

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de Hidrogéis Compósitos para Potencial Aplicação como
Biomateriais**

Gabriela Teixeira da Silva

Pelotas, 2016

Gabriela Teixeira da Silva

Desenvolvimento de Hidrogéis Compósitos para Potencial Aplicação como Biomateriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Pelotas, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de Hidrogéis Compósitos para Potencial Aplicação como
Biomateriais**

elaborada por
Gabriela Teixeira da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo - Presidente/Orientador – PPGQ - UFPel

Prof. Dr^a Ethel Wilhelm – PPGBBIO - UFPel

Prof. Dr. Rafael Moraes – PPGO - UFPel

Pelotas, 15 de Julho 2016.

**Dedico esta dissertação aos meus pais Edson e
Valderes, e a minha irmã Cristiana, por todo amor
e incentivo durante toda a minha formação
acadêmica.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus anjos da guarda, por nunca terem me desamparado, e terem me dado esperança para nunca desistir. Por me protegerem e iluminarem sempre.

Agradeço aos meus pais Edson e Valderes, pessoas excepcionais, por todo exemplo de força, garra e vontade de vencer. Por terem aguentado firme toda saudade e muitas vezes entenderem minha ausência. Por todo apoio e amor que me deram, e por muitas vezes terem aberto mão de seus sonhos para me ajudar a correr atrás dos meus. Hoje estou aqui realizando aquele sonho da minha mãe. Tudo que fiz até hoje é graças a vocês e com certeza dedicado a vocês.

A minha irmã Cristiana, a irmã mais chata do mundo, mas que eu tenho um carinho enorme, e sempre que posso tento proteger de tudo. Pelo companheirismo dès dos meus 2 anos e 8 meses, por nunca me deixar sozinha. Por ser minha amiga e me ajudar no que preciso.

A toda minha família, avôs, tios, primos, por entenderem que nem sempre pude estar junto nas festas ou encontros, por conta da minha busca por ensino e dedicação a graduação e pós. Por todo amor que sempre me deram, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado, Juliano, por todo incentivo e apoio durante o final da minha graduação e durante o mestrado. Por sempre me ajudar nos estudos, me dar conselhos e nunca me deixar desistir. Pelos vários momentos bons, e me ajudar a levantar quando a coisa ficou difícil, te amo. E também a sua mãe, Angela, e seu padrasto, Nei Martinelli, por sempre me ajudarem em tudo que precisei em Pelotas.

Aos meus amigos de infância de São Pedro do Sul, Daiane, Géssica, Andria, Lidiéli, Vanessa, Evelyn, Kelly e Alberto, pela nossa amizade de muitos anos, momentos descontraídos, e por muitas vezes entenderem a minha ausência, nem sempre pude estar com vocês em momentos especiais. Aos amigos da graduação, em especial Gabriele Berwaldt, pela qual tenho um carinho grande, e ao QG301, Álisson, Caci e Lês.

Em especial, agradeço a professora Jacqueline Ferreira por ter aberto as portas de seu grupo de pesquisa e as da físico-química quando eu mais precisei. Ter me aceito vindo de uma área bem diferente, ter paciência em me explicar e ter acreditado em mim.

Aos professores da UFPel, Daniela Bianchini, pela ajuda durante meu seminário na cadeira de seminários, e também por nos ceder um espaço em seu laboratório até que tivéssemos nosso próprio lugar. Ao professor Claudio Pereira, por nos ceder seu liofilizador. As análises feitas no difratômetro de raios-X da UFRGS, como também análises de microscopia realizadas no CEMESUL da FURG.

Agradeço ao Professor Álvaro Guerra Dias, um dos coordenadores do LABGRÃOS, FAEM - UFPel, e em especial a sua aluna do doutorado Bárbara Biduski, por ter arrumado um tempo na sua pesquisa para me auxiliar no texturômetro para análises mecânicas, pela ajuda durante a análise e nos cálculos.

As análises *in vitro*, realizadas sob orientação do professor Celso Nakamura e sua aluna Vanessa Kaplum, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), assim como as análises *in vivo* supervisionadas pelas professoras Ethel Wilhelm e Cristiane Luchese e seu aluno Guilherme Voss, PPGBBIO – UFPel.

Ao meu orientador André Fajardo, por principalmente ter acreditado em mim, por mais que a gente mal se conhecesse. Por toda a ajuda e incentivo, pela paciência em me explicar as coisas e pela amizade e confiança que criamos nestes dois anos trabalhando juntos.

Aos meus colegas de Lab 209, Jaque, Manu, Felipe, Camila, Matheus e Emmanuel, pelo companheirismo, ajuda, conversas e risadas. Obrigada pela amizade de todos vocês. A aqueles que não citei nome, pois se não meus agradecimentos se estenderiam muito, mas que foram de grande ajuda na minha caminhada o meu muito obrigada.

Por fim, agradeço a Capes pelo auxílio de fomento que foi de grande ajuda para manter meus estudos e pesquisas.

“Nem tudo é como você quer,
nem tudo pode ser perfeito,
Pode ser fácil se você
ver o mundo de outro jeito...”
(Capital Inicial)

“... você quer encontrar a solução,
sem ter nenhum problema,
Insistir se preocupar demais,
cada escolha é um dilema...”
(Capital Inicial)

RESUMO

SILVA, Gabriela Teixeira da. **Desenvolvimento de Hidrogéis Compósitos para Potencial Aplicação como Biomateriais**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O desenvolvimento de materiais no âmbito de melhorar a expectativa de vida dos seres humanos vem sendo amplamente buscado nos últimos anos. Neste contexto, esta Dissertação apresenta e discute o desenvolvimento de um potencial biomaterial que possa suprir alguns pontos desta busca. Tratamos aqui do preparo de um hidrogel compósito a partir da mistura de um polímero sintético, o poli (vinil álcool) (PVA), com um polímero de origem natural, o sulfato de condroitina (SC), combinados com pó de osso bovino (POB). O compósito foi preparado pelo método físico de congelamento/descongelamento, sem a utilização de agentes potencialmente tóxicos, o que viabiliza sua aplicação como biomaterial. Foram empregadas diferentes técnicas de caracterização afim de se confirmar a formação de matriz de PVA/SC e a incorporação do POB na mesma. Análises macro e microscópicas evidenciaram a formação de um material com morfologia tipo esponja com alta porosidade; características morfológicas desejáveis uma vez que se objetiva a aplicação desse material como substrato (do inglês, *scaffold*) para a regeneração celular. Ainda, constatou-se que incorporação do POB na matriz PVA/SC exerce influência nas propriedades mecânicas, de absorção de líquidos, no tamanho de poros e na taxa de biodegradabilidade do compósito em comparação ao material sem POB. Conforme avaliado, tais variações são dependentes da quantidade de POB incorporada na formulação dos compósitos. A robustez dos compósitos quanto à sua potencialidade como biomaterial foi investigada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Ensaios *in vitro* demonstraram que o compósito não apresenta citotoxicidade contra células saudáveis e permite a adesão celular sob a sua superfície. Ensaios *in vivo* revelaram que o compósito PVA/SC com POB pode auxiliar em processos de regeneração celular, sem causar ação inflamatória, sendo completamente bioabsorvido após o período de tratamento. Os resultados aqui apresentados e discutidos permitem inferir que os hidrogéis compósitos desenvolvidos nesta Dissertação apresentam potencial para serem aplicados como biomateriais, podendo atuar na regeneração de células e/ou tecidos.

ABSTRACT

SILVA, Gabriela Teixeira da. **Development of Composites Hydrogels for Potential Application as a Biomaterial**. 2016. 75f. Dissertation (Master's Degree) - Chemistry Graduate Program. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The development of novel materials to improve the human quality of life has attracted great attention in the last years. In this sense, the development of a novel biomaterial is presented and rationalized in this Dissertation. Herein, a hydrogel composite was prepared by the blending of a synthetic polymer, poly (vinyl alcohol) (PVA), and a biopolymer, chondroitin sulfate (SC) filled with bovine bone powder (POB). The composite was physically crosslinked via freezing/thawing method, without the use of additional chemicals, which decreases the potential toxicity of the composite and enhances its application as biomaterial. Various techniques confirmed the composite formation and the efficient incorporation of POB into the PVA/SC matrix. Macro and microscopic analyses revealed that the composite shows a sponge type structure with a high porosity. Such characteristics are desired for biomaterials applied as scaffolds for cell and tissue regeneration. Furthermore, it was found here that the adding POB into the PVA/SC matrix promotes changes in the mechanical properties, liquid uptaking, total porosity and biodegradability rate of the composite as compared to the hydrogel without POB. As assessed, these changes depend on the content of POB into the PVA/SC matrix. The performance of the composite as potential biomaterial was investigated by *in vitro* and *in vivo* experiments. *In vitro* experiments showed that the composite does not show toxicity against healthy cells. Moreover, it stimulates cell adhesion on its surface. *In vivo* experiments demonstrated that the composite can be applied efficiently in tissue regeneration without causes inflammatory or other drawbacks to the process. This experiment showed that the composite is completely biodegraded and biosorbed after the treatment period. Overall, the results presented and rationalized in this Dissertation suggest that the PVA/SC/POB composite shows potential as biomaterial, which can be applied in the cell or tissue regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de uma rede tridimensional de um hidrogel.	23
Figura 2. Esquema dos diferentes métodos para a formação de hidrogéis, por meio de método químicos (crosslink) e físico (interação física) a partir de um polímero (adaptado de Hoffman et al., 2002).	25
Figura 3. Representação esquemática do método de congelamento /descongelamento na formação de hidrogéis (adaptado de Kim et al., 2015).	26
Figura 4. Representação das unidades repetidas do SC.	28
Figura 5. Esquema ilustrativo da reação para obtenção do PVA.	29
Figura 6. Esquema de preparo das soluções tampões utilizados.	33
Figura 7. Esquema do ensaio de biodegradabilidade.	40
Figura 8. Aspecto final do POB.	44
Figura 9. Fotos dos hidrogéis (a) formados após os 5 ciclos de congelamento/descongelamento e (b) após secagem em estufa.	45
Figura 10. Espectros de FTIR dos (a) materiais precursores (POB, PVA e SC) e (b) dos hidrogéis H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB.	46
Figura 11. Espectros de DRX obtidos para PVA, SC, H0%POB, H10%POB e POB.	48
Figura 12. Curvas termogravimétricas obtidas para os (a) materiais precursores (SC, PVA e POB), (b) seus respectivos DTGs, (c) para os hidrogéis (H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB) e (d) com seus respectivos DTGs.	50
Figura 13. Imagem de MET do POB.	51
Figura 14. Imagem representativa de MEV do POB.	52
Figura 15. Imagens representativas de MEV das amostras (a) H0%POB e, (b) H10%POB.	52
Figura 16. Análises de EDX das amostras (a) H0%POB e (b) H10%POB.	54
Figura 17. Intumescimento máximo das amostras de hidrogel em solução tampão PBS (pH 7,4) em função da quantidade de POB.	57
Figura 18. Intumescimento dos hidrogéis H0%POB e H1%POB em soluções com diferentes pHs.	59
Figura 19. Cinética de perda de água das amostras H0%POB e H1%POB previamente intumescidas.	60

Figura 20. Taxas de biodegradação das amostras de hidrogéis compósitos após 3 semanas de incubação em solução tampão PBS (pH 7,4) e solução tampão PBS (pH 7,4) suplementado com hialuronidase (E).	62
Figura 21. Avaliação do efeito citotóxico das amostras H0%POB e H10%POB em células Vero utilizando o ensaio de MTT.....	63
Figura 22. Acompanhamento do fechamento da ferida através de imagens macroscópicas ao longo dos dias e, amostras de peles retiradas dos animais pós 15 dias.....	64
Figura 23. Determinação da atividade de MPO no grupo “controle” e nos grupos tratados com as amostras, H0%POB e H10%POB.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades mecânicas determinadas a partir de ensaios de compressão.....	55
Tabela 2. Valores de porosidade determinados para os hidrogéis através do método de deslocamento de líquidos.....	55
Tabela 3. Capacidade de retenção de água.	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Taxa de porosidade.....	37
Equação 2. Taxa de intumescimento máximo	38
Equação 3. Taxa de perda de água	38
Equação 4. Capacidade de retenção em água.....	39
Equação 5. Percentual de biodegradação dos hidrogéis	40

LISTA DE ABREVIATURAS

λ : Comprimento de Onda

°C: Graus Celsius

a.c.: Antes de Cristo

CEME-Sul: Centro de Microscopia Eletrônica do Sul - FURG

EUA: Estados Unidos da América

FURG: Universidade Federal do Rio Grande

kV: Quilovolts

kPa: Quilopascal

m/m: Massa por Massa

m/v: Massa por Volume

M: Molaridade (Mol por Litro)

mA: Miliampère

MPa: Mega Pascal

N: Newton

nm: Nanômetros

pH: Potencial Hidrogeniônico

pKa: Potencial da Constante de Acidez

rpm: Rotação por Minuto

UFPEl: Universidade Federal de Pelotas

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Biomateriais.....	19
2.2 Scaffolds	21
2.3 Hidrogéis	22
<i>2.3.1 Processos de Reticulação para Formação de Hidrogéis</i>	<i>24</i>
<i>2.3.2 Polímeros no Preparo de Hidrogéis</i>	<i>27</i>
<i>2.3.2.1 Sulfato de Condroitina (SC)</i>	<i>27</i>
<i>2.3.2.2 Poli (vinil álcool) (PVA)</i>	<i>28</i>
2.4 Pó de Osso Bovino (POB).....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Reagentes Utilizados	32
3.2. Procedimento Experimental.....	32
<i>3.2.1. Soluções Tampões</i>	<i>32</i>
<i>3.2.2 Obtenção do POB.....</i>	<i>33</i>
<i>3.2.3 Hidrogéis Compósitos.....</i>	<i>34</i>
3.3 Caracterizações.....	34
<i>3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ...</i>	<i>34</i>
<i>3.3.2 Difração de Raios-X (DRX)</i>	<i>35</i>
<i>3.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	<i>35</i>
<i>3.3.4 Avaliação Morfológica</i>	<i>35</i>
<i>3.3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	<i>35</i>
<i>3.3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>36</i>
<i>3.3.5 Análises Mecânicas</i>	<i>36</i>
<i>3.3.6 Avaliação da Porosidade Total</i>	<i>37</i>
<i>3.3.7 Teste de Absorção e Retenção de Líquidos Aquosos</i>	<i>37</i>

3.3.7.1 Efeito da Quantidade de POB	37
3.3.7.2 Efeito do pH do Meio de Intumescimento	38
3.3.7.3 Avaliação da Taxa de Perda de Água	38
3.3.7.4 Capacidade de Retenção em Água	39
3.3.8 Teste de Biodegradabilidade <i>in vitro</i>	39
3.3.9 Ensaios Biológicos	41
3.3.9.1 Ensaios <i>in vitro</i> de viabilidade e adesão celular	41
3.3.9.2 Análises <i>in vivo</i>	42
3.3.10 Análises Estatísticas	43
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	44
4.1. Preparo dos Materiais	44
4.1.1 Obtenção do POB	44
4.1.2 Hidrogéis Compósitos	44
4.2 Caracterizações	45
4.2.1 Análises de FTIR	45
4.2.2 Análise de DRX	47
4.2.3 Análises Térmicas	48
4.2.4 Análises Morfológicas	50
4.2.4.1 MET	50
4.2.4.2 MEV	51
4.2.5 Propriedades Mecânicas	54
4.2.6 Determinação da Porosidade Total	55
4.2.7 Testes de Intumescimento	56
4.2.7.1 Intumescimento Máximo em Função da Porcentagem de POB	56
4.2.7.2 Efeito do pH do meio de intumescimento	58
4.2.7.3 Determinação Cinética da Taxa de Perda de Água	59
4.2.7.4 Capacidade de Retenção de Água	60

4.2.8 Teste de biodegradabilidade <i>in vitro</i>	61
4.2.9 Ensaios <i>in vitro</i> de viabilidade e adesão celular	62
4.2.10 Análises <i>in vivo</i>	63
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Nos últimos anos tem sido cada vez mais frequente a busca por melhores condições de vida, com o intuito de aumentar sua expectativa, saúde e também bem-estar. Grande atenção tem-se dado a pesquisa, procura e desenvolvimento por materiais que possam atender a estes requisitos. A utilização de implantes, por exemplo, em reposição de estruturas biológicas (principalmente as ósseas), é uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente (Barbanti *et al.*, 2005).

Neste contexto, uma área da ciência denominada engenharia de tecidos vem ganhando grande destaque. Fundada pela *National Science Foundation* em 1988, essa área tem como finalidade “aplicar os princípios e métodos da engenharia e ciência da vida em prol da compreensão das relações entre estrutura-função dos tecidos de mamíferos normais e patológicos, e a partir destes desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de algum tecido”. Este campo de pesquisa ainda é relativamente novo, ao passo que a busca por substitutos biológicos teciduais já vem a mais de um século (O’Brien *et al.*, 2011).

Os materiais aplicados em engenharia de tecidos são conhecidos como biomateriais, apresentando uma simples definição, “materiais capazes de tratar, aumentar ou substituir qualquer órgão, tecido ou função do corpo” (Helmus *et al.*, 1995). Estes podem ser aplicados, por exemplo, na regeneração de algum órgão ou tecido vivo, pelo cultivo de células do próprio tecido a ser regenerado em suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds*, para ao final serem reinseridos no local da aplicação (Barbanti *et al.*, 2005).

Um dos tipos mais conhecidos e estudados de *scaffolds* são os hidrogéis, por apresentarem propriedades estruturais e funcionais semelhantes à de muitos tecidos moles. Além de apresentar uma estrutura em formato 3D, também é um material altamente poroso, o que favorece sua aplicação na regeneração de tecidos, de modo que a substituição ocorra de forma natural (Anisha *et al.*, 2013). Os hidrogéis podem ser preparados a partir de um único polímero, porém, estes materiais não irão apresentar todas as propriedades almejadas. A partir deste fato, pode-se haver uma combinação de dois ou mais polímeros, tornando possível que este hidrogel venha a ter as características desejadas.

