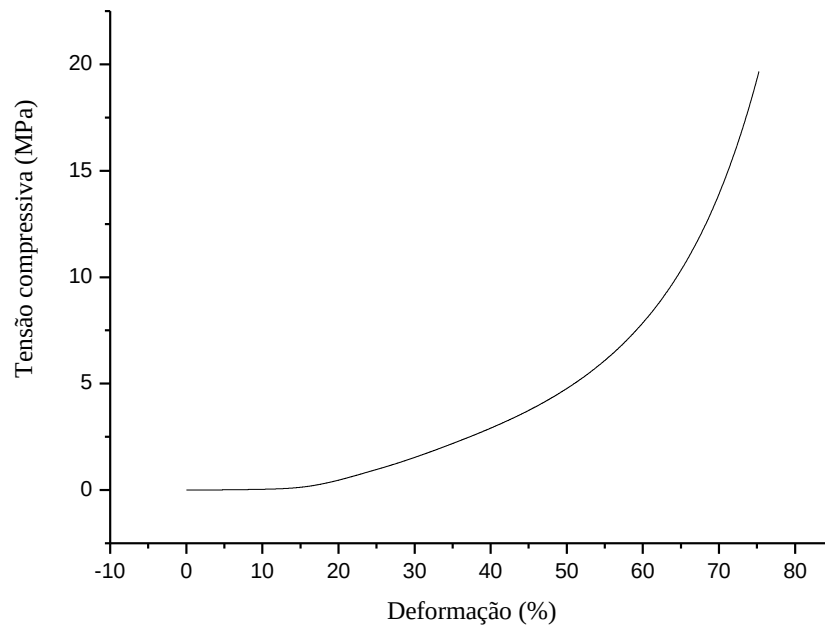


Figura 4.17 – Curva de tensão versus deformação do A_{PHB-QUI}25%.

O osso é um tecido complexo com propriedades mecânicas que dependem de sua composição e de sua estrutura. O osso cortical, por exemplo, exibe módulo de compressibilidade na faixa de 100 - 230 MPa e o osso trabecular apresenta módulo de compressibilidade na faixa de 2 – 12 MPa. Desta forma, pode-se dizer que o A_{PHB-QUI}25% possui potencial aplicação no reparo de osso trabecular. As propriedades mecânicas também são afetadas por parâmetros como, porosidade composição e natureza do material. O A_{PHB-QUI}25% apresentou módulo de compressibilidade maior do que alguns arcabouços porosos compósitos com porosidade igual a 70% aplicáveis a Engenharia tecidual. Como exemplo pode-se citar o arcabouço de policaprolactona-tricálcio fosfato,

que apresentou módulo de compressibilidade igual a 6,8 MPa (HUTMACHER *et al.*, 2007).

4.1.12 - Degradação do A_{PHB-QUI 25%}

O A_{PHB-QUI 25%} foi submetido à degradação em tampão acetato a pH 5,0. De acordo com a literatura a inflamação local, uma das possíveis respostas do organismo hospedeiro à presença de um biomaterial, ocorre a pH 5,0. Com intuito de mimetizar esta situação os arcabouços foram incubados em tampão acetato por um período de três meses. Os arcabouços degradados foram então analisados por MEV e as imagens resultantes são apresentadas na Figura 4.18. De acordo com a Figura 4.14 arcabouços porosos de QUI são formados dentro da matriz de PHB. Essa estrutura de poros atribuída à QUI não é observada na Figura 4.18. Com isso infere-se que os arcabouços de QUI formados dentro da estrutura de poros do PHB degradam mais rápido do que a estrutura de poros do PHB promovendo mudanças na distribuição do tamanho de poros (Figura 4.19). De acordo com a literatura o PHB tem uma elevada estabilidade hidrolítica e leva alguns meses para ser degradado em um meio tamponado (RENARD *et al.*, 2004). A degradação hidrolítica da QUI ocorre através da hidrólise das ligações amino. GUPTA, *et al.* (2000), avaliaram a degradação de microesferas de QUI em meio ácido e constataram que a degradação das referidas esferas ocorreu após o oitavo dia. Desta forma, o resultado de degradação obtido para o A_{PHB-QUI25%} está de acordo com a literatura.

Antes da degradação o tamanho máximo de poros foi de 175µm (Figura 4.13) e depois da degradação este valor mudou para, aproximadamente, 900 µm (Figura 4.19). Uma das grandes discussões no campo de Engenharia Tecidual é a limitação do uso de arcabouços devido à insuficiente difusão de nutrientes e de oxigênio. Esse problema surge da ocupação dos poros por células ou ainda do colapso dos poros que reduzem o

espaço para que a difusão ocorra (PHELPS *et al.*, 2009). Correlacionando este fato ao que foi observado na análise de degradação, o $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$, que tem por característica o aumento do tamanho de poros (Figura 4.18 e distribuição do tamanho de poros na Figura 4.19) pode-se inferir que o uso deste arcabouço seja promissor no que tange a minimização dos problemas relacionados ao espaço para difusão. De acordo com a Figura 4.18 (c), após 90 dias a estrutura de poros de PHB encontra-se bastante degradada. De acordo com literatura os produtos de degradação do PHB (KROEZE, *et al.*, 2009) e da QUI (MARTINO *et al.*, 2005) não são tóxicos. Segundo CORDONNIER *et al.* (2011) os produtos de degradação de arcabouços aplicáveis à engenharia óssea gerados por hidrólise e/ou digestão enzimática podem ser tolerados por um período de um mês a cinco anos.

Trabalhos recentes (COSTA-PINTO *et al.*, 2011, CORDONNIER *et al.*, 2011) tem mostrado que uma das limitações na utilização de arcabouços é a adequada vascularização. Nesse contexto tem sido discutida a confecção de arcabouços com propriedades que induzam a neo-vascularização nas etapas iniciais. O $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ possui, inicialmente, tamanho de poros adequados a neo-vascularização e, com o passar do tempo o tamanho de poros aumenta sendo adequado à proliferação de osteoblastos. Segundo ROOSA *et al.* (2010) e ISHAUG *et al.* (1997) poros na faixa de 100 μm a 400 μm induzem a regeneração óssea e poros na faixa de 200 μm a 350 μm são apropriados à osteocondução.

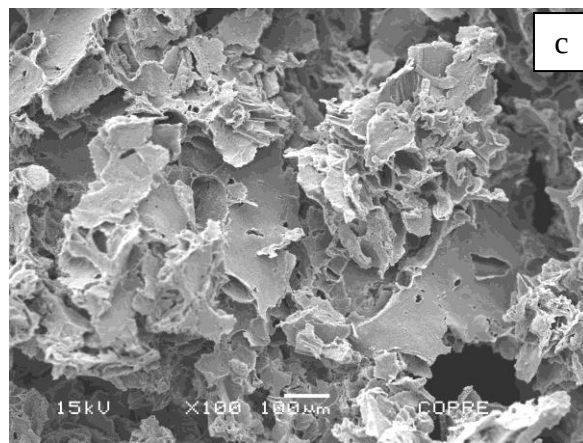
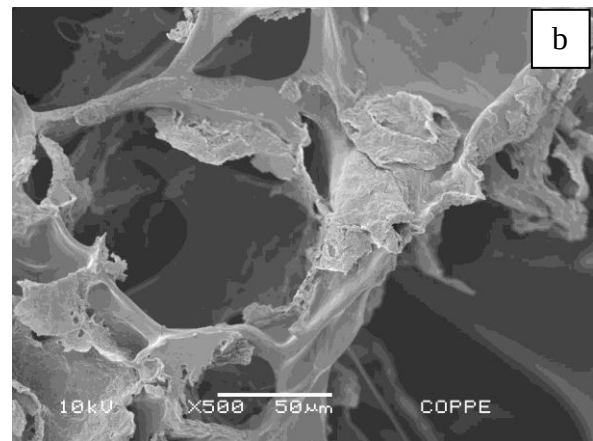
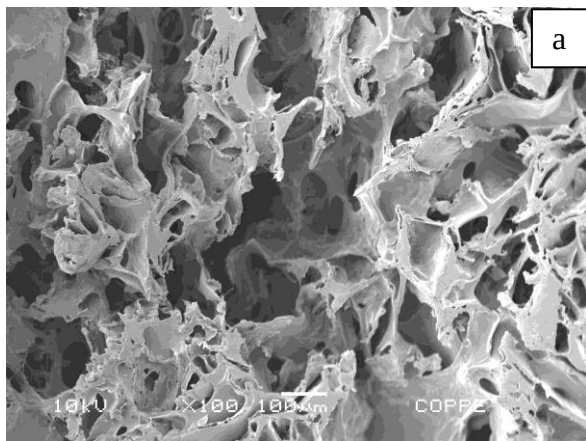


Figura 4.18 - Imagens de MEV da superfície de fratura de $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ degradados por:

(a) 10 dias; (b); 10 dias e (c) 90 dias.

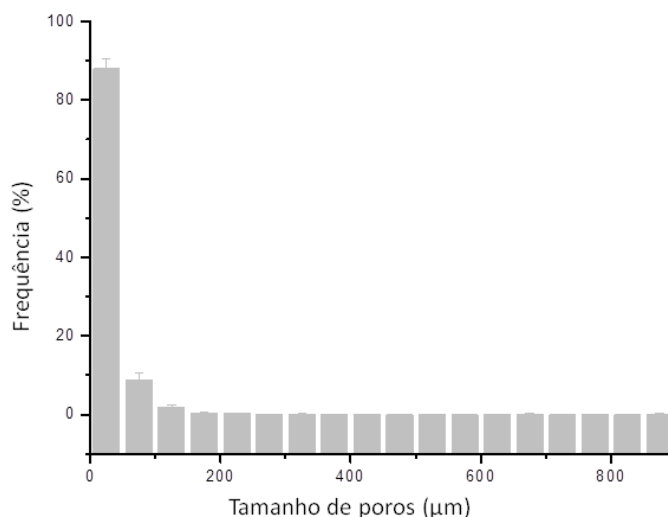


Figura 4.19 – Distribuição do tamanho de poros dos $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ após 10 dias de degradação

4.2 – Arcabouços de PHB e QUI biossinalizados com FN ($A_{\text{PHB-QUI}}^{\text{FN}}$)

Os arcabouços de PHB e QUI biossinalizados com fibronectina ($A_{\text{PHB-QUI}}^{\text{FN}}$) foram obtidos a partir do Pré- $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ devido ao fato deste ter dado origem a um arcabouço poroso com estrutura de poros mais definida do que os demais Pré-arcabouços. Além disso, o arcabouço poroso produzido a partir do Pré- $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ apresentou uma melhor distribuição de QUI na matriz de PHB e, portanto, uma melhor interação entre PHB e QUI. Sendo assim, o Pré- $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ foi imerso em solução de FN a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão PBS a pH 6,0 por 12 h para promover o inchamento das partículas de QUI em solução de FN.

4.2.1 - Inchamento do Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$

O Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ apresentou grau de inchamento igual a 126% em solução de FN dando origem ao Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$, sendo que o grau de inchamento obtido para imersão em água foi de 203% (Tabela 4.6). Esta diferença no grau de inchamento pode está relacionada à difusão do fluido para o interior do arcabouço e à interação entre o fluido de inchamento e o Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$. Além disso, a deposição de FN na superfície dos arcabouços (item IV) também pode ter contribuído para um menor grau de inchamento.

4.2.2 - Análise da morfologia dos $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ e distribuição do tamanho de poros.

Após inchamento em solução de FN o Pré- $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ foi congelado e, na sequência, liofilizado para a obtenção da estrutura porosa, em procedimento similar ao realizado para o inchamento em água. O arcabouço resultante, $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$, foi analisado por MEV e as imagens da seção de fratura do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ são apresentadas na Figura 4.20.

É possível observar na Figura 4.20 (a) a presença de regiões densas não porosas que são atribuídas ao PHB, assim como foi observado no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ (Figura 4.10). Os poros presentes no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ diferem daqueles obtidos no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ quanto a morfologia. Essa alteração morfológica pode estar relacionada com o tipo de cristal formado no interior do arcabouço durante a etapa de congelamento que antecedeu a liofilização. Os $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$ apresentaram poros arredondados ao passo que os $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ apresentaram poros alongados. Ambos os arcabouços apresentaram poros interconectados, no entanto, a presença de regiões densas foi mais acentuada no $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$.

