



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de Doutorado

**"Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes
Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro
Bioativo"**

Autora: Elke Margareth Fernandes Lemos

Orientadora: Prof^ª. Marivalda de Magalhães Pereira, Dra.

Março/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Elke Margareth Fernandes Lemos

**"Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes
Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro Bioativo"**

Tese de doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas
da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof^ª Marivalda Magalhães Pereira, Dra.

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

Março/2013

DEDICATÓRIA

A Deus que com sua infinita grandeza permitiu a gota se transformar em oceano. Por me conduzir pelo caminho da humildade e sabedoria: “Quando eu mudo o mundo muda”, a mudança começa em nós...

Aos meus pais por terem me dado o dom da vida e a oportunidade de estar aqui e evoluir um pouco mais nesta passagem pela existência humana. A minha mami, meu grande exemplo de otimismo, alegria e superação, meu amor sempre incondicional.

A meu eterno e grande amor, meu benzinho Rodolfo, que é meu amigo, amante, confidente, meu norte, minha ternura incondicional. Nos momentos mais difíceis você sempre me amparou, apoiou e motivou, calando meus medos.

Ao meu querido gato “chuchu” por todo carinho e compreensão nos momentos de angústia que sempre ficou deitado ao lado do computador olhando pra mim com seu meigo e doce semblante e que está comigo desde o início desta jornada. Também “a me amore, amorzinho”.

A Chico Xavier por ter me ensinado muito sobre Amor e Compaixão:

“A caridade é um exercício espiritual. Quem pratica o bem, põe em movimento as forças da alma. “

“Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim; todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela!... Novas folhas, novas flores, na indefinida bênção do recomeço...”

AGRADECIMENTOS

À professora Marivalda de Magalhães Pereira que aceitou este desafio de me aceitar na área de Biomateriais, agradeço por me receber, por insistir na minha presença no laboratório, na prática constante, aprendi muito. Nunca vi uma pessoa tão animada quanto ela! Um exemplo de animo e fé na vida sempre. Muito obrigada pela oportunidade.

Ao professor Claudio Luis Donnici do Departamento de Química por seu interesse e carinho em auxiliar-me nos ensaios de IR. E ao aluno de doutorado Marcos pela constante disposição no uso do laboratório, meu muito obrigado.

Aos professores Carlos Roberto Appoloni e Avacir Casanova Andrello do departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina (UEL) por sua grande prestatividade e carinho em me receber e realizar os ensaios de microtomografia computadorizada.

Ao Professor Rodrigo Lambert Oréfice, pela realização dos ensaios mecânicos e por suas aulas, nas quais aprendi muito sobre materiais e polímeros.

Ao técnico Jamil do ICB pelo auxílio no processo de liofilização, por me receber de braços abertos e de forma incondicional, pela simpatia e otimismo constante e por sua espetacular capacidade profissional associada ao bom humor, prova que seriedade não tem nada a ver com cara fechada, rs... profissionais do futuro serão assim como você, carismáticos! Meus sinceros agradecimentos.

Aos técnicos de laboratório Andréia, Patrícia, em especial a dupla dinâmica Ilda e Isabel, por me acudir nos momentos de sufoco disponibilizando o laboratório para meu uso, sem o qual este trabalho seria inviável meu profundo agradecimento. “Bel” minha amiga obrigada pelos conselhos e apoio emocional constante.

As alunas de iniciação científica, Luíza e Bruna meu muito obrigado pela paciência e suportar minhas constantes dúvidas.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo apoio prestado durante a realização dos meus experimentos e por dividir dúvidas e angústias nesta jornada: Agda, Alessandra, Alexandra, Breno, Bruna, Carol, Cheise, Eliane, Joice, Luíza, Magda, Patrícia, Sandhra, Tadeu e Taís.

Meu agradecimento especial a Denise que se dispôs a fazer meus ensaios mecânicos depois de ter trabalhado a noite toda em seu plantão. E a Sandhra do ICB - UFMG pela presteza na realização dos testes de citotoxicidade no ICB-UFMG.

Agradeço muito ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a este projeto, que sem esses recursos seria impossível atravessar mais esta etapa de 4 anos.

E finalmente, minhas amigas de longas datas (ano de 19...?), muitas vivências, alegrias e tristezas compartilhadas, meu carinho incondicional a Daniela e a Valéria, obrigada por partilhar a vida comigo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
ÍNDICE DE NOTAÇÕES.....	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	5
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Biomateriais e Matrizes para Engenharia de Tecidos	6
3.2 Materiais Compósitos e Híbridos.....	10
3.3 Materiais Nanocompósitos e as Nanopartículas	11
3.4 O Processo Sol-Gel.....	13
3.5 O Processo de Liofilização	17
3.5.1 Congelamento	19
3.5.2 Secagem Primária	20
3.5.3 Secagem Secundária	20
3.5.4 A Taxa de Liofilização.....	21
3.6 Aspectos da Porosidade x Liofilização.....	22
3.7 Microtomografia Computadorizada (μ CT)	23
3.8 Os Vidros Bioativos.....	25
3.9 A Quitosana	27
3.9.1 Filmes e Matrizes com Quitosana	27
3.9.2 Origem e Formação da Quitosana.....	28
3.9.3 Estrutura e Propriedades	32

3.10 Propriedades Mecânicas de Filmes e Matrizes	33
3.11 O Reticulante Glutaraldeído (GA)	35
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
4.1 Síntese de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas.....	38
4.1.1 Preparo da Solução Precursora de Vidro Bioativo 60S	40
4.1.2 Preparo da Solução de Quitosana	40
4.1.3 Obtenção de Filmes e Matrizes Híbridas Qui-VB	40
4.1.4 Preparo da Dispersão de Nanopartículas de Vidro Bioativo(BGNP).....	41
4.1.5 Obtenção de Filmes e Matrizes Nanocompósitas Qui-BGNP.....	42
4.1.6 Preparo da Solução de PVA.....	43
4.1.7 Obtenção de Filmes e Matrizes com o PVA.....	43
4.2 Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas.....	44
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.2.2 Avaliação por Microtomografia Computadorizada (μ CT)	45
4.2.3 Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raio-X (EDS)	46
4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier(FTIR).....	46
4.2.5 Ensaio de Bioatividade	46
4.2.6 Caracterização das Propriedades Mecânicas.....	47
Ensaio de Tração dos Filmes	489
Ensaio de Compressão das Matrizes.....	48
4.3 Ensaio de Citotoxicidade	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 Descrição Qualitativa dos Filmes Híbridos Qui-VB.....	50
5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	52
5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
5.2 Descrição Qualitativa dos Filmes Nanocompósitos Qui-BGNP	57
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raio-X	58
5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier(FTIR).....	59
5.3 Descrição Qualitativa das Matrizes Híbridas Qui-VB.....	61
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Microtomografia Computadorizada	61

5.4.1 Morfologia e Porosidade das Matrizes Híbridas Qui-VB.....	62
5.4.2 Morfologia e Porosidade das Matrizes Nanocompósitas Qui-BGNP.....	71
5.4.3 Morfologia e Porosidade das Matrizes Qui-PVA-VB	76
5.5 Ensaio de Tração dos Filmes Híbridos Qui-VB	81
5.6 Ensaio de Tração dos Filmes Nanocompósitos Qui-BGNP	84
5.7 Ensaio de Tração dos Filmes Qui-PVA com 20% VB.....	87
5.8 Ensaio de Compressão das Matrizes Híbridas Qui-VB	91
5.9 Ensaio de Compressão das Matrizes Nanocompósitas Qui-BGNP	93
5.10 Ensaio de Compressão das Matrizes Qui-PVA com 20%VB	96
5.11 Ensaio de Bioatividade	99
5.12 Ensaio Biológicos	104
6. CONCLUSÕES.....	106
7. AGRADECIMENTOS	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Substratos sintetizados para o crescimento de tecidos (<i>Biomerix Biomaterial</i>).....	7
Figura 3.2: Etapas da engenharia de tecidos para a criação de um novo tecido (<i>Biomed Brown</i>).....	8
Figura 3.3: Esquema mostrando o princípio do processo sol-gel (adaptado de Gupta & Kumar, 2008; Costa, 2010).....	14
Figura 3.4: A transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico (Adaptado de Alfaya & Kubota, 2002).....	15
Figura 3.5: Diagrama de fase da água (adaptado de Oetjen e Haseley, 2004).....	18
Figura 3.6: Esquema do comportamento da porosidade em distintas regiões da matriz quando submetida ao processo de liofilização (Adaptado de Deville, <i>et al.</i> 2006).....	22
Figura 3.7: Esquema da técnica de TC e μ CT (Adaptado de Lima, <i>et al.</i> , 2005).....	25
Figura 3.8: Esquema da formação da hidroxiapatita na superfície do vidro bioativo.....	26
Figura 3.9: Fotografia digital de matriz porosa de quitosana após o processo de liofilização (Yang <i>et al.</i> , 2010).....	28
Figura 3.10: Representação das estruturas químicas da celulose, quitina e quitosana.....	30
Figura 3.11: Processo de obtenção da quitosana.....	31
Figura 3.12: Curvas tensão x deformação relativa para filmes com 0 a 30% de vidro: A- 0%, B- 5%, C- 10%, D- 20%, E- 30% (Dias <i>et al.</i> , 2010).....	34
Figura 3.13: Estrutura molecular do glutaraldeído.....	36
Figura 3.14: Esquema genérico da obtenção de bases de Schiff.....	36
Figura 4.1: Fluxograma das etapas de síntese de filmes e matrizes.....	39
Figura 4.2: Etapas do ensaio de bioatividade.....	47
Figura 5.1: Fotografia de filmes com 20% m/m de vidro bioativo (a) antes da gelação e (b) após a gelação.....	51
Figura 5.2: Fotografia de filmes com 0% (a), 10% (b), 20% (c) e 30% m/m (d) de vidro bioativo após secagem.....	52

Figura 5.3: Imagens de MEV para filmes com 30% m/m de VB: (a) 1.000x, (c) 5.000x. EDS para filmes com 30% m/m de VB (b, d). Imagem de MEV para filmes de quitosana pura: (e) 1.000x.....	54
Figura 5.4: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB (a), (b), (c) e (d) respectivamente, (800-1800).....	56
Figura 5.5: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB (a), (b), (c) e (d) respectivamente, (2200-4000).....	56
Figura 5.6: Fotografias de filmes com 1%, 3%, 5% e 10% m/m de BGNP.....	58
Figura 5.7: Imagens de MEV (a) e EDS (b) de filmes com 10% m/m de BGNP, aumento de 40.000 x.	58
Figura 5.8: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP (a), (b), (c), (d) e (e) respectivamente, e do Vidro Bioativo puro (VB) (800-1800).....	61
Figura 5.9: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP (a), (b), (c), (d) e (e) respectivamente, e do Vidro Bioativo puro (VB) (2000-4000).....	61
Figura 5.10: Imagens obtidas por fotografia ótica de matrizes de quitosana e vidro bioativo com dimensões de 10 mm x 18 mm.....	62
Figura 5.11: Comparação das imagens de MEV de matrizes com 0%VB (a), 10%VB (b), 20%VB (c) e 30% VB (d): morfologia e estrutura dos poros. Aumento de 200x (a-d).....	64
Figura 5.12: Imagens de MEV da matriz de quitosana sem o vidro: corpo da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 300x (c) e interconectividades - 500x (d).....	64
Figura 5.13: Distribuição do tamanho de poros obtidos por μCT , nas matrizes de quitosana com 0%, 10% e 20% m/m de vidro bioativo, (a), (b) e (c) respectivamente.....	67
Figura 5.14: Imagens de MEV das matrizes com 10% de vidro bioativo: corpo da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 800x (d).....	69
Figura 5.15: Imagens de MEV das matrizes com 20% de vidro bioativo: corpo da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 500x (d).....	69

Figura 5.16: Imagens de MEV das matrizes com 30% de vidro bioativo: corpo da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 250x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 500x (d).....	70
Figura 5.17: Sugestão esquemática proposta por Al-Sagheer & Muslim (2010), sobre a interação da quitosana e o precursor TEOS.....	72
Figura 5.18: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 1% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros e cavidades das interconectividades - 200x (b).....	73
Figura 5.19: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 3% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros e cavidade das interconectividades - 200x (b).	74
Figura 5.20: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 5% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 200x (a), tamanhos dos poros e cavidade das interconectividades - 200x (b).	75
Figura 5.21: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 10% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros 200 x (b) e cavidade das interconectividades - 500x (c).	76
Figura 5.22: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 10% de BGNP congeladas em nitrogênio líquido a -196°C: matriz fraturada 1500x (a), 500x (b), tamanho de poros 500x (c).	77
Figura 5.23: Imagens de MEV mostrando as diferenças morfológicas de poros das matrizes compostas por quitosana pura - 200x (a), quitosana com PVA - 200x (b), e por quitosana com PVA e 20% de vidro bioativo - 200x (c).....	78
Figura 5.24: Imagens de MEV da matriz de quitosana e PVA: corpo da matriz fraturado - 200x (a), diâmetro dos poros e interconectividades - 500x (b).....	79
Figura 5.25: Distribuição do tamanho de poros da matriz de Qui-PVA (a) e da matriz de Qui-PVA 20%VB (b) obtidos por μCT	80
Figura 5.26: Imagens de MEV da matriz de quitosana e PVA com 20% de vidro bioativo: corpo da matriz fraturado - 60x (a), morfologia dos poros - 500x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 800x (d).....	81
Figura 5.27: Curvas tensão x deformação dos filmes de quitosana pura e dos filmes híbridos com 10% e 20% de vidro bioativo.....	83

Figura 5.28: Influência do teor de vidro bioativo na tensão máxima dos filmes com 0, 10 e 20%VB.....	84
Figura 5.29: Influência do teor de vidro bioativo na deformação à tensão máxima dos filmes com 0, 10 e 20% m/m de VB.....	84
Figura 5.30: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes nanocompósitos de quitosana com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.....	85
Figura 5.31: Influência das nanopartículas na tensão máxima dos filmes com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.....	86
Figura 5.32: Influência das nanopartículas na deformação máxima dos filmes com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.	86
Figura 5.33: Comparação das curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes de Qui-0%VB, 10%VB com o filme 10% BGNP.....	88
Figura 5.34: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes de Qui-0%VB, Qui-PVA, Qui-20%VB e Qui-PVA-20%VB.....	89
Figura 5.35: Influência do vidro bioativo e do PVA na tensão máxima dos filmes.....	90
Figura 5.36: Influência do vidro bioativo e do PVA na deformação máxima dos filmes.	90
Figura 5.37: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes de Qui-0%VB e das matrizes híbridas com 10, 20, 30% m/m de vidro bioativo.....	92
Figura 5.38: Influência do vidro bioativo na tensão máxima a compressão das matrizes com 0, 10, 20 e 30%VB.....	93
Figura 5.39: Influência do vidro bioativo na deformação máxima a compressão das matrizes com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB.....	94
Figura 5.40: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.....	95
Figura 5.41: Influência das nanopartículas na tensão máxima de compressão das matrizes com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.....	95
Figura 5.42: Influência das nanopartículas na deformação máxima das matrizes com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.....	96
Figura 5.43: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes com Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.....	98

Figura 5.44: Influência do PVA e do vidro bioativo na tensão máxima de compressão das matrizes Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.....	98
Figura 5.45: Influência do PVA e do vidro bioativo na deformação máxima de compressão das matrizes Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.....	98
Figura 5.46: Imagens de MEV da superfície dos filmes com 20% de vidro bioativo imersos em SBF por: 1 dia (A-a), 7 dias (B-b) e por 28 dias (c-D-d). Imagem de EDS do filme imerso em SBF por 28 dias (C).	102
Figura 5.47: (A) FTIR de filmes após 1 dia de imersão em SBF: (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% e (d) 30% m/m de VB.....	103
Figura 5.48: (B) FTIR de filmes após 28 dias de imersão em SBF: (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% e (d) 30% m/m de VB.....	104
Figura 5.49: DRX de filmes com (a) 0%, (b) 10% e (c) 20% m/m de VB após 7 dias de imersão em SBF.....	104
Figura 5.50: Viabilidade celular dos híbridos Qui- VB e dos nanocompósitos Qui-BGNP. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística realizada por ANOVA/ Bonferroni/GraphPad/Prism.....	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Propriedades mecânicas de filmes com quitosana citados na literatura.....	34
Tabela 3.2: Propriedades mecânicas de matrizes de quitosana e vidro bioativo citados na literatura.....	35
Tabela 4.1: Composição nominal considerando p/p (%).....	40
Tabela 4.2: Composição nominal considerando p/p (%).....	42
Tabela 5.1: Bandas características de FTIR para híbridos de quitosana e vidro bioativo (Al-Sagheer e Muslim, 2010; Peter <i>et al</i> , 2010 e 2009; Cai <i>et al</i> , 2009; Oliveira, 2007, 2011; Ahmad <i>et al.</i> , 2007; Reis, 2007; Grupta & Jabrail, 2006; Al-kandary <i>et al</i> , 2005; Martinez <i>et al.</i> , 2004; Duarte <i>et al.</i> , 2002; Zong <i>et al.</i> , 2000).....	57
Tabela 5.2: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por MEV e μCT	65
Tabela 5.3: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por μCT e MEV.....	72
Tabela 5.4: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por μCT e MEV.....	78
Tabela 5.5: Comparação dos valores médios de tensão e deformação máxima dos filmes nanocompósitos Qui-BGNP com os filmes híbridos Qui-VB.....	86
Tabela 5.6: Valores médios de tensão e deformação máxima dos filmes.....	90
Tabela 5.7: Comparação dos valores médios de tensão e deformação máxima das matrizes híbridas e nanocompósitas	96
Tabela 5.8: Valores médios de tensão e deformação máxima à compressão das matrizes.....	98
Tabela 5.9: pH médio das amostras dos híbridos e nanocompósitos em função do tempo de imersão em SBF à 37°C.....	100

ÍNDICE DE NOTAÇÕES

ASTM	<i>American Society Testing and Materials</i>
BGNP	<i>Bioactive Glass Nanoparticles</i>
Cp	Corpo de Prova
MEC	Matriz extracelular
EDS	Espectroscopia por difração de raio -x
DRX	Difração de Raios -X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GD	Grau de Desacetilação
HCA	Hidroxiapatita Carbonatada
HA	Hidroxiapatita
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
Kv	kilovolt - Unidade de Medida de Tensão
MBar	Unidade Métrica de Pressão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPa	Mega pascal
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
µm	Micrometro
µCT	Microtomografia Computadorizada

nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PGA	Poli(acido glicolico)
PLGA	Poli(acido lático co-acido glicolico)
PLLA	Poli(acido lático)
PVA	Poli(álcool vinilico-co-acetato de vinila)
PBS	Solução-tampão (<i>“Phosphate-Buffered Saline”</i>)
QUI	Quitosana
Sa	Área superficial
SAOS	Osteosarcoma de linhagem humana
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia Computadorizada
TEP	Trietilfosfato
TEOS	Tetraetilortosilicato
TIPS	Separação de Fase Induzida Termicamente
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VB	Vidro Bioativo
Vs	Volume de solução
60S	60% de Sílica
3D	Tridimensional

RESUMO

Sistemas em nanoescala têm gerado promissores resultados em engenharia de tecido ósseo, um crescente consenso da literatura concentra-se no desenvolvimento de materiais nanoestruturados baseados em materiais cerâmicos ou vidros bioativos, devido à sua elevada capacidade de biomineralização. A introdução da fase bioativa nos compósitos tem sido, em geral, realizada pelo método sol-gel, levando a obtenção de um material híbrido ou um nanocompósito. A utilização de partículas em tamanho nanométrico é conhecida por influenciar o aumento da bioatividade nos materiais cerâmicos e, além disso, a fase inorgânica pode atuar como agente de reforço de carga melhorando as propriedades mecânicas do material. A quitosana também demonstra resultados promissores na literatura, devido a sua capacidade de biodegradar e a sua biocompatibilidade, além disso, possui elevada capacidade mecânica quando associada ao agente de reticulação glutaraldeído. Neste trabalho foram adotadas duas estratégias para introdução da fase bioativa, uma seria na forma de solução (sol) e outra na forma de nanopartículas obtidas pelo método de coprecipitação. Outra estratégia foi o uso do método de liofilização para a obtenção de porosidade nas matrizes. O objetivo foi comparar os resultados obtidos nas duas rotas em filmes e matrizes híbridas e nanocompósitas nos principais aspectos: análise química, porosidade, diferenças morfológicas, resistência mecânica, bioatividade, citotoxicidade. Os resultados foram promissores: o FTIR dos filmes mostra a presença de grupos funcionais característicos do vidro bioativo, confirmando sua introdução na rede polimérica. Resultados significativos de bioatividade mostraram a formação de uma camada de fibrilas na superfície do filme híbrido, característica típica morfológica de HCA, confirmados por DRX e FTIR. Os resultados das medidas de pH mostraram-se estáveis após imersão dos filmes em SBF por 7 e 28 dias. A maioria das matrizes apresentou uma macroporosidade bem homogênea com interconectividades e distribuição de tamanho de poros entre 50 e 120 μm , percentual de porosidade aparente variando de 62 a 91% e total de 93 a 96%. Filmes híbridos e nanocompósitos apresentaram um elevado aumento de resistência mecânica alcançando valores da ordem de 80 MPa e 22% nos filmes, 0,11 MPa e 71% nas matrizes significativamente superiores aos apresentados pela quitosana pura e aos compósitos a base de sílica e polímeros relatados na literatura. Os ensaios biológicos realizados com resazurina em osteoblastos humanos demonstraram uma viabilidade celular bastante promissora confirmando os baixos níveis de toxicidade apresentados pelos materiais híbridos e nanocompósitos.