Esta combinação pode ser entre um polímero de origem sintética e outro de origem natural (biopolímero), como também uma combinação de dois polímeros de mesma origem (Kanimozhi *et al.*, 2016). Por serem considerados materiais bioinertes e biocompatíveis, devido ao fato de apresentarem pouca ou nenhuma toxicidade, estes têm uma ampla aplicação na área biomédica, como, lentes de contato, órgãos artificiais, curativos para queimaduras, entre outros (Oliveira *et al.*, 2015). Muitas vezes para aumentar suas propriedades ou gerar novas, são adicionados aos hidrogéis materiais oriundos de diferentes classes de materiais (metais, sílica, cristais de celulose, entre outros), sem que haja mudança em suas características iniciais e que resulte na formação de um hidrogel compósito. Um fato interessante é que estes materiais incorporados na formulação dos hidrogéis muitas vezes são de fácil obtenção e baixo custo (Tang *et al.*, 2009).

Um exemplo de material que pode ser adicionado a hidrogéis é a hidroxiapatita (HAp). Pode ser encontrada, por exemplo, em ossos, como de origem bovina, um dos maiores resíduos de descartes de frigoríficos e de baixo preço. Por meio de ossos bovinos também pode-se obter o colágeno (Hoshi *et al.*, 2012). Acabando por se obter um hidrogel compósito com novas propriedades por meio da presença destes materiais.

Objetivo Geral:

Preparar e caracterizar hidrogéis compósitos para que apresentem potencial aplicação como biomateriais.

Objetivos Específicos:

- a) Desenvolver uma rota para obtenção do pó de osso bovino (POB) a partir de um fragmento ósseo bovino.
- b) Preparar hidrogéis compósitos a partir de dois polímeros, um de origem sintética (PVA) e outro de origem natural (SC), através do método de congelamento/descongelamento, adicionando a este o POB.
- c) Caracterizar as propriedades estruturais, físico-químicas, assim como as propriedades morfológicas e de retenção de líquidos dos hidrogéis compósitos formados.
- d) Realizar ensaios biológicos afim de verificar o potencial dos hidrogéis compósitos como biomateriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

A utilização de materiais com o objetivo de auxiliar na saúde e bem-estar da humanidade já vem sendo utilizada a mais de um século. O registro mais antigo se data de 2.000 a.c., no antigo Egito, com o uso de suturas de linho e ouro (Au). Desde lá, foram desenvolvidos vários outros materiais, como por exemplo, dentes artificiais de conchas, ferro, substitutos ósseos, órgão artificiais, entre outros (Pires *et al.*, 2015). Com o avanço da tecnologia, os esforços em prol do desenvolvimento de pesquisas pela busca por materiais que tenham o objetivo de não só facilitar a vida como também melhorá-la têm sido realizadas. Sendo assim, nas últimas décadas, foram desenvolvidos os biomateriais, capazes de atender a maioria destes requisitos buscados (Chen *et al.*, 2016).

O termo "biomaterial" apresenta uma definição consolidada, sendo classificado como “material destinado a interagir com sistemas biológicos, tendo o objetivo de tratar, aumentar ou substituir qualquer órgão, tecido ou função do corpo”. Estes materiais passaram de apenas interagir nos processos biológicos do corpo, para regenerar órgãos e tecidos (O'Brien *et al.*, 2011).

No início do seu desenvolvimento, o objetivo era obtê-los como biocompatíveis, onde pudessem substituir algum tecido danificado e promover suporte mecânico, com um mínimo de resposta biológica. Ao longo do tempo, buscou-se aumentar o tempo de vida destes implantes, a interação deste com o tecido do hospedeiro; obter materiais biodegradáveis, que apresentassem a capacidade de serem incorporados e absorvidos (após dissolução) pelo tecido do hospedeiro. Recentemente, os estudos se baseiam no desenvolvimento de materiais biomiméticos, que possam participar de forma ativa no processo de recuperação, atuando de forma a estimular em nível celular o local aplicado (Chen *et al.*, 2016).

Para que um material possa ter aplicação, uma série de requisitos devem ser levados em consideração. O efeito que o ambiente orgânico irá oferecer ao material (corrosão, degradação) e também, o efeito que o próprio material terá no organismo. São fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado e atenção, pois a estes está associada a biocompatibilidade. A interação que ocorre entre o tecido vivo e o biomaterial, associada a resposta do organismo a este, é o ponto mais desafiador no desenvolvimento deste tipo de material. A busca por materiais que

sejam bioinertes e biodegradáveis vem crescendo, pois além de substituírem tecidos traumatizados, também podem propiciar a recuperação do tecido, podendo atuar em metabolismos intra e extracelulares que são responsáveis pela reprodução celular, propagando o crescimento do tecido danificado (Pereira *et al.*, 1999).

Existe uma classificação dos biomateriais, onde os divide em três tipos; bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. Os intitulados bioinertes, são materiais aceitos pelo organismo, menos suscetíveis a causar uma reação biológica adversa, devido a apresentar estabilidade química. Apresenta a característica de formar envoltório fibroso de espessura mínima e liberar quantidades de produtos químicos. Os exemplos mais utilizados são, alumina, carbono, titânio e suas ligas e zircônia.

Os denominados bioativos, são materiais nos quais ocorrem ligações químicas entre o tecido e estes. Apresentam a capacidade de formar tecido sobre a superfície e assim estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais. Os materiais mais utilizados são aqueles a base de fosfatos de cálcio, como as que formam os vidros, as vitrocerâmicas, HAp, entre outros. Já os bioreabsorvíveis ou biodegradáveis, são materiais que quando em contato com tecidos por um certo período acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Os produtos de sua degradação não são tóxicos, sendo eliminados no metabolismo normal. São muito utilizados como implantes temporários, não sendo necessário uma nova intervenção cirúrgica para retirar o material implantado. Os exemplos mais utilizados para este tipo de material são o fosfato tricálcico (β -TCP) e os polímeros poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico) (Callister *et al.*, 2007).

Uma ampla gama de materiais pode dar origem aos biomateriais, como metais (Zhou *et al.*, 2016), cerâmicas (Affatato *et al.*, 2015), polímeros (Pires *et al.*, 2015) e compósitos (Caló *et al.*, 2015). Estes materiais podem ser utilizados isoladamente ou em combinação uns com os outros, a fim de se obter diferentes características e propriedades.

Os polímeros são os mais utilizados no campo de aplicações médicas, por apresentarem melhores propriedades (químicas, por exemplo) do que os metais e cerâmicas. Polímeros podem apresentar propriedades únicas como, flexibilidade, resistência ao ataque bioquímico, biocompatibilidade, são leves, fáceis de moldar e produzir sob diversas formas. Entre os exemplos de polímeros sintéticos tem-se o

poli tereftalato de etila (PET), polipropileno, polietileno. Alguns exemplos de polímeros naturais são a quitosana, alginato e celulose.

A classe denominada compósitos, engloba os materiais constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço ou modificador), cujas características podem somar as propriedades combinadas dos constituintes. Na maioria das vezes se dá entre polímeros, ou a adição de algum material de reforço na matriz do mesmo. Sendo aí denominados de biocompósitos. O desenvolvimento destes tem atraído grande interesse devido as diversas propriedades que podem apresentar. Alguns exemplos de suas aplicações estão no campo de dispositivos para entrega de drogas, engenharia de tecidos, cosméticos, dentre outros. Um exemplo de carga (reforço) adicionado à matriz dos polímeros é a HAp (uma fase do fosfato de cálcio) (Pires *et al.*, 2015; Kohn *et al.*, 2013).

Atualmente, a utilização dos biomateriais atende uma ampla variedade de aplicações, como dispositivos biomédicos (biossensores, tubos de circulação sanguínea), materiais implantáveis (substitutos ósseos, válvulas cardíacas, lentes), dispositivos para liberação de medicamentos (na forma de filmes, subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (coração, pulmão, pele), curativos, entre vários outros (Pereira *et al.*, 1999).

2.2 Scaffolds

Pesquisas na área de materiais que possam ser utilizados como suporte para regeneração de tecidos e órgãos vêm sendo amplamente realizadas. É intensa a busca por materiais que apresentem uma estrutura que se assemelhe aos tecidos, como por exemplo, apresentar um formato tridimensional (3D) e uma porosidade apropriada, semelhantes às de tecidos vivos, facilitando assim o desenvolvimento das células, a fim de que possam substituir os tecidos danificados. Com base nestas pesquisas, foram desenvolvidos os *scaffolds*, materiais que apresentam propriedades morfológicas que atendem aos requisitos anteriormente mencionados (O'Brien *et al.*, 2011). De modo geral, estes biomateriais são conhecidos como suportes biológicos ou sintéticos, utilizados para o cultivo de células, podendo ser ou não inseridos no paciente (Barbanti *et al.*, 2005).

Scaffolds são materiais que podem ser carregados com células vivas ou fatores específicos que estimulem, por exemplo, o crescimento ósseo, favorecendo

a regeneração ou substituição de forma natural (Tsiourvas *et al.*, 2016). Apresentam uma estrutura 3D, altamente porosa podendo propiciar e potencializar o crescimento celular, a difusão de oxigênio e a entrega de nutrientes, mimetizando o ambiente natural do tecido. Para ser considerado um material ideal deve ser biocompatível, biodegradável, promover a adesão e proliferação metabólica das células (Sivashankari *et al.*, 2016).

A característica de maior importância que um *scaffold* deve apresentar para ser considerado ideal é a porosidade, pois é a partir da interligação dos poros que será realizada a aderência e proliferação das células, ocasionando o desenvolvimento dos tecidos. Além de também apresentar propriedades mecânicas que correspondam com o local onde será feito o implante (León-Mancilla *et al.*, 2016). As propriedades mecânicas adequadas são um fator importante para que um *scaffold* possa ser aplicado como biomaterial. A bioestabilidade depende de muitos fatores, como resistência, elasticidade e degradação química. É importantíssimo manter a resistência mecânica após a aplicação, como para a reconstrução de tecidos duros, que suportem altas cargas, como cartilagem e ossos (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Os *scaffolds* podem ser preparados a partir de uma grande variedade de polímeros, tanto os de origem natural quanto de origem sintética. No entanto, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, principalmente após a implantação, para que o organismo possa absorvê-los (Tsiourvas *et al.*, 2016). Um tipo de *scaffold* que vem sendo muito utilizado em diversos ramos de pesquisas, em prol de materiais biocompatíveis, são os hidrogéis.

2.3 Hidrogéis

Para que um substituto dérmico seja considerado eficaz deve apresentar suporte mecânico e proporcionar uma estrutura porosa apropriada para a orientação das células; como também um microambiente, a fim de estimular o fator de crescimento celular. Muitos estudos têm mostrado que a adequada distribuição de poros, retenção de água, proporcionando o crescimento e formação de tecidos são cruciais para se ter sucesso no tratamento e lesões (Yan *et al.*, 2013).

A concepção e aplicação de hidrogéis biodegradáveis aumentou na área biomédica, permitindo o desenvolvimento do campo dos *scaffolds*. Devido ao seu

potencial em absorver altos teores de água mantendo a sua forma, grande porosidade e consistência macia, eles conseguem reproduzir o ambiente do tecido vivo (Caló *et al.*, 2015). Estes materiais podem ser originados por polímeros sintéticos, naturais, homopolímeros ou copolímeros (Gibas *et al.*, 2010).

Os hidrogéis formados a partir do uso de polímeros naturais têm inúmeras vantagens potenciais como biocompatibilidade, degradabilidade controlada e interação celular. Podem ser compostos por uma ampla gama de polímeros, e geralmente exibem propriedades mecânicas limitadas. Ao contrário, os polímeros sintéticos podem ser preparados com suas funções e estruturas controladas (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Estes materiais podem ser quimicamente estáveis ou se degradar, e conseqüentemente, desintegrar ou se dissolver. Conseguem absorver até milhares de vezes o seu peso seco, em soluções aquosas, devido a sua formação se dar por redes poliméricas tridimensionais (Caló *et al.*, 2015). A quantidade de líquido absorvida é um parâmetro de extrema importância, pois esta irá implicar em sua aplicação. Por exemplo, é importante manter um ambiente úmido no processo de cicatrização de feridas (Gibas *et al.*, 2010).

Esta estrutura 3D na qual os hidrogéis são formados pode ser constituída por ligações químicas ou forças de coesão, como interações iônicas, forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio (Bajpai *et al.*, 2008), como ilustrado na **Figura 1**. Os grupos hidroxilas são responsáveis pela sua hidrofiliicidade e a cadeia principal de carbono assegura estabilidade química e mecânica (Kubinová *et al.*, 2009).

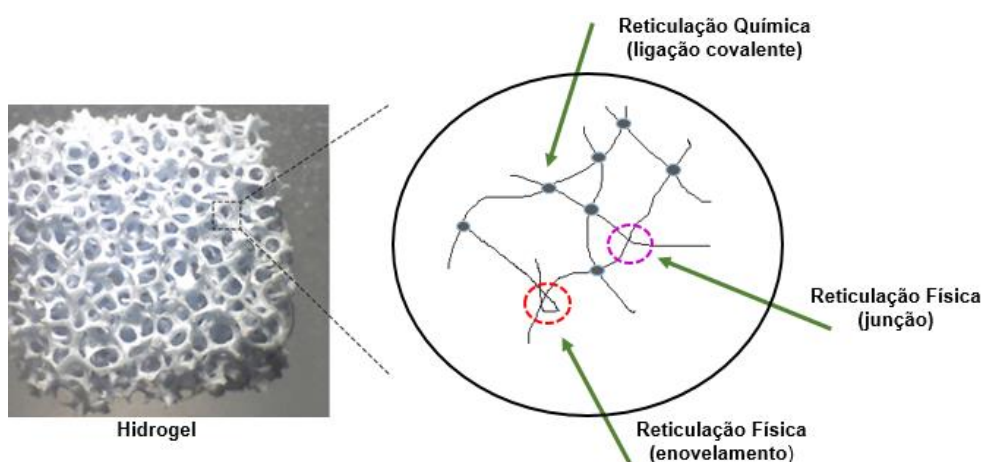


Figura 1. Ilustração de uma rede tridimensional de um hidrogel.

Uma das propriedades indispensáveis que os hidrogéis devem apresentar é a biocompatibilidade, definida como a capacidade de um material estar em contato com órgãos do corpo, sem apresentar qualquer dano para os seus tecidos circundantes e desencadear respostas indesejáveis (Caló *et al.*, 2015). Além de deverem apresentar boa elasticidade, robustez e estabilidade mecânica; para que se tornem excelentes biomateriais (Bajpai *et al.*, 2008). Os hidrogéis podem ser encontrados sob diversas formas, por exemplo, moldados (lentes de contato), em pó (comprimidos ou cápsulas), micropartículas (bioadesivo ou tratamento para lesões), revestimentos (implantes ou cateteres, revestimento sob a parede capilar), dentre vários outros. (Hoffman *et al.*, 2002).

A combinação entre matrizes poliméricas e materiais inorgânicos e orgânicos de outras classes tem sido cada vez mais utilizada para o preparo de hidrogéis compósitos. Estes consistem em uma mistura polimérica com partículas ou fibras, fornecendo uma estrutura que não perca as características do hidrogel, mas sim que agregue novas propriedades atrativas (aumento das propriedades mecânicas ou de absorção de líquidos, por exemplo) (Bae *et al.*, 1993). Um exemplo de material que pode ser adicionado à matriz do hidrogel são os argilominerais, os quais podem prover ao hidrogel compósito maior resistência mecânica sem a perda de elasticidade (Ekici *et al.*, 2006).

2.3.1 Processos de Reticulação para Formação de Hidrogéis

Existem diferentes formas de sintetizar os hidrogéis a fim de formar suas reticulações, denominados métodos químicos ou físicos. Como ilustrado na **Figura 2**, observa-se a formação de hidrogéis com origem em um polímero, onde sua rede 3D pode ser formada por método químico (*crosslink*) ou físico (por exemplo, interação física). Através da mesma pode-se avaliar que hidrogéis formados pelo método químico apresentam uma estrutura mais organizada que pelo método físico (Hoffman *et al.*, 2002).

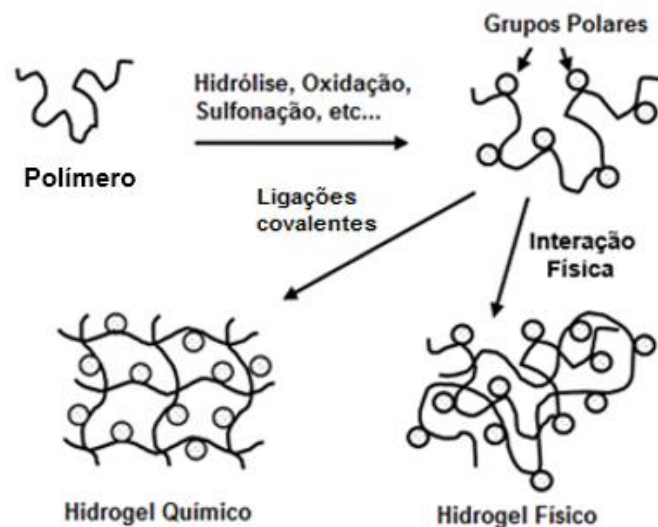


Figura 2. Esquema dos diferentes métodos para a formação de hidrogéis, por meio de método químicos (crosslink) e físico (interação física) a partir de um polímero (adaptado de Hoffman *et al.*, 2002).