QUI 25%^{FN} provavelmente devido a difusão de solução de FN no arcabouço e ao grau de inchamento.

Duas estruturas de poros distintas podem ser observadas na Figura 4.20: uma formada pela expansão das partículas de QUI devido ao inchamento e, dentro desta uma outra estrutura porosa decorrente da eliminação do fluido absorvido pela QUI. Assim como o A_{PHB-QUI} 25%, o A_{PHB-QUI} 25%^{FN} apresentou regiões com tamanho de poros distintos.

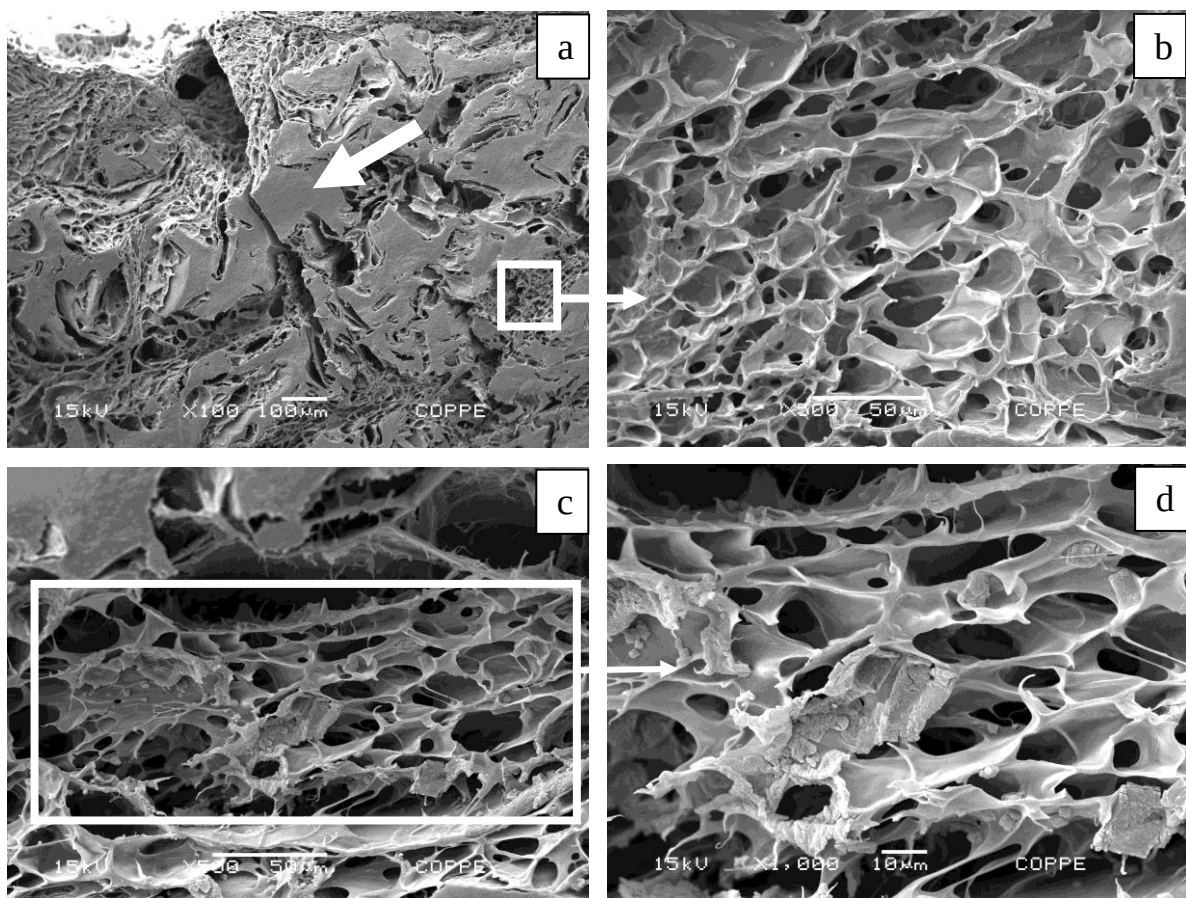


Figura 4.20.- Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção de fratura do A_{PHB-QUI} 25%^{FN}: (a) observe a presença de regiões densas indicada por setas; (b) detalhe da região assinalada em (a); (c) observe a estrutura de poros inserida na matriz densa de PHB e (d) detalhe da região assinalada em (c).

A Figura 4.21 mostra a distribuição do tamanho de poros do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$. Assim como o $A_{PHB-QUI25\%}$ no $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ a maioria dos poros ficaram abaixo de 50 μ m. No entanto, o $A_{PHB-QUI25\%}$ apresentou tamanho de poros máximo de aproximadamente 200 μ m ao passo que o $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ apresentou tamanho máximo igual a 110 μ m. Isso, provavelmente, devido ao diferente grau de inchamento.

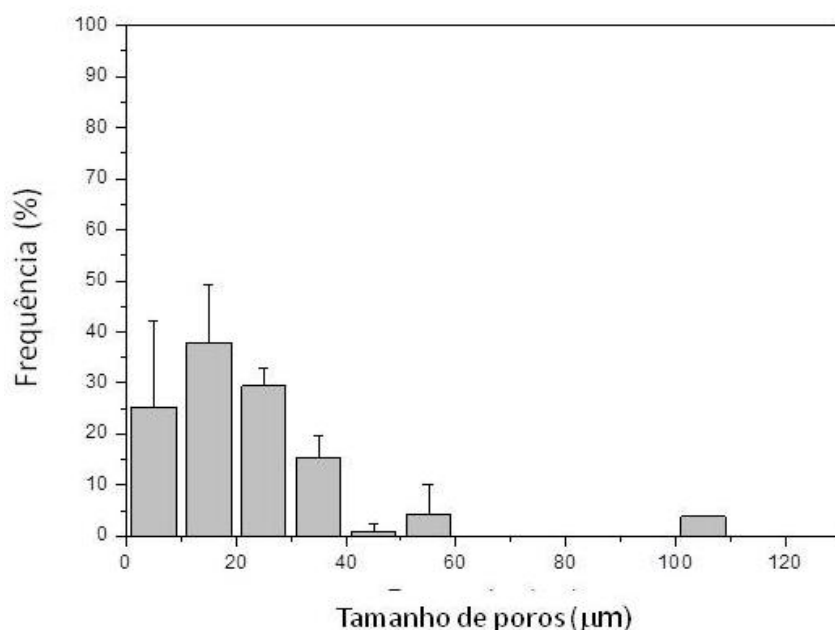


Figura 4.21 – Distribuição do tamanho de poros do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$

4.2.3 - Efeito do inchamento e posterior liofilização na interação FN/QUI/PHB no $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$

A molécula de FN intacta é flexível e pode sofrer alteração na sua conformação global devido ao processo de absorção. Mudanças na estrutura secundária da FN podem ser avaliadas por FTIR. Os $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ foram analisados por FTIR e o espectro obtido pode ser observado na Figura 4.22. O espectro do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ na região de

4000 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} apresentou bandas características da QUI a 3354 cm^{-1} e a 3291 cm^{-1} relativas, respectivamente, ao grupos hidroxil e amino e banda característica do PHB em 1720 cm^{-1} . O espectro do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ na região de 1700 cm^{-1} a 400 cm^{-1} apresentou bandas que diferem tanto do PHB quanto da QUI sugerindo a sobreposição dessas bandas. De acordo com BAUJARD-LAMOTTE *et al.* (2008) a região de 1500 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} abriga bandas características da FN tais como: amida II correspondente às ligações NH de peptídeos (de 1500 a 1550 cm^{-1}), de COO^- relativas ao grupos carboxílicos dos peptídeos Asp e Glu (de 1550 a 1500 cm^{-1}). Comparando o espectro da QUI Figura 4.22 com o espectro do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ fica nítido o aumento da banda situada na região de 1550 a 1500 cm^{-1} (Ver detalhe da Figura 4.22) que está relacionada à presença de FN. Além disso, uma banda característica de aminoácidos pode ser observada na região de 1610 a 1700 cm^{-1} . De acordo com BAUJARD-LAMOTTE, *et al.* (2008) essa banda pode ser decomposta em sete outras relativas aos grupos funcionais da FN quando esta se encontra no estado líquido. A deconvolução da banda na região de 1610 a 1700 cm^{-1} é apresentada na Figura 4.23. Após a deconvolução três bandas foram localizadas em 1660 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} , relativas aos domínios folhas β hidratadas, folhas β desidratadas, e domínios aleatórios hidratados, respectivamente. Resultado similar foi obtido por BAUJARD-LAMOTTE, *et al* (2008) para FN no estado sólido depositada sobre a superfície de poliestireno.

A razão entre as áreas sob as curvas referentes a cada componente em a área da banda de amida primária fornece o percentual correspondente a cada estrutura. A Tabela 4.7 mostra as proporções entre os domínios hidratados, não hidratados e randômicos da FN.

Tabela - Proporções entre os domínios hidratados, não hidratados e randômicos da FN.

Domínios	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Percentual
Randômicos	1628	9,71
Folhas β não hidratadas	1645	8,60
Folhas β hidratadas	1660	4,77

De acordo com a literatura a FN nativa, no estado líquido, apresenta cerca de 28% de domínios não hidratados, 16% de domínios hidratados e 11,5% de domínios randômicos. Quando adsorvida em superfície de PS apresenta cerca de 10% de domínios não hidratados e 27,5% de domínios hidratados (BAUJARD-LAMOTTE, *et al* 2008). No presente trabalho o percentual de domínios randômicos foi maior do que os de domínio hidratados e não hidratados. Além disso, o percentual de domínios hidratados foi menor do que o de domínios não hidratados indicando alterações na conformação da FN em comparação à nativa.

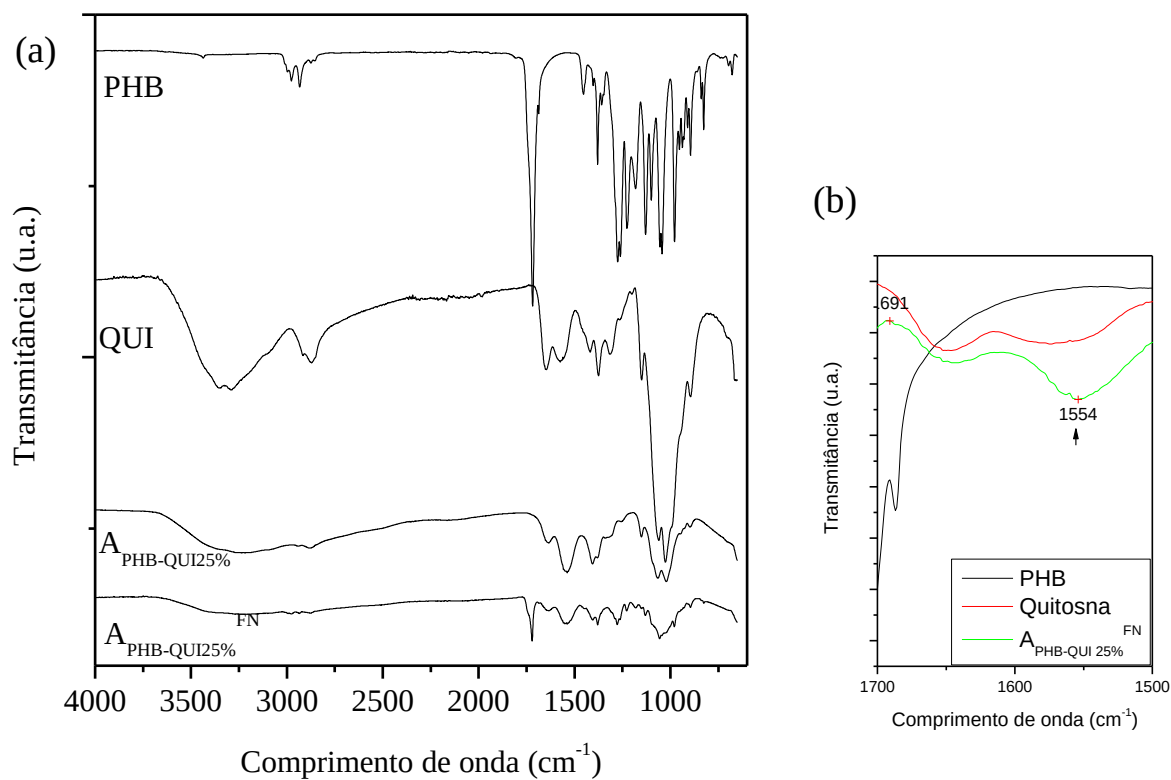


Figura 4.22 – Espectro de FTIR da QUI, do PHB, do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}$ e do $A_{\text{PHB-QUI}25\%}^{\text{FN}}$:
 (a) na região de 4000cm^{-1} a 600cm^{-1} e (b) detalhe mostrando a região de 1700 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} que contém bandas características de FN.