ABSTRACT

Nanostructured scaffolds have generated promising results in bone tissue engineering. The production of composites bioactive glass/polymer have been the focus of studies in the literature, which have associated to the bioactive glass the capacity to form a strong bond with the bone tissue surface. One method for introducing the bioactive phase in composites has been the sol-gel method, leading to a hybrid or a nanocomposite material. The presence of the bioactive phase at the nanometer scale increases the bioactivity and, in addition, acts as an agent for improving the mechanical strength of the material. Among the polymers more frequently used, Chitosan shows promising results in the literature, because of its ability to biodegrade, its biocompatibility, and a high mechanical strength when combined with crosslinking agents. In this work composites bioactive glass/chitosan were developed using two strategies for introducing the bioactive phase: i) a precursor solution (sol) was added to the polymer solution (materials obtained heretofore called hybrids); ii) bioactive glass nanoparticles obtained previously by the sol-gel method was added to the polymer solution (materials obtained heretofore called nanocomposites). The main objective was to compare the films and porous matrices obtained when using the two different routes, in terms of chemical composition, porosity, pore morphology, mechanical behavior, bioactivity, and cytotoxicity. The FTIR results showed the presence of characteristic functional groups of bioactive glass, confirming its introduction into the polymeric network. Some composites, particularly those with higher glass content, showed significant bioactivity, confirmed through the formation of a surface layer with morphological characteristics typical of HCA, confirmed by DRX and FTIR. Most scaffolds obtained presented a homogeneous pore structure with interconnectivity, pore size distribution between 50 and 120 μ m, and porosity ranging from 62 to 91%. Hybrids and nanocomposites obtained presented high mechanical strength, with values reaching the order of 80MPa for films and 11MPa for scaffolds, values significantly higher when compared to those shown by pure chitosan or composites based on silica and other polymers reported in the literature. The maximum deformation reached values in the order of 22% for films and 71% for scaffolds. In general the increase in strength obtained for the nanocomposites was more pronounced than for hybrids. Biological assays performed using human osteoblasts showed cell viability close to the control, confirming the low toxicity presented by the hybrids and nanocomposites materials developed.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de dispositivos que substituam ou reparem as estruturas ósseas, devido à grande perda de tecido ósseo ocasionado por traumas em acidentes ou patologias sofridas neste tecido.

Um outro fator importante relacionado a essa estrutura do aparelho locomotor humano é que a expectativa de vida tem aumentado com o passar dos anos o que também gera uma demanda maior de dispositivos que reparem ou amenizem o envelhecimento natural do sistema esquelético como um todo, visto que ele funciona como uma alavanca e gera sustentação ao corpo humano. Portanto, é imprescindível um estudo minucioso de dispositivos que atendam essa demanda. Entre eles surgem os biomateriais, com várias possibilidades de utilização no reparo do tecido ósseo. Muitos estudos já estão bem desenvolvidos e abrangem o uso de uma variedade de materiais sintéticos e naturais, que por sua vez mimetizam as propriedades dos ossos no que diz respeito à estrutura, a bioquímica, a morfologia entre vários outros requisitos.

Os dispositivos ou substratos para crescimento de tecido, em geral, são denominados matrizes e atuam na restauração da função de um órgão ou membro utilizando as tecnologias da engenharia de tecido. Normalmente esse substrato necessita de uma microestrutura porosa. A elevada porosidade é desejável para permitir migração celular, crescimento do tecido e eventual vascularização (Jones *et al.* 2006). Porém um problema relacionado a este tipo de estrutura porosa seria justamente a baixa resistência mecânica resultante em grande parte dessa alta, embora necessária, concentração de poros.

As propriedades mecânicas de matrizes porosas são de importância crucial, especialmente quando se trata de regeneração de tecidos duros como cartilagem e osso que requerem suporte de carga. A forma ou configuração do tecido duro é um aspecto importante para sua função, e em tais casos, a técnica de processamento deve permitir a preparação de macroestruturas com geometrias tridimensionais irregulares (Thomson, *et al.*, 1997). Deste modo, no processo de síntese das matrizes,

tanto o material utilizado quanto a sua forma de obtenção devem suprir esta demanda de resistência estrutural.

O tecido ósseo natural é um material nanocompósito orgânico-inorgânico complexo, no qual nanocristais de hidroxiapatita e fibras de colágeno estão organizados em uma arquitetura hierárquica. A principal abordagem para se produzir biomateriais artificiais que substituem o tecido ósseo é justamente se inspirar nesse biomimetismo e produzir nanocristais de fosfato de cálcio como a HA, dispersas em matrizes poliméricas (Cai *et al*, 2009). Portanto, o material desenvolvido nesse trabalho seguiu esse sistema de um material compósito. Nesse sentido duas estratégias foram feitas almejando melhorar as propriedades mecânicas da matriz 3D. Uma dessas estratégias é a utilização do método sol-gel para inserção de vidro bioativo (sol) em uma matriz polimérica, material denominado neste trabalho de **híbrido** e a outra estratégia é a utilização de nanopartículas de vidro bioativo dispersas em uma matriz polimérica, material denominado de **nanocompósito**.

A estratégia de uso do método sol-gel apresenta-se potencialmente útil em possibilitar a combinação de polímeros com materiais cerâmicos. Isso por que permite a preparação de materiais cerâmicos, como o vidro bioativo, em temperaturas compatíveis com a do processamento de polímeros (Pereira, 2005a). Além dessa característica, os materiais à base de sílica como o vidro bioativo (sol) dispersos em uma matriz polimérica podem realizar possíveis ligações covalentes entre as fases orgânica-inorgânica durante o processo de síntese criando um material resistente (Jones, 2009).

A outra estratégia foca o uso de vidro bioativo em forma de nanopartículas. Os materiais em nano-escala comparados aos de micro-escala apresentam uma grande área superficial, o que proporciona um aumento interfacial entre o vidro e a matriz polimérica produzindo materiais com alto desempenho mecânico. Além disso, o vidro bioativo em nanoescala pode estimular uma maior reação entre o material e as células, gerada pela extensa área superficial das nanopartículas, elevando a bioatividade do material (Hong *et al*, 2008; Chen *et al*, 2009).

A utilização das duas estratégias visa definir um método mais adequado para obter matrizes com estrutura porosa, bom desempenho mecânico e adequada bioatividade.

Nos últimos anos, os vidros bioativos têm sido amplamente usados para estimular o crescimento ósseo. Sua importância está na capacidade de promover a formação de uma interface de ligação entre sua superfície e os tecidos vivos vizinhos ao material. A formação, *in vitro*, sobre a superfície do material de uma camada rica em hidroxiapatita carbonatada semi-cristalina é uma indicação da bioatividade dos vidros bioativos *in vivo* (Li, 1991a; Jones, 2012).

A quitosana também é um material que tem sido explorado para a aplicação nas áreas biomédica e biofarmacêutica. Ela é um biopolímero natural, não tóxico, biodegradável, biocompatível e possui propriedades de adsorção de proteínas (Peter *et al.*, 2010).

O uso desses dois materiais para formar um híbrido e um nanocompósito é uma estratégia para aumentar a capacidade de resistência mecânica dos *scaffolds*, atendendo à demanda de carga em enxertos ósseos. Existem alguns estudos demonstrando a interação no nível molecular da quitosana com materiais à base de sílica. A quitosana possui grupos funcionais como as hidroxilas e os grupos das aminas, os quais possuem grande possibilidade de se ligarem rapidamente a outros grupos funcionais (Al-Sagheer & Muslim, 2010; Peter *et al.* 2009 e 2010; Lee, *et al.*, 2009).

Na literatura foram relatados alguns trabalhos com resultados promissores como o de Reis (2007) que desenvolveu um híbrido sintetizado com quitosana e vidro bioativo, com variações de 0 a 30% de teor de quitosana inserida na matriz de vidro bioativo. O ensaio mecânico de compressão em híbridos porosos mostrou que a tensão máxima à fratura teve um aumento significativo nas amostras contendo 20% m/m de quitosana, atingindo valor de 0,58 MPa, sendo significativamente superior às amostras obtidas nos vidros puros que obtiveram valores máximos de tensão de 0,13 MPa. No trabalho de Dias *et al.*, (2010) híbridos sintetizados com quitosana, Polivinyl Álcool (PVA) e vidro bioativo apresentaram valores de tensão máxima a

tração de 25 MPa, 34 MPa, 34 MPa, 29 MPa e 19 MPa, nos filmes com teores de 0, 5, 10, 20 e 30% m/m de vidro, respectivamente.

Embora os resultados da literatura tenham sido promissores em relação às matrizes na faixa de composição de 0 a 30% m/m de quitosana, estes valores ainda são baixos em relação ao necessário requerido pelas matrizes de regeneração do tecido ósseo. Valores de resistência a compressão do osso trabecular se encontram na faixa de 2-12 MPa (Jones, 2006; Dash *et al*, 2011). Além disso, investigações da literatura não apresentam resultados para ensaios mecânicos de filmes e matrizes que envolvam a quitosana e nanopartículas de vidro bioativo como é o caso de Peter *et al*. (2009, 2010) que, embora tenha utilizado as nanopartículas de vitrocerâmica bioativa imersas em quitosana, não realizou ensaios mecânicos em suas publicações.

Portanto, esse trabalho foca atender às demandas de carga óssea almejando o aumento da resistência à compressão até a faixa desejada de 2-12 MPa. Para tanto, atuou com novas estratégias de síntese como a utilização de nanopartículas de vidro bioativo, a utilização do processo de liofilização para obter materiais porosos e resistentes. Além disso, esse trabalho visa também oferecer uma continuidade dos estudos de Reis (2007) e Dias *et al* (2010), atuando de forma a complementar o estudo da faixa de composições no sistema quitosana-vidro bioativo, o qual utilizou alto teor de polímero e baixo teor de vidro. Foram sintetizados filmes e matrizes híbridas com 10, 20 e 30% m/m de vidro bioativo inseridos na matriz de quitosana. O percentual de vidro incorporado à fase orgânica na forma de nanopartículas teve teores de 1, 3, 5 e 10% m/m.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Obtenção e caracterização de híbridos e nanocompósitos nas configurações de filmes e matrizes 3D, sendo os híbridos obtidos por solução de quitosana adicionada à solução de vidro bioativo (sol) e os nanocompósitos obtidos por adição de nanopartículas de vidro bioativo na solução de quitosana. Os dois sistemas foram desenvolvidos para a aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de híbridos: a partir da solução de quitosana e solução de vidro bioativo.
- Obtenção de nanocompósitos: adição de nanopartículas de vidro bioativo na solução de quitosana.
- Obtenção de matrizes porosas 3D através do método de Liofilização.
- Obtenção de filmes através da técnica de evaporação do solvente.
- Caracterizações físicas, químicas, mecânicas dos filmes e matrizes obtidos.
- Avaliação do percentual e do tamanho de poros das matrizes através da Microtomografia Computadorizada (μCT).
- Avaliação da bioatividade dos filmes.
- Avaliação de citotoxicidade dos filmes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais e Matrizes para Engenharia de Tecidos

A partir do ponto de vista da engenharia de tecidos, um material sintético deve apresentar estreita afinidade com o ambiente celular, interagindo com toda a dinâmica de desenvolvimento e crescimento tecidual. Isso envolve mecanismos de diferentes afinidades, seja no nível atômico, molecular, ou em um nível macro. Trata-se de um processo complexo que necessita de investigações do universo físico-químico dos materiais em concordância com todo o universo biológico. Embora já se saiba muito desses dois universos, ainda temos muito a descobrir das suas interações e consequências num ambiente real.

A ciência dos biomateriais surge com um caráter interdisciplinar de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias, envolvendo conhecimentos da engenharia com as ciências da saúde como a medicina, odontologia, química, biologia entre várias outras.

A engenharia de tecido é uma ciência que visa a regeneração do tecido humano. A reconstrução do tecido vivo é possível através do desenvolvimento de técnicas de manipulação específica em ambiente de laboratórios objetivando o crescimento de moléculas, células, tecidos ou órgãos para restaurar manter, ou melhorar a função do tecido e, fundamentalmente, compreender as relações entre estruturas-funções em tecidos normais e patológicos.

Na atualidade, correntes esforços científicos têm procurado resolver o problemático tratamento de grandes perdas ósseas. Juntamente com a não união das fraturas, os defeitos ósseos continuam sendo um sério problema associado à perda da função do órgão, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes afetados (Drosse *et al.*, 2008).

De modo geral, os transplantes de órgãos e tecidos possuem uma demanda muito alta e muito superior em relação à oferta dos mesmos e, infelizmente, as projeções indicam que essa discrepância continuará grande nos próximos anos. Além dessa carência, têm-se dispendiosos gastos na área de ortopedia. Dados estatísticos no Brasil mostram que, no ano de 2004, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com

ortopedia totalizaram cerca de R\$60 milhões de reais, sendo que destes, R\$30 milhões foram gastos na compra de próteses para o procedimento de artroplastia total de quadril. Somado a isso, ainda em 2004, houve um gasto adicional de quase R\$ 7 milhões utilizados na compra de próteses para cerca de 1500 cirurgias de revisão (Costa, 2010; Reis, 2007; Soares, 2005). Outro fator relevante é o aumento da expectativa de vida no país. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) relata que a expectativa de vida do brasileiro aumentou em 25,4 anos de 1960 a 2010, ao passar de uma média de 48 anos para 73,4 anos. A participação de idosos na população saltou de 2,7% para 7,4%. Portanto, nos próximos anos existirá uma demanda elevada em ortopedia, a qual deverá atender também essa crescente população idosa.

Visando atender esse déficit de tecidos e órgãos, a engenharia de tecido surge como uma nova estratégia na área da ortopedia. Através dela é possível desenvolver de forma sintética um substrato ideal para o crescimento de células *in vitro* e *in vivo*, que normalmente é chamado de matriz ou, em inglês, *scaffold* (Fig. 3.1). Nele é possível as células aderirem, crescerem e proliferarem, auxiliando na construção da matriz extracelular (MEC), gerando um novo tecido, o qual pode ser implantado no local que ocorre determinada lesão (Williams, 2006; Ratner *et al.*, 2004).

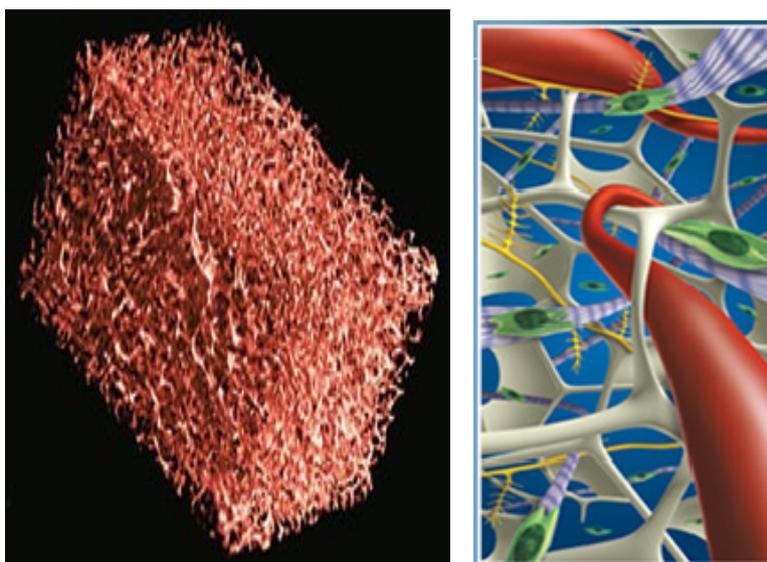


Figura 3.1: Substratos sintetizados para o crescimento de tecidos (*Biomerix Biomaterial*).

Uma estratégia utilizada na engenharia de tecidos para o desenvolvimento de um novo tecido (Fig. 3.2) consiste no isolamento de células específicas através de uma pequena biópsia do paciente com o objetivo de cultivá-las em uma matriz tridimensional porosa, natural ou sintética, sob condições de cultura precisamente controladas. Com a presença de fatores de crescimento e diferenciação, o sistema construído é implantado no sítio defeituoso do paciente, em local anatomicamente apropriado onde ocorre direcionamento, crescimento e remodelação *in vivo* e recapitulação da função do órgão ou tecido, ao mesmo tempo em que a matriz se degrada e possa ser eliminada do organismo sem causar efeitos tóxicos ao mesmo (Reis, 2007; Zhang & Zhang, 2004; Schoen *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2003).

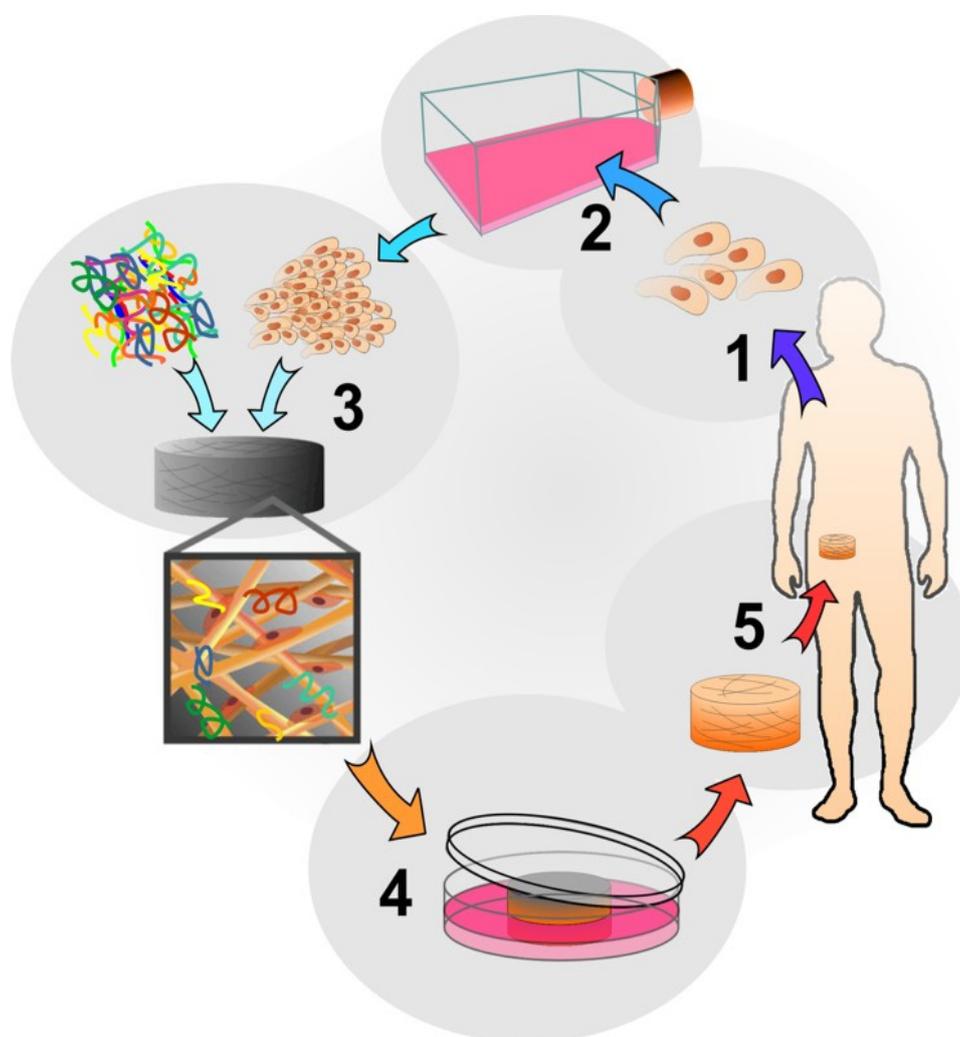


Figura 3.2: Etapas da engenharia de tecidos para a criação de um novo tecido (*Biomed Brown*).

Para ter êxito na reconstrução de um novo tecido ósseo, a partir de um substrato sintético é necessário realizar as seguintes etapas (Hutmacher, 2000):

1. Sintetizar uma adequada matriz bioreabsorvível
2. Semear células de osteoblastos no interior do substrato num meio de cultura estático
3. Gerar o crescimento de tecido imaturo num meio dinâmico, através do uso de bioreatores
4. Gerar o crescimento de tecido maduro num ambiente mais próximo ao do meio biológico
5. Realizar o transplante cirúrgico
6. Conseguir a integração do tecido transplantado ao tecido hospedeiro

No sentido de identificar os biomateriais mais adequados para o crescimento de tecidos é necessário investigar bem o sistema de funcionamento do crescimento e da regeneração do tecido específico, o qual se pretende reconstruir. Por outro lado, também é necessário investigar as características que deve ter uma matriz em função do tipo do tecido lesionado. Para tal é imprescindível que no projeto de uma matriz sejam seguidos alguns requisitos para o seu bom desempenho. Uma matriz de regeneração óssea para ter sucesso de implante no local lesionado deve (Buckley 2004; Jones, 2009):

1. Ser biocompatível (induzindo ao mínimo de toxicidade ou resposta imune *in vivo*);
2. Promover adesão celular, ligação com o osso e estimular a osteogênese;
3. Atuar como um suporte de crescimento ósseo e, portanto, ter uma estrutura porosa (diâmetros da ordem de 100 μm) com interconectividade que possa permitir o crescimento celular, vascularização e suprimento de nutrientes;
4. Reabsorção segura no corpo (remodelação do tecido) e ter uma taxa controlada de degradação;
5. Exibir propriedades mecânicas similares à do osso anfitrião;

6. Ter processos de fabricação os quais permitem flexibilidade para possuir várias formas;
7. Ser esterilizável e ter características legais para uso clínico.

As propriedades das matrizes dependem primariamente da natureza do biomaterial, do processo de fabricação e da microarquitetura 3D. A natureza do biomaterial tem sido objeto de extensivos estudos envolvendo diferentes materiais, e combinações desses materiais para formar compósitos. Materiais compósitos feitos a partir de polímeros e cerâmicas bioativas tem atraído muito atenção como um promissor biomaterial para a engenharia de tecido ósseo devido a sua combinação de biocompatibilidade e biodegradabilidade polimérica com a bioatividade das biocerâmicas (Hong *et al.*, 2008; Renghini *et al.*, 2009).

3.2 Materiais Compósitos e Híbridos

Um compósito trata-se de um material resultante da combinação de dois ou mais componentes, com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma interface em escala microscópica. As composições devem estar presentes em proporções razoáveis (> 5%). O objetivo principal de se produzir compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único produto com propriedades superiores às dos componentes unitários. O tecido ósseo tem suas propriedades baseadas na combinação bem-sucedida de partículas de hidroxiapatita carbonatada (HCA) com fibras de colágeno e, portanto a substituição de tecidos vivos por materiais sintéticos pode estar ligada ao desenvolvimento de compósitos especiais capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos vivos originais (Oréfice, 2006; Vasconcelos, 1999).

O osso humano é composto de uma fase orgânica (30% em peso), constituída principalmente por colágeno, e uma fase inorgânica (60% em peso) composta pela apatita. O restante é constituído basicamente por água. *In vivo*, os cristais de apatita crescem sobre as fibras colágenas com uma orientação preferencialmente paralela umas sobre as outras e no sentido longitudinal ao osso. Esta configuração peculiar dos cristais de apatita é responsável por proporcionar resistência ao osso enquanto permite alguma flexibilidade aos mesmos (Athanasίου *et al.*, 2000).