Também conhecidos como hidrogéis permanentes ou químicos, apresentam em sua matriz constituída por redes covalentes reticuladas. Podem ser originados da reticulação de polímeros, através da utilização de algum agente reticulante, por exemplo formaldeído, a fim de formar uma rede com ligações cruzadas (Hoffman *et al.*, 2002). No entanto, este tipo de material possui algumas limitações para o uso em aplicações biomédicas, devido a utilização de compostos tóxicos durante o seu preparo (Bajpai *et al.*, 2008).

Os hidrogéis físicos ou também chamados de hidrogéis reversíveis, são aqueles mantidos por envoltórios moleculares ou forças químicas, como iônica, ligações de hidrogênio e ainda forças hidrofóbicas (Hoffman *et al.*, 2002). É possível revertê-los mudando as condições do ambiente, como o pH, força iônica da solução e temperatura (Caló *et al.*, 2015). Um exemplo é o processo denominado congelamento/descongelamento (*freezing-thawing*).

Este método consiste em submeter o hidrogel a ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento, promovendo assim a formação de reticulações, como ilustrado na **Figura 3** (Kim *et al.*, 2015).

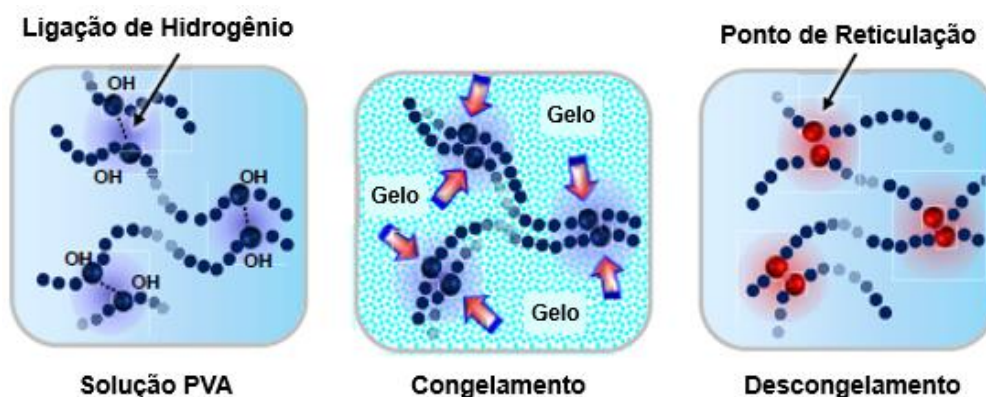


Figura 3. Representação esquemática do método de congelamento/descongelamento na formação de hidrogéis (adaptado de Kim *et al.*, 2015).

Durante o congelamento da solução, o gelo cria uma região amorfa que induz o crescimento de cristalitos poliméricos que atuam como pontos de reticulação física entre as cadeias do polímero, produzindo um hidrogel insolúvel em água. As reticulações são responsáveis pelas propriedades mecânicas dos hidrogéis, dependentes da concentração do polímero, tempo de congelamento e temperatura, assim como o número de ciclos de congelamento/descongelamento (Kim *et al.*, 2015).

Estas reticulações promovem um material com tamanhos de poros aleatórios. Devido a apresentar zonas com mais cadeias poliméricas do que outras, que influenciarão na distribuição e, conseqüentemente no tamanho dos poros. Com o congelamento das moléculas de água, os locais onde estas irão descongelar formaram poros com diferentes tamanhos. Este fato explica a formação de hidrogéis com aspectos mais esponjosos, elimina totalmente a existência de radicais livres, produzindo materiais com elevada resistência mecânica e boa elasticidade (Hassan *et al.*, 2000). Todas estas características favorecem sua aplicação, em por exemplo, carreador de sistemas de liberação controlada de fármacos (Hoare *et al.*, 2008).

O aumento no número de ciclos de congelamento/descongelamento acarreta no aumento no número de poros do material e seus tamanhos. Entretanto, utilizar muitos ciclos produzirá efeito adverso, pois há um aumento da densidade de reticulações, restringindo a mobilidade das cadeias poliméricas (Hassan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2015).

2.3.2 Polímeros no Preparo de Hidrogéis

Os polímeros podem agir como uma matriz para suportar o crescimento celular, devido a apresentarem várias propriedades, como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, e por serem de fácil modificação através da inserção de grupos funcionais desejáveis (Lee *et al.*, 2007). Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais, a diferença está no fato de que os oriundos de polímeros naturais não apresentam uma força mecânica satisfatória, porém tem como vantagens ser biocompatível e biodegradável. Por outro lado, os de origem sintética, na maior parte das vezes, não apresentam boas propriedades bioativas (Bajpai *et al.*, 2008).

Devido a suas propriedades bioativas, os polímeros naturais apresentam melhores interações com as células, permitindo melhorar o desempenho destas no sistema biológico. Os polímeros sintéticos são muito úteis na área biomédica, devido as suas propriedades, como porosidade e características mecânicas. Estes são normalmente de custo mais alto do que os naturais. Muitos deles têm propriedades físico-químicas e mecânicas comparáveis com as de tecidos biológicos (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Existe uma ampla variedade de polímeros que podem ser utilizadas para o preparo dos hidrogéis, dentre estes os de origem natural, sintética ou a combinação de ambos. Como por exemplo, hidrogéis a base de pectina, colágeno e sulfato de condroitina (exemplos de polímeros naturais) (Hoffman *et al.*, 2002) e hidrogéis a base de poliacrilamida, poli (vinil álcool), poli (vinilpirrolidona) (exemplos de polímeros sintéticos) (Caló *et al.*, 2015). E hidrogéis formados pela combinação de ambos os tipos de polímero como, por exemplo, colágeno-acrilato, alginato-acrilato (Hoffman *et al.*, 2002).

2.3.2.1 Sulfato de Condroitina (SC)

Membro da família dos glicosaminoglicanos, pertence a classe dos biopolímeros, apresenta origem natural e elevada massa molecular. O SC é comumente extraído a partir de fontes animais como cartilagem de peixes (tubarão), mamíferos (bovino e suínos) e aves (Ebube *et al.*, 2002). É um dos componentes da matriz extracelular de muitos tecidos conjuntivos, incluindo cartilagem, ossos, pele, ligamentos e tendões. Sua estrutura é formada pela repetição de $\beta(1,4)$ -D ácido

glucurônico e $\beta(1,3)$ -*N*-acetil-*D*-galactosamina; os dois isômeros mais comuns, são respectivamente os padrões de sulfonação nas posições C₄ e C₆ (Zhang *et al.*, 2015), como representado na **Figura 4**.

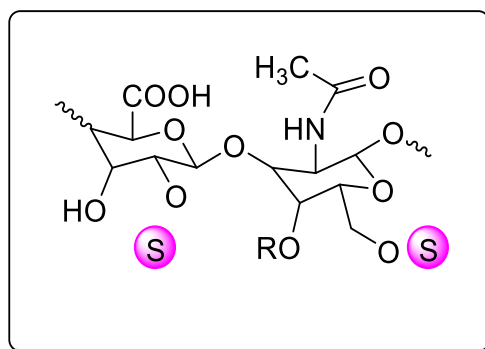


Figura 4. Representação das unidades repetidas do SC.

Ele também contribui em várias bioatividades, como, desenvolvimento do sistema nervoso central, cicatrização de feridas e também fatores de crescimento celular (Zhang *et al.*, 2015). Apresenta a capacidade de estimular a síntese de proteoglicanos e diminuir a atividade catabólica de condrócitos inibindo a síntese das enzimas proteolíticas. O SC também exerce atividade anti-inflamatória (Muzzarelli *et al.*, 2012).

Hidrogéis formados a partir de SC reticulado apresentam um adequado ambiente *in vitro*, favorecendo o crescimento e proliferação de células, em especial os condrócitos e produtos cartilaginosos. Como resultado, é um dos principais componentes de hidrogéis híbridos que podem atuar em aplicações *in vivo* (Abbadessa *et al.*, 2016).

2.3.2.2 Poli (vinil álcool) (PVA)

O PVA é uma resina polimérica sintética, solúvel em água a altas temperaturas, e a mais produzida em volume no mundo. Excelente adesivo, possui boa resistência mecânica a solventes, óleos e graxas, e sua resistência a passagem de oxigênio é superior a qualquer polímero conhecido. Tem sido utilizado em processamento de papel e fibras como estabilizante de emulsão, além de ser importante matéria prima para filmes (Aranha *et al.*, 2001).

Pode ser obtido por reação de polimerização do acetato de vinila, gerando o poli (acetato vinílico) (PVAc); ocorrendo reação de hidrólise do PVAc formando o

PVA, como representado na **Figura 5**. A relação entre o percentual de hidroxilas no PVA, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de radicais ácido acético representa o grau de hidrólise. O aumento no grau de hidrólise implica na redução de sua solubilidade em água, na adesão em superfícies hidrofílicas, viscosidade e resistência a tração (Costa Jr. *et al.*, 2008).

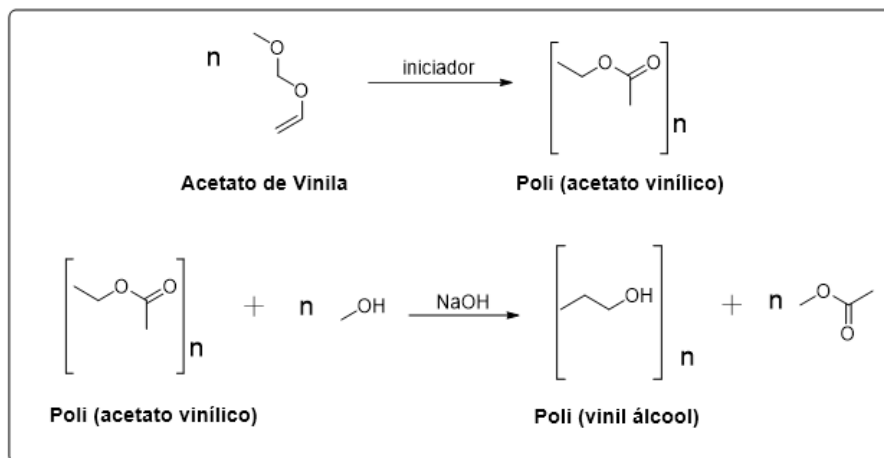


Figura 5. Esquema ilustrativo da reação para obtenção do PVA.

O PVA é utilizado principalmente em solução. Solúvel em solventes altamente polares e hidrófilos, como, acetamida e água. Sua solubilização em água requer temperaturas elevadas, devido à alta energia associada a dissolução da fase cristalina do PVA. Após a dissolução, ele se mantém solúvel mesmo a temperatura ambiente. O efeito da temperatura na solubilidade está associado à quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Quando se aumenta a temperatura, as ligações de hidrogênio são rompidas, diminuindo as forças inter e intramoleculares, aumentando a solubilidade. Contudo, o aumento na temperatura pode quebrar as ligações de hidrogênio diminuindo sua solubilidade em água (Aranha *et al.*, 2001).

Hidrogéis a base de PVA quando reticulados, possuem muitas características atrativas que os tornam excelentes candidatos a biomateriais, como, biodegradabilidade, atoxicidade, caráter bioadesivo. Pesquisas recentes têm demonstrado que quando hidrogéis de PVA entram em contato com o sangue, este parece ativar as plaquetas. Além disso, apresentam elevada capacidade de absorver água e fluidos biológicos, e natureza elástica. Devido a estas propriedades, o PVA é

capaz de simular o tecido natural, tendo diversas aplicações, como, lentes de contato, válvulas artificiais cardíacas, substituição de tecidos moles, entre outros (Li *et al.*, 2004). Um ramo dos hidrogéis de PVA que vem adquirindo atenção em pesquisas são os hidrogéis compósitos. Adicionando a sua matriz algum material compósito que poderá agregar novas propriedades atrativas ao hidrogel. Como, por exemplo, a HAp, por esta apresentar propriedades que podem auxiliar no desenvolvimento do tecido ósseo (Ye *et al.*, 2014).

2.4 Pó de Osso Bovino (POB)

Os ossos são um exemplo de tecido duro, eles têm o objetivo de apoiar, proteger, formar as estruturas do corpo e auxiliar nos movimentos. A sua dureza tem origem de sua composição química, grande parte da água é substituída por materiais inorgânicos. O cálcio (Ca) e o fósforo (P) são os principais componentes dos ossos humanos; o mineral oriundo destes dois é a HAp. Contudo, os ossos não só são constituídos de materiais inorgânicos, mas também substâncias orgânicas, como, colágeno, proteoglicanos, entre outros. Estes componentes não são exclusivos dos ossos, estão presentes também em tecidos fibrosos, como, pele, tendão ou ligamentos (Hoshi *et al.*, 2012).

Os ossos são constituídos de uma matriz orgânica de colágeno (tipo I), a proteína mais abundante em mamíferos, contendo proteoglicanas de baixa massa molecular. E uma matriz mineral, a HAp, formada por um processo de biomineralização, no qual a matriz orgânica é a base e fornece a orientação para deposição do material inorgânico (Galia *et al.*, 2011).

A HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é um material cerâmico utilizado para reconstituição do tecido ósseo e dentes. Pode ser obtido de forma sintética ou natural. De origem natural, pode ser obtida por ossos bovinos, frango, peixes, suínos, ovinos, cascas de ovos, coral e conchas. Vários estudos têm demonstrado que a HAp sintética apresenta diferentes características da HAp de origem natural (Sofronia *et al.*, 2014). Ela é um dos materiais mais promissores para implantes ósseos, devido a sua excelente biocompatibilidade e semelhança química com os tecidos rígidos. A sua principal limitação como implante é a fragilidade mecânica e baixa tenacidade a fratura, bem menor que os ossos humanos (Zhang *et al.*, 2002).

A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química, para obtenção de HAp sintética, apresenta vantagens quando comparado aos métodos naturais, como, baixo custo e simplicidade, no entanto, a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases (Rigo *et al.*, 2007).

O colágeno apresenta a função de transmitir aos ossos ductibilidade e capacidade de absorver energia. Já a HAp confere propriedades estruturais e mecânicas, excelente osteocondutividade e osteoindutividade. Estudos tem demonstrado que a HAp não só facilita a formação de tecido ósseo, mas também modula os perfis de crescimento e expressão de tumores ósseos metastáticos (Ye *et al.*, 2014).

Um interessante trabalho contendo HAp foi publicado por Ye e colaboradores em 2014, onde neste foi desenvolvido um hidrogel para atuar como *scaffold*, constituído de PVA, formando um hidrogel compósito. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo material que possa ser utilizado como modelo *in vitro* frente a metástases ósseas causadas pelo câncer de mama. Em resumo, foram preparados *scaffolds* de modo satisfatório, onde sua arquitetura (como tamanho e distribuição de poros) foi de grande importância em sua aplicação. Quanto aos testes biológicos, os materiais mostraram grande adesão a proteínas séricas (que compõem o plasma sanguíneo); com o objetivo de tornar o material mais semelhante ao ambiente corporal. Sugerindo que estes materiais podem ser utilizados como suportes no desenvolvimento de modelos *in vitro* para estudos referentes a metástases ósseas causadas pelo câncer de mama. E a partir da presença de HAp nestes materiais, poder se estudar a interação que estas células cancerosas têm com o tecido ósseo humano (Ye *et al.*, 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes Utilizados

- Acetona (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Brometo de Potássio (KBr) (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Cloreto de Potássio (KCl) (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Cloreto de Sódio (NaCl) (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Enzima Hialoronidase (400-1000 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich, EUA)
- Etanol (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Fosfato de Sódio Dibásico (NaH_2PO_4) (P.A., ACS Synth, Brasil)
- Hidróxido de Potássio (KOH) (P.A., ACS Synth, BR)
- Poli (Vinil Álcool) (Massa molar 85-124 kg/mol, 99% hidrolisado, Sigma-Aldrich, EUA)
- Sulfato de Condroitina (doador por Solabia, Maringá, Brasil)

3.2. Procedimento Experimental

3.2.1. Soluções Tampões

- Tampão Fosfato Salina (PBS)

Inicialmente foi pesado em uma balança analítica 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 e 1,15 g de NaH_2PO_4 , homogeneizou-se os com água destilada até completa dissolução. Após, adicionou-se os em um balão volumétrico de 1000 mL e completou seu volume com água destilada. A seguir mediu seu pH utilizando um pHmetro, marca Hanna Instruments (Portugal), tendo o mesmo que apresentar um valor de 7,45.

- Diferentes pHs

De acordo com a **Figura 6**, abaixo, visualiza-se as quantidades de cada reagente utilizado para preparar as soluções tampões com diferentes valores de pH. Onde, quando precisar corrigir o valor do pH da solução, foram utilizados HCl 0,1 M (para diminuir os valores de pH, deixar o meio mais ácido) ou NaCl 0,1 M (para aumentar os valores de pH, deixar o meio mais básico).