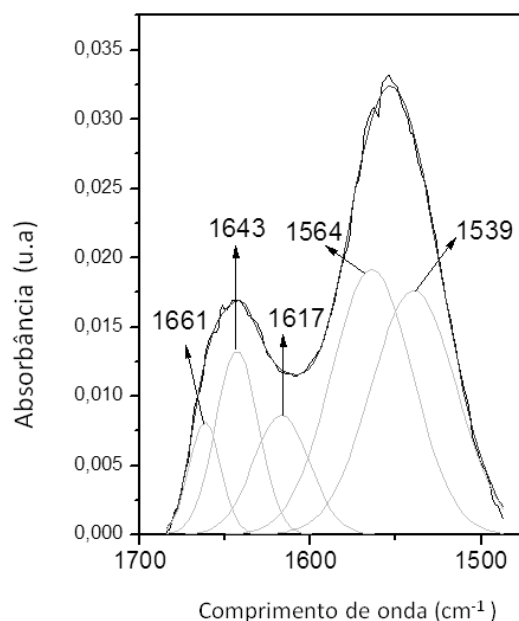


Figura 4.23 – Espectro de FTIR do $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ na região de 1700 cm^{-1} a 1550 cm^{-1} . As curvas em cinza são referentes à deconvolução.

4.2.4 - Identificação de FN na superfície dos $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ por quimiluminescência e AFM

Visando avaliar a eficiência da metodologia na biossinalização dos arcabouços, os $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ foram analisados por quimiluminescência e o resultado da análise pode ser observado na Figura 4.24. Na técnica de quimiluminescência um anticorpo é utilizado para se ligar à proteína. A presença de FN na superfície analisada é confirmada quando um sinal luminoso é emitido pela amostra. Com base na imagem apresentada na Figura 4.24, conclui-se que o $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ contém FN.

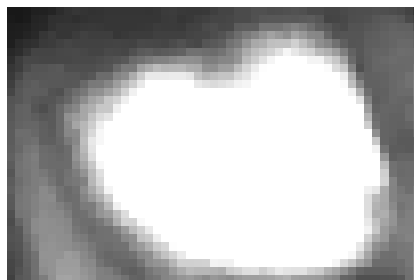


Figura 4.24 – Fotografia do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ (região brilhosa associada à presença de FN).

Para avaliar a distribuição de FN na superfície do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ este foi submetido a análise de microscopia de força atômica juntamente com o $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ para observar possíveis alterações na topografia e na composição da superfície pela análise do contraste de fase. As imagens de AFM são apresentadas na Figura 4.25.

De acordo com a imagem de topografia (Figura 4.25 (a)) a superfície do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ apresenta estruturas arredondadas bem definidas. Já a imagem de topografia do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ (Figura 4.25 c) não apresentou essas estruturas sugerindo a formação de um filme sobre a superfície do arcabouço. Este filme, de acordo com a análise de quimiluminescência está relacionado à presença de FN na superfície do arcabouço. A presença desse filme pode ter afetado a difusão da solução de FN para o interior do arcabouço resultando em um grau de inchamento menor do que o alcançado quando o Pré- $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ foi inchado em água.

Imagens de contraste de fase da superfície dos $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ (Figura 4.25 b) mostraram que esta é composta por dois materiais distintos, no caso PHB e QUI, como indicou a análise de FTIR (Figura 4.14). A parte mais escura é relacionada à QUI que é o material em menor quantidade (25% p/p), portanto, disperso na matriz de PHB. Já a imagem de contraste de fase do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ (Figura 4.25 d) foi bem diferente daquela obtida para o $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ sugerindo que o filme formado na superfície não é

homogêneo, visto que algumas regiões apresentam contrastes de fase diferentes. Esta diferença pode ser associada aos diferentes tipos de interação entre a FN e os materiais constituintes do arcabouço.

De acordo com a literatura, devido à natureza catiônica, a QUI tende a interagir com proteínas como a FN. Já o PHB não apresenta grupos funcionais disponíveis para a interação com a FN. Tal fato pode justificar os diferentes contrastes de fase observados na Figura 4.25 (d). Por outro lado, FN pode ter sido depositada sobre regiões que já continham FN dado este que também pode justificar diferentes contrastes de fase.

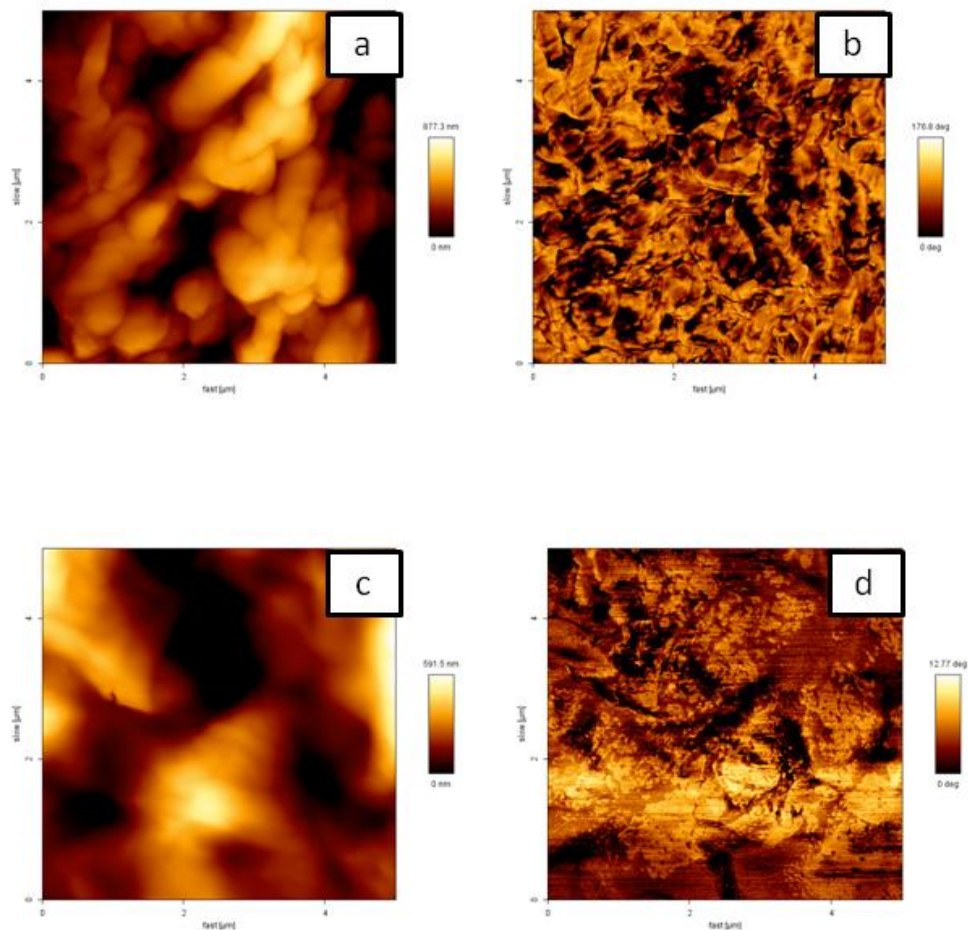


Figura 4.25 - Imagens de microscopia de força atômica da superfície dos arcabouços:

$A_{PHB-QUI25\%}$ (a) topografia (b) fase e $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ (c) topografia e (d) fase.

4.2.5 - Dessorção de FN em meio de cultura para osteoblastos

Para avaliar a dessorção de FN os arcabouços foram imersos em meio de cultura para osteoblastos e avaliados por quimiluminescência. Foi observado (Figura 4.26 (a)) que após 24h, parte da FN adsorvida à superfície do arcabouço foi dessorvida. No entanto, foi observado que a porção inferior do arcabouço (indicada por setas) apresentou luminosidade indicando a presença de proteína na estrutura de poros. Visando facilitar a visualização uma imagem de contraste invertido é também apresentada (Figura 4.26 (b)).

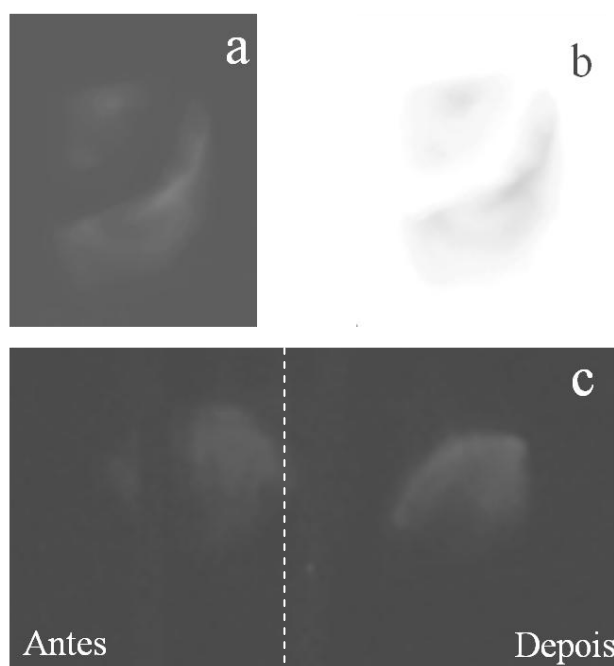


Figura 4.26 – (a) Fotografia do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ (1/4 do arcabouço que, originalmente possui formato cilíndrico) após 24 h de imersão de meio de cultura para osteoblastos (região brilhosa associada à presença de FN); (b) Refere-se à mesma imagem mostra em a porém com contraste invertido o que significa que a região escura contém FN e (c) Seção de fratura dos antes e após a dessorção. Note que ainda há FN no arcabouço.

A imagem de quimiluminescência mostrou que, após 24h, a intensidade do brilho atribuído à presença da FN na superfície diminuiu. Além disso, é possível perceber a presença de pontos mais luminosos na superfície do arcabouço indicando que a dessorção na superfície não ocorre uniformemente. Já a região interna do arcabouço continuou apresentando luminosidade intensa o que indica que, após 24h FN ainda permanece no arcabouço. Esta heterogeneidade na dessorção, provavelmente, deve-se ao fato do arcabouço ser constituído por dois materiais: um com forte interação com a FN, a QUI, e outro não, o PHB.

4.2.6 - Módulo de compressibilidade

A curva tensão compressiva versus deformação do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ (Figura 4.27) apresentou comportamento similar à curva do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ (Figura 4.17). O $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ apresentou módulo de compressibilidade igual a (18.0 ± 0.03) MPa mostrando-se mais resistente à compressão do que o $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$ que apresentou módulo de compressibilidade igual a $(13,07 \pm 0,01)$ MPa. Esta diferença pode ser atribuída às diferentes estruturas porosas. Embora o módulo de compressibilidade do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ seja maior, o mesmo também pode ser aplicado à regeneração de osso trabecular (HUTMACHER, *et al* 2007).