Um tipo especial de compósito sintético é o denominado material híbrido, esse termo “*Híbrido Orgânico-Inorgânico*” começou a ser usado muito recentemente, nos últimos 20 anos, com o desenvolvimento de silicatos organicamente modificados, destacando-se a preparação de géis inorgânicos, impregnados por polímeros orgânicos. Híbridos são materiais homogêneos, constituídos por componentes de origem orgânica e inorgânica, cuja, mistura dos seus componentes ocorre em escala nanométrica ou submicrométrica, o que os tornam diferentes dos compósitos convencionais. Deste modo, compósitos e híbridos diferem entre si nas dimensões e na dispersão de seus componentes. É esperado também desses materiais que formem possíveis ligações covalentes entre a fase inorgânica e orgânica, um problema comum, em compósitos convencionais (José, 2005; Al Sagheer & Muslim, 2010). Os derivados da quitosana e a própria quitosana podem apresentar interações específicas com a superfície de gel de sílica, como ligações químicas ou adsorção específica (Muzzarelli & Muzzarelli, 2002).

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos podem ser obtidos por alguns métodos, o mais utilizado é o processo sol-gel. Esse método apresenta-se potencialmente útil porque possibilita a combinação de polímeros com materiais cerâmicos em escalas moleculares e ao mesmo tempo permite a preparação de materiais cerâmicos em temperaturas compatíveis com o processamento de polímeros. Além disso, as reações de polimerização das cadeias inorgânicas no método sol-gel se assemelham às reações usualmente encontradas na síntese e modificação de polímeros (Pereira, 2005).

3.3 Materiais Nanocompósitos e as Nanopartículas

Matrizes para a aplicação na engenharia de tecido ósseo devem oferecer características macro e micro para interações físicas e químicas com os agentes biológicos (células, moléculas, fatores de crescimento). Contínuos esforços têm sido feitos no sentido de melhorar a interface de atuação do biomaterial com o fluido biológico. Podemos citar entre outros, biofilmes densos e porosos, matrizes 3D com nanopartículas, matrizes com nanoporos. É conhecido que as nanosuperfícies e as nanopartículas influenciam o comportamento das células no que diz respeito à

adesão e proliferação celular, portanto é imprescindível que cada vez mais se busque soluções no nível da nanoestrutura, o que permite ao biomaterial se aproximar muito da dinâmica de funcionamento do sistema biológico (Dalby *et al.*, 2006).

O termo nanocompósito foi introduzido para designar materiais compósitos contendo mais de uma fase sólida na qual a fase dispersa apresenta, pelo menos, uma das suas dimensões em escala nanométrica. O objetivo de se criar um nanocompósito em engenharia de tecidos é obter uma interação em nanoescala entre a fase inorgânica bioativa e a fase orgânica, criando um material resistente (Boury, 2002; Jones, 2009).

Para fins de engenharia de tecido ósseo, compósitos produzidos a partir de polímero e vidro bioativo são de grande interesse quando usados em nanoescala para melhorar tanto as propriedades mecânicas quanto as propriedades biológicas das matrizes. Ao se comparar os vidros bioativos em micro escala com as partículas nanométricas, estas apresentam área superficial milhares de vezes maior e podem formar uma interface com melhor desempenho nos compósitos de matriz polimérica. A introdução de partículas nanométricas de vidro bioativo em materiais poliméricos pode aumentar a rigidez do material polimérico sem, no entanto, diminuir muito a sua resistência mecânica. Além disso, os vidros bioativos que possuem área de superfície em nanoescala permitem maior adsorção e maior bioatividade. Existem evidências na literatura de que ocorre uma deposição mais rápida ou mineralização de tecidos, tais como osso ou dentes quando estes tecidos estão em contato com as partículas em nanoescala em oposição as partículas microdimensionadas. Ao considerar que a estrutura do osso exibe características em nanoescala, ou seja, consiste numa mistura de fibrilas de colágeno sob medida e nanocristais de hidroxiapatita, o material de implante sintético imita as nano características que ocorrem na superfície do osso. Na literatura também tem sido demonstrado um aumento de formação óssea, ocorrendo maior adesão e proliferação celular (Oliveira 2011; Boccaccini *et al.* 2010; Sen lin *et al.*, 2009; Guarino *et al.*, 2007; Ostomel *et al.*, 2006; Rezwan *et al.*, 2006; Palin *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2000; Roco, 1999).

Não somente a bioreatividade da superfície das nanopartículas irá ser mais elevada que as partículas de tamanho micro, mas também estas nanopartículas de vidro bioativo irão induzir a formação de superfícies nanoestruturadas sobre a matriz, a qual estará suscetível a melhorar a ligação com as células de osteoblastos e seu subsequente comportamento celular (Alves *et al.*, 2010).

As nanopartículas de vidro bioativo podem ser obtidas pela combinação do processo sol gel e o método de co-precipitação, onde inicialmente ocorre a hidrólise dos precursores sob condições ácidas e posteriormente estes são condensados e monodispersos em solução alcalina. O resultado é uma dispersão contendo nanopartículas. A morfologia e o tamanho das nanopartículas de vidro bioativo são conseguidos variando as condições de síntese e a razão entre os reagentes (Oliveira, 2011; Boccaccini *et al.*, 2010; Hong *et al.* 2009). Cinco parâmetros desempenham um papel importante no tamanho e na distribuição de tamanho de nanopartículas de sílica: (i) relação TEOS/H₂O, (ii) a concentração de catalisador, (iii) temperatura de reação, iv) álcool utilizado, e v) método de agitação (Rahmana *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2005).

3.4 O Processo Sol-Gel

A partir da década de 80, houve um interesse crescente sobre o processo sol-gel. Uma vantagem importante desse processo é a habilidade para se controlar as propriedades químicas da superfície do material (Greenspan, 1998).

Originalmente o processo sol-gel foi destinado à produção de vidros homogêneos e cerâmicas de alta pureza em temperaturas bastante inferiores às utilizadas nos processos convencionais, aspecto o qual, viabilizou a incorporação de uma fase orgânica no material cerâmico com baixo risco de degradação térmica e com extrema integração entre os constituintes, o que poderia significar a existência de ligações químicas primárias ou secundárias específicas entre os mesmos (Costa, 2001). Além disso, um aspecto relevante nessa técnica que a difere das demais utilizadas nos sistemas de vidros e cerâmicas é que esta permite a construção de estruturas porosas.

Essa técnica tem sido empregada nos últimos anos com sucesso na produção de materiais como os vidros bioativos, por elevar a reatividade desses, pois fornece materiais com elevada área superficial. Os vidros produzidos por esse processo podem apresentar uma bioatividade de 100% de SiO_2 . Devido a sua ampla área superficial e grande concentração de grupos silanol (SiOH) sobre a superfície do material microporoso. Há um aumento da nucleação e cristalização de hidroxiapatita carbonatada (HCA) sobre o material, requisito necessário a bioatividade (Pereira *et al.*, 2006).

De maneira geral, o processo sol-gel refere-se a qualquer rota de síntese de materiais onde, num determinado momento, ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O sol é constituído de uma suspensão de partículas coloidais (diâmetros menores que 100nm) em um líquido, sendo o gel formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios (Fig. 3.3). A diferença entre um sol e uma solução reside no fato de que a solução é um sistema de uma única fase, enquanto que um sol é uma suspensão de uma fase sólida em uma fase líquida. Portanto, um gel úmido é uma substância que contém um esqueleto sólido contínuo cercado de uma fase líquida (Oliveira, 2007; Mamede & Prado, 2005).

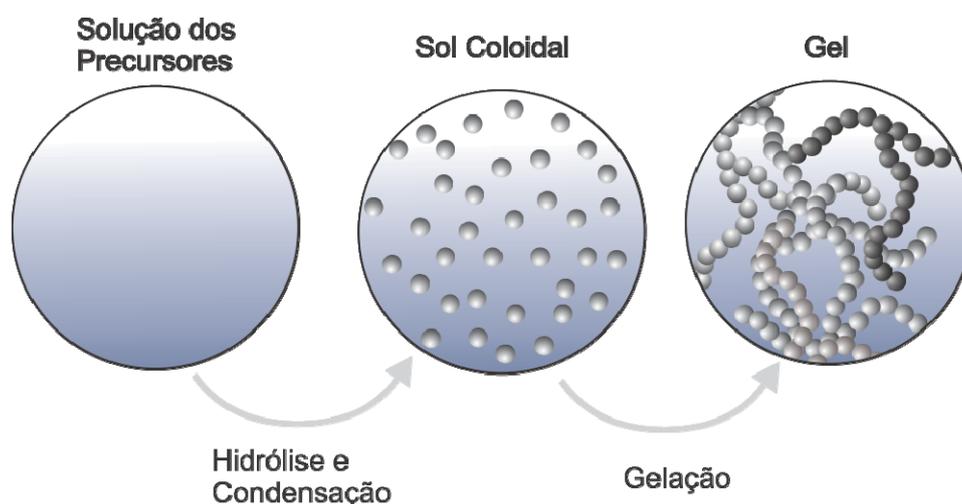


Figura 3.3: Esquema mostrando o princípio do processo sol-gel (adaptado de Gupta & Kumar, 2008; Costa, 2010).

De outro modo, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde ocorrem reações de polimerização, e a gelação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Fig. 3.4).

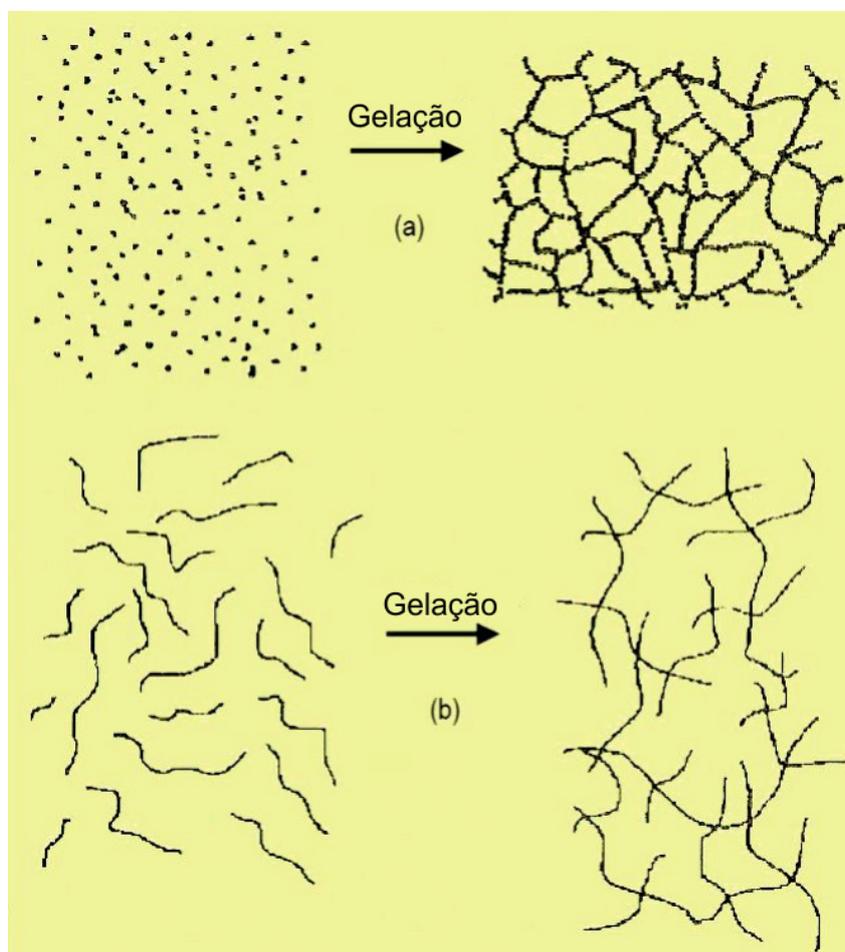


Figura 3.4: A transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico (Adaptado de Alfaya & Kubota, 2002).

Dentre os compostos alcóxidos utilizados para a preparação de materiais via sol-gel, destacam-se os dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio, largamente utilizados. Os alcóxidos de silício são os utilizados na síntese da sílica (SiO_2). O processo sol-gel via alcóxido é um método de síntese relativamente simples usado para o preparo de vidros e cerâmicas de alta pureza, a temperaturas bastante reduzidas e com grande flexibilidade na preparação de sistemas com composição e formas variadas. A evolução da síntese através do processo sol-gel requer uma combinação de precursores de alcóxidos metálicos $[\text{M}(\text{OR})_n]$ e água, onde M é o

elemento inorgânico formador de rede e R é tipicamente um grupo alquila (Airoidi e Farias, 2004; Costa, 2010).

O processo sol-gel pode ser dividido em sete etapas, conforme descrito abaixo, porém neste trabalho foram utilizadas apenas as etapas A, B e C. A utilização da síntese na forma de solução requer apenas as três etapas para a construção de filmes e matrizes:

- A. Dissolução e mistura dos precursores
- B. Moldagem (vazão em molde)
- C. Transição sol-gel ou gelação
- D. Envelhecimento
- E. Secagem
- F. Estabilização
- G. Transição de gel para vidro ou sinterização

O processo sol-gel de forma geral se inicia com a mistura de água, catalisador e o alcóxido metálico. Com o contato das moléculas de água com as de alcóxidos, iniciam-se as reações de hidrólise e condensação. De acordo com o produto final desejado, algumas condições devem ser obedecidas para garantir um sucesso na obtenção dos diferentes materiais tais como monolitos, fibras e filmes finos. A concentração da água na solução de alcóxidos, o tipo e a concentração de catalisador e a temperatura do processo são variáveis que devem ser controladas (Oliveira, 2007).

O sol obtido é transferido para um molde de geometria desejada. A forma final do gel é uma reprodução do molde utilizado, embora as dimensões do produto final fiquem alteradas devido às contrações que ocorrem durante o processo. O material do molde deve ser escolhido de forma que evite a adesão do gel. A gelação envolve o crescimento e agrupamento de unidades poliméricas para formar uma rede contínua que se estende através do líquido. Quando os polímeros em solução crescem através das reações de condensação, eles se unem para formar macromoléculas que se estenderão por toda a solução. Esse ponto representa a transição de sol para gel, e é reconhecido pelo grande aumento na viscosidade da

solução. O ponto de gel representa o momento quando o último elo é formado na cadeia de ligações que constitui a extensão de aglomerados. O sol torna-se um gel quando ele pode suportar uma tensão elástica.

O processo de mudança na estrutura e propriedade do gel que ocorre após a gelificação é conhecido como envelhecimento. As reações químicas que causam a gelificação continuam a ocorrer mesmo após o ponto gel ser estabelecido, produzindo resistência, dureza e contração na rede. Durante o envelhecimento ocorrem mudanças em muitas propriedades estruturais do gel, tais como tamanho médio de poros, porosidade e área superficial (Coelho, 2003).

3.5 O Processo de Liofilização

Na literatura existem algumas técnicas que possibilitam a obtenção de matrizes porosas como: liofilização ou TIPS (separação de fases induzida termicamente), moldagem por compressão / liberação de partículas, evaporação de solvente/ liberação de partículas, síntese de microesferas, prototipagem rápida (Monteiro, 2008).

Matrizes poliméricas 3D com alta porosidade (~97%) podem ser produzidas com sucesso utilizando a técnica de liofilização. Estas podem ser altamente porosas com morfologias tubulares anisotrópicas e extensas interconectividades dos poros. Com esta técnica é possível controlar as macro e microestruturas das matrizes. A microporosidade das matrizes, a morfologia dos poros, as propriedades mecânicas, a bioatividade e a taxa de degradação podem ser controladas variando a concentração do polímero na solução, bem como a temperatura de congelamento do sistema polímero/solvente (Ma & Zhang, 2001).

Em 1954 K.H. Neumann foi o primeiro a escrever sobre Liofilização em seu livro, cujo título pode ser traduzido para “Projeto de Liofilização”, descrevendo o que Altmann realizou - a liofilização de partes de órgãos em 1890. Mais tarde, Sawyer, Lloyd e Kitchen tiveram sucesso na liofilização do vírus da febre amarela em 1929, a partir daí a liofilização industrial se desenvolveu em grande escala. Já em 1949, E.W.

Flosdorf mostrou em seu livro de liofilização, a produção e preservação do plasma sanguíneo e da penicilina (Oetjen e Haseley, 2004).

A desidratação de alimentos é um dos métodos mais antigos de preservação da humanidade. A liofilização é um processo de desidratação sem aquecimento, também conhecida como “secagem por congelamento”. É um processo industrial que consiste em remover o solvente e ou o meio de suspensão do material, sendo este cristalizado a baixas temperaturas e posteriormente sublimado (Fig. 3.5), passando diretamente do estado sólido para o estado vapor sob vácuo constante. Deste modo é possível gerar poros no material em consequência dos espaços vazios resultantes no material após o processo da sublimação dos cristais. A liofilização é um processo amplamente usado para secar, de modo a melhorar ou manter a estabilidade de vários produtos farmacêuticos, incluindo: vírus, vacinas, proteínas, peptídeos, ou transportadores coloidais: lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões. A liofilização não afeta diretamente a matriz sólida que envolve os cristais de gelo, preservando as características originais do material (Abdelwahed *et al.*, 2006).

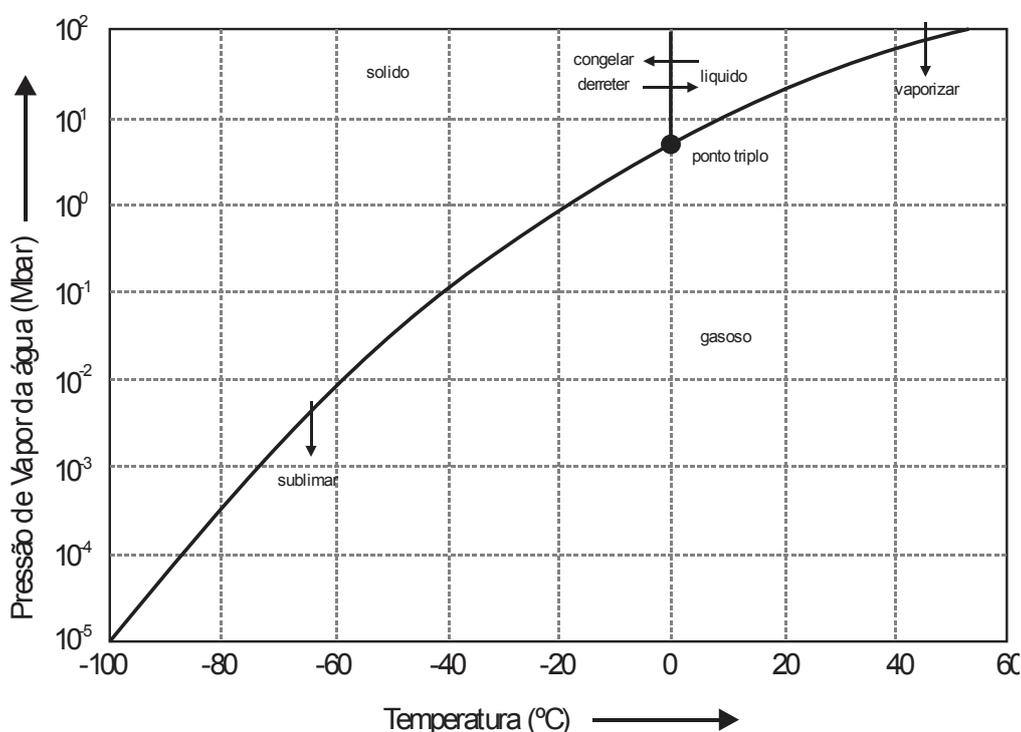


Figura 3.5: Diagrama de fase da água (adaptado de Oetjen e Haseley, 2004).

A aplicação do vácuo elevado na liofilização faz com que os cristais sublimem mais rapidamente. O objetivo principal desse processo é produzir uma substância com boas propriedades estruturais e estabilidade (Oetjen e Haseley, 2004).

A importância do uso desse método em matrizes porosas nanocompósitas seria uma opção de método de secagem no qual tem possibilidade de manter as características estruturais mais intactas, ou seja, não afetaria muito as propriedades mecânicas e também manteria os poros formados pelos cristais após a sublimação da solução.

O processo de liofilização é relativamente demorado e seu ciclo pode ser dividido em três passos conforme Abdelwahed *et al.* (2006):

- Congelamento (solidificação) ($<0\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Secagem Primária (sublimação do cristal-gelo), eliminação de 90% da água, produto apresentará cerca de 15% de umidade.
- Secagem Secundária (desorção da água descongelada), eliminação de 10% da água, produto desidratado, apresentando somente 2% de umidade.

3.5.1 Congelamento

O congelamento é o primeiro passo da liofilização. O congelamento de um material é um passo muito importante, pois a estrutura do produto congelado decidirá se o produto poderá ser todo liofilizado, e em que condições isso poderá ser feito. Portanto, as conseqüências da taxa de congelamento, a espessura da camada do produto (matriz) e excipientes utilizados são variáveis importantes nesse processo (Oetjen e Haseley, 2004).

É importante controlar a taxa de congelamento do material; assim, caso ela ocorra com a velocidade alta, é possível obter cristais bem pequenos, mas se a taxa de congelamento for lenta ocorrerá à formação de cristais maiores. Durante esta fase, o líquido em suspensão é congelado, e são formados cristais de água pura. Como o processo de congelamento é contínuo, mais e mais água contida no líquido congela. Isso resulta em aumento da concentração do líquido remanescente. Esse líquido altamente concentrado e viscoso solidifica, resultando em uma fase amorfa, ou as duas fases, amorfa e cristalina combinadas (Franks, 1990).

No processo de liofilização, o segundo ponto principal é a medição e o controle das duas fases de secagem.

3.5.2 Secagem Primária

O primeiro estágio da secagem envolve a sublimação dos cristais de gelo a partir do produto congelado. Nesta fase, a pressão é reduzida e o solvente é sublimado. Aproximadamente 95% da água do material é sublimada nesta fase. Assim, o material congelado sofre remoção da água dentro dos interstícios da estrutura congelada sem danificá-la. O solvente passa de uma fase sólida para uma fase gasosa sem a formação da fase intermediária líquida. Nesta fase, a pressão é reduzida através da aplicação de um vácuo parcial que acelera o processo de sublimação. Em alguns sistemas ou equipamentos o processo ocorre da seguinte forma: o coletor é ativado, resfriando a bobina para temperaturas inferiores à temperatura da amostra e a água (ou solvente) é solidificada na bobina. O coletor impede o vapor de água de alcançar a bomba de vácuo, promovendo o seu bom funcionamento. A temperatura do coletor pode estar entre -45°C e -85°C e a pressão entre 150 e 50mmHg. O material, sob vácuo, pode ser congelado a temperaturas entre -10 e -25°C , durante um período de tempo entre 1h e 10h (Williams & Polli, 1984; Mccaryhy *et al.*, 2008).