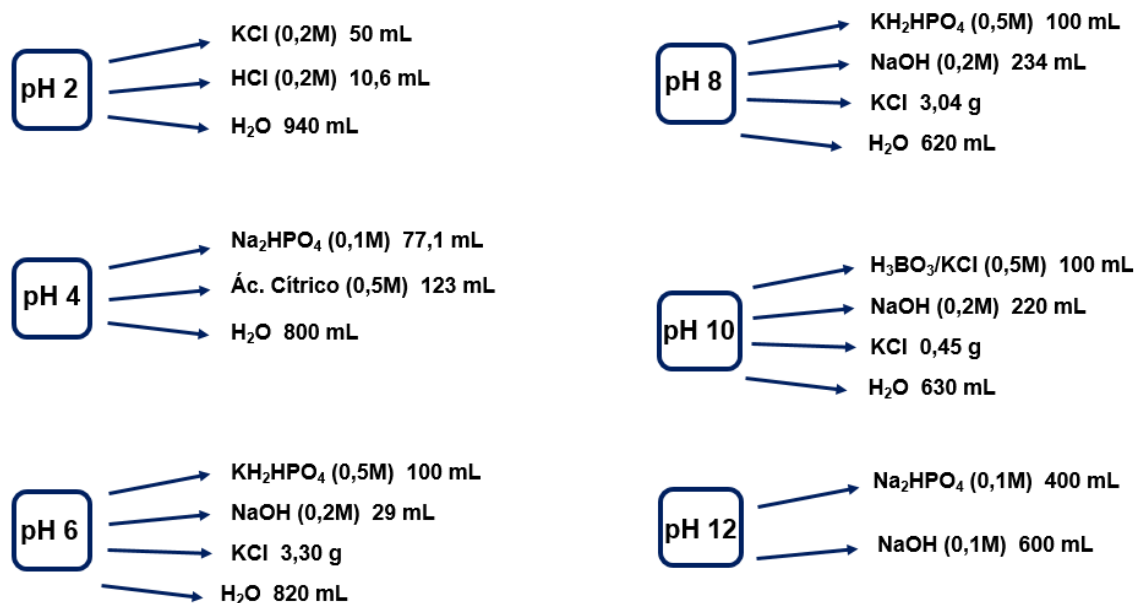


Figura 6. Esquema de preparo das soluções tampões utilizados.

Todas as soluções tampão foram preparadas de acordo com a farmacopeia americana (USP30-NF25, 2007).

3.2.2 Obtenção do POB

Uma fração de osso bovino (porção femoral) foi obtido em um açougue da cidade de Pelotas-RS. Inicialmente, fez-se a limpeza manual do mesmo, a fim de remover algum traço macroscópico de músculos, ligamentos e/ou cartilagem. Após, este foi imerso em água destilada e mantido a temperatura de aproximadamente 100 °C por 2,5 h. O material resfriado foi então mergulhado em uma solução alcóxida (KOH/etanol) durante 12 h a temperatura ambiente. Em seguida, sonificado por 15 min em banho de ultrassom, equipamento da marca UltraCleaner, modelo USC-800a (Brasil), contendo acetona a fim de remover algum material graxo restante. Já limpo, o fragmento de osso bovino foi seco em estufa a temperatura de 100 °C por 24 h e moído em um moinho de bolas marca Marconi, modelo MA350 (Brasil) durante 10 min a temperatura ambiente. O pó obtido foi separado granulometricamente utilizando uma peneira de 80 Mesh (< 180 µm). O POB foi caracterizado aplicando-se técnicas como difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), análises termogravimétricas (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2.3 Hidrogéis Compósitos

Os hidrogéis foram preparados a partir da mistura de duas soluções poliméricas utilizando a técnica de congelamento/descongelamento. A primeira, uma solução de PVA (15% m/v), foi preparada a partir da solubilização de 1,5 g de PVA em 10 mL de água destilada, sendo que a solução foi mantida sob agitação magnética a temperatura de 75 °C durante 12 h. A segunda solução preparada foi a de SC (30% m/v), para esta 3,0 g do biopolímero foi solubilizada em 10 mL de água destilada, e a mesma mantida a temperatura ambiente sob agitação magnética por 12 h. Posteriormente, as duas soluções foram misturadas sob agitação magnética moderada a temperatura ambiente. A solução resultante da mistura de ambas foi mantida sob agitação por aproximadamente 60 min, até a obtenção de uma mistura homogênea. Por seguinte, a solução PVA/SC foi levada ao freezer, a temperatura de aproximadamente -20 °C, com o objetivo de iniciar o processo de reticulação do material.

Foi aplicado o método de congelamento/descongelamento para formação de suas reticulações. Realizou-se 5 ciclos de congelamento/descongelamento com aproximadamente 24 h cada (16 h congelado e 8 horas descongelado). Ao final, o material foi imerso em uma solução de KCl por 30 min e em água destilada por mais 30 min. Por fim levado a estufa a 37 °C para secagem. Partindo desta mesma metodologia foram preparados hidrogéis compósitos, adicionando na etapa de mistura das duas soluções, algumas quantidades de POB, na razão 1, 5 e 10% (m/m) em relação a massa total de PVA/SC. Os hidrogéis obtidos foram denominados H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB, respectivamente.

Os hidrogéis preparados foram caracterizados utilizando técnicas de DRX, FTIR, TGA, MEV e espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX). Além disso, foram investigadas as propriedades mecânicas dos hidrogéis, bem com a suas propriedades de absorção e retenção de líquidos aquosos.

3.3 Caracterizações

3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação da composição molecular dos materiais foi realizada utilizando a técnica de FTIR em um equipamento da marca Shimadzu, modelo IR-Affinity-1, (Japão), acoplado ao acessório de refletância total atenuada (ATR) da marca

Shimadzu (Japão). Previamente as análises, foram preparadas pastilhas contendo as amostras sólidas trituradas e misturadas ao KBr anidro. As análises foram realizadas em um intervalo de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} com 64 varreduras por amostra.

3.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

As medidas de DRX foram realizadas em um difratômetro da marca Siemens, modelo D500 (Alemanha) equipado com uma fonte de radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), utilizando uma tensão de 40 KV e uma corrente de 1,75 mA. As medidas foram feitas em um ângulo de varredura (2θ) de 5 a 70° , com resolução de $0,02^\circ$ e velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$. As amostras foram analisadas na forma de pó.

3.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises térmicas foram realizadas no equipamento SDT Q600, da marca TA Instruments, modelo TA60 (EUA) a uma faixa de temperatura de 30 a 500°C , sob um fluxo de $\text{N}_{2(g)}$ de 100 mL/min, a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Amostras com peso entre 0,1 a 10,0 mg foram pesadas previamente e colocadas em porta amostra hermético de platina.

3.3.4 Avaliação Morfológica

3.3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia do POB foi também investigada utilizando um Microscópio Eletrônico de Transmissão, da marca JEOL, modelo JEM-1400 (EUA). Para a obtenção das imagens, a amostra foi preparada pela deposição de 5 μL de suspensão (0,02% em peso) no porta amostra (gride de cobre de 200 mesh, revestido com carbono, Pacific Grid-Tech, EUA). O excesso de líquido foi removido por absorção com papel filtro para evitar que as partículas se agreguem, e secas a temperatura ambiente. A imagem de MET foi obtida com uma aceleração potencial de 120 KV. O tamanho médio das partículas do POB foi calculado a partir da avaliação da dimensão de 20 partículas escolhidas aleatoriamente, com auxílio do software Size Meter, versão 1.1.

3.3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação morfológica dos materiais preparados nesta Dissertação (POB e hidrogéis) foi realizada com auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura, da marca JEOL, modelo JSM - 6610LV (EUA) equipado com microsonda de Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) utilizando durante a obtenção das micrografias uma aceleração potencial de 10 KV. Para a obtenção das imagens de MEV, a porção superficial das amostras foram previamente metalizadas com uma fina camada de Au em um metalizador da marca DentonVacuum, modelo Desky (EUA). Também foi utilizada a microsonda de EDX para avaliar a composição química da superfície dos materiais. O tamanho médio das partículas do POB foi calculado a partir da avaliação da dimensão de 50 partículas escolhidas aleatoriamente com o auxílio do software Size Meter, versão 1.1. De modo semelhante, o tamanho médio de poros dos hidrogéis preparados foi determinado a partir de 70 poros com tamanhos aleatórios em cada amostra. A dimensão dos poros foi avaliada com o auxílio do software Size Meter, versão 1.1.

3.3.5 Análises Mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis sintetizados foram determinadas por meio de ensaios de compressão dos materiais. Para isso, foi utilizado um equipamento texturômetro, marca TA.TXTplus (Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 50 N. Os parâmetros de cada ensaio de compressão foram fixados em, limite de compressão/deformação de 95% (até seu rompimento); velocidade de pré-teste 1mm/s; velocidade de teste 0,5 mm/s e velocidade de pós teste 1,5 mm/s. Os ensaios de compressão foram feitas com corpos de prova de forma cúbica (0,6 x 0,6 x 0,6 cm), os quais foram previamente intumescidos em solução tampão PBS (pH 7,4) por 24 h a temperatura ambiente. Os dados de compressão foram coletados na forma de curvas de tensão (MPa) versus deformação (%) e a partir delas foram determinados parâmetros como o Módulo de Young, a taxa de deformação e a força no ponto de ruptura. Os ensaios de compressão foram realizados com 3 replicatas para cada amostra.

3.3.6 Avaliação da Porosidade Total

A porosidade total dos hidrogéis com diferentes quantidades de POB foi avaliada utilizando o método de deslocamento de líquidos. Neste caso acetona foi utilizada como solvente, uma vez que a mesma preencha os poros sem alterar a morfologia do material. Adicionando-se uma quantidade conhecida do solvente (8 mL), imergiu-se o material neste, e após 24 h observou-se o deslocamento do líquido. Os valores de porosidade dos materiais foram calculados através da **Equação 1**. Os ensaios de porosidade total foram realizados com 3 replicatas de cada amostra.

$$\varepsilon \% = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \times 100$$

Equação 1. Taxa de porosidade total

Sendo

V_1 : Volume conhecido do solvente (mL)

V_2 : Volume deslocado (mL)

V_3 : Volume final (mL)

3.3.7 Teste de Absorção e Retenção de Líquidos Aquosos

Todos os hidrogéis preparados foram avaliados perante suas capacidades de absorver e reter líquidos, avaliando diferentes parâmetros, como, diferentes pHs do meio, retenção a temperatura constante e frente a uma força aplicada (centrifugação). Segue abaixo a descrição de cada teste realizado.

3.3.7.1 Efeito da Quantidade de POB

Foram pesados aproximadamente 500 mg de cada amostra, as quais foram mergulhadas em 100 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) durante 24 h a uma temperatura de 37 °C sem agitação magnética. Utilizando a **Equação 2** foram calculados os valores de intumescimento máximo de cada amostra. Os testes foram realizados com 3 amostras de cada amostra de hidrogel.

$$I (\%) = \frac{(M_i - M_f)}{(M_f)} \times 100$$

Equação 2. Taxa de intumescimento máximo

Sendo

M_i : Massa da amostra seca (mg)

M_f : Massa da amostra intumescida no equilíbrio (mg)

As amostras com maior capacidade de intumescimento foram utilizadas nos testes subsequentes.

3.3.7.2 Efeito do pH do Meio de Intumescimento

O efeito do pH do meio de intumescimento na capacidade de absorção dos hidrogéis compósitos foi investigado por meio da imersão das amostras pesando 500 mg em 100 mL de solução tampão durante 24 h a temperatura de 37 °C sem agitação magnética. Foram testadas soluções tampão com diferentes pHs (2 a 12). Os valores referentes a capacidade de intumescimento em diferentes pHs foram calculados utilizando a **Equação 2**. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.7.3 Avaliação da Taxa de Perda de Água

Em 100 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) foram imersos 500 mg de cada amostra durante 24 h em uma temperatura de 37 °C, sem agitação magnética. Posteriormente, as amostras foram recolhidas e, então, secas em estufa a 37 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras foram removidas da estufa e pesadas afim de se avaliar a cinética de perda de água. O processo de pesagem foi realizado até as amostras apresentarem peso constante. A perda de água em cada intervalo de tempo foi calculada utilizando a **Equação 3**.

$$I (\%) = \frac{(M_s - M_i)}{(M_i)} \times 100$$

Equação 3. Taxa de perda de água

Sendo:

M_s : Massa da amostra seca (mg)

M_i : Massa da amostra intumescida em diferentes intervalos de tempo (mg)

3.3.7.4 Capacidade de Retenção em Água

A determinação da capacidade de retenção de água das amostras foi realizada utilizando a centrifugação. Inicialmente as amostras de hidrogéis compósitos foram imersas em solução tampão PBS (pH 7,4) durante 24 h para que atingissem o intumescimento de equilíbrio. Posteriormente, estas foram pesadas e centrifugadas, em uma centrífuga de *ependorfs*, marca Minispin, modelo Plus Eppendorf (EUA), a 10.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Feito isso, as amostras foram novamente pesadas, e o cálculo utilizado para se obter o valor de retenção de água foi realizado utilizando a **Equação 4**.

$$Capacidade = \frac{M_c}{M_i} \times 100$$

Equação 4. Capacidade de retenção em água

Sendo:

M_c : Massa da amostra após ser centrifugada (mg)

M_i : Massa da amostra intumescida no equilíbrio (mg)

3.3.8 Teste de Biodegradabilidade *in vitro*

Ensaio de biodegradabilidade com as amostras dos hidrogéis compósitos foram realizados em dois meios; solução tampão PBS (pH 7,4) e solução tampão PBS (pH 7,4) suplementado com 3,0 mg da enzima hialuronidase (E) (600 unidades/mg) como segue o esquema da **Figura 7**.

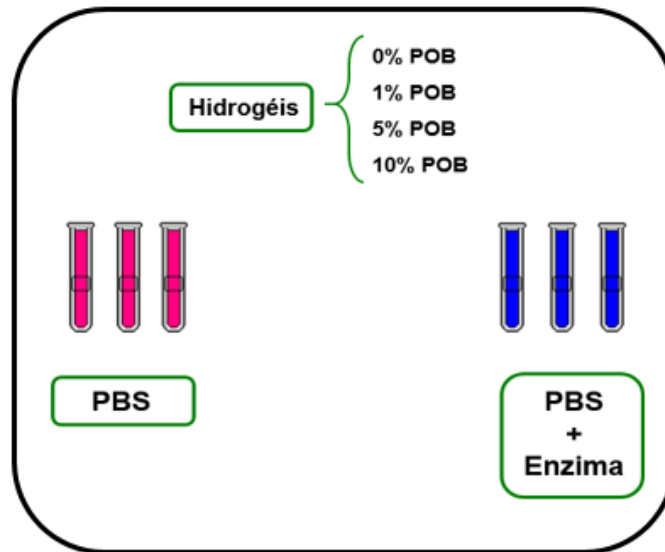


Figura 7.Esquema do ensaio de biodegradabilidade.

Manteve-se os tubos em repouso com as amostras durante 1 semana; após este período, lavou-se cuidadosamente as amostras com água destilada e, secou-as em estufa a 50 °C durante 48 h, e ao final pesou-as novamente. Em seguida, as amostras retornaram aos tubos de origem. As mesmas foram retiradas e pesadas nos intervalos de 2 e 3 semanas de incubação. O percentual de biodegradação das amostras foi calculado utilizando a **Equação 5**. Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em triplicada para cada amostra de hidrogel compósito em cada um dos meios analisados.

$$\% Biod = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100$$

Equação 5. Percentual de biodegradação dos hidrogéis

Sendo

M_i : Massa inicial da amostra (mg)

M_f : Massa após o período de incubação (mg)

3.3.9 Ensaios Biológicos

3.3.9.1 Ensaios *in vitro* de viabilidade e adesão celular

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o intuito de investigar se as amostras, H0%POB e H10%POB, apresentam alguma toxicidade frente a células saudáveis, utilizando o método colorimétrico com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]. Resumidamente, foram cultivadas células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) em DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*, Gibco, EUA) suplementado com 10% FBS (Soro Fetal Bovino, Gibco, EUA) e 50 µg/mL de getamicina (37 °C, 5% de CO₂). Elas foram armazenadas em recipientes plásticos selados para o seu respectivo cultivo. Para os ensaios de citotoxicidade, as amostras de biocompósitos, previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 min, foram colocadas em microplacas de cultura (24 poços), juntamente com 500 µL do meio de cultura, e foram incubados por 4 h (37 °C, 5% de CO₂). Feito isso, foram semeadas células sob o topo das amostras (densidade de semeadura 2,5 x 10⁵ células/mL de DMEM). Cada poço foi suplementado com FBS (10%) e 50 µg/mL de gentamicina. A placa de teste foi incubada a 37 °C e os meios de cultura foram substituídos em dias alternados. Após o tempo de incubação (24, 48 e 72 h), cada meio de cultura foi retirado e os poços lavados com solução tampão PBS (pH 7,4) (500 mL). O poço que não continha nenhuma amostra foi denotado como controle. Em seguida, foi adicionada a solução de MTT (2 mg por mL de PBS) nos poços, e as placas de teste foram incubadas durante 4 h (37 °C, 5% de CO₂) protegida da luz. Ao final, o MTT que não reagiu foi removido e então, foi adicionado 500 µL de DMSO com a finalidade de dissolver o produto formado. A densidade óptica das células vivas em cada poço foi medida em um micro leitor de placas, marca Bio-Tek Power Wave XS, (EUA) a 570 nm.

Para determinar a aderência das células nas amostras de hidrogéis, as amostras incubadas na etapa anterior foram recolhidas e lavadas com solução tampão PBS (pH 7,4), e em seguida, colocadas em uma nova microplaca de cultura contendo solução de MTT. Esta foi incubada a 37 °C por 4 h (5% de CO₂) na ausência de luz. O MTT que não reagiu foi removido e os cristais formados foram dissolvidos em DMSO por 15 min. A densidade óptica das células vivas foi medida em um leitor de microplaca a 570 nm.

3.3.9.2 Análises *in vivo*

Estas análises foram realizadas utilizando camundongos Swiss, adultos, do sexo masculino, pesando de 25,0 a 35,0 g. Eles foram mantidos em uma sala de animais separado, em um ciclo de 12 h de luz/escuridão, com luzes ligadas às 7 h, à temperatura ambiente (22 ± 1 °C), com livre acesso a comida e água. Os estudos foram realizados de acordo com as orientações da Comissão sobre Cuidados e Uso de Recursos Experimentais com Animais da UFPel (Brasil). O número de animais e as intensidades de estímulos nocivos utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos consistentes dos hidrogéis H0%POB e H10%POB.