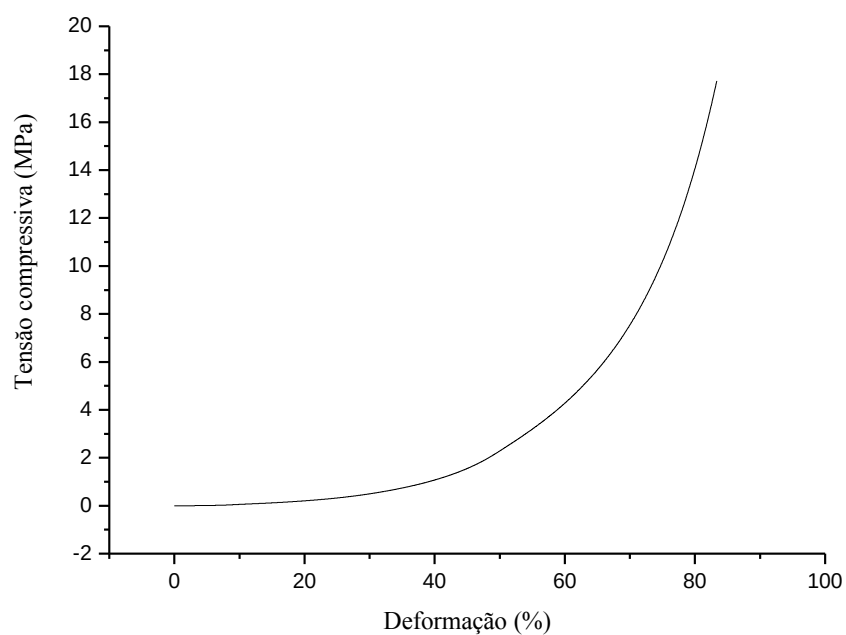


Figura 4.27 - Curva de tensão versus deformação do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$.

4.2.7 - Degradação do $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$

Os $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ assim como os $A_{PHB-QUI25\%}$ foram submetidos a análise de degradação em tampão acetato. As imagens de MEV dos arcabouços degradados são apresentadas na Figura 4.28.

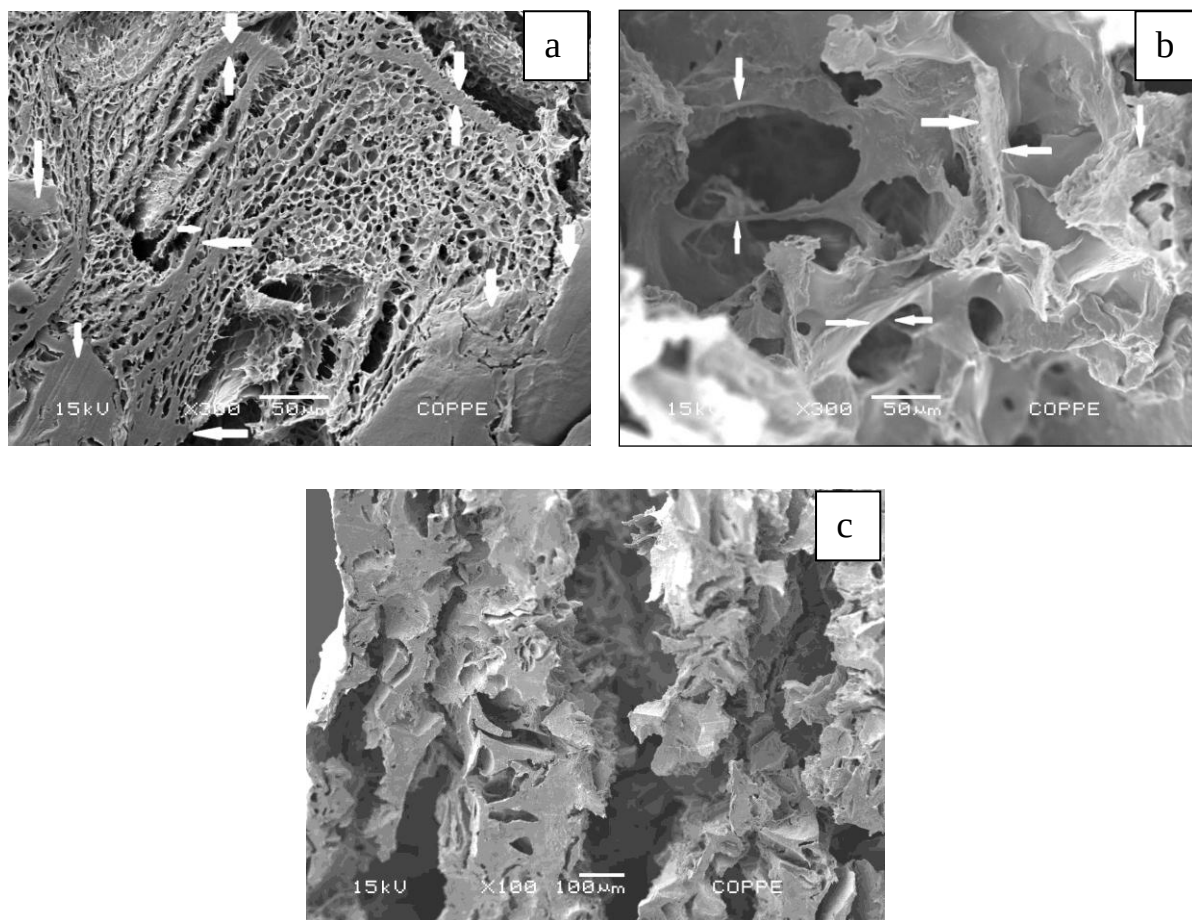


Figura 4.28 – Imagens de MEV: (a) $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$; (b) $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ degradado após 10 dias e (c) após 90 dias.

A Figura 4.28 (a) mostra uma imagem de MEV do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ antes da degradação onde é possível observar as bordas dos poros de PHB (indicadas por setas). Após 10 dias de degradação, assim como observado para o $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}$, ocorreu a degradação do arcabouço de QUI dando origem a um arcabouço com tamanho de poros maior do que antes da degradação. A Figura 4.29 mostra a distribuição de poros do $A_{\text{PHB-QUI } 25\%}^{\text{FN}}$ degradado. Esta nova faixa de tamanho de poros é adequada à engenharia óssea (ROOSA *et al.*, 2010). Neste caso em que se trata de um arcabouço funcionalizado a diferença entre a taxa de degradação do arcabouço de QUI e de PHB e

a capacidade de dessorção faz com que o $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$ possa ser utilizado como material para liberação controlada. De acordo com a literatura (CORDONNIER *et al.*, 2011) é interessante que os arcabouços aplicáveis à engenharia óssea sejam biossinalizados e capazes de liberar fatores de crescimento e/ou moléculas biossinalizadoras.

Assim como o $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ o $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$ apresentou, após 90 dias, estrutura de poros bastante degradada.

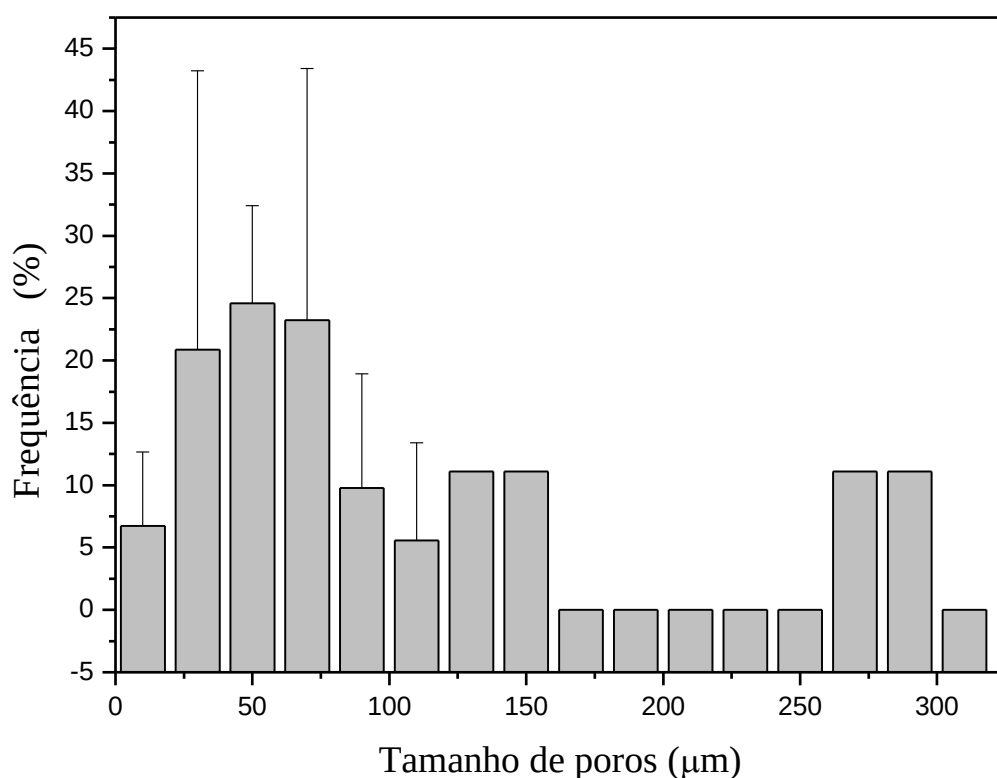


Figura 4.29 - Distribuição do tamanho de poros do $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$

4.3- Análise da Citotoxicidade do $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ e do $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$.

Os arcabouços $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ e $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$ foram submetidos a análise de citotoxicidade e os resultados das análises de XTT, NR e CVDE, são apresentados,

respectivamente, nas Figuras 4.32, 4.33 e 4.34. Todos os resultados foram estatisticamente analisados para um intervalo de confiança com parâmetro p menor do que 0,05. A análise de XTT (Figura 4.32) mostrou que não há diferença significativa entre a atividade respiratória celular entre os arcabouços e o controle.

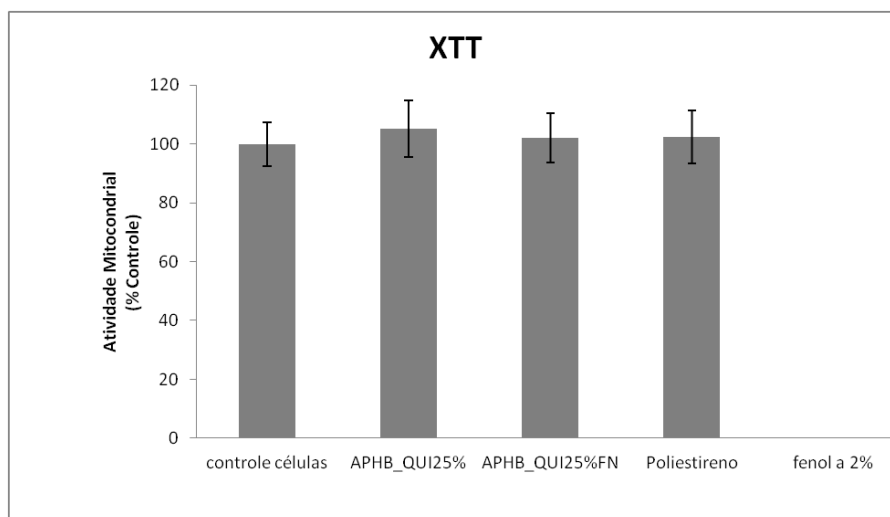


Figura 4.30 – Resultado da análise de XTT para o $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ e o $A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$

A análise de VN (Figura 4.33) mostrou que não houve alteração significativa na viabilidade celular dos arcabouços em comparação ao controle. De acordo com os resultados da análise CVDE (Figura 4.34) a densidade celular não foi afetada pelos arcabouços. Com base nesses resultados apresentados, tanto o $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ quanto $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$ não são citotóxicos.