É importante salientar que este é apenas um exemplo de utilização do liofilizador, existem vários modelos para diferentes tipos de materiais, com diferentes valores de temperatura e pressão.

3.5.3 Secagem Secundária

A secagem secundária envolve a remoção de água absorvida pelo produto. Esta é a água que não formou cristais de gelo durante o congelamento. Esta fase tem como objetivo sublimar as moléculas de água que não foram sublimadas na primeira fase de secagem. A temperatura é mais elevada nesta que na primeira fase de secagem (sublimação), com o objetivo de quebrar as ligações físico-químicas que se formaram entre as moléculas de água e o material congelado. A temperatura pode estar entre 10°C e 20°C , e o tempo de secagem entre 36h e 48h, mantendo o vácuo constante (Pikal *et al.*, 1990; Mccaryhy *et al.*, 2008).

3.5.4 A Taxa de Liofilização

O processo de liofilização depende da área de superfície da amostra, da espessura da amostra, da temperatura do coletor, do vácuo parcial, do ponto triplo e da concentração de soluto. É importante lembrar estes fatores quando se tenta obter uma utilização eficiente do liofilizador.

A área de superfície e a espessura da amostra podem ser ignoradas, quando a amostra tem dimensões reduzidas (milímetros). Para grandes volumes, esses fatores não podem ser ignorados, uma vez que, quanto maior a área de superfície da amostra, mais rápida é a taxa de liofilização. Mas, para uma determinada área de superfície, quanto maior a espessura da amostra mais lenta é a taxa de liofilização. Para que ocorra liofilização, o gelo tem de ser removido da amostra via sublimação, sendo esta tarefa realizada pelo coletor (transforma o gelo em vapor) e pela bomba de vácuo. Assim, a pressão de água no coletor é mais baixa que a da amostra e o fluxo de vapor de água desloca da amostra para o coletor. O processo de sublimação ocorre muito lentamente nas condições atmosféricas normais, sendo um bom vácuo essencial para obter uma taxa liofilização eficiente. A taxa de liofilização é diretamente proporcional à pressão de vapor, que por sua vez é dependente da temperatura do ponto triplo e da concentração de solvente na amostra. Por exemplo, a solução do cloreto de sódio e água liofiliza a uma taxa mais lenta que a água pura. Isto porque, quanto maior a concentração de soluto, menor é a área de superfície da amostra congelada que é ocupado pela água. O volume de amostra que pode ser liofilizado está relacionado com outros fatores e também com o tamanho e o projeto do sistema de liofilização (Labconco, 2007).

Um típico equipamento de liofilização consiste de uma câmara de secagem com prateleiras de temperatura controlada, que é ligado a uma câmara de refrigeração através de válvulas de grandes dimensões. A câmara é capaz de manter uma temperatura muito baixa ($< -50^{\circ}\text{C}$). Uma ou mais bombas de vácuo são conectados em série na câmara do condensador para atingir pressões na faixa de 4 a 40Pa ($133,322\text{Pa} = 1\text{mmHg}$) em todo o sistema durante a operação (Pikal *et al.*, 2002).

3.6 Aspectos da Porosidade x Liofilização

A porosidade nas amostras não ocorre de forma homogênea, pois sua estrutura, tanto interna, quanto externa depende diretamente do processo ao qual estas são submetidas. No processo de liofilização a microestrutura das amostras pode claramente ser dividida em três zonas distintas (Fig. 3.6), cada uma delas caracterizada por um tipo de morfologia e com dimensões de poros distintos. Na primeira zona (zona 1), a mais próxima da área de contato com o frio, nenhuma porosidade é observada e o material é denso. Na segunda zona, o material é caracterizado por uma morfologia celular. Finalmente, na zona superior (zona 3), a material é lamelar, com longos poros paralelos alinhadas na direção de crescimento do cristal de gelo (Shirosaki *et al.*, 2008; S. Deville *et al.* 2006).

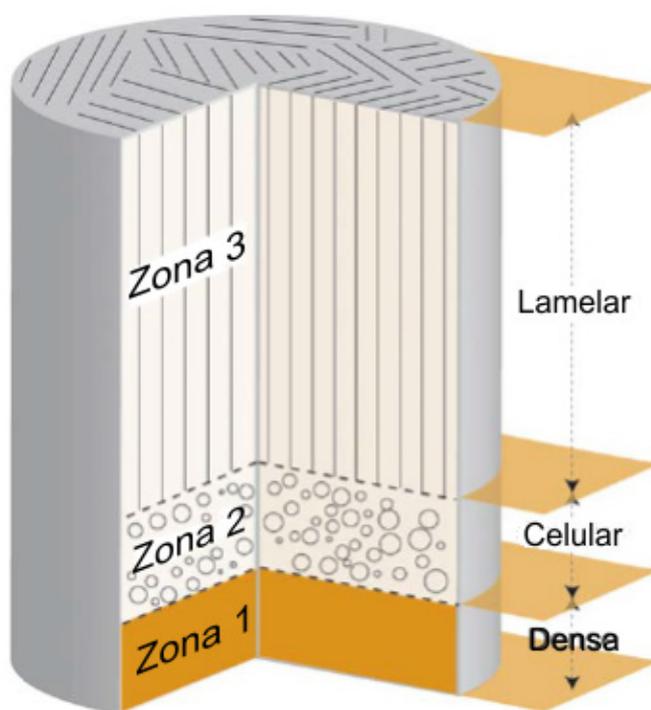


Figura 3.6: Esquema do comportamento da porosidade em distintas regiões da matriz quando submetida ao processo de liofilização (Adaptado de Deville *et al.* 2006).

É importante salientar que nem todas as matrizes obtidas no processo de liofilização terão esta estrutura exata como ilustrado na Figura 3.6. Portanto, a predominância das zonas, assim como, a morfologia dos poros dependerá do material das amostras, da temperatura, da taxa de resfriamento e também do material que acondiciona as

amostras (da espessura da parede dos frascos). A Figura 3.6 é somente uma ilustração esquemática da morfologia de poros predominantes em matrizes compostas por material polimérico e por material inorgânico obtidos pela técnica de liofilização.

3.7 Microtomografia Computadorizada (μ CT)

Uma das características fundamentais para a regeneração do tecido humano é gerar condições fisiológicas, mecânicas e geométricas para um bom desempenho de crescimento celular. Assim, todas as características para o sucesso de um implante para regeneração tecidual devem seguir critérios rigorosos para atender uma demanda específica do tecido lesionado. Portanto o projeto de uma matriz de regeneração tecidual óssea deve analisar o ambiente em questão de forma integral, analisando o material tanto em escala macro quanto em uma escala micro. Para se trabalhar nessas escalas temos a necessidade de técnicas que auxiliam a visualização e o entendimento desses ambientes tão restritos e complexos. A microtomografia computadorizada seria uma dessas técnicas capaz de fornecer informações precisas qualitativamente e quantitativamente sobre a morfologia tridimensional de matrizes sem destruir as amostras.

Os avanços na tecnologia da tomografia computadorizada foram possíveis com os avanços do desenvolvimento da moderna tecnologia computacional por volta de 1960 e, portanto, somente por volta de 1972 a tomografia computadorizada de raio-X foi introduzida na prática clínica (Kalender, 2006; Lima *et al*, 2007).

O principal objetivo da microtomografia computadorizada é manter o material intacto, por isso uma técnica não destrutiva é necessária, pois para uma avaliação de matrizes teciduais *in vivo* e *in vitro* é imprescindível conhecer exatamente a estrutura de poros das mesmas antes e após a sua implantação. A tomografia computadorizada é uma técnica que atua de forma não invasiva e não destrutiva e que possibilita obter informações sobre a estrutura interna de um elemento investigado (determinação de defeitos, posições, informações sobre a anisotropia, morfologia e tamanhos de poros, interconectividade dos poros). Permite também diagnosticar a forma tridimensional (3D) de um detalhe do objeto inspecionado, por

exemplo, em materiais porosos cada poro do material pode ser separado de seus vizinhos e calculado separadamente. O interior da amostra pode ser estudado em detalhes sem necessidade de seccionamento da mesma, permanecendo intactas. Dentro da imagem digitalizada, o volume da matriz e a área superficial por volume podem ser estudadas. A imagem 3D permite a visualização de qualquer região da matriz (Jones *et al.*, 2007; Ho & Hutmacher, 2006).

Outro benefício desta técnica é que ela permite avaliar o crescimento tecidual para dentro dos poros, mede ainda as mudanças de conformação da matriz à medida que o tecido é formado e a matriz é reabsorvida, ou seja, é capaz de permitir a avaliação da cinética de degradação da matriz. Os métodos tradicionais para avaliação da osseointegração de matrizes conjugadas com células são baseados em técnicas radiográficas e histológicas bidimensionais. A microtomografia computadorizada fornece informações tridimensionais das mesmas. É uma técnica que tem sido muito utilizada para o estudo do osso esponjoso e da interface tecido hospedeiro e matriz ou implante (Renghini *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Lenthe *et al.*, 2007; Reis, 2007; Gupta *et al.*, 2005; Atwood *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004).

A investigação do objeto é feita obtendo as projeções da amostra a partir de várias direções. Isto pode ocorrer girando a amostra segundo a direção da radiação e com isso é medida, em cada passo, a atenuação da radiação (Fig. 3.7). Cada projeção é adquirida com o objeto rotacionado de certo ângulo em relação à posição original, de modo que, se obtém uma projeção para cada ângulo. Em suma, o processo tomográfico consiste em rotacionar o corpo de prova em passos de ângulos iguais até completar uma volta de 360°. A cada passo, são adquiridos vários quadros gerando-se, no final, uma imagem (Lima *et al.*, 2005).

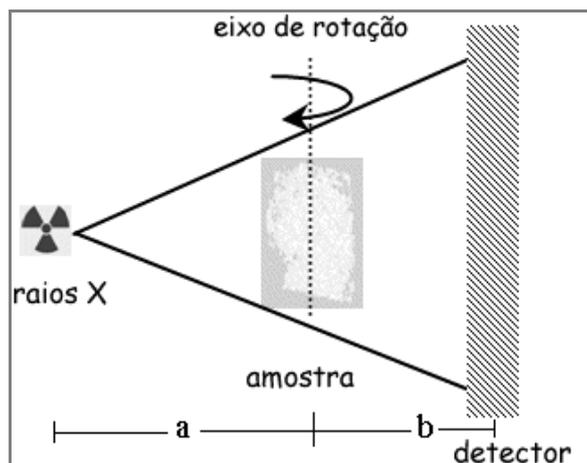


Figura 3.7: Esquema da técnica de TC e μ CT (Adaptado de Lima *et al*, 2005).

Após a captura das imagens as mesmas são reconstruídas para que possa ser possível sua visualização tridimensional. A microtomografia computadorizada tridimensional por transmissão de raios X possui os mesmos embasamentos da tomografia computadorizada, ela é um avanço das técnicas de inspeção por raios X por ser um procedimento não invasivo, com um alto poder de resolução (da ordem de microns). O diferencial dessa técnica está relacionado ao tamanho do foco tubo de raios X. Este parâmetro pode variar desde 1 à 4 mm (foco normal) até 1 μ m à 100 μ m (microfoco), passando pelas dimensões de 1 à 0,1 mm (minifoco). O pequeno diâmetro do foco do tubo de raios X é um atributo muito importante do ensaio de μ CT. Isso ocorre porque quanto menor for esse parâmetro melhor se dará a focalização das estruturas inspecionadas, o que está intimamente relacionado com a qualidade da imagem adquirida no ensaio microtomográfico (Lima *et al*, 2007).

3.8 Os Vidros Bioativos

Os vidros bioativos são materiais baseados na sílica amorfa e considerados não só como biocompatíveis, mas também como bioativos e osteocondutores. Certas composições de vidros e vitrocerâmicas podem formar uma ligação mecanicamente forte com o osso. Os componentes básicos dos vidros bioativos são SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 . Eles surgem como um material que tem sido amplamente estudado para a aplicação em engenharia de tecido, porque possui a capacidade de promover a formação de uma interface ou camada de ligação entre sua superfície e os tecidos vivos vizinhos ao material. A formação dessa camada pode ser comprovada *in vitro*,

quando se verifica a formação, sobre a superfície do material, de uma camada rica em hidroxiapatita carbonatada (HCA) semi-cristalina, indicando bioatividade (Fig. 3.8). Essa fase HCA formada é equivalente quimicamente e estruturalmente à fase mineral do osso (Lee *et al.*, 2006; Hench, 1993).

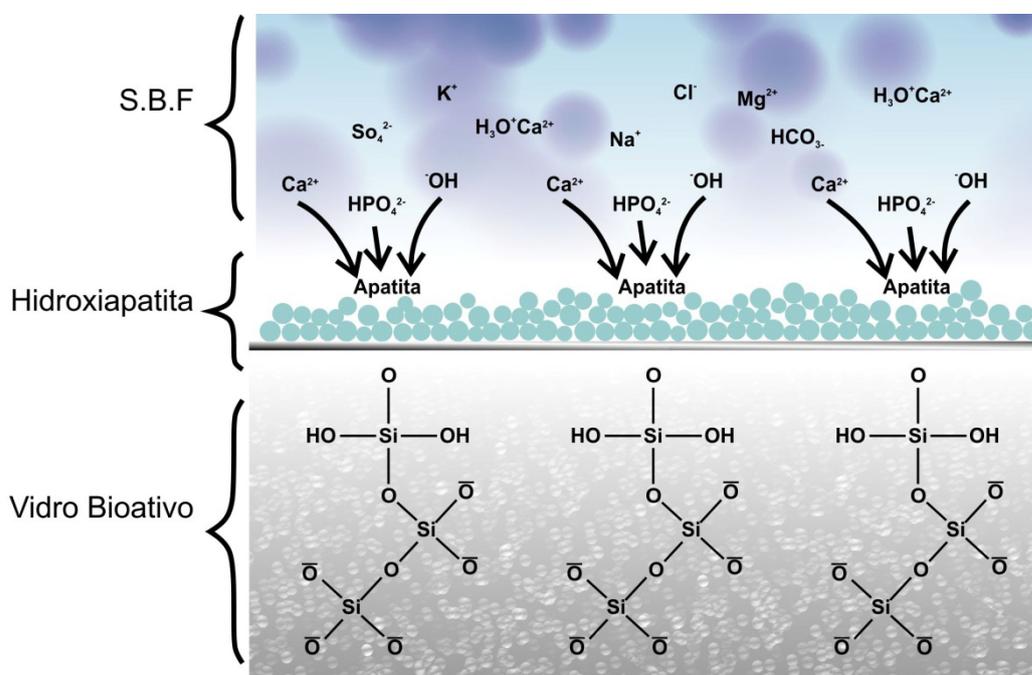


Figura 3.8: Esquema da formação da hidroxiapatita na superfície do vidro bioativo.

Essa nova camada possibilita gerar o crescimento de tecido vivo sobre os *scaffolds*, a partir da superfície dos poros. Os osteoblastos podem proliferar sobre a camada de apatita formada diferenciando-se e formando matriz extracelular composta de apatita biológica e colágeno. Como consequência, o tecido ósseo hospedeiro entra em contato com esta camada superficial de apatita e uma ligação química pode ser formada entre o biomaterial e o osso natural (Kokubo *et al.*, 2003; Kim, 2003).

Deve ser salientado que a formação da camada de HCA ocorre não somente sobre a superfície do vidro bioativo, mas também no interior dos seus poros, levando à diminuição do número e tamanho dos mesmos, embora esta formação não ocorra de maneira uniforme, pois a superfície externa mais exposta à solução reage mais rapidamente que as paredes dos poros (Notingher *et al.*, 2003; Rámila & Vallet-regí, 2001).

Apesar da sua capacidade bioativa a utilização de vidros bioativos como material único em matrizes possui uma desvantagem; eles apresentarem baixa tenacidade à fratura e resistência mecânica, especialmente na forma porosa. Assim, os vidros bioativos utilizados como material isolado tem aplicação limitada em situações de carga. Alguns autores apresentam a resistência à compressão, o módulo de elasticidade e alguns valores de tenacidade à fratura de matrizes densas e porosas de cerâmica bioativa nas referências (Jones *et al.*, 2006; Seal *et al.*, 2001; Keaveny *et al.*, 1993), e percebem que as matrizes particularmente porosas apresentam propriedades mecânicas muito baixas comparadas ao osso cortical e esponjoso.

Atualmente alguns compósitos de polímeros e vidros bioativos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a estabilidade mecânica da matriz e melhorar a sua interação de bioatividade com o tecido.

3.9 A Quitosana

3.9.1 Filmes e Matrizes com Quitosana

Nos últimos setenta anos a quitosana têm sido investigada no campo científico e cada vez mais sendo estudada para aplicação como biomateriais, entretanto somente a partir da década de 90 começou-se a investir em pesquisas que envolvem a quitosana, um versátil material, em sistemas de engenharia de tecido e principalmente como matriz porosa 3D. Podemos ressaltar aqui alguns resultados que envolvem o uso da quitosana como o de Madihally & Matthew (1999) que foi um dos pioneiros a explorar a utilização da quitosana pura como matriz 3D para a área de engenharia de tecido. Ele utiliza o método de liofilização para obter biomateriais como matrizes porosas e micro-esferas.

Yang e vários colaboradores (2010) prepararam e caracterizaram uma nova matriz de quitosana com fosfato de sódio, resultando em um material na forma de um hidrogel, o qual obteve bons resultados através da utilização do método de liofilização, fornecendo poros em sua estrutura.

Peter *et al.* (2010) descreve em seu trabalho o desenvolvimento de uma matriz nanocompósita de quitosana e vitrocerâmica bioativa, usando o método de liofilização para obter matrizes porosas.

Li *et al.* (2005) estudaram uma matriz híbrida porosa biodegradável composta de quitosana e alginato para ser utilizada na engenharia de tecido servindo como um enxerto temporário para acomodar e estimular o crescimento de tecido. As amostras foram obtidas pelo processo de liofilização.

Costa Jr *et al.*, (2007b) desenvolveram filmes de quitosana/PVA, quimicamente reticulados para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.

As matrizes de quitosana (Fig. 3.9) normalmente são preparadas pela tecnologia de liofilização, porque esse processo é benéfico para produtos que são dissolvidos em meio aquoso (Lee *et al.*, 2005; O'brien *et al.*, 2004). Além disso, as propriedades das matrizes de quitosana como a micro-estrutura, a cristalinidade e a resistência mecânica podem ser moduladas pela variação da concentração de quitosana, a taxa de congelamento, bem como o peso molecular e o percentual de desacetilação da quitosana (Nettles *et al.*, 2002).

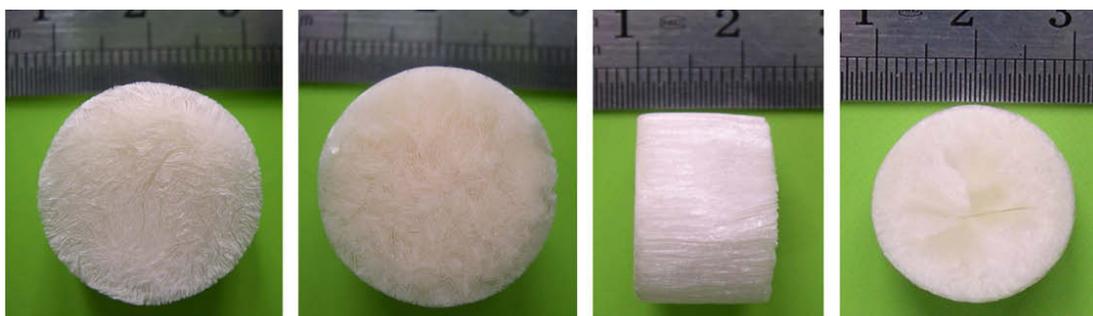


Figura 3.9: Fotografia digital de matriz porosa de quitosana após o processo de liofilização (Yang *et al.*, 2010).

3.9.2 Origem e Formação da Quitosana

O uso de polímeros naturais, como algodão, a seda e a celulose em aplicações biomédicas data do início da civilização humana e os polímeros sintéticos começaram a ser usados como biomateriais em 1940-1942 com o uso do Nylon em suturas. Na atualidade o uso de biomateriais é muito amplo, com inúmeros tipos de

materiais: polímeros (Nylon, polietileno, silicone, Teflon®, Dacron®), os metais (titânio, aço inoxidável, ouro), a cerâmica (HA, carbono) e os materiais denominados de compósitos. Podem ser usados em locais lesionados ou doentes (articulações artificiais, vasos artificiais); na cicatrização (suturas, adesivos tissulares); para melhorar a função (marcapassos, lentes oculares, oxigenadores); entre várias outras funções (Oréfice *et al.*, 2006).

Especialmente na última década as pesquisas em engenharia de tecido se desenvolveram bastante e o uso de polímeros tem sido amplamente empregado como matriz de enxerto em grandes lesões. Vários polímeros tanto sintéticos e naturais tem sido estudados para a utilização como matriz de crescimento de tecidos, tais como o PLGA poli(ácido lático co-ácido glicólico), PVA poli(álcool vinílico), PGA poli(ácido glicólico), PLLA poli(ácido lático), poli(caprolactona), alginato, colágeno, gelatina, quitina e a quitosana.

A quitosana tem emergido como um dos mais promissores materiais biodegradáveis devido as suas propriedades físicas e químicas altamente controláveis. Considerada como um material com grande potencial para aplicações biomédicas por causa da sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-antigenicidade, mucoadesividade, e devido a sua propriedade de adsorção de proteínas. Ela pode ser degradada através de enzimas (lisozima) do organismo e o produto dessa degradação não é tóxico (Yang *et al.*, 2010; Peter *et al.*, 2010; Costa Jr., 2008; Gupta *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2004; Peppas *et al.*, 1997; Hirano *et al.*, 1990; Muzzarelli *et al.*, 1988).

A quitina, de origem natural e a quitosana são poliaminossacarídeos, sendo a quitina, um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo. Ela é um dos principais constituintes das conchas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e da parede celular de fungos onde fornece resistência e estabilidade, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (Costa Jr., 2008; Krajewska, 2004).