Com o objetivo de se verificar a potencial biocompatibilidade das amostras H0%POB e H10%POB com a pele, os camundongos foram anestesiados por inalação com isoflurano, e após suas costas foram raspadas. Foi gerada uma ferida de aproximadamente 0,5 cm na parte traseira de cada camundongo com um perfurador de biópsia. Os hidrogéis em estudo, H0%POB e H10%POB, foram colocados no local da ferida, e um grupo denominado “controle” permaneceu sem tratamento.

A verificação de mudança na área da ferida foi realizada em tempos de 0, 3, 9 e 15 dias. Ao final destes, os animais foram sacrificados e a área da ferida foi removida para a observação macroscópica e determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO). As amostras de pele foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato de potássio (20 mmol/L, pH 7,4) contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (0,1 mmol/L). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 900 rpm a 4 °C durante 10 min para se obter uma fração de sobrenadante de baixa velocidade (S1). Por seguinte, fração S1 foi centrifugada novamente a 20.000 rpm a 4 °C, durante 15 min para produzir um pelete final (P2) que foi ressuspense em meio contendo solução tampão de fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 6,0) e brometo de hexadeciltrimetil (0,5 %). As amostras foram finalmente congeladas e descongeladas três vezes para o ensaio enzimático posterior. Para a determinação da atividade da MPO, uma alíquota de P2 ressuspensa (100 µL) foi adicionada em um meio contendo o meio de ressuspensão e *N,N,N',N'*-tetrametilbenzidina (1,5 mmol/L). A análise cinética da MPO foi iniciada depois da adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,01 %), e a cor da reação foi medida a 655 nm a 37 °C. Os resultados foram expressos como a densidade óptica

(OD)/mg de proteína/min. A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (1 mg/ml) como padrão.

3.3.10 Análises Estatísticas

Todos os dados que compõem esta Dissertação estão expressos em média $\pm$ desvio padrão com repetições ($n \geq 3$), para cada amostra em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o software OriginPro 8.5. Os dados correspondentes as análises *in vivo* foram avaliados por análise unidirecional de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls quando apropriado, e expresso como média $\pm$ S.E.M..

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Preparo dos Materiais

4.1.1 Obtenção do POB

Após a utilização do método proposto no item 3.2.2 do procedimento experimental para a obtenção do POB, obteve-se um fino pó de coloração branca, com tamanho de partícula $\leq 180 \mu\text{m}$, como pode ser observado na **Figura 8**. O POB utilizado na formulação dos hidrogéis compósitos não sofreu nenhum outro tipo de manipulação ou tratamento após a sua obtenção.



Figura 8. Aspecto final do POB.

4.1.2 Hidrogéis Compósitos

Foram preparadas três amostras de hidrogéis compósitos, com quantidades de POB variando entre 1 e 10% POB (m/m) e uma de hidrogel sem a presença do POB, utilizado para fins de comparação. Ao final dos 5 ciclos de congelamento/descongelamento os hidrogéis obtidos apresentaram uma aparência tipo esponja, conforme demonstrado na **Figura 9a**. Após serem secos em estufa os mesmos apresentaram o aspecto mostrado na **Figura 9b**. Deve ser ressaltando que estas imagens têm caráter representativo; todos os hidrogéis formados obtiveram mesma coloração e formato.

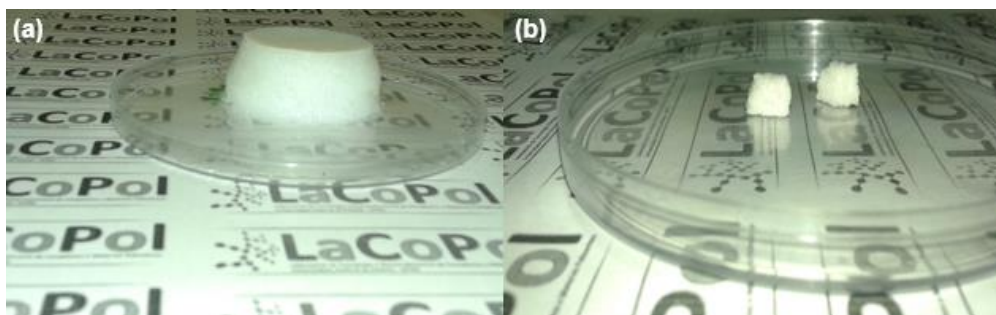


Figura 9. Fotos dos hidrogéis **(a)** formados após os 5 ciclos de congelamento/descongelamento e **(b)** após secagem em estufa.

4.2 Caracterizações

4.2.1 Análises de FTIR

A técnica de FTIR permite obter um espectro onde as bandas características de cada grupo funcional que compõem a amostra analisada estão representadas. A **Figura 10a** exibe os espectros de FTIR relativos aos três materiais precursores utilizados para o preparo dos hidrogéis compósitos. O espectro obtido para o POB apresenta as bandas características dos grupamentos fosfato (PO_4^{3-}) (1030 cm^{-1}) e carbonatos (CO_3^{2-}) (1454 cm^{-1}), os quais constituem a fase inorgânica do mesmo (HAp). Além disso, é observada uma banda em 1622 cm^{-1} (deformação axial da ligação C=O de amidas) e uma banda alargada em 3280 cm^{-1} (moléculas de água estruturais ou adsorvidas), as quais são características da fase orgânica do POB, constituída principalmente por colágeno (Galia *et al.*, 2011).

No espectro obtido para o PVA é observada uma banda alargada próximo a 3450 cm^{-1} atribuída a vibração dos grupos hidroxila e bandas em 2916 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} atribuídas estiramento da ligação C-H de grupos alquila e a vibração das ligações C-O. Ainda, observa-se uma banda pouco intensa próximo a 1710 cm^{-1} (estiramento C=O) devido a presença de grupos acetato não hidrolisados (Kim *et al.*, 2010). Para o SC verifica-se a presença das bandas relativas ao grupamento amida e estiramento da ligação C-O (1650 cm^{-1} e 1420 cm^{-1}), como também a banda atribuída a vibração da ligação sulfato (SO_4^{2-}) em 1253 cm^{-1} (Amrutkar *et al.*, 2009).

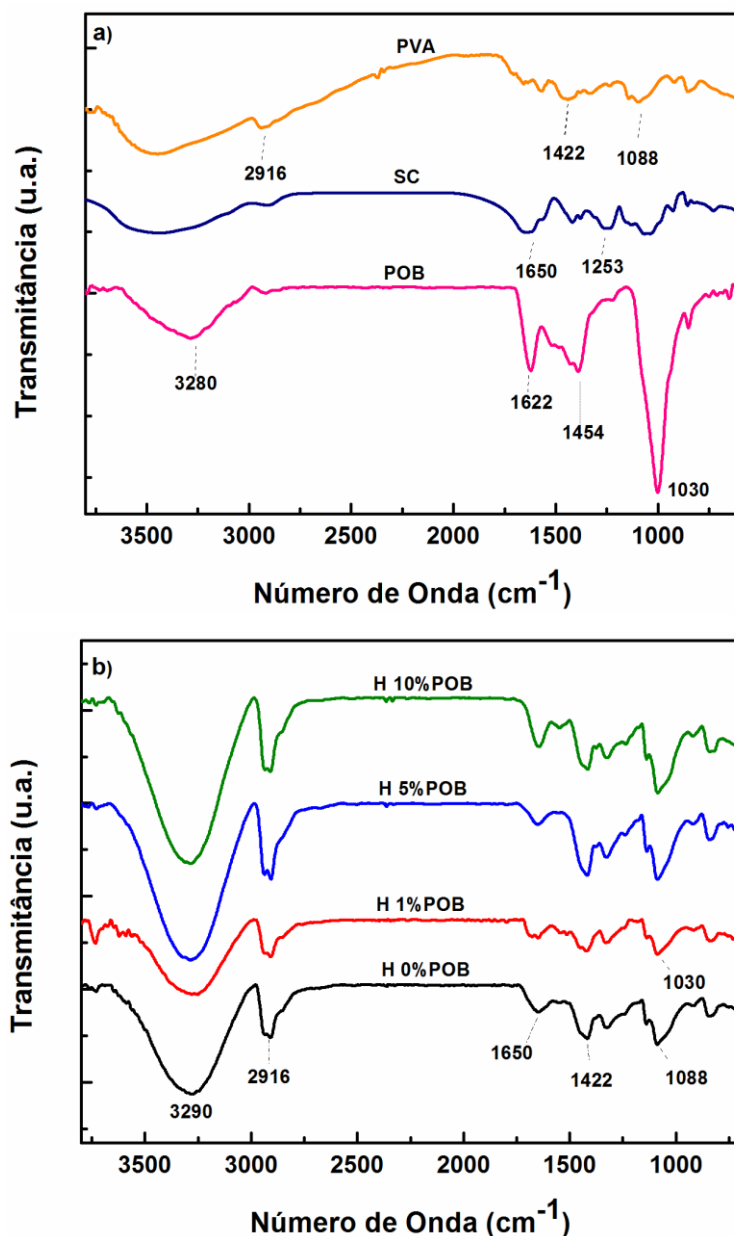


Figura 10. Espectros de FTIR dos **(a)** materiais precursores (POB, PVA e SC) e **(b)** dos hidrogéis H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB.

A **Figura 10b** apresenta os espectros de FTIR obtidos para o hidrogel (H0%POB) e para os hidrogéis compósitos (H1%POB, H5%POB e H10%POB). Os espectros obtidos de todos os hidrogéis apresentaram todas as bandas características de seus materiais precursores, o que permite afirmar que os mesmos são constituídos de PVA/SC, no caso da amostra H0%POB, e de PVA/SC/POB, no caso dos hidrogéis compósitos.

No espectro da amostra H0%POB podem ser observadas bandas em 1088 cm^{-1} , 1422 cm^{-1} e 2916 cm^{-1} relativas a estrutura do PVA e bandas em 1650 cm^{-1} e

1253 cm^{-1} oriundas da estrutura do SC. Para as demais amostras (H1%POB, H5%POB e H10%POB), além de serem evidentes as bandas descritas acima, com a incorporação do POB observa-se também a presença de bandas características deste. Estas bandas são observadas em 1030 cm^{-1} (PO_4^{3-}) e 1454 cm^{-1} (CO_3^{2-}), respectivamente. A intensidade das mesmas aumenta à medida que a quantidade de POB incorporada na matriz de PVA/SC aumenta. Dessa forma, pode ser inferido que o hidrogel compósito foi obtido com sucesso.

4.2.2 Análise de DRX

Os espectros de DRX obtidos para o PVA, SC, POB, H0%POB e H10%POB são apresentados na **Figura 11**. No difratograma do POB, nota-se a presença dos principais picos difração da HAp, componente da fração inorgânica, em $2\theta = 25,8^\circ$ e $31,9^\circ$ designados pelos planos de reflexão (002) e (211), além dos picos em $2\theta = 32,4^\circ$ (112) e $33,0^\circ$ (300) (Zhang *et al.*, 2002). O mesmo padrão de difração demonstra que a fração orgânica (colágeno) presente no POB interfere no padrão de difração da HAp, uma vez que esta apresenta alta cristalinidade e picos de difração bem definidos quando pura. A presença da fração orgânica no POB é caracterizada pelo aparecimento de um halo próximo a $2\theta \approx 21^\circ$, além de picos não definidos em toda faixa de varredura.

O padrão de difração do PVA apresenta picos em $2\theta = 19,6^\circ$, $22,8^\circ$ e $40,4^\circ$, caracterizando o material como semicristalino. Essa característica estrutural pode ser atribuída a formação ligações de hidrogênio intra e intermoleculares nas cadeias de PVA (Strawhecker *et al.*, 2002). O perfil de difração do SC apresenta um halo na região de $2\theta \approx 22^\circ$ (característico de SC de origem bovina) e a ausência de picos de difração, o que caracteriza o mesmo como sendo um material amorfo (Ebube *et al.*, 2002).

O difratograma da amostra H0%POB apresenta além do pico de difração proveniente do PVA ($2\theta \approx 20^\circ$), inúmeros picos de difração o que permite inferir que o processo de preparo do hidrogel contribui para o ordenamento das cadeias de PVA/SC, resultando assim em um material com maior cristalinidade quando comparado com o PVA e o SC puros. Conforme ilustrado na **Figura 3**, os ciclos de congelamento/descongelado contribuem para a aproximação das cadeias poliméricas que formam o hidrogel e por meio de ligações de hidrogênio o material é

reticulado. Esta configuração aumenta a cristalinidade do hidrogel. Acredita-se que a quantidade de ciclos de congelamento/descongelamento está associada a cristalinidade do material, ou seja, quando se aumenta o número de ciclos aumenta a cristalinidade. O grau de cristalinidade, por sua vez, depende do número de cristalitos formados durante o processo de reticulação (Fukumori *et al.*, 2013).

O difratograma obtido para a amostra H10%POB apresenta os picos de difração relativos ao POB ($2\theta = 25,8^\circ$ e $31,9^\circ$), confirmando assim a incorporação do mesmo na matriz de PVA/SC. Quando comparado com o difratograma da amostra H0%POB, verifica-se que a presença do POB reduz a cristalinidade do compósito em relação ao H0%POB. A incorporação do POB acaba interferindo na aproximação das cadeias poliméricas, uma vez que o mesmo pode se alojar entre as cadeias de PVA e SC, atuando como uma barreira física para a organização do sistema. Consequentemente, grande parte dos picos de difração observados para a amostra H0%POB não foram observados para amostra H10%POB.

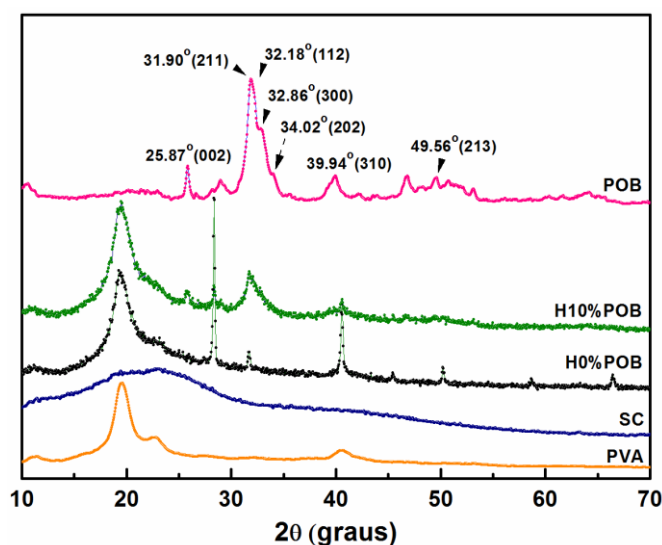


Figura 11. Espectros de DRX obtidos para PVA, SC, H0%POB, H10%POB e POB.

4.2.3 Análises Térmicas

A estabilidade térmica dos materiais precursores e dos hidrogéis compósitos foi investigada utilizando análise termogravimétrica (TGA). Esta tem por objetivo avaliar a perda de massa dos mesmos à medida que se aumenta a temperatura do meio de análise. Na **Figura 12a-d** são apresentadas as curvas termogravimétricas e as curvas DTG (primeira derivada das curvas TG) obtidas para o PVA, SC e POB e

para as amostras H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB. A análise das curvas TGA de todas amostras, materiais precursores e hidrogéis, apresentam um primeiro estágio de perda de massa na faixa de temperatura entre 75 e 150 °C relativa a vaporização de água e eliminação de algum composto volátil (Fajardo *et al.*, 2013).

Para temperaturas superiores a 200 °C são verificados perdas de massa correspondentes as degradações térmicas das cadeias poliméricas do PVA e SC. A decomposição térmica do PVA é caracterizada por dois estágios de perda de massa, a primeira entre 210 e 400 °C referente a decomposição das cadeias laterais do PVA e a segunda entre 400 e 500 °C correspondente a decomposição da cadeia principal do mesmo (Kim *et al.*, 2010). Já o SC apresenta um estágio de perda de massa que se inicia em 226 °C atribuída a degradação térmica do polímero indo até aproximadamente 450 °C (Jardim *et al.*, 2015).

Para o POB, a curva TGA demonstra que o mesmo sofre um processo de degradação térmica com início em aproximadamente 220 °C, referente a degradação térmica da sua fase orgânica (colágeno) e também de algum resquício de água estrutural presente, indo até aproximadamente 400 °C (Galia *et al.*, 2011). Ainda, a curva TGA do POB revelou que na temperatura de 500 °C, o mesmo apresenta cerca de 75,2% de resíduo. Esse resíduo corresponde a fase inorgânica presente em sua composição, ou seja, HAp.

A curva de TGA obtida para a amostra H0%POB demonstra que após a formação do hidrogel, esse possui temperatura de degradação térmica maior que os seus componentes puros, PVA e SC. Esse dado corrobora com a análise de DRX, uma vez que a amostra H0%POB possui maior cristalinidade que o PVA e o SC puros. A formação de um compósito com 1% de POB (amostra H1%POB) praticamente não afeta a estabilidade térmica do sistema. Contudo, quando quantidades de 5 e 10% de POB são incorporadas na matriz PVA/SC (amostras H5%POB e H10%POB) verifica-se uma diminuição na temperatura de degradação dos compósitos em comparação com a amostra sem POB (ver **Figura 12c, d**). Tal observação também está em acordo com a análise de DRX pois, a presença do POB atenua a formação de regiões ordenadas na matriz PVA/SC o que consequentemente reduz sua estabilidade térmica. Notando-se que o aumento da quantidade de POB no compósito reflete-se em um aumento proporcional na quantidade de resíduos a 500 °C.