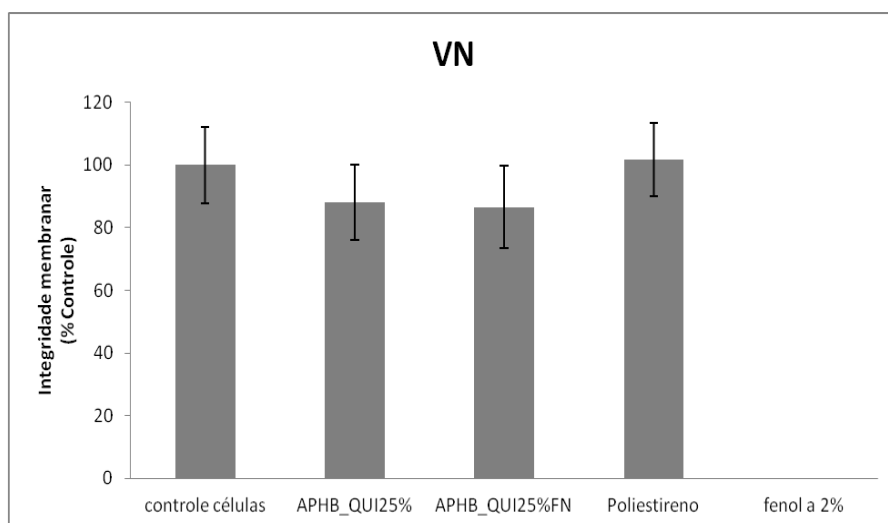


Figura 4.31 – Resultado da análise de vermelho neutro (VN) para o $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ e o

$A_{PHB-QUI\ 25\%}^{FN}$

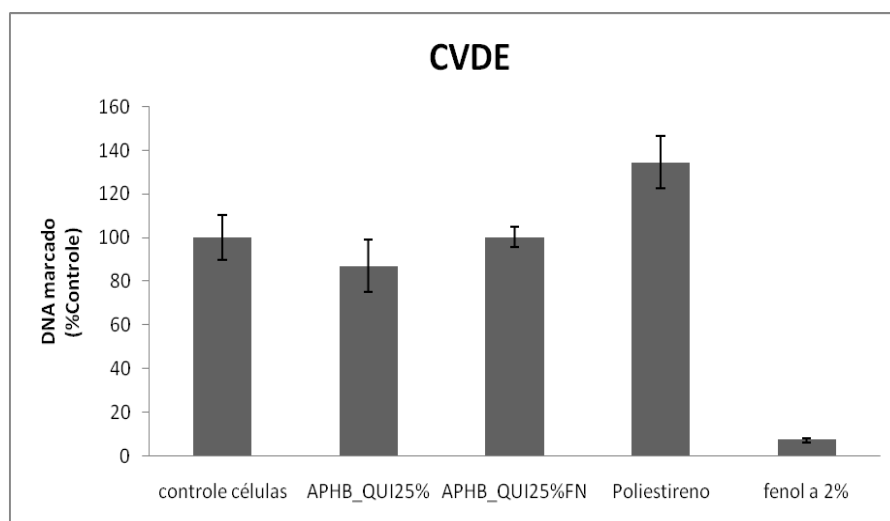


Figura 4.32 – Resultado da análise de CVDE para o $A_{PHB-QUI\ 25\%}$ e o $A_{PHB-QUI25\%}^{FN}$

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia apresentada neste trabalho é nova e permite a funcionalização do volume e da superfície do arcabouço durante o processo produtivo, o que é uma vantagem, pois introduz no arcabouço de PHB grupos que posteriormente podem ser utilizados na imobilização de moléculas bioativas. Esta metodologia, a qual utiliza a QUI como agente porogênico, pode ser sumarizada de acordo com a Figura 5.1.

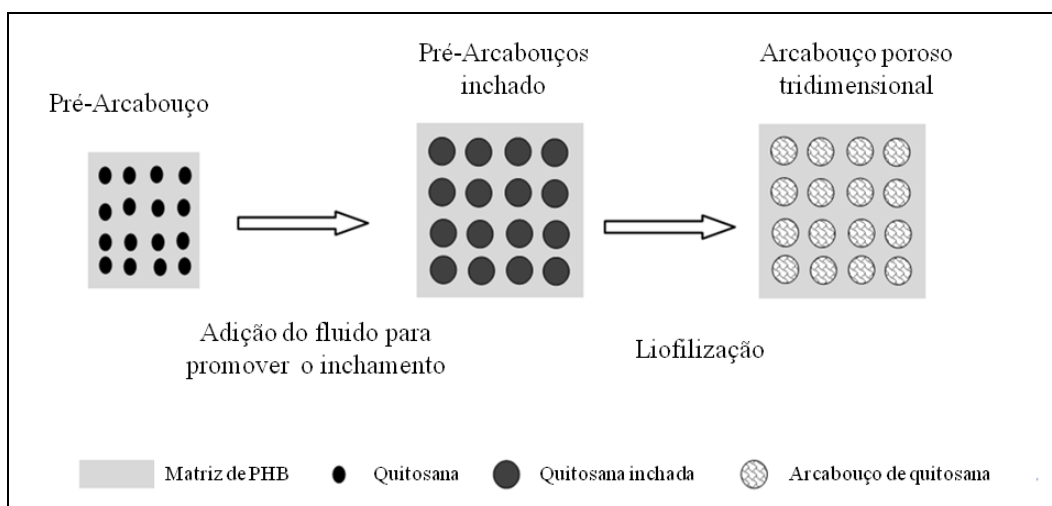


Figura 5.1 - Representação esquemática da produção dos arcabouços porosos

A obtenção dos arcabouços porosos se dá através do inchamento de uma matriz anfifílica de PHB/QUI seguida de congelamento e posterior liofilização. Desta forma, o teor de QUI na matriz (Pré-arcabouço) tem influência direta nas propriedades dos arcabouços porosos e conseqüentemente nas propriedades dos arcabouços. A formação dos poros se deu por dois processos distintos: o primeiro associado ao inchamento da

QUI que promoveu a abertura da matriz de PHB e o segundo decorrente do processo de liofilização que eliminou o fluido absorvido pela QUI na etapa de inchamento.

Uma das vantagens desta técnica é a utilização de diferentes fluidos na etapa de inchamento o que permite a obtenção de arcabouços com diferentes composições. De acordo com a literatura a QUI interage com espécies aniônicas como as glicosaminoglicânicas (GAG) e proteoglicanas e com outras espécies negativamente carregadas presentes no sangue (COSTA-PINTO *et al.*, 2011). Sendo assim, a matriz anfifílica de PHB/QUI pode ser inchada em fluidos que possuam afinidade com a QUI de acordo com a aplicação pretendida.

A análise de degradação mostrou que os arcabouços degradam heterogeneamente. Esse comportamento abre um precedente para a produção de arcabouços porosos capazes de atuar como materiais para liberação controlada de moléculas bioativas.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Arcabouços tridimensionais de PHB/QUI e PHB/QUI/FN foram obtidos com sucesso a partir da metodologia proposta baseada no inchamento da QUI em água ou em solução de FN na etapa II do processo de produção dos arcabouços. A formação dos poros bem como a quantidade destes ocorre em função da quantidade e da distribuição de QUI na matriz anfifílica (Pré-arcabouço).

O teor de QUI igual a 25% favoreceu a redução da cristalinidade do PHB, o que constitui uma vantagem visto que, um dos grandes problemas da aplicação do PHB como biomaterial é o seu caráter quebradiço devido à sua cristalinidade. Foi observado também que para o Pré-arcabouço contendo 25% de QUI o efeito de barreira imposto pelo PHB (componente hidrofóbico da matriz) foi minimizado e o inchamento da matriz foi mais pronunciado, o que contribuiu para a formação da estrutura porosa desejada. A distribuição do tamanho de poros foi afetada pelo processo de degradação e foi observado que os arcabouços de QUI inseridos na matriz de PHB tendem a degradar a diferentes taxas.

O $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ e o $A_{\text{PHB-QUI25\%}}^{\text{FN}}$ apresentaram módulo de compressibilidade iguais a (13.07 ± 0.01) MPa e (18.0 ± 0.03) MPa respectivamente, próximos ao do osso trabecular. Testes realizados “*in vitro*” mostraram que os arcabouços não apresentaram citotoxicidade. Desta forma os arcabouços produzidos por esta metodologia têm potencial para aplicação na regeneração do tecido ósseo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em 2011 foi realizada uma conferência onde foram discutidos os principais requisitos a serem alcançados por arcabouços porosos aplicáveis à Engenharia Tecidual (O' KEEFE *et al.*, 2011). A saber:

(i) Forma: refere-se à moldagem do arcabouço de acordo com o “defeito” a ser reparado.

(ii) Função: refere-se à similaridade em termos de propriedade mecânica entre o arcabouço e o tecido a ser reparado ou substituído.

(iii) Fixação: refere-se à habilidade do arcabouço se integrar aos tecidos macios presentes nas vizinhanças do tecido ósseo.

(iv) Formação: refere-se às propriedades de osteocondução do arcabouço, e a algumas características como, por exemplo, porosidade, permeabilidade, difusividade e integração de moléculas bioativas ou células.

Desta forma, sugere-se:

1. Avaliar o inchamento do arcabouço em diferentes fluidos biológicos que se adequem à proposta iv em termos de interação célula biomaterial;
2. Conduzir estudos “*in vivo*” para avaliar a fixação (item iii)
3. Avaliar o uso dos arcabouços como material de liberação controlada;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, T., MARÇAL, H., LAWLESS, M., *et al.*, 2010, “Polyhydroxybutyrate and its Copolymer with Polyhydroxyvalerate as Biomaterials: Influence on Progression of Stem Cell Cycle”, *Biomacromolecules*, v. 11, pp. 2707–2715
- ALVES, E.G.L., REZENDE, C.M.F., Serakides, R., 2011, “Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats”, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 13, pp. 546 -552.
- AMARAL, I.F., LAMGHARI, M., SOUSA, S. R., *et al.*, 2005, “Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation”, *Journal of Biomedical Material Research A.*, v.75, n. 2, pp. 387-97
- AMARAL, I.F., UNGER, R.E., FUCHS, S, *et al.*, 2009, “Fibronectin-mediated endothelialisation of chitosan porous matrices”, *Biomaterials*, v.30, pp. 5465-5475.
- ARIFFIN, H. NISHIDA, H., SHIRAI, Y, HASSAN, M;A., 2008, “Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate)” . *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, pp. 1433-1439.
- ARKIN, A. H., HAZER, B., 2002, “Chemical Modification of Chlorinated Microbial Polyesters”, *Biomacromolecules*, v. 3, pp. 1327-1335.
- BARBOSA, L.C.A., Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos, 1 ed., UFV, Belo Horizonte, 2008.
- BASKAR, D., KUMAR, T.S.S., 2009, “Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films”, *Carbohydrate Polymers*, v.78, pp. 767–772.

- BAUJARD-LAMOTTE, L., NOINVILLE, S., GOUBARD, F., *et al.*, 2008, “Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces”, *Colloids and Surfaces: B biointerfaces* v., 63, 129-137.
- BERGER, J., REIST, M., MAYER, *et al.*, 2004a, “Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, pp. 35–52.
- BERGER, M., REIST, M., MAYER, J.M., *et al.*, 2004b, “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, pp.19–34.
- BLOEMBERGEN, S., HOLDEN, D.A., HAMER, G.K., *et al.*, 1986, “Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate)” *Macromolecules*, v., 19, pp. 2865-2871.
- BUMGARDNER JD, WISER R, GERARD PD, *et al.*, 2003, “Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants”, *Journal of Biomaterial Science Polymer*, v.14, pp. 423 – 438.
- BURG, K.J.L., PORTER, S., KELLAM, J.F, 2000, “Biomaterial developments for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 2347-2359.
- CAI, K., YAO, K., CUI, Y., YANG, Z. *et al.*, 2002, “Influence of different surface modification treatments on poly(d,l-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro” v. 23, pp. 1603–1611.
- CAI, K., YAO, K., YANG, Z., 2007, “Histological study of surface modified three dimensional poly (D, L-lactic acid) scaffolds with chitosan in vivo”, *Journal of Materials Science Materials in Mmedicine*, v. 18, pp. 2017–2024.
- CANCEDDA R., MASTROGIACOMO M., BIANCHI, G., *et al.*, 2003, “Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone”. *Novartis Foundation Symposium* v.249, pp. 133–143.

- CANELLA, K.MN.C., GARCIA, R. B., 2001, “Caracterização de quitosana por cromatografia por permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente”, *Química Nova* v. 24, n.a, pp.13-17.
- CANEVAROLLO, S.V., 2004, *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. 1ed., São Paulo, Artliber.
- CANEVAROLLO, S.V., 2010, *Ciência de Polímeros*. 3ed., São Paulo, Artliber.
- CAO, W., WANG, A., JING, D., *et al.*, 2005, “Novel biodegradable films and scaffolds of chitosan blended with poly(3-hydroxybutyrate)”. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, v. 16, pp. 1379–1394.
- CARVALHO, A.C. *Aspectos tecnológicos e mercadológicos da reciclagem de plásticos descartados de lanchonetes*. Dissertação de mestrado, (IMA/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- CHEN, C., DONG, L., CHEUNG, M.K., 2005, “Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/chitosan blends”, *European Polymer Journal*, v. 41, pp. 958–966.
- CHEN, C-H, WANG, F-Y, MAO, C-F, *et al.* ,2008, “Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, pp. 37–42.
- CHEN, G., USHIDA, T., TATEISHI, T., 2001, “Development of biodegradable porous scaffolds”, *Materials Science and Engineering: C*, v.17, n. 1–2, pp. 63-69.
- CHEUNG, M.K.; WAN, K.P.Y.; YU, P.H., 2002, “Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ¹H T₁ and T₁ρ CRAMPS”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 86, pp. 1253-1258.