Os polissacarídeos consistem em polímeros de elevado peso molecular com dezenas ou mesmo centenas de resíduos de monossacarídeos por cadeia. Os polissacarídeos

têm se mostrado como um material de grandes potencialidades na aplicação biomédica, entre eles, a celulose, a quitosana e o dextrano, são os mais potencialmente pesquisados atualmente. O potencial de utilização destes compostos se deve ao fato destes possuírem em sua estrutura alguns grupos funcionais como os grupos hidroxílicos primários e secundários, grupos amínicos e grupos carboxílicos. Estes grupos podem gerar a derivatização química das moléculas ou a ligação a estas de ligantes específicos, assim a molécula natural pode ser modificada, as suas características químicas e físicas alteradas e a sua aplicabilidade específica melhorada (Costa Jr. 2008; Gil e Ferreira, 2006). A quitina é um biopolímero de cadeia linear formada por unidades de β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose formando um polissacarídeo semicristalino representado pela fórmula geral $(C_8H_{13}O_5N)_n$. A estrutura química da quitina é bastante parecida com aquela da celulose, exceto pela substituição do grupo hidroxila (OH) na posição C-2 por um grupo acetamida (NHCOCH₃). A quitosana é obtida pela desacetilação alcalina da quitina neste mesmo carbono, apresentando um grupo amina (NH₂) nesta posição (Reis, 2007), conforme a Figura 3.10.

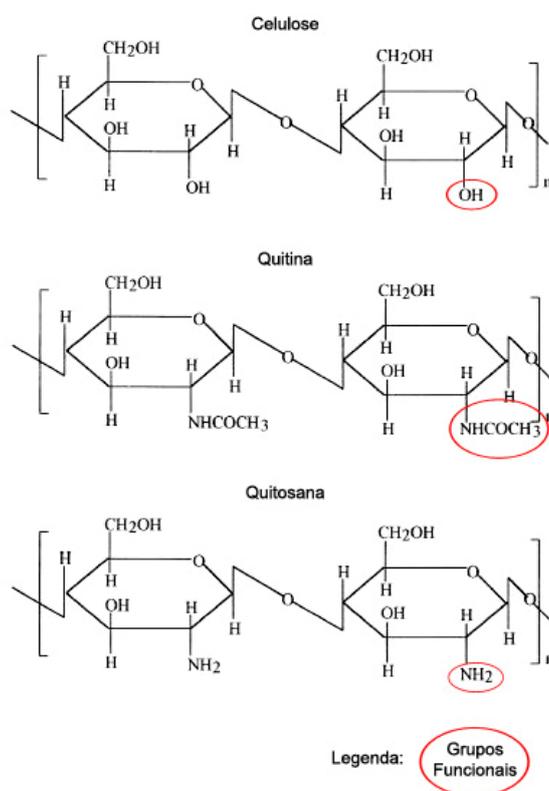


Figura 3.10: Representação das estruturas químicas da celulose, quitina e quitosana (Adaptado de Reis, 2007).

A quitina é separada de outros componentes da carapaça dos crustáceos e fungos (cascas e ou esqueletos de conchas de molusco: caranguejos, camarões, lagostas) por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteíntização (Fig. 3.11) dessas carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCOCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH 1% sob agitação por 24h a 65°C , produzindo a quitosana (Azevedo *et al.* 2007; Santos, 2004).

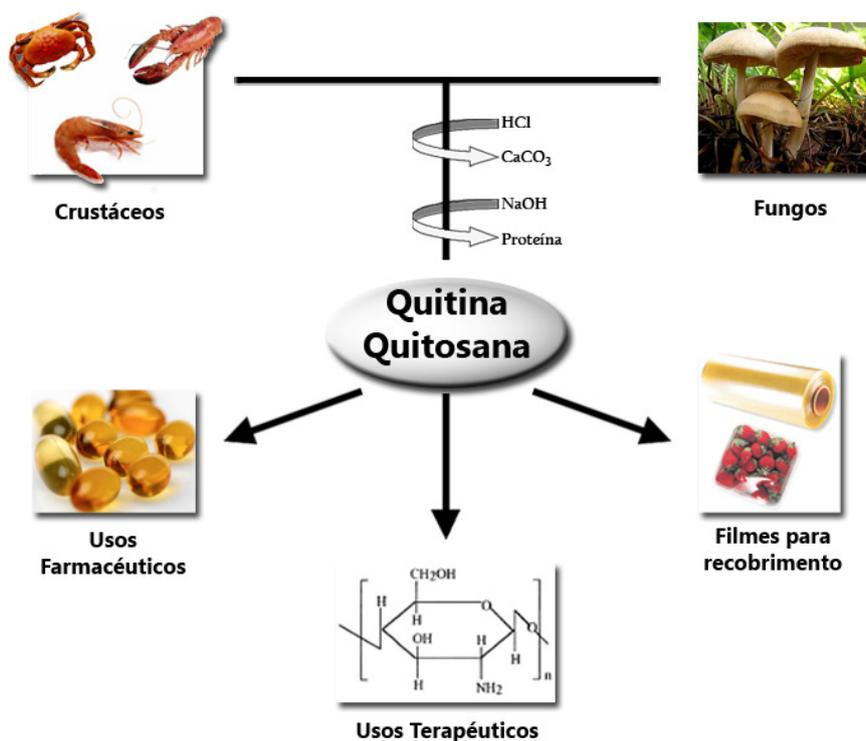


Figura 3.11: Processo de obtenção da quitosana.

Podemos definir que a quitosana é obtida por N-desacetilação em uma extensão variável que é caracterizada pelo grau médio de desacetilação (GD), que representa a porcentagem de grupos NH_2 livres. Quando o grau de desacetilação da quitina alcança em torno de 50% (dependendo da origem do polímero) ele se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado quitosana. (Rinaudo, 2006; Santos, 2004).

3.9.3 Estrutura e Propriedades

A presença de grande número de grupos hidroxilas confere ao polímero uma propriedade importante, a hidrofiliabilidade. Alguns dos grupos reativos da quitosana são as hidroxilas presentes nos carbonos 3 e 6 da estrutura do monômero e ainda conforme a literatura, ela oferece algumas possibilidades de modificações químicas gerando inúmeros derivados. Este polímero oferece potencial para variadas opções de modificações e melhoria de propriedades para as mais diversas aplicações. Isso devido à grande quantidade de grupos amino reativos em sua cadeia. A reatividade dos grupos pendentes ligados a carbonos do anel obedece à ordem decrescente $C2 > C6 > C3$, referentes, respectivamente, ao grupo amino da quitosana, ao grupo hidroxila primário, de caráter mais instável e ao grupo hidroxila secundário (Azevedo *et al.*, 2007; Lima, 2005; Kumar & Hudson, 2004; Lavertu *et al.*, 2003).

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes, mas também às propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas. Este comportamento pode ser de grande utilidade quando da fabricação de híbridos de quitosana através do processo sol-gel, que utiliza meio ácido para a sua realização. A mistura de soluções aquosas de ácido acético com a quitosana faz com que os íons hidrogênio liberados acidifiquem o meio e protonem facilmente os grupos amins (NH_3^+) das quitosanas, tornando-as solúveis e catiônicas. Assim devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana, por exemplo, pode atrair e se ligar a moléculas de natureza negativa (Azevedo *et al.*, 2007; Aimoli & Beppu, 2004; Rinaudo, Pavlov & Desbrieres, 1999).

Devido à sua superfície ser hidrofílica ela promove a adesão celular, proliferação e diferenciação e evoca um mínimo de reação imunológica sobre algum implante. Algum processo antiinflamatório ou reações alérgicas não tem sido observadas em humanos sujeitos a aplicação, implantação, injeção ou ingestão de quitosana. A habilidade da quitosana para suporte e aderência celular é atribuída às suas propriedades químicas. A cadeia principal do polissacarídeo da quitosana é estruturalmente similar aos da glicosaminoglicanas, o maior componente da matriz extracelular do osso e cartilagem (Khor *et al.* 2003; Hirano, 1996).

Outra vantagem da matriz de quitosana para a engenharia de tecido inclui a possibilidade de formação de matrizes altamente porosas com poros interconectados, osteocondutividade e habilidade para melhorar a formação óssea tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Thein-Han *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2005).

A quitosana no estado sólido é um polímero semicristalino. Sua morfologia já foi investigada e seu polimorfismo é mencionado na literatura. Cristais simples de quitosana são obtidos de quitina totalmente desacetilada de baixo peso molecular. A difração de raios-X indica célula unitária ortorrômbica contendo duas cadeias de quitosana antiparalelas sem molécula de água (Ogawa, 1992, 1991).

As propriedades da solução de quitosana dependem não somente do grau médio de desacetilação, mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além da massa molar. A desacetilação, usualmente feita no estado sólido, fornece uma estrutura irregular devido ao caráter semicristalino do polímero inicial. A solubilidade da quitosana em 1% ou 0,1M de ácido acético demonstrou que a quantidade de ácido necessariamente depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de prótons necessária é no mínimo igual à concentração de unidades -NH₂ envolvidas (Costa Jr, 2008; Rinaudo, 2006).

A quitosana pode ter o seu peso molecular variando de 50 a 2000kD e o grau de desacetilação variando de 30 a 95%, esse fato depende da sua origem e processamento, visto que esse processamento feito na quitina natural não é controlado e que envolve inevitavelmente o seu grau de desacetilação ou percentual de grupos aminas livres. Segundo a literatura a quitosana se apresenta com uma ampla variação de pesos moleculares e graus de desacetilação, características estruturais que são muito importantes para suas propriedades físicas e biológicas (Alsarra *et al.*, 2002; Madihally & Matthew, 1999).

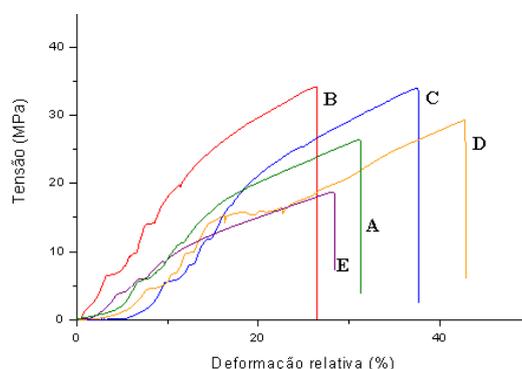
3.10 Propriedades Mecânicas de Filmes e Matrizes

Dados da literatura apontam alguns valores de resistência à tração e percentual de deformação de filmes que contêm a quitosana como componente básico. A tabela 3.1 apresenta variações da ordem de 0,9MPa a 105MPa para tensão máxima a tração e 2% a 100% para a deformação específica (alongamento em percentual).

Tabela 3.1: Propriedades mecânicas de filmes com quitosana citados na literatura.

Descrição dos Filmes	Tensão Máxima de tração (MPa)	Deformação Específica %	Vidro%	Reticulante %	Autor	Ano
Quitosana sem reticulação	0,9 MPa	9%	0%	0%	Lee <i>et al</i>	2009
Quitosana e sílica xerogel (80% SiO ₂)	1 MPa	2,5%	30% de SiO ₂	0%	Lee <i>et al</i>	2009
Quitosana Comercial	3 MPa	2%	0%	0%	Camacho <i>et al</i>	2010
Quitosana e PVA sem reticulação	19 MPa	100%	0%	0%	Costa Jr <i>et al</i>	2008
Quitosana e PVA reticulada	25 MPa	25%	33%	3%	Dias <i>et al</i>	2010
Quitosana ret., PVA e Vidro Bioativo	34 MPa	32%	10%	3%	Dias <i>et al</i>	2010
Quitosana e nanotubos de carbono	105 MPa	40%	0%	0%	T Wu <i>et al</i>	2011

O gráfico (Fig. 3.12) apresenta curvas de tensão versus deformação relativa para filmes de quitosana e PVA reticulados com glutaraldeído, com diferentes concentrações de vidro bioativo (0-30%). O limite de resistência à tração é a tensão no ponto máximo da curva tensão-deformação. Os resultados apresentaram valores de tensão máxima e deformação específica máxima menor para o filme com 30% de vidro comparado aos filmes com 0 a 20% de vidro, o que demonstra uma resistência mecânica mais favorável para os filmes com 0 a 20 % de vidro. O filme com 10% de vidro bioativo teve um significativo desempenho na resistência à tensão e no alongamento percentual (Dias *et al.*, 2010).

**Figura 3.12:** Curvas tensão x deformação relativa para filmes com 0 a 30% de vidro: A- 0%, B- 5%, C- 10%, D- 20%, E- 30% (Dias *et al.*, 2010).

Os valores encontrados na literatura para resistência à compressão de algumas matrizes híbridas se encontram na tabela 3.2. Os valores sofrem muitas diferenças dependendo de qual compósito foi obtido, eles variam de 0,58 MPa a 120 MPa. Essas diferenças devem-se ao material, mas principalmente à rota de processamento a qual foram submetidas as matrizes.

Tabela 3.2: Propriedades mecânicas de matrizes de quitosana e vidro bioativo citados na literatura.

Descrição das matrizes	Tensão máxima de compressão (MPa)	Deformação específica %	Reticulante %	Autor	Ano
Quitosana 20% com 80% vidro bioativo (m/m)	0,58 MPa	10,55%	0%	Reis	2007
Vidro bioativo, HA e PCL	1,45 MPa	x	0%	Esfahani <i>et al</i>	2011
Vidro bioativo 70S30C	2,26 MPa	x	0%	Jones <i>et al</i>	2006
PVA e vidro bioativo e GA	10 MPa	15%	5%	Costa	2010
Quitosana 30% com HA 70% (m/m)	120 MPa	x	0%	Cai <i>et al</i>	2009

Alguns dados da tabela 3.2 são interessantes para a aplicação em estrutura óssea trabecular devido à resistência a compressão desse tecido se encontrar na faixa de 2 a 12 MPa (Jones *et al.* 2006).

3.11 O Reticulante Glutaraldeído (GA)

Os reticulantes são moléculas que apresentam no mínimo dois grupos funcionais reativos, os quais permitem a formação de ponte entre cadeias poliméricas. Eles são moléculas de peso molecular muito menor que o peso molecular da cadeia principal (Berger, *et al.*, 2004b).

Entre vários agentes de reticulação podemos citar o glutaraldeído. Ele é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos como a quitosana que possuem grupos amina na sua estrutura (Fig. 3.13).

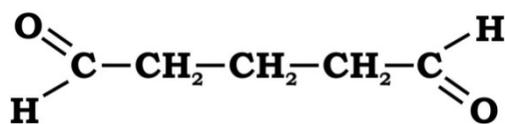


Figura 3.13: Estrutura molecular do glutaraldeído.

O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos NH_2 está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído (carbonila ligada ao hidrogênio) e os grupos amina livres dos compostos (Wang, 2004; Monteiro Jr., 1999).

Segundo Monteiro Jr. (1999) sobre a estrutura da interação do glutaraldeído com grupo amina pode-se ter três possibilidades básicas em suas estruturas:

- Há a formação de apenas uma base de Schiff com um dos grupos aldeídos do glutaraldeído, o outro grupo permanece livre e é utilizado para uma reação subsequente
- Os dois grupos aldeídos de uma única molécula de glutaraldeído reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada, e
- a ligação cruzada é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído.

Conforme a IUPAC, as bases de Schiff ou iminas, são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo $\text{R}_2\text{C}=\text{NR}^*$ onde $\text{R}^* \neq \text{H}$, $\text{R}=\text{H}$ ou aril e são formadas a partir da condensação de uma amina primária com um grupo carbonila. Um esquema genérico para a obtenção de bases de Schiff é mostrado (Fig. 3.14) onde R e R^* são alquil e/ou aril (Santos, 2004).

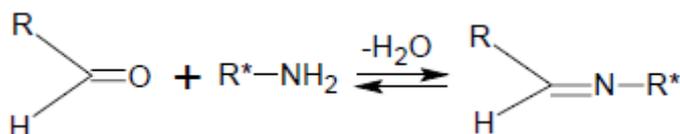


Figura 3.14: Esquema genérico da obtenção de bases de Schiff (Costa Jr., 2008)

O procedimento de reticulação permite a muitos polímeros terem uma boa estabilidade química, térmica e mecânica. Hidrogéis com agentes reticulantes ou pontes formam cadeias poliméricas interconectadas pelo reticulante conduzindo a

formação de rede tridimensional, gerando uma macromolécula insolúvel em água (Bolto *et al.*, 2009).

As propriedades dos hidrogéis reticulados dependem principalmente da sua densidade de ligações cruzadas, notadamente da relação de mols do agente reticulante com os da unidade de repetição do polímero. Exige-se um número crítico de ligações cruzadas por cadeia para permitir a formação da rede. A rede do hidrogel de quitosana reticulada pode ocorrer com ela mesma onde a reticulação envolve duas unidades estruturais que podem ou não pertencer à mesma cadeia, ou pode ser uma rede híbrida de polímero onde a reação de reticulação ocorre entre a unidade estrutural de quitosana e uma cadeia polimérica de outro tipo, ou ainda pode ser semi ou totalmente interpenetrada na qual contém um polímero não reagente adicionado à solução de quitosana antes da reticulação, isto é, a formação de uma rede de quitosana na qual um polímero não reagente está aprisionado pela mesma. A maioria dos reticulantes usados para realizar ligações cruzadas covalentes pode induzir toxidez se estiverem livres antes da administração. Um método para resolver esse problema e evitar o passo de purificação e verificação antes da administração, seria preparar os hidrogéis por reticulação iônica reversível. A quitosana por ser um polímero catiônico, reage com componentes carregados, íons ou moléculas, conduzindo a formação de uma rede através de pontes iônicas entre cadeias poliméricas (Sadahira, 2007; Neto, 2005; Berger, *et al.*, 2004b; Lee, 1992).

A integridade estrutural depende das ligações cruzadas entre as cadeias do polímero que é formado por diversas ligações químicas e interações físicas. Hidrogéis utilizados nestas aplicações são tipicamente degradáveis, podendo ser processados em condições estáveis, possuem propriedades mecânicas e estruturais semelhantes a muitos tecidos. Vidros e polímeros semicristalinos têm alto módulo elástico e pouca deformação (Drury *et al.*, 2003; Sperling, 2001; Ratner, 1996).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Síntese de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas

Cinco sistemas foram estudados neste trabalho:

- Filmes obtidos a partir de solução de quitosana e solução (coloides) de vidro bioativo: Filme Híbrido Qui-VB.
- Filmes de quitosana com dispersão de nanopartículas de vidro bioativo: Filme Nanocompósito Qui-BGNP.
- Matrizes obtidas a partir de solução de quitosana e solução (coloides) de vidro bioativo: Matriz Híbrida Qui-VB.
- Matrizes de quitosana com dispersão de nanopartículas de vidro bioativo: Matriz Nanocompósita Qui-BGNP.
- Filmes e matrizes de quitosana, PVA e 20% (m/m) de vidro bioativo: Qui-PVA-20%VB.

Os principais reagentes utilizados foram: quitosana comercial (alto peso molecular e grau de desacetilização >75%), tetraetilortossilicato (TEOS), trietilfosfato (TEP), PVA (álcool polivinílico) com GH=80%, glutaraldeído (25%), fornecidos pela Aldrich Chemical.

O fluxograma ilustra as etapas seguidas para a obtenção dos filmes e matrizes (Fig. 4.1):

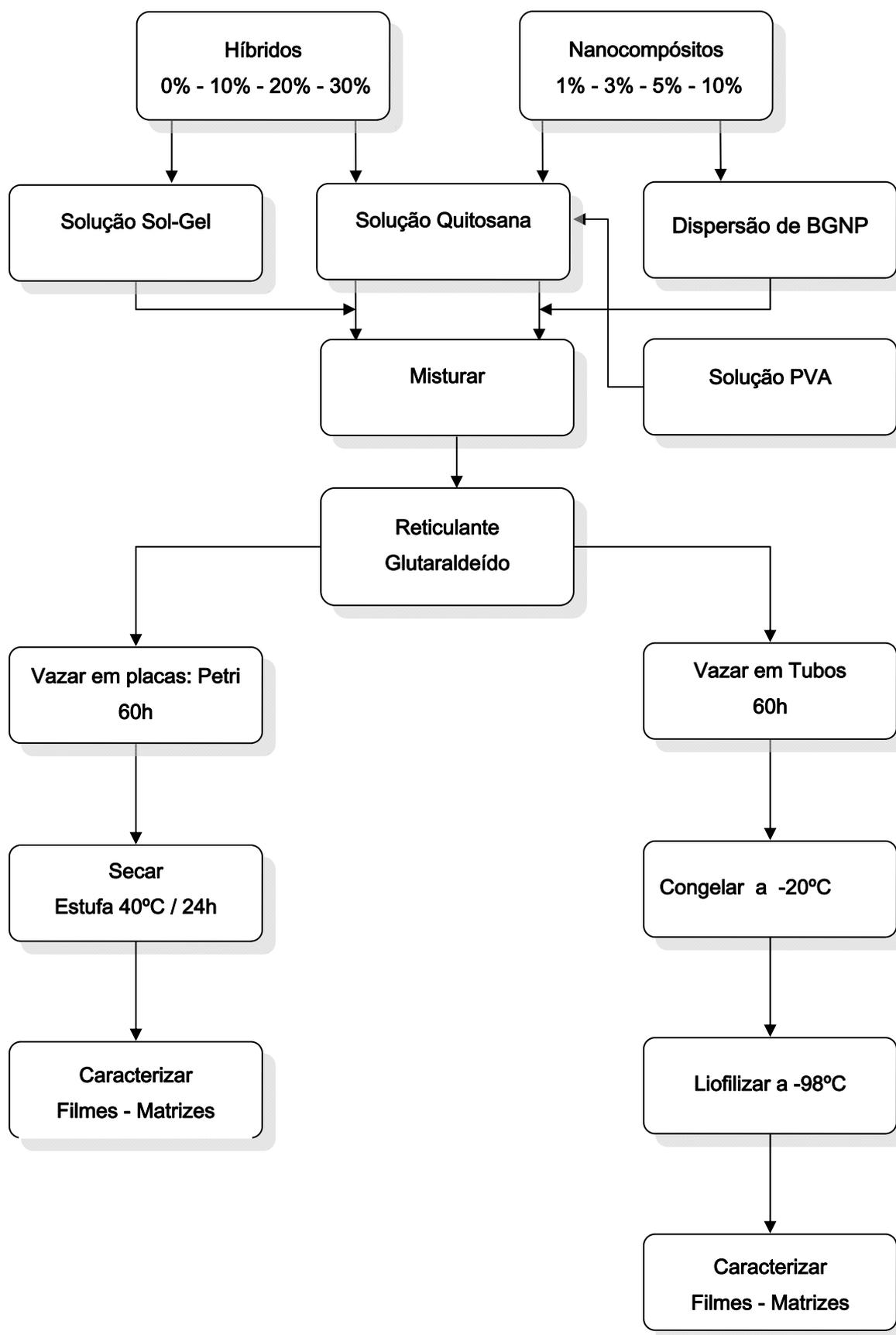


Figura 4.1 – Fluxograma das etapas de síntese dos filmes e matrizes.