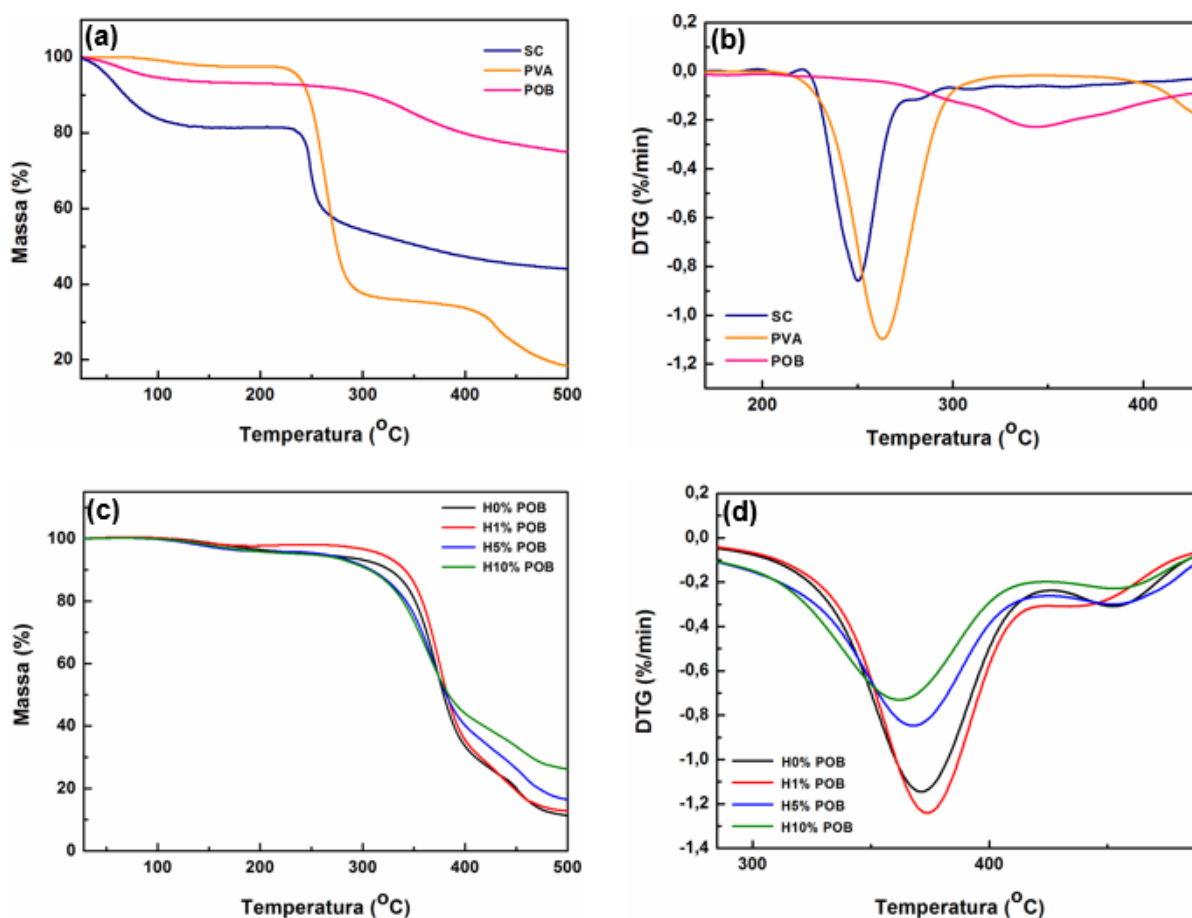


Figura 12. Curvas termogravimétricas obtidas para os **(a)** materiais precursores (SC, PVA e POB), **(b)** seus respectivos DTGs, **(c)** para os hidrogéis (H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB) e **(d)** com seus respectivos DTGs.

4.2.4 Análises Morfológicas

4.2.4.1 MET

Imagens de MET foram obtidas para o POB com o objetivo de observar sua disposição morfológica e tamanho. A microscopia da **Figura 13** demonstra que as partículas do POB estão organizadas em agregados constituídos de cristais separados (na figura mostrados com pontos escuros) referentes a matriz inorgânica (HAp), e componentes esféricos menos densos, a matriz orgânica (colágeno), representado na figura pela parte na cor cinza. Os cristais apresentam dimensões nanométricas com diâmetro médio de 25 ± 4 nm.

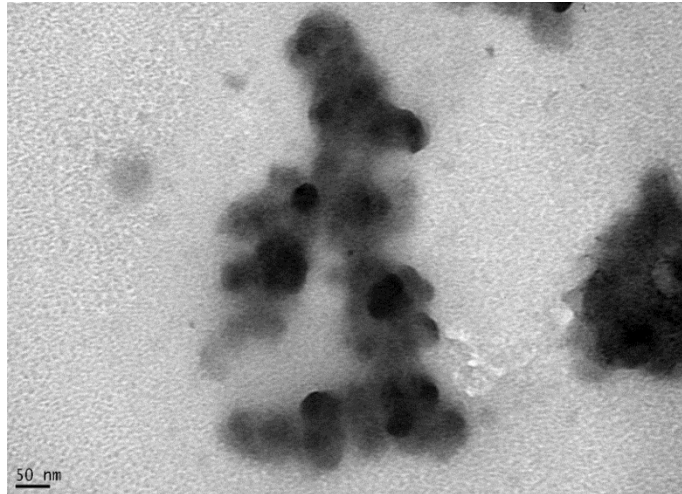


Figura 13. Imagem de MET do POB.

4.2.4.2 MEV

Por meio das micrografias geradas através de MEV pode-se avaliar a morfologia do material compósito preparado, bem como sua rede tridimensional e porosidade. A avaliação da porosidade destes tem um papel importante quanto a aplicação que será dada ao material. Como, por exemplo, na aplicação de biomateriais em engenharia de tecidos, como *scaffolds*, os tamanhos de poros recomendados são de 100 a 200 μm , com uma porosidade de aproximadamente 90%, a fim de proporcionar espaço suficiente para a semeadura de células (Li *et al.*, 2016).

A imagem de MEV obtida para o POB, **Figura 14**, demonstra que o mesmo é constituído de um material particulado e que estas partículas apresentam tamanhos distintos e formas poligonais não ordenadas. A distribuição do tamanho das partículas varia de 5 a 60 μm , enquanto que o tamanho médio calculado foi de $11,1 \pm 9 \mu\text{m}$.

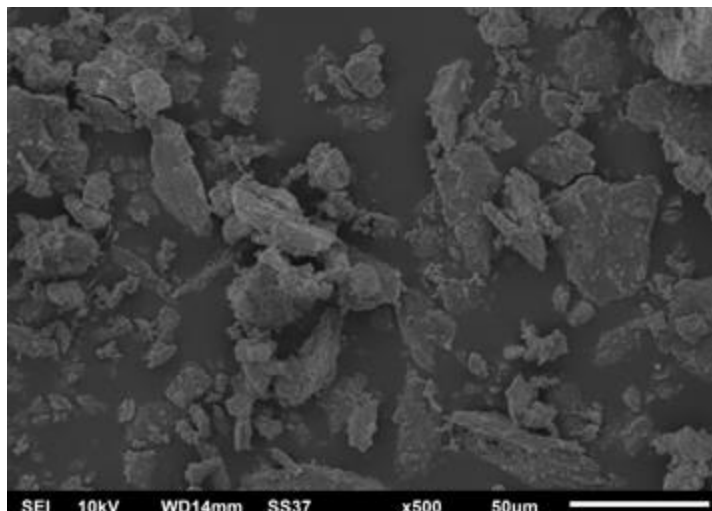


Figura 14. Imagem representativa de MEV do POB.

A **Figura 15a** apresenta uma imagem representativa de MEV obtida para a amostra H0%POB. Avaliando sua morfologia, pode-se inferir que o material obtido apresenta uma morfologia altamente porosa, onde os poros são distribuídos de modo heterogêneo. O tamanho médio calculado para esta amostra foi $119,6 \pm 21 \mu\text{m}$. Já quando se avalia a **Figura 15b**, imagem representativa da amostra H10%POB, nota-se que sua morfologia se distingue um pouco da H0%POB, pois apresenta visivelmente poros com tamanhos distintos e menores (tamanho médio de $87,3 \pm 13,9 \mu\text{m}$). Este fato pode estar atribuído a adição de POB no meio, acabando por desorganizar a matriz polimérica, fazendo com que os cristalitos formados pelo método de congelamento/descongelamento fiquem menores, e consequentemente ocorrendo a formação de poros menores.

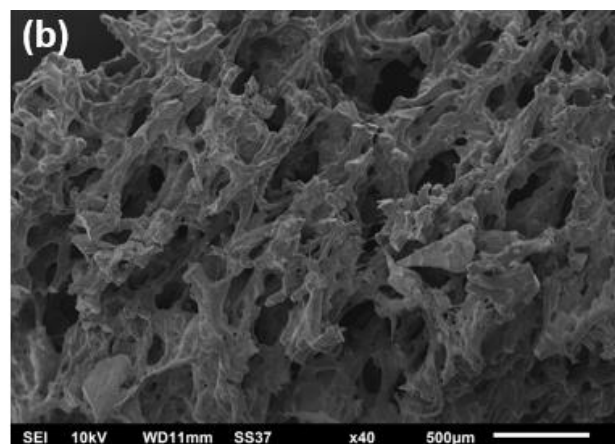
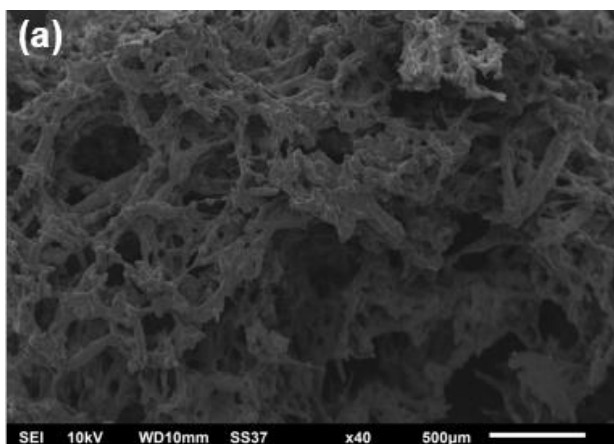


Figura 15. Imagens representativas de MEV das amostras **(a)** H0%POB e, **(b)** H10%POB.

Pode-se ainda fazer mais uma avaliação nos materiais através da análise de MEV, utilizando um de seus recursos, o EDX. Trata-se de uma análise elementar qualitativa que identifica a composição química da superfície dos materiais. Para os materiais avaliados, H0%POB e H10%POB, objetivou-se avaliar suas composições na superfície a fim de verificar as diferenças.

Para o H0%POB, **Figura 16a**, observa-se picos indicando ter uma composição baseada em carbono (C), nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O), todos estes oriundos dos polímeros que fazem parte da matriz do hidrogel PVA/SC; além de um pico de Au com grande intensidade. Este aparece, pois, o material foi recoberto com uma camada de Au para conduzir elétrons a fim de poder ser analisado no equipamento.

Já na avaliação da composição do H10%POB, **Figura 16b**, observa-se o aparecimento de alguns outros picos, como Ca e P, estes oriundos da HAp que faz parte do POB, confirmando que este está contido no hidrogel. Além de potássio (K) decorrente da imersão do material em solução de KCl, C e O relativos aos polímeros de origem. Neste caso além do Au pelo recobrimento aparece cobre (Cu), pois esta análise foi realizada com uma fita de cobre para prender o hidrogel ao porta amostra.

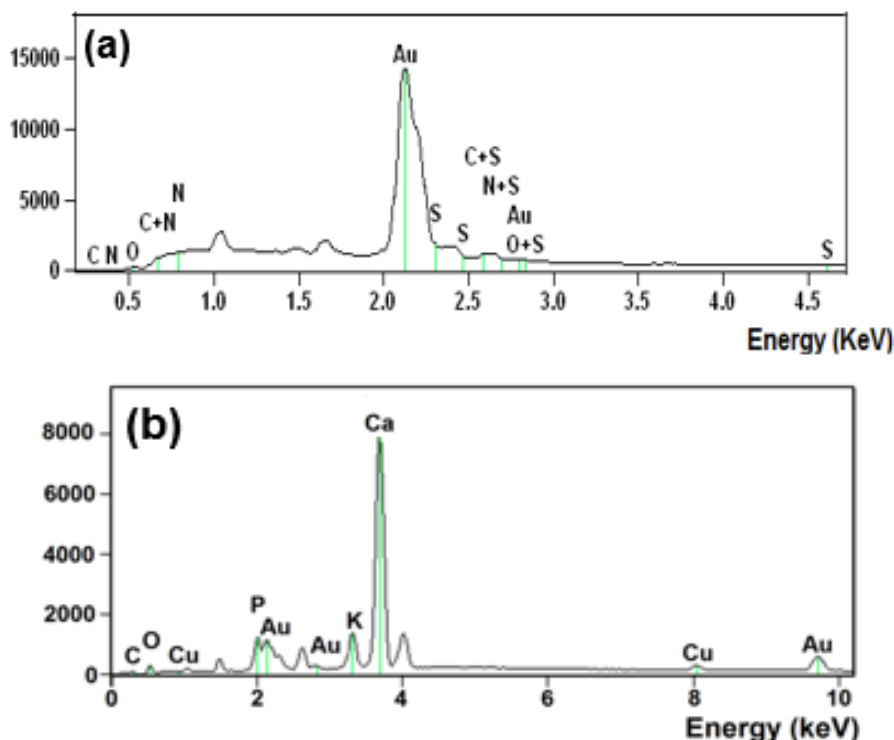


Figura 16. Análises de EDX das amostras **(a)** H0%POB e **(b)** H10%POB.

4.2.5 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas de hidrogéis como por exemplo, na aplicação como *scaffolds*, em engenharia de tecidos, são parâmetros importantes devido a necessidade de apresentar estabilidade estrutural frente as tensões ocorridas durante aplicações *in vitro* e *in vivo*. Estes parâmetros avaliam, por exemplo, a força aplicada para compressão do material, ou seja, o quanto o mesmo suporta até sua ruptura; sendo esta força de grande importância em sua aplicação. A grande maioria dos polímeros não suporta grandes quantidades de forças, porém, com a adição de algum material em sua matriz, este parâmetro pode ser melhorado (Kanimozhi *et al.*, 2016).

Foi realizada a análise de compressão nos hidrogéis H0%POB e H10%POB, utilizando uma carga de 50 N, a fim de avaliar suas propriedades mecânicas como, força de ruptura, Módulo de Young e deformação de ruptura. Avaliando a influência que a incorporação do POB tem no material. Os valores obtidos neste teste se mostram na **Tabela 1**, assim como seus desvios.

Tabela 1. Propriedades mecânicas determinadas a partir de ensaios de compressão.

Amostra	Força de Ruptura (N)	Módulo de Young (kPa)	Deformação de Ruptura (%)
H0%POB	70,1 ± 16.7	9,0 ± 2	93
H10%POB	95,7 ± 18.3	17,3 ± 2	94

Observa-se através dos valores obtidos pela força de ruptura que a adição do POB no meio altera a força aplicada, sendo ela superior à que foi aplicada na amostra H0%POB. Consequentemente, o mesmo ocorre com o Módulo de Young, pois sugere-se que o POB acabe aumentando a rigidez do meio. Sabe-se que materiais considerados flexíveis exigem uma baixa força aplicada (como no caso da maioria dos polímeros); e neste caso, observa-se que a adição do POB exigiu uma força aplicada maior, podendo ser classificado como material rígido.

O POB incorporado atua como um reforço para a matriz do hidrogel, deixando-o mais rígido, porém, sua incorporação desorganiza o meio, auxiliando com que se forme poros menores e seja exigido uma força de compressão maior.

4.2.6 Determinação da Porosidade Total

A determinação da porosidade total dos hidrogéis foi realizada através do método de deslocamento de líquidos, utilizando acetona, pois esta não interfere na estrutura dos materiais (Anisha *et al.*, 2013). A porosidade total determinada para cada amostra de hidrogel é apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de porosidade determinados para os hidrogéis através do método de deslocamento de líquidos.

Amostra	Porosidade
H0%POB	87,4 ± 0,7
H1%POB	88,1 ± 0,4
H5%POB	88,5 ± 0,6
H10%POB	65,6 ± 4,4

De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, verifica-se que quanto maior a quantidade de POB incorporada na matriz PVA/SC, menor é a porosidade do mesmo. Fato este que foi confirmado pela análise das imagens de MEV (ver **Figura 15a, b**). Quando se tem uma pequena quantidade de POB, como no caso da amostra H1%POB não se nota uma mudança significativa na porosidade total, porém, quando se adiciona uma quantidade maior, como no caso da amostra H10%POB, verifica-se uma mudança no tamanho dos poros. Relação semelhante foi observado na avaliação da estabilidade térmica do material.

A incorporação de POB na matriz do hidrogel auxilia na formação, durante o processo de congelamento/descongelamento, de poros com tamanhos menores. E esta característica não é satisfatória para as amostras, se estas forem aplicadas como *scaffolds*, como por exemplo, no caso de enxertia óssea, onde os poros devem ter um tamanho maior (Li *et al.*, 2016). No entanto, por apresentar em sua estrutura a adição de diferentes materiais, como por exemplo POB, o material pode vir a ser atrativo para outras aplicações, como auxiliar na cicatrização de feridas.

4.2.7 Testes de Intumescimento

4.2.7.1 Intumescimento Máximo em Função da Porcentagem de POB

Um biomaterial desenvolvido para atuar como *scaffold* deve possuir a habilidade de absorver e reter fluídos fisiológicos bem como a capacidade de transferir nutrientes e compostos bioativos através de sua matriz. Geralmente, um bom *scaffold* é capaz de absorver altas quantidade de fluídos aquosos mantendo seu formato e permitindo o trânsito de nutrientes e de resíduos inerentes aos processos de crescimento e regeneração celular. Nesta Dissertação, a capacidade de intumescimento dos compósitos foi avaliada em solução tampão PBS (pH 7,4) a 37 °C durante 24 h. Os dados calculados pela **Equação 2** referentes ao intumescimento máximo das amostras H0%POB, H1%POB, H5%POB e H10%POB são apresentados na **Figura 17**.