- CORDONNIER, T., SOHIER, J., ROSSET, P., LAYROLLE, P., 2011, “Biomimetic Materials for Bone Tissue Engineering – State of the Art and Future Trends”, *Advanced Engineering Materials, Advanced Biomaterials*, v.13, pp.135-150.
- COSTA-PINTO, A.R., REIS, R.L., NEVES, N.M., 2011, “Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan”, *Tissue Engineering: Part B*, v. 17, n.5, pp- 331-347.
- DE-DEUS, G., CANABARRO, A., ALVES, G., *et al.*, 2009, “Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells”, *Basic Research –Technology*, v. 35, pp. 1387-1390.
- DENKBAŞ E.B., SEYYAL, M. PIŞKIN, E., 2000, “Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning”, *Journal of Membrane Science*, v. 172, pp. 33–38.
- EUGENE K, LEE YL, 2003, “Implantable applications of chitin and chitosan” *Biomaterials*, v.24, pp. 2339–2349.
- FAKHRY, A., SCHNEIDER, G.B., ZAHARIAS, R., ŞENEL, S., 2004, “Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts”, *Biomaterials*, v.25, pp. 2075- 2079.
- FILIPCZAK K., JANIK, I., KOZICKI M. *et al.*, 2005, “Porous polymeric scaffolds for bone regeneration” *E-Polymers*, v.20, art 11. for tissue engineering”, *Journal of Materials Science and Engineering C*. 17, 63–69.
- GOMES, S.; LEONOR, I.B.; MANO, J.F.; *et al.*, 2011, “Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering”, *Progress in Polymer Science*, v. 37, n.1, pp. 1-17.
- GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H., 2006, “Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres”, *Carbohydrate Polymers*, v. 66, pp. 43–54.

- GUPTA, K.C.; KUMAR, M.N.V., 2000, "Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan", *Biomaterials*, v.21, pp. 1115-1119.
- HO, M-G.WANG, D-M., HOU, L-T., *et al.*, 2006, "Preparation of cell-specific membranes for bone regeneration by peptide grafting", *Desalination*, v.199, pp. 144–146.
- HOFFMAN, A.S., 2002, "Hydrogels for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 43, pp. 3–12.
- HONG, S-G., LIN, Y-C., LIN, C-H., 2008, "Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates", *Reactive & Functional Polymers* , v.68 pp. 1516–1523.
- HUMPHRIS, A.D.L., MILLES, M.J., HOBBS, J.K., 2005, "A mechanical microscope: High – speed atomic force microscopy", *Applied Physics Letters* v. 86, 34106.
- HUTMACHER, D., SCHANTZ,J.T., LAM, C.X.F., 2007, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective", *Journal of Tissue Engineering and regenerative medicine*, v.1, pp. 245–260.
- HUTMACHER, D.W, 2000, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, v. 21, n 24, pp. 2529-2543.
- IKEJIMA, T & INOUE, Y, 2000, "Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3-hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan", *Carbohydrate Polymers*, v. 41, pp. 351–356.
- IKEJIMA,T. YAGI, K., INOUE, Y., 1999, "Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan", *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 200, pp. 413–421.
- INOUE Y, & YOSHI, 1992, "Structure and physical properties of bacterially synthesized polyesters", *Progress in Polymer Science*, v.17 pp. 571-610.
- ISHAUG,S.L., CRANE, G.M., MILLER, M.J., 1997, "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblasts culture in biodegradable polymer scaffolds"*Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, pp. 17–28.

- ITO, Y., JI Z., YUKIO I. 1997, "Enhancement of cell growth on a porous membrane co-immobilized with cell-growth and cell adhesion factors" *Biomaterials* v. 18, pp.197-202.
- IVANTSOVA, E. L. IORDANSKII A. L. R. KOSENKO, Y., 2011, Poly(3-hydroxybutyrate)-chitosan: a new biodegradable composition for prolonged delivery of biologically active substances", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 45, pp. 51 55
- JIAO, Y-P, CUI, F-Z, 2007, "Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering", *Biomedical Material*, v. 2, pp. R24–R37.
- JUSTI, K.C., LARANJEIRA, M.C.M., NEVES A., *et al.*, 2004, "Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption", *Polymer*, v. 45, pp. 6285–6290.
- KHALID, M.N., AGNELY, F., YAGOUBI, N., *et al.*, 2002, "Water state characterization, swelling behavior, thermal, and mechanical properties of chitosan based networks", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, pp. 425–432.
- KHASIM, H;R:I:, HENNING, S., MICHLER, G.H., BRAND, J., *et al.*, 2010, "Development of Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering" *Macromolecular Symposia*, v. 294-I, pp. 144–152.
- KHNOR, E., LIM, L., 2003, "Implantated applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*, v. 24, pp.2339–49.
- KLOKKEVOLD PR, VANDEMARK L, KENNEY EB, BERNARD GW, 1996. "Osteogenesis enhanced by chitosan (poly N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro", *Journal of Periodontology*, v. 11, pp. 1170–1175.
- KRETLOW, J.D.,MIKOS, A.G., 2007, "Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Tissue Engineering*, v.13, n.5, pp. 927-938.

- KROEZE, R.J., HELDER, M.N., GOVAERT, L.E., *et al.*, 2009, “Biodegradable Polymers in Bone Tissue Engineering” *Materials*, v.2, pp. 833-856.
- KRUTH, J-P., MERCELIS, P. VAERENBERGH, J.V., 2005, “Binding mechanisms in selective laser sintering and selective laser melting”, *Rapid Prototyping Journal*, v.11, n. 1, pp. 26–36.
- LAHIJI A, SOHRABI A, HUNGERFORD DS, *et al.*, 2000, “Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes”. *Journal of Biomededical Materials Research*, v.51, n.4, pp. 586–95.
- LANGER, R., TIRREL, D.A., 2004, “Designing materials for biology and medicine”, *Nature*, v.428, pp. 487-492.
- LEE, J-Y, NAM, S-H, IM, S-Y, *et al.*, 2002, “Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials”, *Journal of Controlled Release*, v.78, pp. 187–197.
- LEE, J.W., KIM, S.Y., KIM, S.S., *et al.*, 1999, “Synthesis and Characteristics of Interpenetrating Polymer Network Hydrogel Composed of Chitosan and Poly(acrylic acid)”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 73, pp. 113–120.
- LIAO, L-F., LIEN, C-F., LIN, J-L., 2001, “FTIR study of adsorption and photoreactions of acetic acid on TiO₂”, *Physical Chemistry. Chemical Physics.*, v. 3, pp. 3831 – 3837.
- LIU, X., HOLZWARTH, J.M., MA, P.X. 2012, Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience*, v., 12, pp. 911–919
- LIU, C., XIA, Z., CZERNUSZKA, J.T., 2007, “Design and Development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering”, *trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, v.85 (A7), pp.1051-1064.

- LIU, X., MA, P.X., 2004, "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Annals of Biomedical Engineering*, v. 32, n. 3, pp. 477–486.
- LIU, Y., HE, T., GAO, C., 2005, "Surface modification of poly(ethylene terephthalate, via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.46, pp. 117-126.
- LÓPEZ, F.A., MERC A. L. R., ALGUACIL, F. J., *et al.*, 2008, "A kinetic study on the thermal behavior of chitosana", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 91, n.2, pp. 633–639.
- MA, P. X., LANGER, R., 1999, *Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering*. In: Tissue Engineering Methods and Protocols, Morgan, J., and Yarmush, M. (eds.) Humana Press, NJ, 47
- MADIHALLY, S.V., MATTHEW, H.W.T., *et al.*, 1999, "Porous chitosan scaffolds for tissue Engineering", *Biomaterials*, v. 20 pp.1133–42.
- MADISON L. L., MADISON G. W. 1999, "Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer) from DNA to plastic", *Microbiology end Molecular biology Reviews*, v. 63, pp. 21-53
- MARTINO, A.D., SITTINGER, M., RISBUD, M.V., 2005, "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering", *Biomaterials*, v. 26, pp.5983–5990.
- MASAEI, E., MORSHED, M., RASEKHIAN, P, *et al.*, 2012, "Does the tissue engineering architecture of poly(3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell–material interactions?" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.100A, pp. 1907–1918.
- MEIGA, T.O., 2010. *Avaliação de Metodologias para Imobilização Covalente de Fibronectina em Arcabouços de Poli(3-hidroxibutirato)*. Dissertação de mestrado, (COPPE/PEMM/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

- MENDONÇA, R.H., THIRÉ, R.M.S.M., COSTA, M.F., SILVA FILHO, F.C., 2009, “Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea”. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v.19, pp.143-148.
- MENDONÇA, R.H., 2008. *Imobilização de Fibronectina na Superfície de arcabouços Poros de PHB para Aplicação em Engenharia Óssea*. Dissertação de mestrado, (COPPE/PEMM/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- MENEZES, G. D. 2003, *A Interação de Osteoblastos Humanos com Filmes de Fibronectina Plasmática Humana Constituídos Sob Diferentes Condições de pH*. 2003. 105 P. Dissertação de Mestrado (IBCCF/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
- MIKOS, A. G.; LU, L.; TEMENOFF, *et al.*, “Synthetic Bioresorbable polymer scaffolds”. In: *An introduction to material in medicine*, Ratner, B. D., Hoffman, A.S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., (Ed.). pp 743, Elsevier Academic Press. USA, 2004.
- MIKOS, A.G., TEMENOFF, J.S., 2000, “Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering”, *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, n.2.
- MIRANDA, S.C.C.C., SILVA, G.A.B, HELL, R.C.R., *et al.*, 2011, “Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction”, *Archives of Oral Biology*, v. 56, n.1, pp. 1–15.
- MISRA, S.K., ANSARI, T.I., VALAPPIL, S..P. *et al.*, 2010, “Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications”, *Biomaterials* v.31, pp. 2806–2815.
- MISTRY, A.S., MIKOS, A.G., 2005, “Tissue Engineering strategies for bone regeneration”, *Advanced Biochemistry Engineering/ Biotechnology*, v.94, pp.1-22.
- MORONI, L., ELISSEEFF, J.H, 2008, “Biomaterials engineered for integration”, *Material Today*, v.11, pp.44 -51.

- MOURA, M.R., RUBIRA, A.F., MUNIZ, E.C., 2008, “Hidrogéis Semi-IPN Baseados em Rede de Alginato-Ca²⁺ com PNIPAAm Entrelaçado: Propriedades Hidrofílicas, Morfológicas e Mecânicas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18, n. 2, pp. 132-137.
- MOURYA, V.K., INANDAR, N.N., 2008, “Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore”, *Reactive and Functional Polymers*, v. 68, pp. 1013–1051.
- NIETO, J.M & PENICH-COVAS, C., 1991, “Characterization of chitosan by pyrolysis –mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry”. *Thermochimica Acta* v. 176, pp.63-68.
- O'BRIEN, F.J., 2011, “Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering”, *Materials Today*, v. 14, pp. 88-95.
- O'KEEFE, R.J., MAO, J., 2011, “Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic—An Overview”, *Tissue Engineering: Part B*, v. 17, n. 6, pp. 389-392.
- OH, S.H., PARK, I.K., KIM, J.M., LEE, J.H., 2007, “In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method”, *Biomaterials*, v. 28, pp. 1664–1671.
- OKAMOTO Y, MINAMI S, MATSUHASHI A, *et al.*, 1993. “Polymeric N acetyl-D-glucosamine (Chitin) induces histionic activation in dogs. *J Vet Med Sci* v.; 55 pp. 739–42.
- OLIVEIRA, S.; ARAÚJO, E.S.; GUEDES, S.M.L, 2006, “Gamma irradiation effects on poly(hydroxybutyrate)” *Polymer Degradation and Stability*, v.91, pp. 2157-2162.
- OLSON, J.L.; ATALA, A.; YOO, J.J. 2011, “ Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions”, *Chonnam Medical Journal*, v. 47, pp. 1-13.
- ORLANDO, G., WOOD, K.J., STRATTA, R.J., *et al.*, 2011, “Regenerative Medicine and Organ Transplantation”, *Transplantation*, v.91, pp. 1310-1317.