4.1.1 Preparo da Solução Precursora de Vidro Bioativo 60S

O vidro bioativo 60S foi obtido pela hidrólise ácida e policondensação de tetraetilortosilicato (TEOS ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$)), alcoóxido precursor de SiO_2 , e trietilfosfato, alcoóxido precursor de P_2O_5 , (TEP ($(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$)). A hidrólise ocorreu pela adição de água deionizada e foi catalisada por ácido nítrico. Nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foi adicionado como precursor de CaO . A composição nominal do vidro bioativo 60S (porcentagem em mol) foi:

- SiO_2 - 60%
- P_2O_5 - 36%
- CaO - 4%

4.1.2 Preparo da Solução de Quitosana

A solução de quitosana 1% (m/v) foi preparada por dissolução do pó comercial e adição de 2mL de ácido acético 2% (m/v) com agitação mecânica por 24h.

4.1.3 Obtenção de Filmes e Matrizes Híbridas Qui-VB

Os filmes e matrizes híbridas foram obtidos a partir da solução de quitosana 1% (m/v) com a adição de solução precursora de vidro bioativo nas seguintes composições: 0%, 10%, 20%, 30% (m/m) que foram então reticuladas com glutaraldeído correspondendo a 3,0% da massa total de quitosana. A solução de glutaraldeído 2,0% (m/v) foi obtida pela diluição da solução de glutaraldeído 25% em água deionizada conforme trabalho de Dias *et al.*, (2010). A partir da tabela 4.1 é possível visualizar as composições nominais utilizadas nos filmes e matrizes híbridas produzidas.

Tabela 4.1: Composição nominal considerando m/m (%).

Quitosana	Vidro Bioativo
100%	0%
90%	10%
80%	20%
70%	30%

A solução final para obtenção dos filmes híbridos foi vertida em placas de Petri com dimensões de 5 cm e de 15 cm (diâmetro) e mantidas a temperatura ambiente por cerca de 60h. Em seguida foram colocadas em estufa ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24h para a secagem completa. A utilização de placas com diâmetro de 15 cm foi devida à necessidade de se ter amostras de filmes com comprimento aproximado de 10 cm, para uso nos ensaios mecânicos.

A solução final para obtenção das matrizes híbridas foi vertida em frascos cilíndricos com 5 mL de volume (2 cm no diâmetro e 3 cm de altura). Os frascos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 60h, permitindo ao gel um tempo necessário para ocorrer a gelação e permitir maior tempo para que as reações dos componentes se completassem. Logo em seguida esse frasco com o híbrido em forma de gel foi congelado e mantido em refrigerador a -20°C por mais 60h. Após esse tempo os frascos congelados foram imersos em nitrogênio líquido com temperatura -196°C por 20 minutos e em seguida, imediatamente colocados no liofilizador (Modelo: K105 – Empresa Liotop - SP/Brasil) para secagem por 48h com temperatura no condensador de -98°C e temperatura no coletor das amostras de -4°C .

4.1.4 Preparo da Dispersão de Nanopartículas de Vidro Bioativo (BGNP)

As nanopartículas de vidro bioativo foram obtidas pela combinação de duas etapas: método de coprecipitação e o processo sol-gel, este último dividido em duas etapas (Hong *et al.*, 2009; Boccaccini *et al.*, 2010): (1) os precursores foram hidrolisados sob condições ácidas e (2) condensados monodispersos em solução alcalina. 5,57 ml de TEOS e 0,56 mL de TEP foram dispersos em solução de 10 mL de metanol e água (5,3 mL : 4,7mL) - (1:2 molar). O pH foi ajustado entre 1-2 por ácido nítrico e a mistura mantida sob agitação magnética até a obtenção de um sol transparente (1 h). O sol foi então gotejado em 1200 mL de água deionizada e 0,27 mL de hidróxido amônio sob vigorosa agitação mecânica. O pH da solução foi ajustado na faixa de 10-12. Após 12 horas de agitação mecânica a suspensão foi levada à estufa, 50°C , para evaporação da amônia (até pH < 8). Adicionou-se 3,45 g de nitrato de cálcio e manteve-se sob agitação mecânica por 24h. A dispersão obtida foi filtrada em

Milipore 0,22 e 0,11 μm , apenas a dispersão passante no filtro foi recolhida e estocada para uso posterior. O aspecto final da dispersão era de um líquido incolor.

4.1.5 Obtenção de Filmes e Matrizes Nanocompósitas Qui-BGNP

Os filmes e matrizes nanocompósitas foram obtidos a partir da síntese descrita abaixo, contendo vidro bioativo (BGNP) nas seguintes composições: 1%, 3%, 5%, 10% (m/m).

Adicionou-se 41mL de água deionizada em 50mL da dispersão de nanopartículas de vidro bioativo (BGNP) sob agitação magnética. Mediu-se o pH, obtendo-se um valor acima de $\text{pH}=7$. Adicionou-se ácido nítrico concentrado até obter-se $\text{pH}=2.5$ (equivalente ao pH de uma solução de ácido acético 2%). Adicionou-se aos poucos a quitosana em pó mantendo-se o pH abaixo de aproximadamente 4. Quando o pH atingia um valor acima de 4, adicionava-se ácido nítrico antes de mais adição de quitosana. Manteve-se a suspensão em agitação até estabilização do pH. Mediu-se o pH novamente encontrando-se $\text{pH}=5,8$. Adicionou-se ácido nítrico até pH próximo de 4. Após estabilização a suspensão foi mantida sob agitação mecânica por 24h. Foi adicionado o reticulante glutaraldeído e a suspensão foi mantida em agitação por mais 15 minutos, logo em seguida foi vertida em placas de Petri (35mL). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 60h e a secagem foi finalizada em estufa 40°C por 24h.

A partir da tabela 4.2 é possível visualizar as composições nominais dos filmes e matrizes nanocompósitas produzidas.

Tabela 4.2: Composição nominal considerando m/m (%).

Quitosana	BGNP
99%	1%
97%	3%
95%	5%
90%	10%

A suspensão final para a obtenção dos filmes nanocompósitos foi vertida em placas de Petri em duas dimensões de 5 cm e de 15 cm (diâmetro) e mantidas a temperatura ambiente por cerca de 60 horas. Em seguida foram secadas em estufa

($40 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24h. A utilização de placas com diâmetro de 15 cm foi devida à necessidade de se obter amostras de filmes com comprimento aproximado de 10 cm para uso nos ensaios mecânicos.

A suspensão final para a obtenção das matrizes nanocompósitas foi vertida em frascos cilíndricos com 5 mL de volume (2 cm no diâmetro e 3 cm de altura). Os frascos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por cerca de 60h, permitindo ao gel um tempo necessário para ocorrer a gelação e permitir maior tempo para que as reações dos componentes se completassem. Logo em seguida esse frasco com o nanocompósito em forma de gel foi congelado e mantido em refrigerador a -20°C por 60h. Após esse tempo os frascos congelados foram imersos em nitrogênio líquido com temperatura -196°C por 20 minutos e em seguida imediatamente colocados no liofilizador (Modelo: K105 – Empresa Liotop - SP/Brasil) por 48h com temperatura no condensador de -98°C e temperatura no coletor das amostras de -4°C . A pressão no coletor foi de 30 mmHg.

Alguns frascos com o material já gelados (somente nas matrizes nanocompósitas) foram imersos diretamente no nitrogênio líquido para se obter comparações entre a taxa de resfriamento a -20°C e a -196°C e sua consequência morfológica nos poros.

4.1.6 Preparo da Solução de PVA

A solução de PVA 5,0% (m/v) foi preparada pela dissolução de PVA (GH=80%) em água deionizada com temperatura de ($70 \pm 2^\circ\text{C}$) e agitação magnética por 45 minutos.

4.1.7 Obtenção de Filmes e Matrizes com o PVA

A relação em massa na obtenção dos filmes e matrizes de quitosana/PVA foi de 1:3. Foi feita a mistura de quitosana e PVA com agitação mecânica por 15 minutos em seguida realizada a adição da solução precursora do vidro com agitação mecânica por 30 minutos e por último a adição de glutaraldeído, agitando-se por mais 15 minutos. A solução resultante foi vertida em placas de Petri e mantida à temperatura ambiente por 60h. Para finalizar a secagem, as placas de Petri foram colocadas em

estufa com circulação de ar à $(40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ por 24h. As matrizes foram obtidas conforme o item 4.1.5.

4.2 Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas

Os híbridos e os nanocompósitos foram caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A porosidade e o tamanho médio de poros das matrizes foram analisados por MEV e microtomografia computadorizada (μCT). A estrutura cristalina foi avaliada por difração de raios X (DRX) e sua estrutura e composição química foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e espectroscopia por energia dispersiva de elétrons (EDS). A resistência mecânica dos filmes e das matrizes foi medida através de ensaios de tração e ensaios de compressão, respectivamente, conforme normas ASTM.

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras dos filmes foram recobertas com ouro. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEI-Inspect-S50/Republica Tcheca) foi observada sua microestrutura após ensaios de bioatividade com finalidade de avaliar a formação de hidroxiapatita carbonatada ao longo de sua superfície. Para análise morfológica da estrutura porosa as matrizes foram imersas em nitrogênio líquido e fraturadas. A superfície fraturada foi recoberta com carbono (SPI/ Supplies-EUA). As matrizes possuem um comportamento flexível que durante o preparo das amostras pode deformar sua estrutura original, por isto, foi utilizado o nitrogênio líquido que permite a configuração da estrutura se manter intacta na fratura.

A porosidade e o tamanho de poros das matrizes foram determinados por meio das seguintes técnicas de análise:

- Avaliação qualitativa de imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliação quantitativa obtida por microtomografia computadorizada (μCT) para obter a porosidade total.
- Balança de Arquimedes para obter a porosidade aparente.

Os valores de porosidade aparente referem-se aos poros abertos presentes no material, ao passo que a porosidade total corresponde ao volume ocupado pelos poros abertos e fechados (Reis, 2007).

O método de Arquimedes baseia-se no princípio de que um sólido com certo volume V , quando mergulhado num fluido, recebe uma reação do fluido igual ao peso de igual volume de fluido. Nesta técnica, são medidas a massa da amostra da matriz seca (M_{se}), a massa da amostra saturada com líquido (M_{sat}) e a massa da amostra submersa no líquido (M_{sub}) (Ho & Hutmacher, 2006). Utilizam-se as seguintes equações para o cálculo da porosidade aparente (poros abertos) que representa o volume dos poros que foram acessíveis ao fluido utilizado no teste, e a porosidade total representa o volume de poros abertos e fechados no material:

$$\text{Porosidade aparente (\%)} = (M_{sat} - M_{se}) / (M_{sat} - M_{sub}) \times 100$$

4.2.2 Avaliação por Microtomografia Computadorizada (μCT)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Física Nuclear Aplicada/ Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O equipamento utilizado para as análises de porosidade foi do fabricante Skyscan/Bruker – Modelo 1174 – Bélgica. As amostras são alocadas diretamente no porta amostras do equipamento da μCT e para sua fixação foi utilizado massa de moldar odontológica. Os dados necessários para a aquisição das amostras foram:

- Amostra - Qui 0%VB e 20%VB: Resolução espacial de 2 μm , tensão no tubo de 45 kV, escaneamento em 180°, sem filtro, com 3 frames para média, movimento aleatório de 5 e passo de rotação de 0,25.
- Amostra - Qui 10%VB e 30%VB: Resolução espacial de 2 μm , tensão no tubo de 50 kV, escaneamento em 180°, sem filtro, com 3 frames para média, movimento aleatório de 5 e passo de rotação de 0,25.

- Amostra Qui-PVA: Resolução espacial de 2 μm , tensão no tubo de 40 kV, escan em 180°, sem filtro, com 3 frames para média, movimento aleatório de 5 e passo de rotação de 0,25.
- Amostra Qui-PVA-20%VB: Resolução espacial de 2 μm , tensão no tubo de 55 kV, escaneamento em 180°, sem filtro, com 3 frames para média, movimento aleatório de 5 e passo de rotação de 0,25.

4.2.3 Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X (EDS)

Com o microscópio acoplado a microssonda para espectroscopia por dispersão de energia de Raios-X (EDS/EDAX-Genesis-EUA) foi avaliada a introdução do vidro bioativo na rede polimérica da quitosana e composição química dos filmes.

4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Nos filmes híbridos foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) para avaliar a presença de grupos químicos do vidro bioativo e da quitosana. A técnica também foi utilizada para avaliar a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície dos filmes imersos em SBF. Os espectros foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1} em uma resolução de 1 cm^{-1} com um média de 64 varreduras. O equipamento utilizado foi Nicolet 380 da ThermoScientific, usando cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os dados foram obtidos em absorbância e os espectros foram normalizados utilizando-se a técnica de divisão das intensidades pelo maior valor de absorbância.

4.2.5 Ensaios de Bioatividade

As amostras em triplicatas cortadas nas dimensões 10mm X 20mm foram imersas em 40 ml de SBF (*simulated body fluid*) para cada uma das composições dos filmes (0%, 10%, 20% e 30%) e mantidas por três tempos: 1, 7, 28 dias (Fig.4.2).



Figura 4.2: Etapas do ensaio de bioatividade.

A quantidade de SBF referente à 40mL obedece à relação entre a área superficial da amostra (S_a) em milímetros quadrados e o volume de solução de SBF (V_s) em mililitros dada por: $V_s = S_a/10$. Os frascos contendo as amostras foram colocados em banho-maria à $(37 \pm 2^\circ\text{C})$. Após o tempo determinado de imersão, as amostras foram retiradas do SBF, lavadas e secadas à temperatura ambiente. Os testes de biomineralização foram feitos conforme a norma ISO/FDIS 23317: 2007(E).

4.2.6 Caracterização das Propriedades Mecânicas

A seleção das amostras submetidas aos ensaios de tração e compressão foi definida a partir da região mais homogênea dos filmes e matrizes, realizada por observação visual, para se obter resultados mais representativos nas análises mecânicas. As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por teste de tração e as propriedades das matrizes foram avaliadas por testes de compressão.

As análises estatísticas de todos os resultados obtidos de propriedades mecânicas e físicas foram realizadas usando o *software Microcal Origin® 8.0*. Cada resultado foi registrado como média e desvio padrão considerando o número de replicatas característico de cada experimento.

Ensaio de Tração dos Filmes

As amostras dos filmes foram submetidas a teste de tração para avaliar o limite de resistência e a deformação. Os filmes com dimensões de 120 mm x 20 mm e espessuras variadas ($90 \pm 30\mu\text{m}$) foram submetidos ao ensaio com espaçamento inicial entre as garras de 50 mm. Para assegurar precisão nos resultados foram realizados uma média de 6 a 8 ensaios de cada filme. Os testes foram realizados em equipamento de teste da Instron (modelo EMIC DL 3000), utilizando uma célula de carga de 200 N, velocidade de ensaio de 25 mm/min, temperatura de ensaio de ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Os testes de tração foram realizados conforme a norma ASTM D882-10 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*).

Ensaio de Compressão das Matrizes

Os corpos de prova das matrizes foram submetidos ao ensaio de compressão para avaliação do limite de resistência e da deformação. As matrizes cilíndricas com dimensões de 18 mm de diâmetro e 10 mm de altura foram submetidas ao ensaio com final de curso pré-estabelecidos. Foram ensaiados três unidades de cada tipo de matriz. Os testes foram realizados em equipamento de teste da Instron (modelo EMIC DL 3000), utilizando uma célula de carga de 200 N, velocidade de ensaio de 0,5 mm/min, temperatura de ensaio de ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Os testes de compressão foram realizados conforme a norma ASTM D 695 (*Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics*).

4.3 Ensaio de Citotoxicidade

Os filmes sintetizados foram submetidos à primeira etapa de avaliação *in vitro*, através do teste de citotoxicidade seguindo a norma ISO 10993. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com Resazurina.

Células do Osteossarcoma Humano (SAOS) de linhagem comercial imortalizada foram gentilmente cedidos pelo professor Alfredo de Miranda Goes do Departamento de Imunologia e Bioquímica da UFMG. As células foram cultivadas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, NY, EUA), penicilina G sódica (10 UI / mL), sulfato de estreptomicina (10mg / L) e 0,25 anfotericina-b (Gibco BRL, NY, EUA), em estufa com 5% de CO_2 a 37°C .

As amostras dos filmes de 15,4 mm de diâmetro foram colocados em placas de 24 poços. O método de esterilização foi radiação ultravioleta. As células foram semeadas (1×10^4 células / mm^3 poço) em cada amostra de filme. Foram utilizados controles com células e meio DMEM com 10% de SFB, como controle positivo PBS (2X) e como controle negativo lascas de eppendorf (0,1 mg / mL). Os testes foram realizados em triplicata ($n = 3$). Após 72 horas todo o meio foi aspirado e colocado 900 μL de meio de cultura com soro, em cada poço. Foram adicionados 100 μL de resazurina (0,1 mg / mL; SIGMA-ALDRICH, EUA) em cada poço por um período 18 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida, foram removidos 100 μL de cada poço e transferidos para placas planas de 96 poços e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com dois filtros de 570 nm e 590 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição Qualitativa dos Filmes Híbridos Qui- VB

As imagens mostradas na Figura 5.1 apresentam fotografias das soluções de quitosana com teor de 20% m/m de vidro bioativo vertidas em placa de Petri em estágio inicial de evaporação de solvente. Nesta etapa tanto os filmes sem presença de vidro como os filmes contendo vidro apresentam um aspecto bem homogêneo, transparente e sem coloração aparente (Fig. 5.1 a). Após 24 horas ocorreu uma mudança de coloração e gelação dos filmes (Fig. 5.1 b). Seu aspecto inicial incolor é modificado para uma coloração amarelada, atribuída à ação do reticulante glutaraldeído. O aspecto amarelado fica mais intenso em filmes com um maior percentual de reticulante conforme descrito no trabalho de Costa Jr (2008). Alguns filmes sintetizados nesse trabalho tinham apenas 1% m/m de glutaraldeído e seu aspecto inicial era um tom amarelado claro, porém quando se utilizava concentrações mais elevadas (5% m/m GA) a coloração sofria um aumento de intensidade passando para um tom amarelo escuro. Optou-se neste trabalho por utilizar um percentual máximo de 3% m/m de glutaraldeído para a síntese dos filmes híbridos e nanocompósitos. Este percentual mostrou-se adequado para a síntese apresentando filmes com aspecto bastante homogêneo, uniforme, flexível e resistente nos ensaios mecânicos (Dias *et al*, 2010).

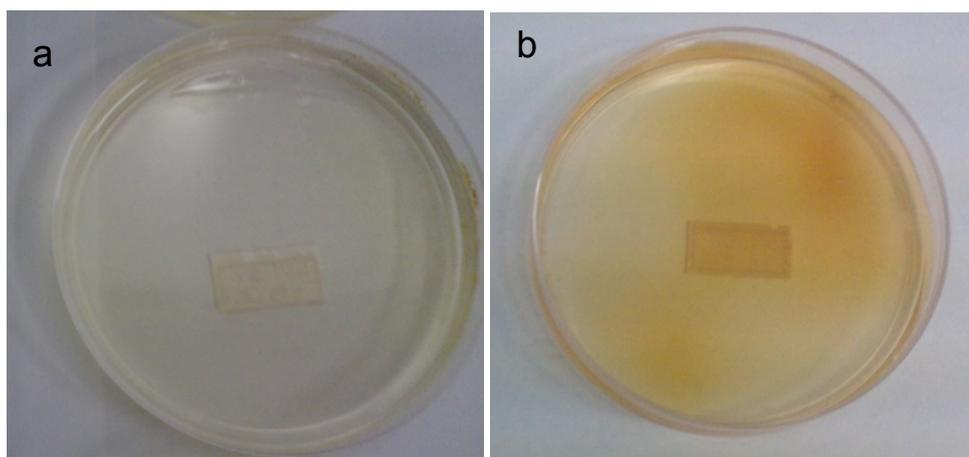


Figura 5.1: Fotografia dos filmes com 20% m/m de vidro bioativo (a) antes da gelação (b) após a gelação.

Em um mesmo filme algumas regiões apresentavam diferenças de intensidade na sua coloração, o que pode ser percebido a partir de manchas amareladas mais

intensas em algumas regiões e em outras regiões tons mais claros. Isto pode ser atribuído provavelmente às diferenças na cinética das reações durante a reticulação em algumas regiões ou a pequenas variações de espessura dos filmes. As sínteses tanto dos híbridos como dos nanocompósitos sofreram ajustes no tempo de reação com o objetivo de otimizar a homogeneidade da solução.

Após a secagem em estufa a 40°C os filmes permanecem com um aspecto bem homogêneo de cor amarelada e brilhante (Fig. 5.2). No entanto, nos filmes híbridos com teores de 20% e 30% m/m (Fig. 5.2c-d) de VB ocorreu uma modificação no seu aspecto, apresentando características de retração na estrutura, perda da flexibilidade e apresentou um aspecto opaco na superfície. Esse comportamento é claramente percebido nos filmes com 30% m/m de VB. Os filmes tiveram uma variação de espessura apresentando valores da ordem de 82µm a 140µm conforme o teor de vidro acrescentado ao híbrido e conforme volume adicionado nas placas de petri.

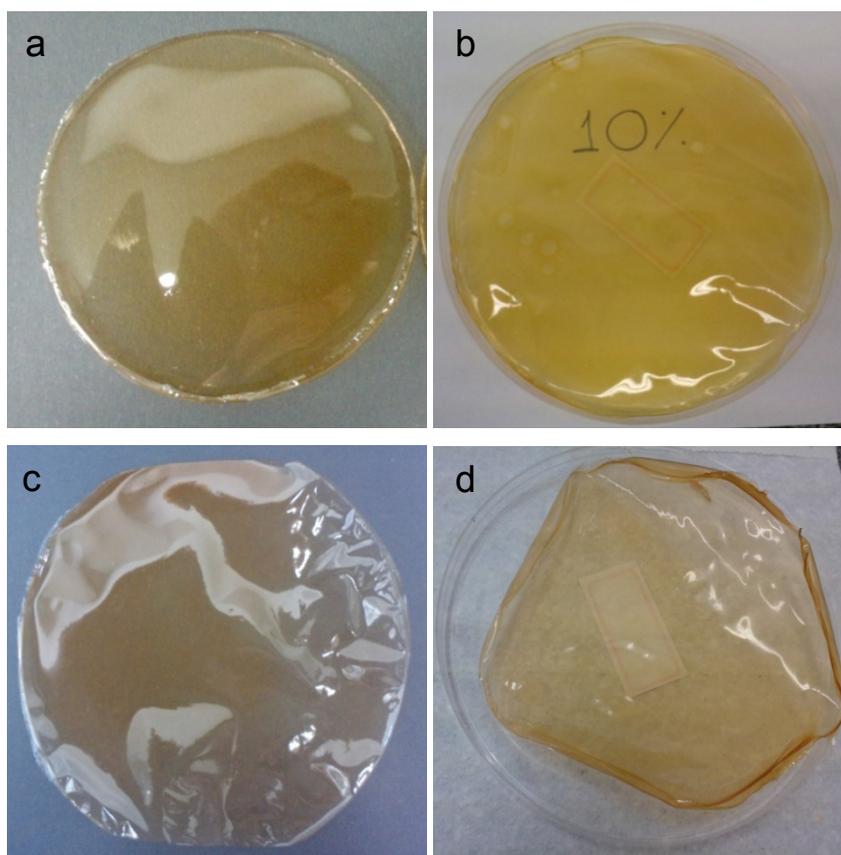


Figura 5.2: Fotografia de filmes com 0% (a), 10% (b), 20% (c) e 30% m/m (d) de VB após secagem.