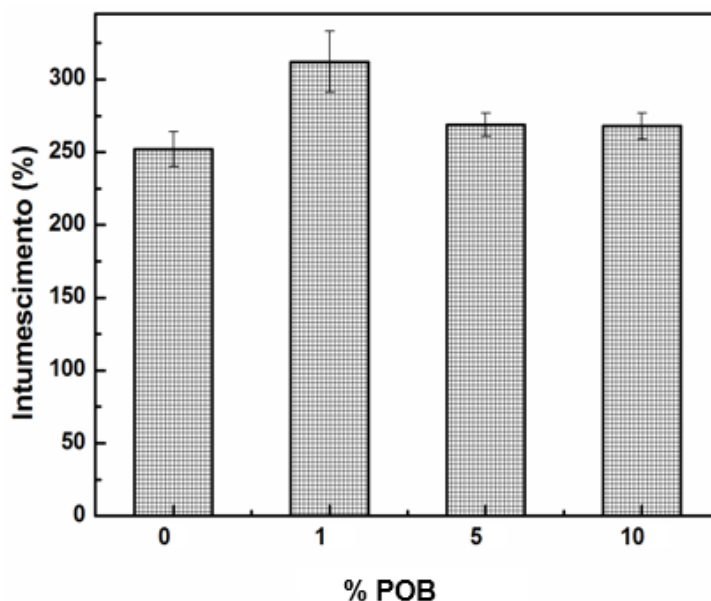


Figura 17. Intumescimento máximo das amostras de hidrogel em solução tampão PBS (pH 7,4) em função da quantidade de POB.

Nota-se que para a amostra H1%POB houve uma elevada capacidade de intumescimento, quando comparada com as demais. Para as amostras H5%POB e H10%POB houve pouca diferença na taxa de intumescimento após 24 h de imersão em solução tampão PBS (pH 7,4). O POB quando em pequenas quantidades (como no caso do H1%POB) acaba auxiliando no aumento da capacidade de absorção de líquidos do material. Além da matriz ser composta por PVA/SC, que apresentam características altamente hidrofílicas, a presença do POB também ajuda na absorção.

Porém quando se tem uma maior quantidade de POB no meio (como nas amostras H5%POB e H10%POB), verifica-se que a capacidade de intumescimento diminui. Sugere-se que este fato aconteça devido as reticulações formadas pelo método de congelamento/descongelamento dos polímeros formadores do hidrogel, PVA/SC e da interação da matriz com o POB. Isso acabando por deixar a matriz do hidrogel compósito mais rígida, reduzindo sua flexibilidade e a quantidade de grupos hidrofílicos no meio. Conforme avaliado, o aumento na quantidade do POB no compósito reduz o tamanho de poros e a porosidade total, assim a absorção e retenção de líquido diminui.

4.2.7.2 Efeito do pH do meio de intumescimento

Foi avaliado o intumescimento das amostras H0%POB e H1%POB frente à solução com diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12), notando-se que os mesmos mostram uma dependência de intumescimento em relação aos pHs do meio, conforme segue na **Figura 18**. Em soluções ácidas ($\text{pH} \leq 6$), onde os pHs são menores ou muito próximos aos valores de pK_a dos grupos carboxilato ($-\text{COOH}$, $\text{pK}_a \approx 4,57$) e sulfato ($-\text{OSO}_3\text{H}$, $\text{pK}_a \approx 2,6$), observa-se um ligeiro aumento na capacidade de absorção das amostras testadas (Fajardo *et al.*, 2010). Sugere-se que este fato ocorre devido a variação na protonação dos grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{OSO}_3\text{H}$, o que pode contribuir para absorção de líquidos, principalmente quando os grupos mencionados apresentam carga negativa.

Em soluções com pH próximo a neutralidade ($6 < \text{pH} < 8$), observou-se uma ligeira diminuição no intumescimento de ambas as amostras. Isso ocorre devido a não formação de carga nos grupos funcionais do PVA e do SC, o que favorece a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos, restringindo o inchaço. Por outro lado, em soluções alcalinas ($\text{pH} \geq 8$), percebeu-se um elevado aumento no intumescimento das amostras testadas. Nestes pHs os grupos hidroxila ($-\text{OH}$) do PVA são desprotonados, havendo uma repulsão de cargas entre os ânions, consequentemente, uma expansão da matriz e aumento da absorção (Fajardo *et al.*, 2012). Verifica-se que a amostra H0%POB apresenta valores de intumescimento superiores as do H1%POB, sugerindo que a adição de POB interfere em relação a capacidade de absorção do material.

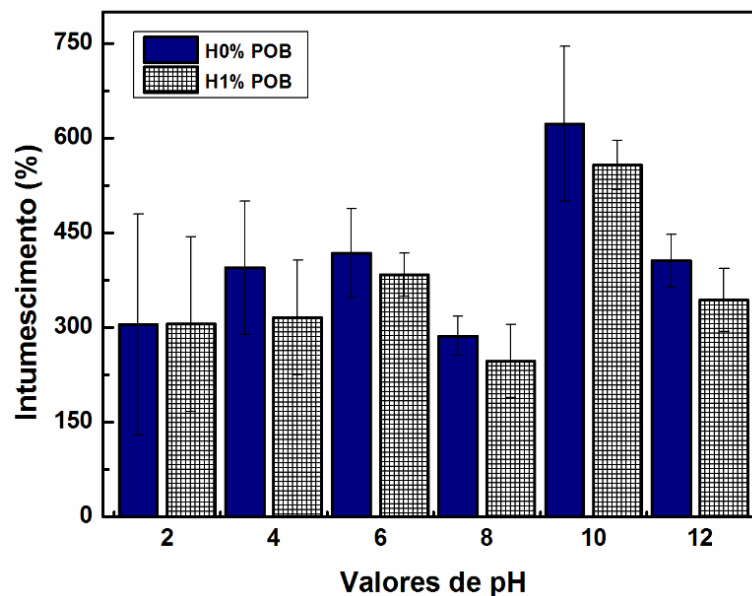


Figura 18. Intumescimento dos hidrogéis H0%POB e H1%POB em soluções com diferentes pHs.

4.2.7.3 Determinação Cinética da Taxa de Perda de Água

Neste teste foram utilizadas as amostras H0%POB e H1%POB, os melhores resultados obtidos para o teste descrito no item 4.7.2.1. Avaliou-se a taxa de perda de água destes materiais monitorando sua secagem. Os valores calculados pela **Equação 3** são apresentados na **Figura 19**. Conforme observa-se na figura, ambas as amostras apresentam uma curva cinética de perda da água previamente absorvida em decorrência do passar de tempo. Após 250 min, as amostras atingiram um estado estacionário de peso. Ao final do teste (360 min) foi calculado a perda de água de aproximadamente 87% para H0%POB e 84% para H1%POB. A partir deste resultado nota-se que a adição, mesmo que em pequenas quantidades, do POB na matriz PVA/SC, auxilia na retenção da água previamente absorvida. Este resultado pode ser explicado pelo caráter hidrofílico do POB, o qual contribui para retenção do líquido. Ainda, comparando as duas curvas é possível inferir que a adição de POB altera a cinética de perda de água, a qual para o material compósito se mostrou mais lenta que para o H0%POB. Nos materiais com potencial aplicação como biomateriais, a propriedade de retenção de líquidos é um fator muito importante, pois estes devem evitar a perda de umidade no local onde forem aplicados (Dai *et al.*, 2011).

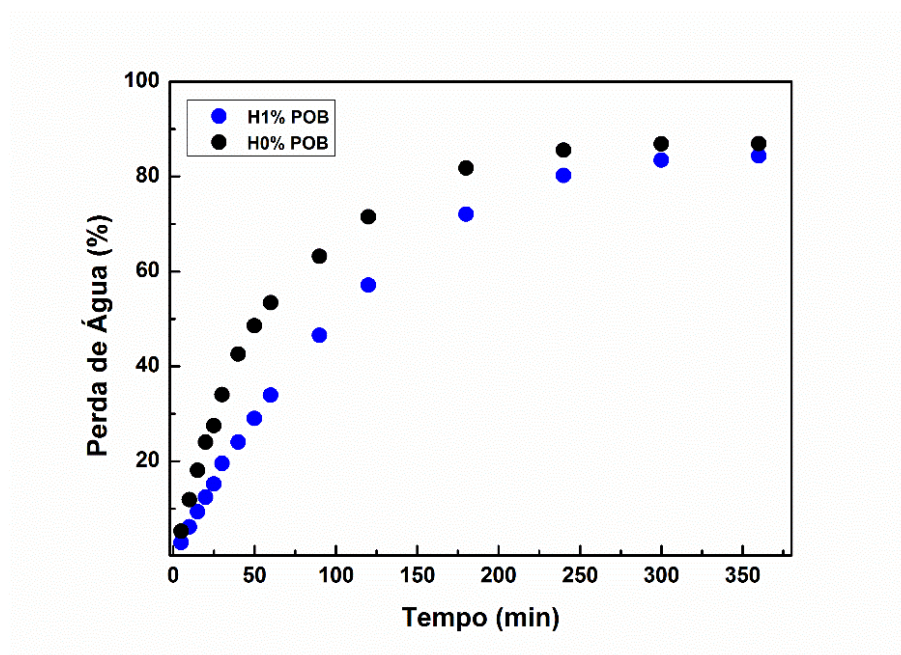


Figura 19. Cinética de perda de água das amostras H0%POB e H1%POB previamente intumescidas.

4.2.7.4 Capacidade de Retenção de Água

A capacidade de retenção de líquidos nos hidrogéis está intimamente relacionada com a porosidade assim como o intumescimento dos mesmos. Primeiramente os materiais são imersos em uma solução tampão PBS (pH 7,4) por 24 h a fim de que seja atingindo o máximo de intumescimento. Por seguinte submete-se as amostras a um processo de centrifugação (10.000 rpm por 5 min), avaliando posteriormente a perda de água por meio da diferença entre suas massas. A capacidade de retenção de água calculada para o hidrogel e dos compósitos são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Capacidade de retenção de água.

Amostra	Capacidade (%)
H0%POB	56 ± 12
H1%POB	59 ± 6
H5%POB	$41,8 \pm 2$
H10%POB	$32,2 \pm 2$

A partir dos resultados da **Tabela 3**, nota-se para as amostras H0%POB e H1%POB foram as que apresentaram os melhores valores quanto a retenção de líquidos. O aumento da quantidade de POB na matriz PVA/SC reduz a disponibilidade dos grupos hidrofílicos dos polímeros o que faz com que a interação com as moléculas de água reduza. Dessa forma, após a aplicação de uma força física (centrifugação) externa, a água é retirada com maior facilidade das amostras H5%POB e H10%POB.

4.2.8 Teste de biodegradabilidade *in vitro*

Os ensaios de biodegradabilidade dos hidrogéis foram realizados em solução PBS (pH 7,4) pois este mimetiza o pH do plasma humano e em solução PBS (pH 7,4) suplementado com a enzima hialuronidase, uma enzima não específica capaz de degradar glicosaminoglicanos. Todos os meios testados foram mantidos na temperatura de 37 °C, a qual é a temperatura corpórea em condições normais. A taxa de biodegradação foi determinada a partir da relação entre o peso inicial das amostras secas e o peso registrado para essas após três semanas de incubação. Os resultados são descritos na **Figura 20**.

Como observado, para ambos os meios testados os compósitos com maior quantidade de POB apresentaram uma maior taxa de biodegradação. Esta condição pode estar associada a capacidade de absorção de líquidos, como também a adição de POB no meio. Sugere-se que ocorra uma interação entre os íons Ca (carga positiva) presentes no POB e os grupos carboxilato (carregados negativamente) das cadeias laterais dos aminoácidos ou também grupos carboxilato terminais da enzima hialuronidase (Ye *et al.*, 2014). Outro fator que deve ser mencionado é que a taxa de biodegradação avaliada por ser relacionada a ocorrência da biodegradação do próprio POB, o que explica, por exemplo, os valores obtidos para as amostras H5%POB e H10%POB.

Ainda, a maior taxa de biodegradação apresentada pelas amostras, H5%POB e H10%POB pode ser correlacionada com a eliminação de fragmentos de PVA e SC. Conforme avaliado por DRX, a incorporação do POB reduz a organização do sistema. A menor organização estrutural da matriz polimérica permite que a solução incubadora ao difundir pelo interior das amostras arraste algum fragmento polimérico, o que contribui para a biodegradação. Este fato ocorre em muito menor

escala nas amostras, H0%POB e H1%POB, pois nestes têm-se maior densidade de ligações de hidrogênio formadas entre as cadeias que formam a matriz do hidrogéis (ver **Figura 3**).

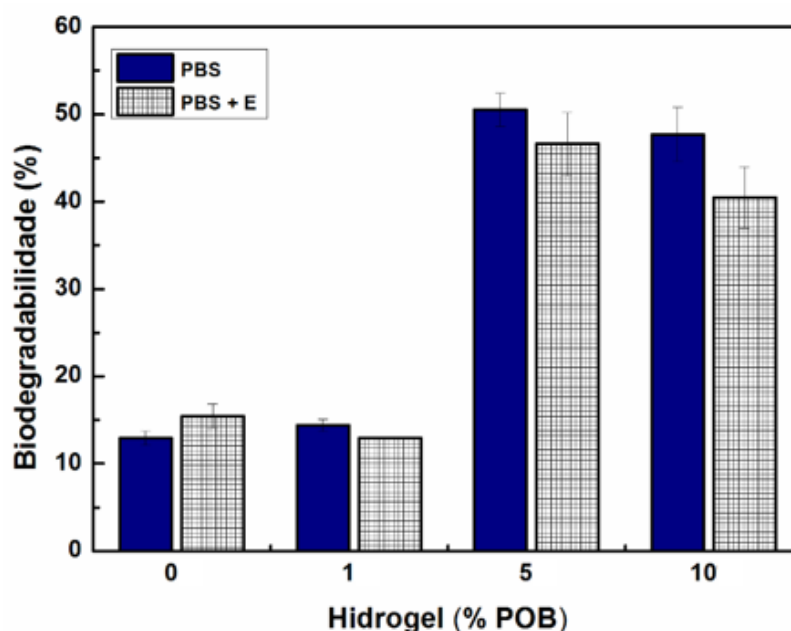


Figura 20. Taxas de biodegradação das amostras de hidrogéis compósitos após 3 semanas de incubação em solução tampão PBS (pH 7,4) e solução tampão PBS (pH 7,4) suplementado com hialuronidase (E).

4.2.9 Ensaios *in vitro* de viabilidade e adesão celular

Este foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico das amostras, H0%POB e H10%POB, em células saudáveis. A viabilidade das células Vero e sua aderência sobre a amostra foram determinadas pelo ensaio MTT. Como observado na **Figura 21**, nenhuma variação estatisticamente significativa em relação à viabilidade das células foi verificada para as amostras H0%POB e H10%POB em relação ao “controle” pós 24 ou 48 h de incubação. Até as 48 h de incubação as amostras não afetaram a proliferação celular em comparação com o “controle”.

Porém, foi verificada uma variação significativa ($P < 0,05$) na viabilidade celular nas amostras incubadas por 72 h, quando comparadas com o “controle”. Esta diminuição ocorrida na viabilidade celular pode ser explicada por um possível dano causado pela fricção da parede externa dos *scaffolds* contra a camada de células formada nos poços da placa de incubação.

Estes resultados sugerem que ambas as amostras não exercem efeito citotóxico contra as células testadas. Além disso, o teste de adesão celular mostrou que a densidade celular sob a amostra H0%POB aumentou de 3475 ± 230 células/mL para 4275 ± 153 células/mL, quando o tempo de incubação aumenta a partir de 24 para 72 h, enquanto que densidade celular para H10%POB aumenta de 3560 ± 339 células/mL para 4125 ± 146 células/mL. A presença de HAp e colágeno na matriz de PVA/SC podem melhorar a adesão celular na matriz total. Estes estudos demonstram que ambas amostras, H0%POB e H10%POB, mostraram potencial para serem aplicadas como biomateriais, mais especificamente como *scaffolds*.

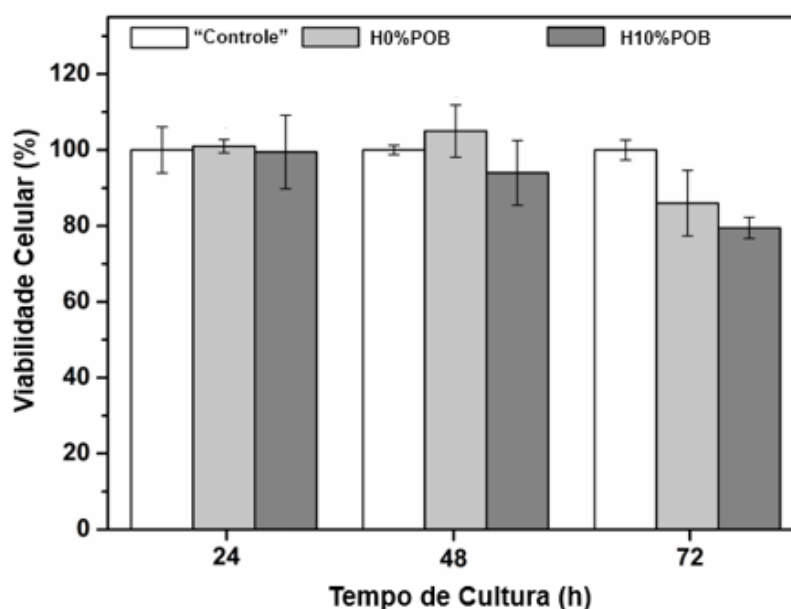


Figura 21. Avaliação do efeito citotóxico das amostras H0%POB e H10%POB em células Vero utilizando o ensaio de MTT.