- PATEL, Z.S., YOUNG, S., TABATA, Y., *et al.* 2008, “Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model” *Bone*, v. 43, pp. 931–940.
- PATTERSON, J. MARTINO, M.; HUBBELL, J.A., 2010, “Biomimetics Materials in Tissue Engineering”, *Materials Today*, v.13, pp. 2- 15.
- PEPPAS, N.A., COLOMBO, P., 1997, “Analysis of drug release behavior from swellable polymer carriers using the dimensionality index”, *Journal of Controlled Release*, v.45, pp. 35-40.
- PEREIRA, T.F., 2009, *Influência das Técnicas de Preparação nas Propriedades de Suportes Porosos de Polihidroxialcanoatos para uso em Engenharia de Tecido*, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- PEREIRA, T.F., SILVA, M.A.C., OLIVEIRA, M.F., *et al.*, 2012, “Study of poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds fabrication by selective laser sintering for use in tissue engineering.” *In: 1st International Conference on Design and Processes for Medical Devices - PROMED, 2012, Brescia. Proceedings of the 1st International Conference on Design and Processes for Medical Devices - PROMED. Brescia, 2012. v. 1.*
- PESCHEL, G., DAHSE, H.M., KONRAD, A., 2008, “Growth of keratinocytes on porous films of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, v. 85A, pp.1072-1081.
- PHELPS, E.A.; GARCIA, A.J., 2009, “Update on therapeutic vascularization strategies” *Regenerative Medicine*, v. 4, n.1, pp. 65-80.
- PUPPI, D., CHIELLINI, F., PIRAS, A.M., CHIELLINI, E., 2010, “Polymeric materials for bone and cartilage repair”, *Progress in Polymer Science*, v.35, pp. 403–440.

- RAJAN, R., SREEKUMAR, P.A., JOSEPH, K., 2012, "Thermal and Mechanical Properties of Chitosan Reinforced Polyhydroxybutyrate Composites", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, pp. 3357–3362.
- RENARD, E., WALLS, M., GUÉRIN, P., LANGLOIS, V., 2004, "Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and functionalized polyhydroxyalkanoates", *Polymer Degradation and Stability*, v. 85, pp.779-787.
- RENTAD, K R., ALBERTSSON, A.C, et al, 1997, "Influence of processing parameters on the molecular weight and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) copolymers", *Polymer Degradation and Stability*, v. 57, pp. 331-338.
- RINAUDO, M., PAVLOV, G., DESBRIÈRES, J, 1999, "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan", *Polymer*, v.40, pp. 7029–7032.
- ROOSA, S. M. M, KEMPPAINEN, J. M., MOFFITT, E.N., et al., 2010, "The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 92A, pp. 359–368.
- RUEDA, D.R., SECALL, T., BAYER, R.K., 1999, "Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry", *Carbohydrate Polymers*, v. 40, pp.49–56.
- SADER, M.S., FERREIRA, M., DIAS, M.L., 2006, "Preparação e Caracterização de Estruturas Porosas de Poli(3-hidroxibutirato)", *Polímero: Ciência e Tecnologia*, v. 16, pp. 12-18.
- SANTOS, M., REIS, R.L., 2010, "Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges", *Macromolecular Bioscience*, v.10, pp. 12–27.
- SHIH, W-J., CHEN, Y-H., SHIH C-J., et al., 2007, "Structural and morphological studies on poly(3-hydroxybutyrate acid) (PHB)/chitosan drug releasing microspheres prepared by

- both single and double emulsion processes” *Journal of Alloys and Compounds*, v. 434–435, pp. 826–829.
- SHIN, H., 2007, “Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell–biomaterial interactions”, *Biomaterials* v.28, pp.126–133.
- SHIN, H., JO, S; MIKOS, A.G., 2003, “Biomimetic materials for tissue engineering” *Biomaterials*, v. 24, pp. 4353–4364.
- SILVERSTEIN R. M., BASSLER G. C. E MORRIL T. C., 1981, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4 ed. New York, John Wiley and Sons.
- SINGLA A.K., CHAWLA M., 2001. “Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update”, *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v. 53, pp.1047–1067.
- SKRBIC, Z., DIVJAKOVIC, V., 1996, “Temperature influence on changes of parameters of the unit cell of biopolymer PHB”, *Polymer*, v.37, pp. 505-507.
- STEVENS, B., YANG, Y. MOHANDAS, A., STUCKER, B., NGUYEN, K.T, 2008b, “A Review of Materials, Fabrication Methods, and Strategies Used to Enhance Bone Regeneration in Engineered Bone Tissues”, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, v. 85B, pp. 573–582.
- STEVENS, M.M., 2008a, “Biomaterials for Bone Tissue Engineering”, *Materials Today*, v.11, n.5, pp. 18-25.
- SUBIA,B. KUNDU, J. KUNDU, S.C.“Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications”. In: Eberli, *Tissue Engineering*, 1 ed, chapter 7, InTech, 2010.
- SUDESH, K.H., DOI, A.Y., 2000, “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters”, *Progress. Polymer Science*, v.25, pp. 1503-1555.

- SULTANA, N., WANG, M., “Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterization of the scaffolds”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.19, pp. 2555-2561.
- TABATA, Y., 2009, “Biomaterial technology for tissue engineering applications” , *Journal of the Royal Society Interface*, v.6, pp. S311-324.
- TANIGAWA T, TANAKA Y, SASHIWA H, *et al.*, 1992, “Various biological effects of chitin derivatives. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in Chitin and chitosan*. Elsevier v., pp. 206–15.
- THIRÉ, R. M. S.M., MEIGA, T. O., DICK, S., *et al.*, 2007, “Functionalization of Biodegradable Polyester for Tissue Engineering Applications” *Macromolecular Symposia*, v. 258, n. 1, pp. 38-44.
- TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, *et al*, 1997, Nishi N. “Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan”, *Macromolecular Symposia*, v.120, pp. 1–9.
- TSANG, V.L., BHATIA, S.N., 2004, “Three-dimensional tissue fabrication”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, pp.1635– 1647.
- TUZLAKOGLU, K., ALVES, C.M, MANO, J.F., *et al.*, 2004, “Production and Characterization of Chitosan Fibers and 3-D Fiber Mesh Scaffolds for Tissue Engineering Applications”, *Macromolecular Bioscience*, v. 4, pp. 811 -819.
- WANG, Y-U., WU, Q., CHEN, G-Q, 2004, “Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds”, *Biomaterials*, v. 25, pp.669-675.
- WIDMER, M.S., GUPTA, P.K., LU, L., *et al.* 1998, “Manufacture of porous biodegradablepolymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration”, *Biomaterial*, v.19, pp.1945-1955.

- XU, J., GUO, B-H.; YANG, R.; WU, Q.; CHEN, G-Q.; ZHANG, Z-M. *Polymer*, 2002, 43(25), 6893-6899.
- YEATTS, A.B, FISHER, J.P, 2011, “Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress”, *Bones*, v. 48, pp. 171-181.
- YEN, M-T., YANG J-H., MAU, J-L., 2009, “Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells”, *Carbohydrate Polymers*, v. 75, pp. 15–21.
- ZALDIVAR, M.P., FERNÁNDEZ, N.G., PEÑA, C.G. *et al.*, 2011 “Synthesis and characterization of a new semi-interpenetrating polymer network hydrogel obtained by gamma radiations”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 106, pp-725-7230.
- ZAN, J., ZHU, D., TAN, F., 2006, “Preparation of Thermosensitive Chitosan Formulations Containing 5-Fluorouracil/Poly-3-hydroxybutyrate Microparticles Used as Injectable Drug Delivery System”, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.14, n.2, pp. 235-241.
- ZHAO, K., DENG, Y., CHEN, J.C. *et al.*, 2003, “Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility”, *Biomaterials* v.24, pp.1041–1045.
- ZONARI, A., NOVIKOFF, S., ELECTO, N.R.P., ET AL., 2012, Endothelial Differentiation of Human Stem Cells Seeded onto Electrospun Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate Fiber Mesh, *PLoS ONE* 7(4): e35422. doi:10.1371/journal.pone.0035422.

Anexo 1

CURVAS DE DSC

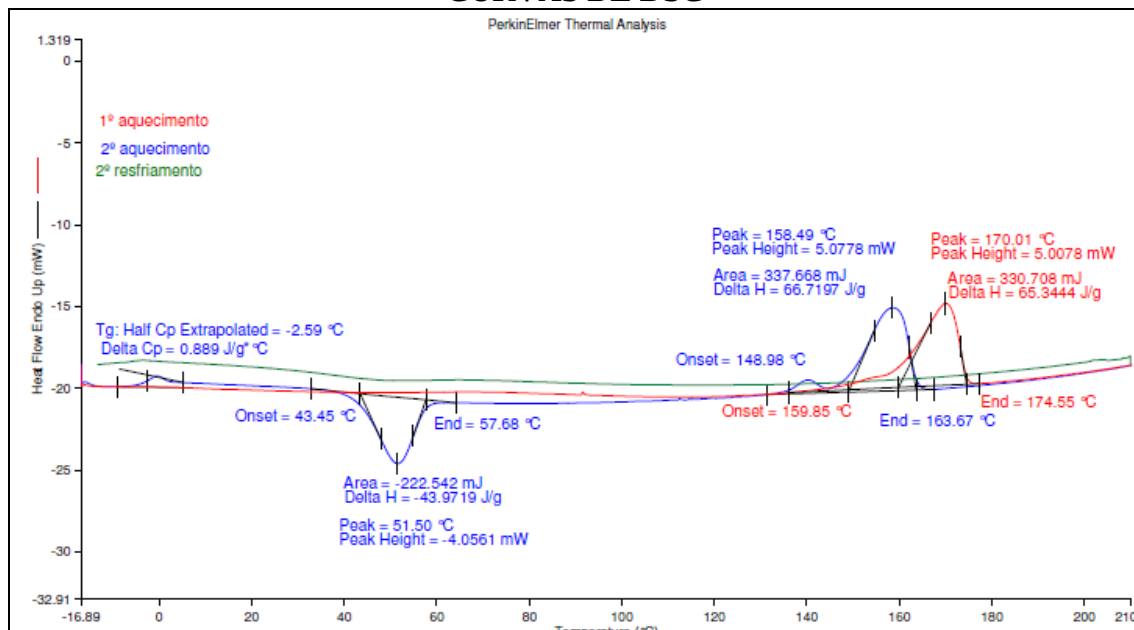


Figura A1.1 - Curva de DSC do Pré-A_{PHB-QUI 2%} referentes ao primeiro e ao segundo aquecimento

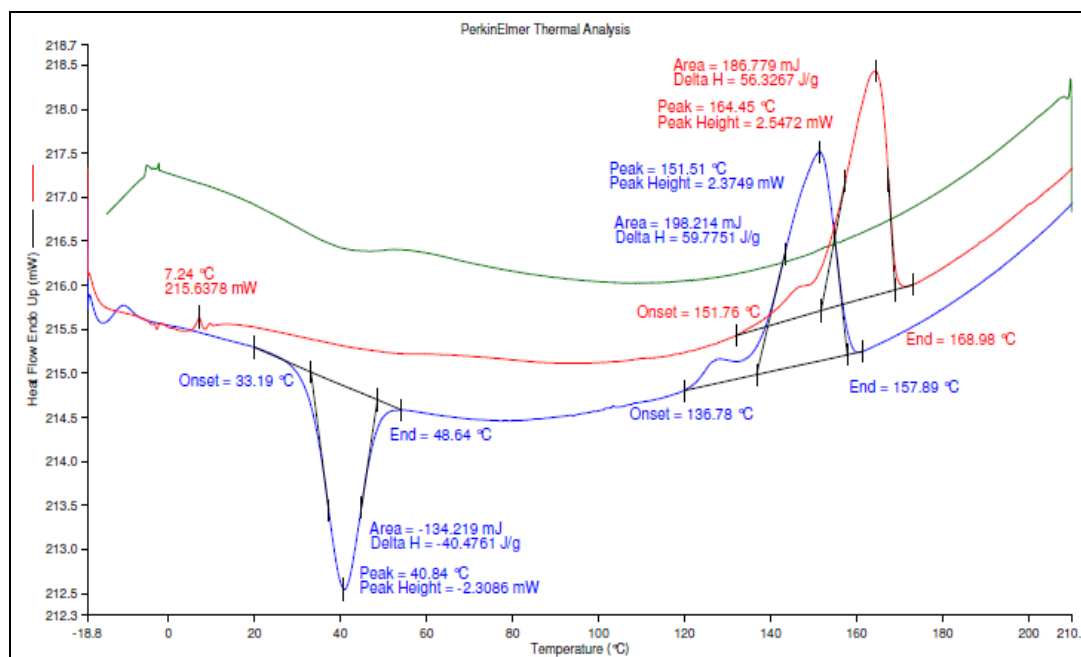


Figura A1.2 - Curva de DSC do Pré-A_{PHB-QUI 5%} referentes ao primeiro e ao segundo aquecimento