Com o objetivo de realizar comparações no comportamento mecânico dos filmes, foram realizadas também algumas sínteses com a blenda quitosana-PVA. Estes filmes com a adição de PVA sofreram um aumento de espessura, obtendo-se valores da ordem de 180 μ m.

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os resultados obtidos por MEV/EDS realizados sobre diversos pontos da superfície dos filmes híbridos, de modo geral, não apresentaram grandes variações na sua composição evidenciando ser um material homogêneo. Estes resultados de EDS confirmam a incorporação da fase vítrea nos filmes híbridos.

As análises realizadas por MEV na superfície dos filmes contendo 30%*m/m* de vidro bioativo apresentaram duas regiões distintas destacadas nas imagens de MEV e EDS (Fig. 5.3). As duas regiões Z e Y mostram uma superfície lisa (Fig. 5.3 a) representada por Z e outra superfície mais rugosa representada por Y. Após investigação das duas regiões através do EDS foi possível verificar que embora sejam regiões com morfologias bem distintas formadas na superfície do filme híbrido, estas regiões possuem os mesmos elementos como o silício (Si), o cálcio (Ca) percebidos na Figura 5.3 (b, d) e o elemento fósforo (Fig. 5.3b), que embora tenha obtido um espectro não elevado em relação aos demais elementos não podemos considerá-lo irrelevante, pois se trata de uma caracterização qualitativa. Todos esses elementos são da fase vítrea do híbrido. As variações no aspecto da superfície dos filmes híbridos podem ser atribuídas a heterogeneidade ocorrida durante a mistura entre o vidro e a quitosana, formando determinadas regiões com maior concentração polimérica ou maior concentração vítrea, embora as duas regiões do filme híbrido apresentem fase vítrea, identificada pelo EDS.

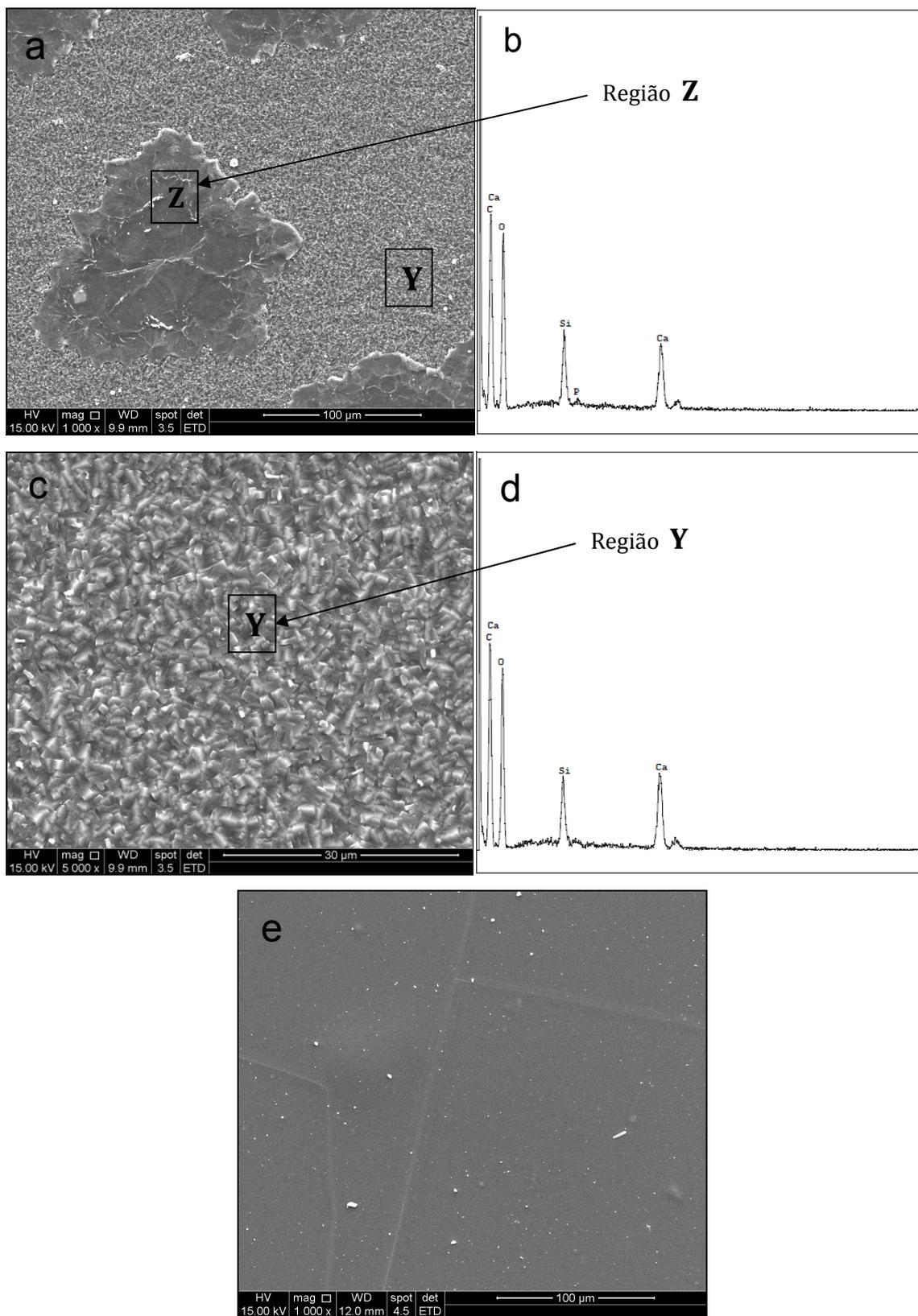


Figura 5.3: Imagens de MEV para filmes com 30% m/m de VB: (a) 1.000x, (c) 5.000x. EDS para filmes com 30% m/m de VB (b,d). Imagem de MEV para filmes de quitosana pura: (e) 1.000x.

Com o objetivo de comparar a superfície dos filmes com vidro e sem vidro a Figura 5.3 (e) mostra imagem de MEV para os filmes que contém somente quitosana (ampliação de 1000x) na mesma magnitude da imagem mostrada na Fig. 5.3a, referente à superfície do filme de quitosana contendo vidro.

5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O estudo dos resultados obtidos por espectroscopia de absorção por infravermelho foi realizado para se observar a interação entre a matriz do polímero e a formação da rede inorgânica. Quando se inicia o processo sol-gel, as partículas de sílica de pequenas dimensões são formadas devido às condições ácidas deste método. Em seguida, estas partículas agregam-se para formar os aglomerados. Quando a quitosana está presente na solução, ela pode interagir com a sílica através de uma variedade de possibilidades, incluindo ligações de hidrogênio e ligações covalentes do tipo Si-O-C que, por sua vez, mantêm as partículas de sílica próximas umas das outras e facilitaram a formação dos híbridos (ver esquema da página 71/Fig. 5.17). Portanto, a quitosana tem uma potencial função de servir como conexão para as partículas a base de sílica (Al-Sagheer & Muslim, 2010; Martinez *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2001).

Os espectros normalizados dos filmes de quitosana pura e dos filmes híbridos compostos por 10%, 20% e 30% m/m de vidro bioativo são mostrados nas Figuras 5.4 e 5.5. As estruturas relacionadas aos modos de vibração observados nas análises de FTIR são apresentadas na tabela 5.1. O espectro de FTIR característico para a quitosana sem vidro e para o híbrido apresenta a banda da ligação amida I (estiramento da ligação carbonila C=O) entre 1622-1660 cm^{-1} . O dobramento devido à amida II (N-H) foi evidente devido a banda em 1533 cm^{-1} , o qual aparece no espectro de forma bem acentuada, podendo ser atribuído a soma dos dois modos vibracionais de N-H e C-H. Foi percebida também a presença dos grupos C-H, envolvidos em interações quando aparece a banda entre 1335-1453 cm^{-1} . A banda associada ao estiramento assimétrico C-O-C aparece em 1153 cm^{-1} e aquela referente ao estiramento C-O foi observada em 1047 cm^{-1} , característico das vibrações em esqueletos de polissacarídeos.

Bandas específicas na região de 1000-1100 cm^{-1} são características da absorção do grupo Si-O-C (vidro bioativo), que foi percebido, na região de 1013 cm^{-1} (Al-Sagheer e Muslim, 2010; Peter *et al*, 2010 e 2009; Martinez *et al*, 2004; Duarte *et al*, 2002; Hu *et al*, 2001; Zong *et al*, 2000).

O aparecimento gradual da banda de absorção em 945 cm^{-1} está relacionado com as vibrações de estiramento das ligações de Si-OH (Fig. 5.4), deslocado devido à formação de ligações de hidrogênio entre grupos silanols da rede de sílica e a amida da quitosana. No híbrido com 30%*m/m* aparece uma banda de absorção em 871 cm^{-1} associada à vibração de estiramento do grupo químico C-C. A banda em 815 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico das ligações Si-O-Si é vista apenas nos espectros dos filmes híbridos com 20% e 30%*m/m* de vidro bioativo, devido a maior concentração desse componente no compósito mostrando claramente a introdução da fase vítrea no material (Al-Sagheer e Muslim, 2010; Oliveira, 2007; Ahmad *et al*, 2007; Martinez *et al*, 2004; Duarte *et al*, 2002).

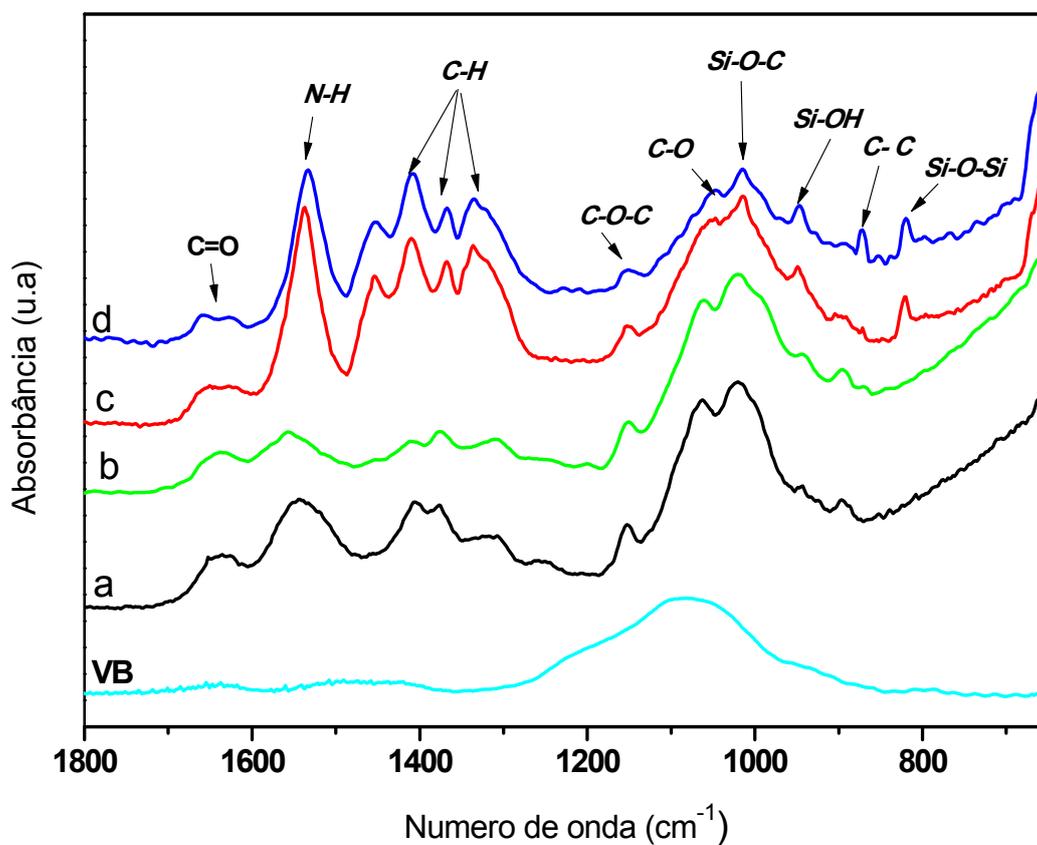


Figura 5.4: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 10, 20 e 30% *m/m* de VB (a), (b), (c) e (d) respectivamente, (800-1800 cm^{-1}).

Na Figura 5.5 é apresentado o espectro da quitosana pura e dos filmes híbridos com 10%, 20% e 30% m/m de VB na faixa de frequência entre 4000-2200 cm^{-1} . A ampla banda de absorção entre 3500 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} é referente às vibrações larga do estiramento OH nas moléculas de água, envolvido em interações de hidrogênio. Na mesma região ocorrem absorções entre 3348- 3455 cm^{-1} associadas as vibrações de estiramento do grupo de N-H. Com a incorporação da fase vitrea *in situ* verifica-se uma redução das intensidades das bandas entre a faixa 3500- 3000 cm^{-1} , incluindo a região de N-H, que tem seu pico deslocado ligeiramente para uma frequência mais elevada no híbrido com 20% m/m de VB, indicando uma maior interação interfacial entre a matriz e a fase inorgânica (Al-Sagheer & Muslim, 2010; Peter *et al*, 2010 e 2009; Gupta & Jabrail, 2006; Al-kandary *et al*, 2005).

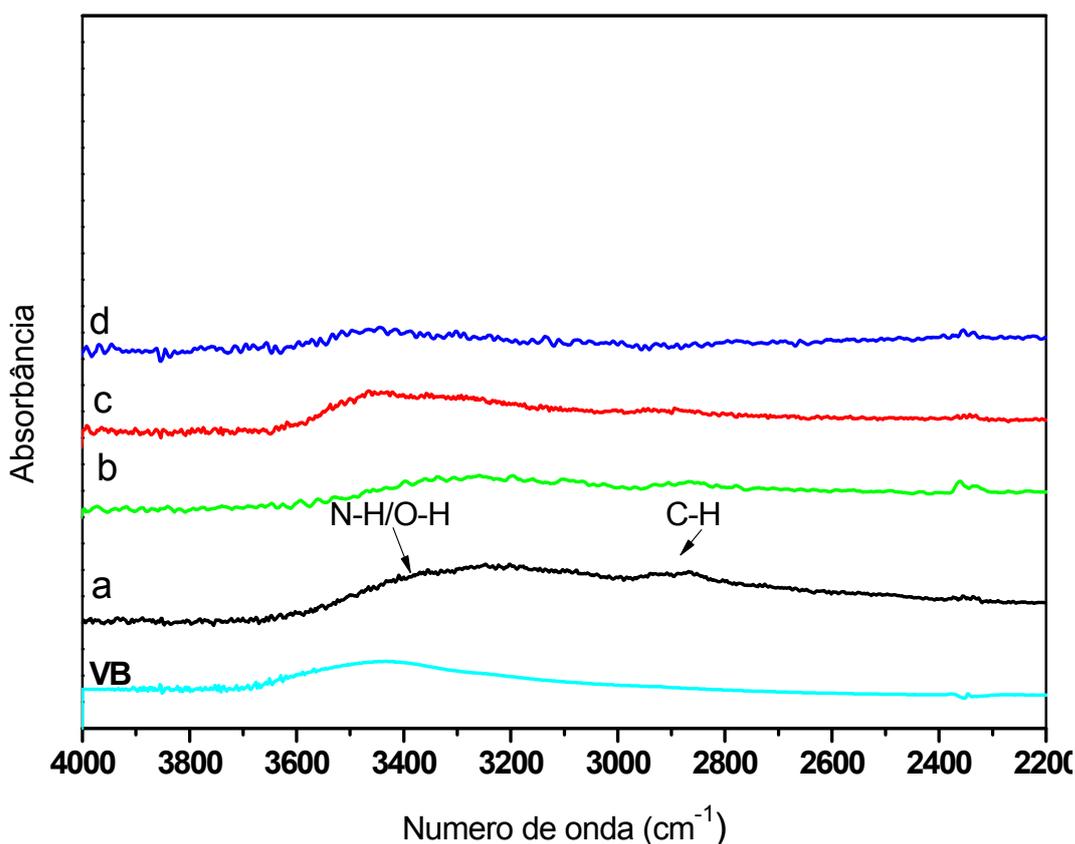


Figura 5.5: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB (a), (b), (c) e (d) respectivamente, (2200-4000 cm^{-1}).

Tabela 5.1: Bandas características de FTIR para híbridos de quitosana e vidro bioativo (Al-Sagheer & Muslim, 2010; Peter *et al*, 2010 e 2009; Cai *et al*, 2009; Oliveira, 2007, 2011; Ahmad *et al.*, 2007; Reis, 2007; Grupta & Jabrail, 2006; Al-kandary *et al*, 2005; Martinez *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Zong *et al.*, 2000).

Bandas Qui-VB (cm⁻¹)	Bandas Qui-BGNP (cm⁻¹)	Grupo Químico Associado
780-815	780- 820	Estiramento simétrico Si-O-Si
860-900	860- 900	Estiramento simétrico C-C
945-967	949- 967	Estiramento simétrico Si-OH
1000-1100	1030- 1078	Estiramento Si-O-C
1030-1078	1000- 1100	Estiramento C-O
1153	1150	Estiramento assimétrico C-O-C
x	1300- 1464	Estiramento CH ₂
1313-1464	1313- 1464	Estiramento CH ₂
1557-1560	1542- 1560	Amida II: deformação de N-H
1622-1700	1600- 1620	Amida I: estiramento carbonila-C=O
2828-2950	1626- 1700	Estiramento CH
3000-3500	2828- 2960	Estiramento de diversos grupos OH
3200- 3455	3000- 3500	Estiramento N-H

5.2 Descrição Qualitativa dos Filmes Nanocompósitos Qui-BGNP

As imagens (Fig. 5.6) apresentam fotografias dos filmes de quitosana com 1%, 3%, 5% e 10% m/m de nanopartículas de vidro bioativo (BGNP). Os filmes nanocompósitos sofreram o mesmo processo de reticulação e secagem que os filmes híbridos. Eles mostraram um aspecto homogêneo com coloração levemente amarelada. Filmes com 1% e 3% m/m de BGNP apresentaram um aspecto uniforme com superfície lisa, porém a medida que o teor de BGNP foi aumentado nos filmes, estes demonstravam um comportamento similar aos dos híbridos, tornando-se menos flexíveis e ocorrendo retração na sua estrutura. Os filmes nanocompósitos apresentaram espessura de (100 ± 25 µm).

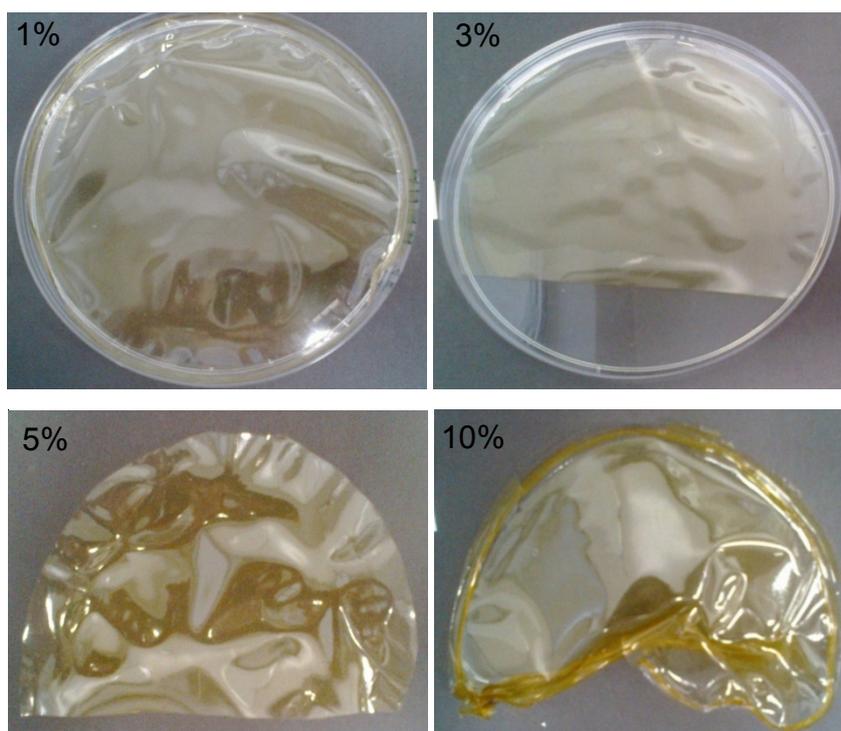


Figura 5.6: Fotografias de filmes com 1%, 3%, 5% e 10% m/m de BGNP.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raio-X (EDS)

As análises realizadas por MEV na superfície dos filmes com nanopartículas de BGNP apresentaram uma superfície homogênea e rugosa, somente percebida a partir de uma imagem com alta resolução (40 000 x). É possível também perceber que os cristais inorgânicos têm uma elevada afinidade com a matriz de quitosana, porque a interface entre as fases orgânicas e inorgânicas foi indistinguível nessa magnitude (Fig. 5.7a).