4.2.10 Análises *in vivo*

As análises *in vivo* foram realizadas afim de se verificar a ação do compósito no fechamento de ferimentos utilizando um modelo em camundongos. Os resultados mostraram que ocorreu um rápido fechamento das feridas em presença das amostras testadas, H0%POB e H10%POB, após decorrido 3, 9 e 15 dias, como observado na **Figura 22**. Nota-se que nem o animais pertencentes ao grupo “controle” nem aqueles tratados com os hidrogéis apresentaram alguma complicação na ferida

ou infecção. Infecções de feridas e falhas de reparação podem ocorrer quando materiais sintéticos são utilizados para fechamento de algum tipo de ferimento. No entanto, quando se utiliza materiais naturais, as feridas são menos susceptíveis a infecções (Drewa *et al.*, 2005).

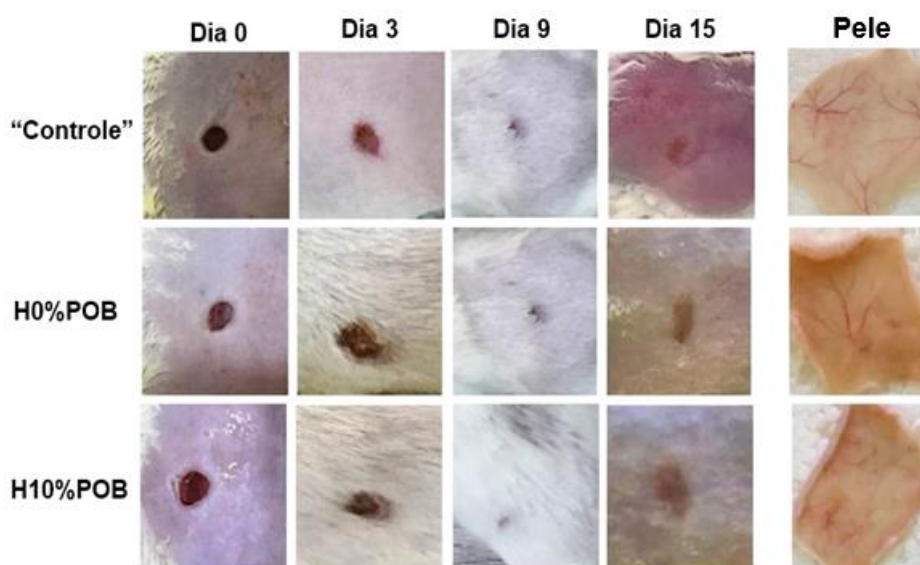


Figura 22. Acompanhamento do fechamento da ferida através de imagens macroscópicas ao longo dos dias e, amostras de peles retiradas dos animais pós 15 dias.

Na avaliação macroscópica das peles das áreas das feridas, ainda na **Figura 22**, nota-se que estas foram completamente regeneradas e revascularizadas tanto no grupo “controle” quanto nos grupos tratados com H0%POB e H10%POB decorrido 15 dias após o implante. É importante salientar que após o período de tratamento ambas as amostras utilizadas, H0%POB e H10%POB, foram completamente biodegradadas e bioabsorvidas pelo organismo.

Quanto aos resultados obtidos para o teste da avaliação da atividade de MPO na área da ferida para as amostras de hidrogel analisadas e o grupo “controle” são avaliados através do gráfico representado na **Figura 23**. Quando se aplicam as amostras nos animais, uma cascata inflamatória é iniciada, pois está sendo implantado um corpo estranho na ferida, e esta inflamação é medida por enzimas liberadas por neutrófilos. Contudo, se o material implantado não é degradado

enzimaticamente, o processo torna-se uma inflamação crônica (Gardner *et al.*, 2013).

As partículas menores são fagocitadas pelos macrófagos, que são recrutados no início do processo. Para fagocitar moléculas maiores, os macrófagos se fundem para formar um corpo estranho de células gigantes (Anderson *et al.*, 2008). Além disso, se os materiais forem semelhantes as macromoléculas do corpo, serão degradadas por fagocitose mediada por macrófagos, com infiltração inflamatória limitada (Chang *et al.*, 2011).

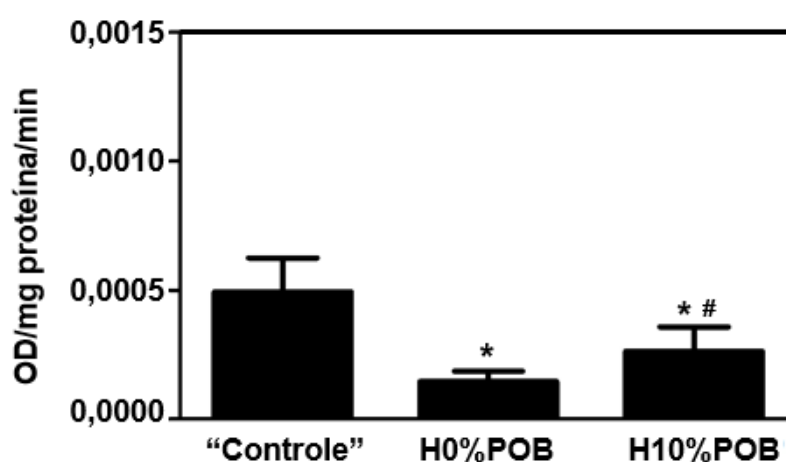


Figura 23. Determinação da atividade de MPO no grupo "controle" e nos grupos tratados com as amostras, H0%POB e H10%POB.

Os resultados experimentais confirmam que após duas semanas de tratamento a atividade de MPO não foi alterada na região da ferida. Este dado reforça a ideia de que as amostras analisadas são materiais de grande biocompatibilidade, e não exercem respostas inflamatórias frente a sua aplicação. É importante ressaltar que estes resultados estão de acordo com os obtidos no ensaio de citotoxicidade, salientando assim a segurança em se utilizar os hidrogéis compósitos para este tipo de aplicação. Percebendo-se que tais resultados demonstram que os materiais desenvolvidos e descritos nesta Dissertação podem ser explorados como biomateriais para atuarem como *scaffolds*.

4.5. Perspectivas futuras

Mais estudos poderão ser realizados com o intuito de se investigar o processo de regeneração de células/tecido após o tratamento com os hidrogéis compósitos desenvolvidos nesta Dissertação como, por exemplo, avaliação histológica da região tratada. Por meio desta avaliação pode ser ter uma clara ideia do comportamento dos materiais na regeneração celular e também estimar seu tempo exato de absorção pelo organismo. Estudos podem ser executados no sentido de incorporar algumas moléculas com ação biológica (agentes de crescimento, fármacos, entre outros) na matriz do material compósito ampliando assim seu campo de ação e efetividade na aplicação proposta.

5. CONCLUSÃO

Nesta Dissertação é apresentado o preparo de hidrogéis compósitos a partir de uma matriz formada por PVA/SC preenchida com POB. A metodologia empregada para a obtenção do POB, bem como a metodologia executada para o preparo dos hidrogéis compósitos mostraram-se satisfatórias. Utilizando o método de congelamento/descongelamento para promover a reticulação da matriz polimérica foi possível obter materiais sem a presença de agentes potencialmente tóxicos, o que pode potencializar a aplicação destes como biomateriais.

A formação do hidrogel compósito foi confirmada pelas análises obtidas pelas técnicas de FTIR, DRX e TGA. Além da interação entre as cadeias de PVA e SC decorrentes do processo de reticulação, foi possível também evidenciar a incorporação do POB na matriz do hidrogéis compósitos. Conforme avaliado, o POB tem efeito sobre diferentes propriedades do material compósito (como, estrutural, térmica). A intensidade desses efeitos é proporcional ao conteúdo de POB utilizado no preparo dos hidrogéis compósitos.

Conforme avaliado, os materiais preparados apresentam interessantes propriedades morfológicas e estruturais que sugerem seu potencial uso como biomaterial. As análises de MEV mostraram que os materiais preparados são redes tridimensionais altamente porosas, onde esses poros são interconectados. Ainda, os mesmos possuem elevada capacidade de intumescimento, alta taxa de porosidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas adequadas ao tipo de aplicação anteriormente mencionado.

As análises preliminares *in vitro* e *in vivo* mostraram que os hidrogéis compósitos não exercem efeito citotóxico contra a células saudáveis e auxiliaram no fechamento de feridas sem causar processo inflamatório. Mostrando serem materiais biocompatíveis e biodegradáveis. Os resultados obtidos nesta Dissertação sugerem que os materiais desenvolvidos, por meio das propriedades obtidas, possuem potencial para serem utilizados como *scaffolds* na regeneração de células e/ou tecidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADESSA, A., BLOKZIJL, M. M., MOUSER, V. H. M., MARICA P., MALDA, J., HENNINK, W. E., VERMONDEN, T. A thermo-responsive and photo-polymerizable chondroitin sulfate-based hydrogel for 3D printing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 163-174, 2016.
- AFFATATO, S., RUGGIERO, A., MEROLA, M. Advanced biomaterials in hip joint arthroplasty. A review on polymer and ceramics composites as alternative bearings. **Composites Part B: Engineering**, v. 83, p. 276-283, 2015.
- AMRUTKAR, J. R.; GATTANI, S. G. Chitosan-chondroitin sulfate based matrix tablets for colon specific delivery of indomethacon. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, p. 670-677, 2009.
- ANDERSON, J. M., RODRIGUEZ, A., CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 86-100, 2008.
- ANISHA, B. S., SANKAR, D., MOHANDAS, A., CHENNAZHI, K. P., NAIR, S., V., JAYAKUMAR, R. Chitosan – hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1470-1476, 2013.
- ARANHA, I. B., LUCAS, E. F. Poli (álcool vinílico) modificado em cadeias hidrocarbônicas: avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 174-181, 2001.
- BAE, Y. H., KIM, S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block co-polymers or interpenetrating network. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 109-135, 1993.
- BAJPAI, A. K., SHUKLA, S. K., BHANU, S., KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 1088-1118, 2008.
- BALASUNDARAM, G., WEBSTER, T. J. An overview of nano-polymers for orthopedic applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 635-642, 2007.
- BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.
- CALÓ, E., KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252-267, 2015.
- CALLISTER, J. W. D. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 7° ed. John Wiley & Sons, 2007. 5 p.

- CHANG, P. R., ZHENG, P., LIU, B., ANDERSON, D. P., YU, J., MA, X. Characterization of magnetic soluble starch-functionalized carbon nanotubes and its application for the adsorption of the dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 2144-2150, 2011.
- CHEN, F-M., LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86-168, 2016.
- COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos. **Química Nova**, v. 31, p. 1460-1466, 2008.
- DAI, T. H., TANAKA, M., HUANG, Y. Y., & HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, p. 857-879, 2011.
- DHANDAYUTHAPANI, B., YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T., KUMAR, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. 1-19, 2011.
- DREWA, T., GALAZKA, P., PROKURAT, A., WOLSKI, Z., SIR, J., WYSOCKA, K., CZAJKOWSKI, R. Abdominal wall repair using a biodegradable scaffold seeded with cells. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 40, p. 317-312, 2005.
- EBUBE, N. K.; MARK, W.; HAHM, H. Preformulation studies and characterization of proposed chondroprotective agents: glucosamine HCl and chondroitin sulfate. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7, p. 457-469, 2002.
- EKICI, S. I. Poly (acrylamide-sepiolite) composite hydrogels: preparation, swelling and dye adsorption properties. **Polymer Bulletin**, v. 57, p. 231-241, 2006.
- FAJARDO, A. R., LOPES, L. C., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C. Development and application of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for removal and recovery of Pb(II). **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 253-260, 2012.
- FAJARDO, A. R.; FÁVARO, S. L.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Dual-network hydrogels based on chemically and physically crosslinked chitosan/chondroitin sulfate. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 1662-1671, 2013.
- FAJARDO, A. R., PIAI, J. F., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C. Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 934-943, 2010.

- FUKUMORI, T., NAKAOKI, T. Significant improvement of mechanical properties for polyvinyl alcohol film prepared from freeze/thaw cycles gel. **Open Journal of Organic Polymer Materials**, v. 3, p. 110-116, 2013.
- GALIA, C. R., LOURENÇO, A. L., ROSITO, R., MACEDO, C. A. S., CAMARGO, L. M. A. Q. Physicochemical characterization of lyophilized bovine bone grafts. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, p. 444-451, 2011.
- GARDNER, A. B., LEE, S. K. C., WOODS, E. C., ACHARYA, A. P. Biomaterials-based modulation of the immune system. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- GIBAS, I., JANIK, H. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. **Chemistry & Chemical Technology**, v. 4, p. 298-304, 2010.
- HASSAN, C. M., PEPPAS, N. A. Structure and applications of Poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslink or by freezing/thawing methods. **Advances in Polymer Science**, v. 153, p. 37-55, 2000.
- HELMUS, M. N., TWEDEN, K. **Materials Selection, In: Encycloped Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, part A, v. 1, p. 25-59, 1995.
- HOARE, T. R., KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. **Polymer**, v. 49, p. 1993-2007, 2008.
- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-12, 2002.
- HOSHI, K. Fine structure of bone matrix calcification. **Journal of Oral Biosciences**, v. 54, p. 19-24, 2012.
- JARDIM, K. V., JOANITTI, G. A., AZEVEDO, R. B., PARIZE, A. L. Physico-chemical characterization and Cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticle. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 294-304, 2015.
- KANOMOZHI, K., BASHA, S. K., KUMARI, V. S. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 484-491, 2016.
- KIM, G-M. **Nanotechnology and Nanomaterials "Nanofibers"**. Croácia: Intechopen, 2010.
- KIM, T. H., AN, D. B., OH, S. H., KANG, M. K., SONG, H. H., LEE, J. H. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing-thawing

method to investigate stem cell differentiation behaviors. **Biomaterials**, v. 40, p. 54-60, 2015.

KOHN, J., LANGER, R. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3^o ed. Academic Press, 2013. 64 p.

KUBINOVÁ, S., HORÁK, D., SYKOVÁ, E. Cholesterol-modified superporous Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 4601-4609, 2009.

LEE, K. Y., YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 669-697, 2007.

LEÓN-MANCILLA, B. H., ARAIZA-TÉLLEZ, M. A., FLORES-FLORES, J. O., PINA-BARBA, M. C. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, p. 77-85, 2016.

LI, Y., NEOH, K. G., KANG, E. T. Poly (vinyl alcohol) hydrogel fixation on poly (ethylene terephthalate) surface for biomedical application. **Polymer**, v. 45, p. 8779-8798, 2004.

LI, W., KANG, J., YUAN, Y., XIAO, F., YAO, H., LIU, S., LU, J., WANG, Y., WANG, Z., REN, L. Preparation and characterization of PVA-PEEK/PVA- β -TCP bilayered hydrogels for articular cartilage tissue repair. **Composites Science and Technology**, v. 128, p. 58-64, 2016.

MAHDAVINIA, G. R., ETEMADI, H. *In situ* Synthesis of magnetic CaraPVA IPN nanocomposite hydrogels and controlled drug release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 45, p. 250-260, 2014.

MUZZARELLI, R. A. A., GRECO, F., BUSILACCHI, A., SOLLAZZO, V., GIGANTE, A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 723-739, 2012.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue Engineering. **Materials Today**, v. 14, p. 88-95, 2011.

Oliveira, R. N., MCGUINNESS, G. B, ROUZE, R., QUILTY, B., CAHILL, P., SOARES, G. D. A., THIRÉ, R. M. S. M. PVA hydrogels loaded with a brazilian propolis for burn wound healing applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 42129 (1-12), 2015.

- PEREIRA, A. P. V., VASCONCELOS, W. L., ORÉFICE, R. L. Novos Biomateriais: híbridos orgânico-inorgânico bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 104-109, 1999.
- PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.
- RIGO, E. C. S., GEHRKE, S. A., CARBONARI, M. Síntese e caracterização da hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press Implantol**, v. 1, p. 39-50, 2007.
- SIVASHANKARI, P. R., PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043
- SOFRONIA, A. M., BAIES, R., ANGHEL, E. M., MARINESCU, C. A., TANASESCU, S. Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 153-163, 2014.
- STRAWHECKER, K. E., MANIAS, E. AFM of poly (vinyl alcohol) crystals next to an inorganic surface. **Macromolecules**, v. 34, p. 8475-8482, 2001.
- TANG, Q.; SUN, X.; LI, Q.; WU, J.; LIN. Fabrication of a high-strength hydrogel with a interpenetrating network structure. **Journal Colloids And Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 346, p. 91-102, 2009.
- TSIOURVAS, D., SAPALIDIS, A., PAPADOPOULOS, T. Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries. **Materials Today Communications**, v. 7, p. 59-66, 2016.
- USP30-NF25, United States Pharmacopeia – National Formulary, **The United Pharmacopeia Convention**, Rockville, MD, USA, 2007.
- ZHANG, H., YAN, Y., WANG, Y., LI, S. Morphology and formation mechanism of hydroxyapatite whiskers from moderately acid solution. **Materials Research**, v. 6, p. 111-115, 2002.
- ZHANG, W., SUN, F., NIU, H., WANG, Q., DUAN, J. Mechanistic insights into cellular immunity of chondroitin sulfate A and its zwitterionic N-deacetylated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 331-338, 2015.
- ZHOU, Z., WEI, Q., LI, Q., JIANG, B., CHEN, Y., SUN, Y. Development of Co-based bulk metallic glasses as potential biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, 2016. doi: 10.1016/j.mse.2016.05.025

YAN, S., ZHANG, Q., WANG, J., LIU, Y., LU, S., LI, M., KAPLAN, D. L. Silk fibroin/ chondroitin sulfate/ hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction.

Acta Biomaterialia, v. 9, p. 6771-6782, 2013.

YE, M., MOHANTY, P., GHOSH, G. Biomimetic apatite-coated porous PVA scaffolds promote the growth of breast cancer cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 310-316, 2014.

Anexo – Carta da Comissão de Ética