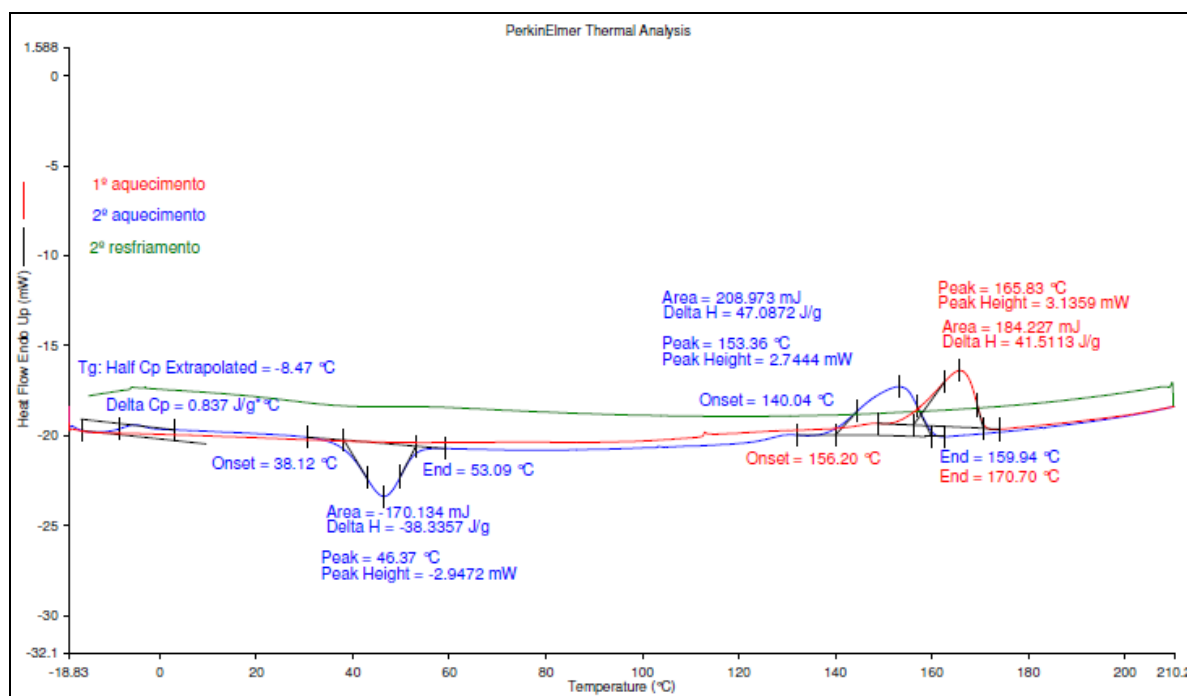


Figura A1.3 - Curva de DSC do Pré-A_{PHB-QUI 10%} referentes ao primeiro e ao segundo aquecimento

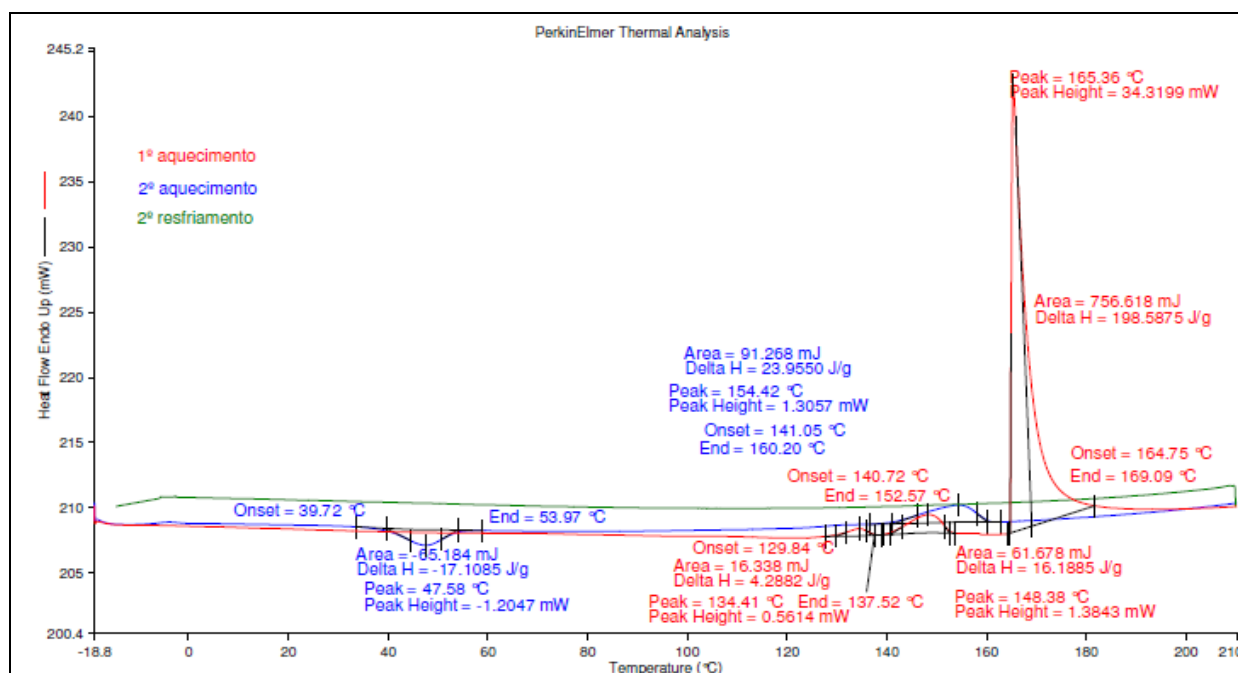


Figura A1.4 - Curva de DSC do Pré-A_{PHB-QUI 25%} referentes ao primeiro e ao segundo aquecimento

Anexo 2

ÍNDICE DE DIMENSIONALIDADE

De acordo com Peppas e colaboradores (1997) o índice de dimensionalidade (d) pode ser obtido tomando por base o caso de “amostras que incham”. O d é definido como o número de direções em que uma expansão não obstruída ocorre.

No presente trabalho, mudanças no diâmetro e na altura do Pré- $A_{\text{PHB-QUI25\%}}$ foram monitoradas por um período de 12h e os resultados são apresentados na Tabela A2.1. Os valores obtidos para a área (Equação 6) e para o volume (Equação 7) também são apresentados na Tabela A2.1

A Tabela A2.2 mostra os valores de $\ln[Agel/Adry]$ (onde $Agel$ é a área do arcabouço inchado e $Adry$ é área do arcabouço seco) e de Q (a razão entre o volume do arcabouço inchado (V_{gel}) e o volume do arcabouço seco (V_{dry})). O valor de d foi obtido plotando-se $\ln[Agel/Adry] \times Q$. Com isso obteve-se uma reta cujo coeficiente angular é igual a $(d-1)/3$ (Figura A2.1).

Os dados de regressão linear utilizados para o cálculo do valor de d são apresentados na Tabela A2.3. De acordo com os valores obtidos na regressão linear (Tabela A2.3) o coeficiente angular foi 0,42611. Sendo assim, o valor de d foi 2,3.

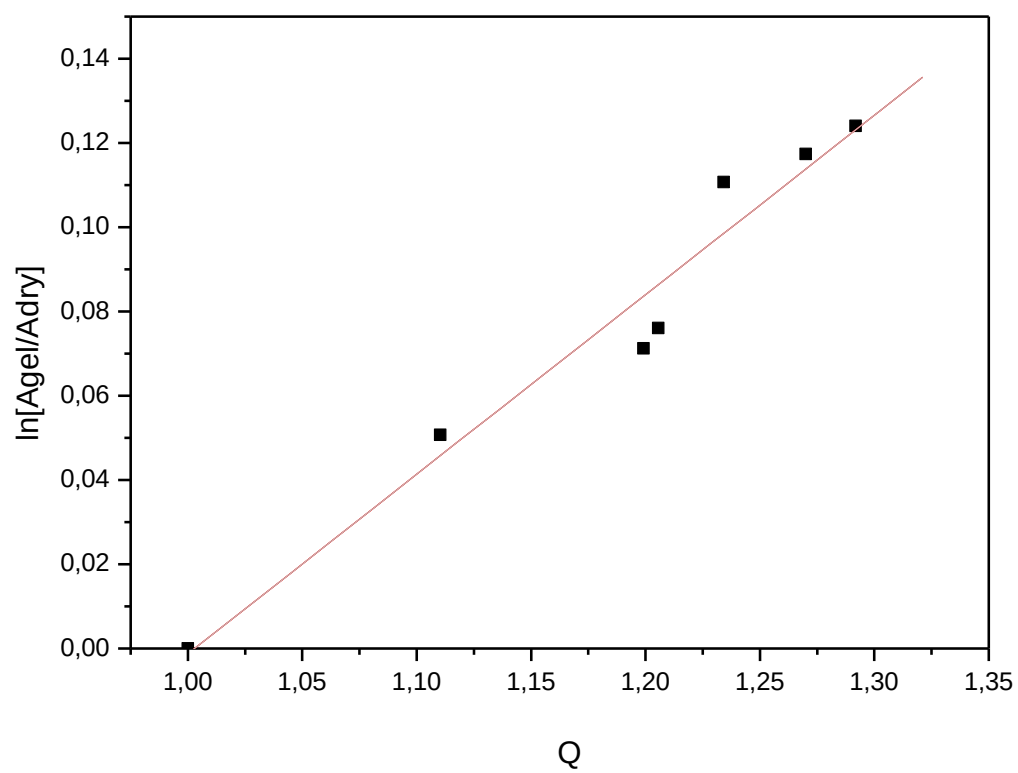


Figure A2.1: $\ln[Agel/Adry] \times Q$.

Tabela A.2-1: Dados da variação do diâmetro e da altura do Pré-_{APHB-QUI25%} em função do tempo e os respectivos valores de area e volume.

Pré- _{APHB-QUI25%}	tempo (h)													
	0		2h		4h		6h		8h		10h		12h	
	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹	D ¹	h ¹
I	11	2,4	11,3	2,7	11,6	2,6	11,6	2,8	11,8	2,8	11,8	2,8	11,8	2,7
II	11	2,8	11,2	3	11,1	3,6	11,4	3,1	11,4	3	11,7	3,2	11,6	3,3
III	11,2	2,5	11,4	2,5	11,4	2,6	11,4	2,7	11,7	2,8	11,7	2,7	11,7	2,9
Media	11,06667	2,566667	11,3	2,733333	11,36667	2,933333	11,46667	2,866667	11,63333	2,866667	11,73333	2,9	11,7	2,966667
Volume ²	246,758877		273,9801767		297,5070919		295,8838281		304,5476115		313,4082844		318,793995	
Area ³	286,1307556		301,0213333		308,7317778		307,2524889		319,6328111		321,7610333		323,9067	

¹mm; ² mm³; ³mm²

Tabela A.2-2: Valores de $\ln[Agel/Adry]$ e razão entre o volume da amostra após o inchamento e da amostra seca.

$\ln(Agel/Adry)$	Q
0	1
0,050732244	1,110315
0,076023973	1,205659
0,071220955	1,199081
0,110723978	1,234191
0,117360244	1,270099
0,124006618	1,291925

Tabela A2.3: Regressão Linear ($Y = A + B * X$):

Parâmetro	Valor	Erro
A	-0.42735	0.04546
B	0.42611	0.03817
<i>Desvio padrão: 0,00947</i>		