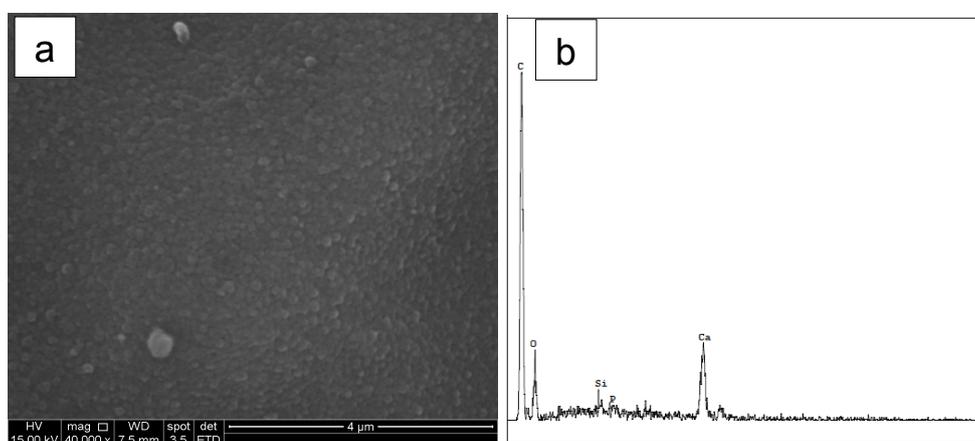


Figura 5.7: Imagens de MEV (a) e EDS (b) de filmes com 10% m/m de BGNP, aumento de

40.000 x.

As análises por EDS associadas ao MEV, realizadas sobre algumas regiões do filme confirmam a incorporação das nanopartículas de vidro bioativo no nanocompósito. A partir do EDS foi possível identificar os elementos Silício (Si), Cálcio (Ca) e Fósforo (P).

A maioria das nanopartículas de vidro bioativo foram distribuídas homogêneas e de forma compacta no interior da matriz de Qui-BGNP. Não foi observada nenhuma delaminação entre a fase inorgânica e a fase orgânica. Essa dispersão entre as partículas inorgânicas e a matriz orgânica pode melhorar o desempenho mecânico do nanocompósito (Cai *et al.* 2009).

5.2.2 Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros normalizados de FTIR dos filmes nanocompósitos são mostrados na Figura 5.8, 5.9 e na tabela 5.1 (item 5.1.2) são apresentadas estruturas relacionadas aos modos de vibração observados. Nota-se que os espectros de FTIR de Qui-BGNP são bem similares aos espectros de Qui-VB mostrados anteriormente. Os espectros de FTIR de Qui-BGNP mostraram a banda a 1649 cm^{-1} que corresponde aos grupos primários amina da quitosana. Os espectros com as BGNPs mostraram picos a 1030 e a 1070 cm^{-1} associados com a vibração do estiramento dos grupos fosfatos. Em comparação com a quitosana pura, os espectros do nanocompósito com BGNP foram caracterizados por três novas bandas de absorção, o estiramento simétrico Si-O-Si em 820 cm^{-1} , o alargamento do pico em 1002 cm^{-1} relacionado à vibração de estiramento simétrico das ligações Si-O-C. De forma similar ao híbrido, no nanocompósito ocorreu uma interação da ligação C-H devido à Amida II aparecendo uma banda em 1300 cm^{-1} (Peter *et al.* 2010; Peter *et al.* 2009; Cai *et al.* 2009). A banda entre 3500 e 3000 cm^{-1} é observada em todos os espectros e corresponde às vibrações de estiramento de diversos grupos hidroxil nas moléculas de água e ao estiramento C-H (Oliveira, 2011; Peter *et al.* 2010; Peter *et al.* 2009).

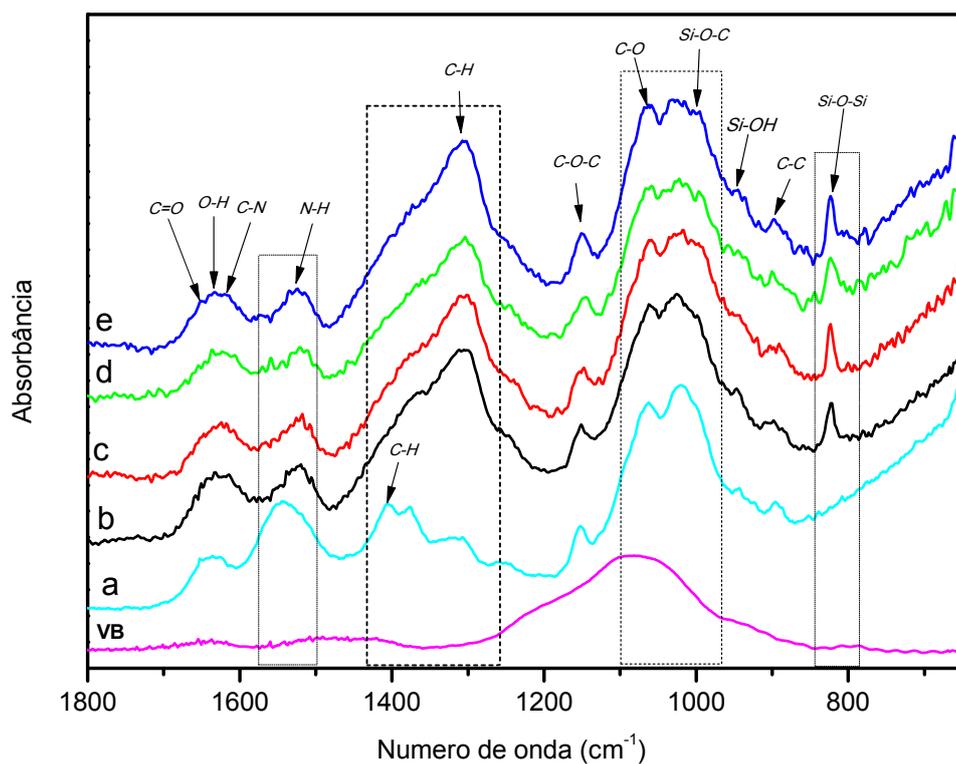


Figura 5.8: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP (a), (b), (c), (d) e (e) respectivamente, e do Vidro Bioativo puro (VB) ($800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$).

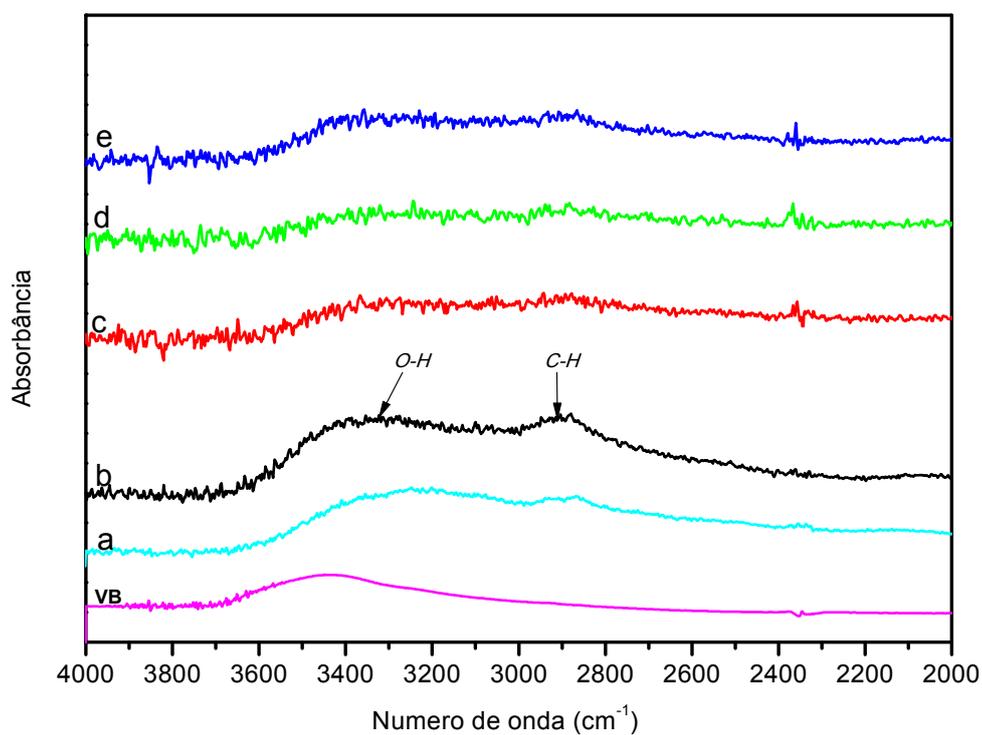


Figura 5.9: Espectros de FTIR dos filmes de quitosana com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP (a), (b), (c), (d) e (e), respectivamente e do Vidro Bioativo puro (VB) ($2000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$).

5.3 Descrição Qualitativa das Matrizes Híbridas Qui- VB

As imagens da Figura 5.10 ilustram as matrizes de quitosana e vidro bioativo obtidas com sucesso usando do método de liofilização conhecido também por secagem através do congelamento. As matrizes apresentaram uma estrutura intacta sólida nas paredes externas e internamente porosa, de modo geral, mostraram-se sem fraturas ou trincas, com poucas variações nas dimensões finais, apresentando também uma configuração externa bastante simétrica.



Figura 5.10: Imagens obtidas por fotografia ótica das matrizes de quitosana e vidro bioativo com dimensões de 10 mm x 18 mm.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Microtomografia Computadorizada (μ CT)

Os requisitos para um substituto de osso sintético visa fornecer uma matriz rica em poros com muitas interconectividades que promoverá o rápido crescimento ósseo e ainda possuir resistência suficiente para evitar esmagamento sob cargas fisiológicas durante a integração e a regeneração. A técnica ideal de fabricação do osso sintético deveria produzir uma matriz complexa com o controle do tamanho de poros, incluindo suas interconectividades. Possuir poros com dimensões controladas é importante do ponto de vista da adesão, proliferação e migração das células cultivadas "*in vitro*" ou das células presentes nos tecidos vivos sobre os quais a matriz híbrida será implantada. A interconectividade entre os poros é importante no desenvolvimento de uma adequada vascularização e nutrição das células em

migração e proliferação, essencial para a manutenção das mesmas. A liofilização é uma técnica simples para se produzir matrizes porosas, evitando as tensões de secagem e encolhimento que pode levar a rachaduras e empenamento durante as secagens normais. O resultado é uma matriz com uma microestrutura complexa e rica em poros.

A avaliação da porosidade nas matrizes neste trabalho foi realizada por MEV de forma qualitativa, sendo possível avaliar a configuração, o alinhamento preferencial dos cristais do líquido congelado, a presença das interconectividades e o aspecto das paredes dos poros. Resultados quantitativos como o percentual do tamanho médio de poros e o percentual total de poros das matrizes com 0%, 10% e 20% m/m foram obtidos por microtomografia computadorizada (μCT). No entanto, este método não obteve sucesso ao mensurar a porosidade total da matriz com 30% m/m de vidro bioativo. Esta amostra analisada por microtomografia apresentou uma estrutura compacta impossibilitando a identificação de poros.

5.4.1 Morfologia e Porosidade das Matrizes Híbridas Qui- VB

A morfologia das matrizes com 0, 10, 20 e 30% m/m de vidro bioativo obtida por MEV revelaram diferenças significativas na estrutura dos poros destas matrizes (Fig. 5.11). Para a matriz de quitosana pura (0%VB) os poros são pouco uniformes com pouca homogeneidade nas cavidades (Fig.5.11a). Na matriz com 10%VB os poros são mais regulares e uniformes (Fig.5.11b). Na matriz com 20%VB os poros também são bem uniformes, embora levemente alongados ficando mais lamelares (Fig.5.11c). Na matriz com 30%VB os poros são em determinadas regiões mais uniformes e definidos, porém também apresenta regiões com poros alongados e ainda em outras regiões os poros estão quase em colapso (Fig.5.11d). De modo geral, todas as matrizes apresentaram uma parede com poros com estrutura tipo lâmina com espessura bastante fina. Nas quatro composições de matrizes foi possível identificar alguma interconectividade, mesmo com poucas cavidades, sendo mais acentuadas nas matrizes com 10% e 20%VB, estas duas faixas de percentual se mostraram mais satisfatórias, como uma matriz mais adequada ao crescimento e

proliferação celular, pois resultaram em uma morfologia uniforme, isotrópica e mais rica em interconectividades.

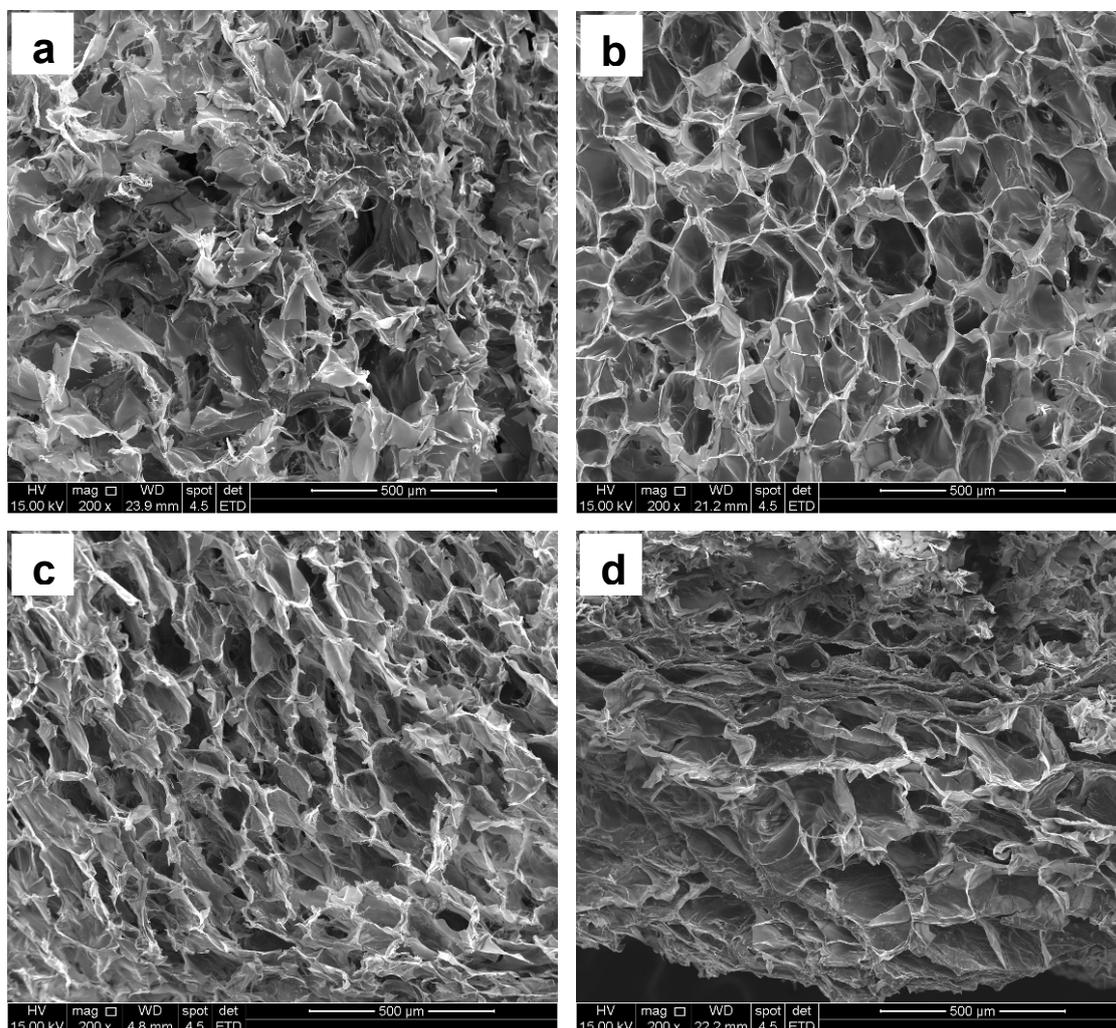


Figura 5.11: Comparação das imagens de MEV de matrizes com 0%VB (a), 10%VB (b), 20%VB (c) e 30% VB (d): morfologia e estrutura dos poros. Aumento de 200x (a-d).

Com o objetivo de investigar com mais detalhes as características morfológicas de cada composição de matriz foram descritas em seguida: suas características de congelamento, imagens dos poros obtidas por MEV, tamanho médio de poros, interconectividades e porosidade total.

Conforme imagens obtidas por MEV, as matrizes de quitosana sem vidro bioativo (Fig. 5.12) apresentaram uma morfologia heterogênea, não uniforme, sem direcionamento de poros. O resultado foi uma matriz com uma microestrutura complexa com porosidade anisotrópica, a qual foi gerada durante o congelamento

da matriz que possuía grande teor de líquido em sua estrutura. Grande quantidade de cristais de gelo, foram formados após o processo de liofilização, deixando uma microestrutura final a qual é uma réplica negativa do cristal de gelo, ou seja, um material constituído por uma microestrutura porosa, mas pouco uniforme (Deville *et al.* 2006).

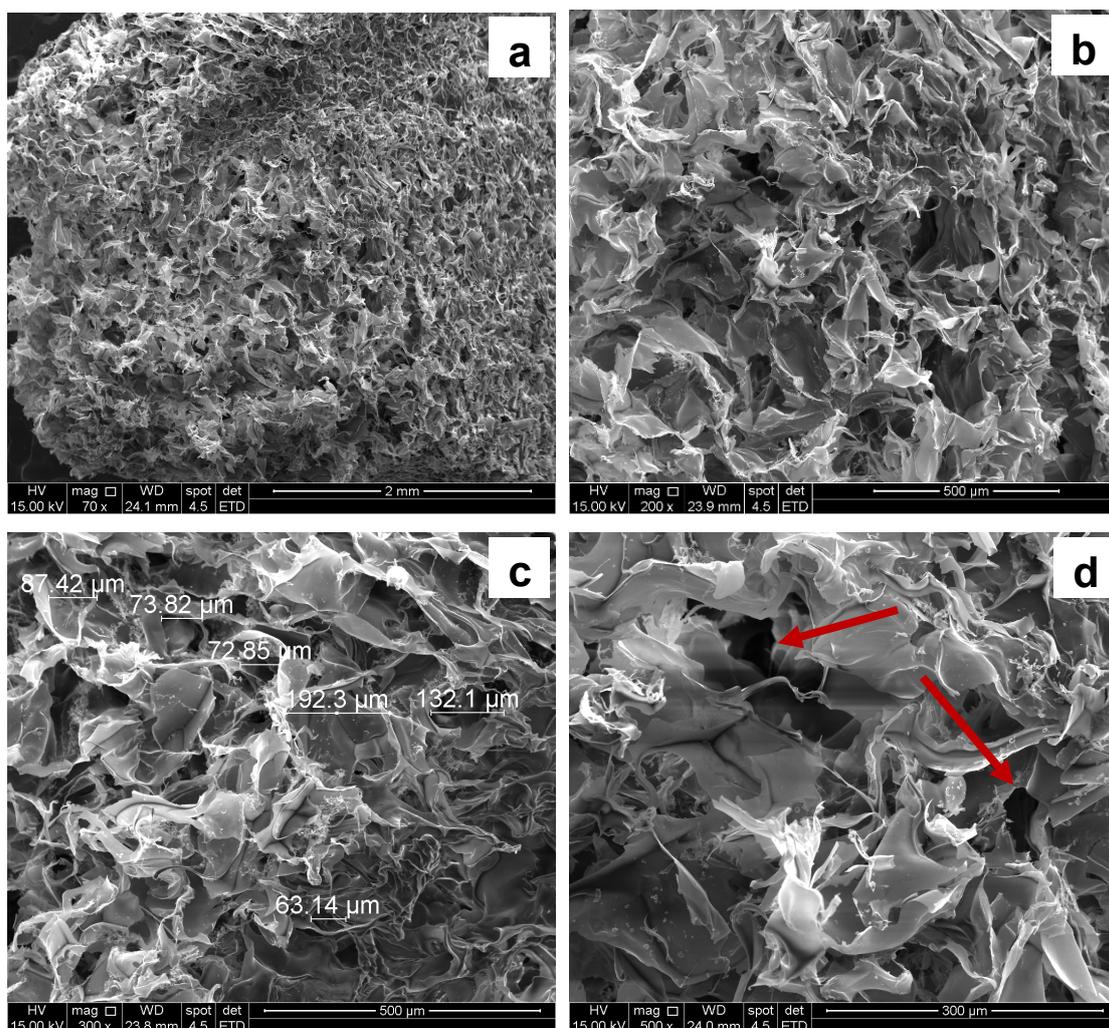


Figura 5.12: Imagens de MEV da matriz de quitosana sem o vidro: amostra da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 300x (c) e interconectividades - 500x (d).

Os tamanhos de poros das matrizes foram medidos por MEV (Fig. 5.12c), porém os valores são estimados e não são absolutos, foi apenas uma medida realizada na superfície onde ocorre a ruptura da amostra da matriz, resultando em uma face rica em poros aparentes, os quais foram medidos aleatoriamente. O tamanho de poros obtido na região analisada por MEV se encontra entre 63,14µm e 192,3µm. As

interconectividades não foram claramente visualizadas devido também a seu aspecto anisotrópico, embora fosse possível identificar algumas cavidades através das imagens de MEV situadas na região interior da matriz (Fig. 5.12d).

A porosidade total da matriz sem vidro (0%VB) obtida por μCT foi de $96 \pm 0,4\%$ (Tab. 5.2). Este percentual podia ser esperado devido ao alto teor de líquido contido nesta matriz. A distribuição do tamanho de poros mostrou uma predominância de 80% dos poros com dimensões entre 50 e $80\mu m$, ou seja, a maioria dos poros dessa matriz apresentou dimensões abaixo de $100\mu m$ e o restante de poros, cerca de 20% apresentou dimensões maiores que $50\mu m$ e menores que $80\mu m$ (Fig. 5.13a). Conforme descrito em itens anteriores sobre os resultados da literatura, esta gama de valores atende de forma significativa as variações de tamanho de poros necessárias ao bom desempenho da matriz na engenharia de tecidos.

O percentual das interconectividades não foi quantificado pela μCT , portanto os resultados foram identificados apenas pelas imagens de MEV e devido ao seu alto grau anisotrópico não ficou claro se existe, de fato, interconetividades nas matrizes de quitosana pura. Também foi medida a porosidade aparente de modo comparativo, sendo possível perceber diferenças significativas das duas técnicas, por μCT (porosidade total) e pela balança de Arquimedes (porosidade aparente).

Tabela 5.2: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por MEV e μCT .

Amostra	Porosidade		Faixa de tamanho de poros predominante	Faixa de tamanho de poros
	aparente (%)	total *(%)	* (μm)	** (μm)
Qui 0%	$72,08 \pm 2,0$	$96,03 \pm 0,36$	50 – 80	63,14 – 192,3
Qui 10% VB	$64,07 \pm 2,4$	$96,01 \pm 0,39$	46 – 84	64,11 – 212,7
Qui 20% VB	$55,18 \pm 5,5$	$95,74 \pm 0,68$	50 – 110	90,34 – 104,9
Qui 30% VB	$47,45 \pm 2,2$	x	x	122,4 – 227,3

*Obtido por μCT

** Obtido por MEV

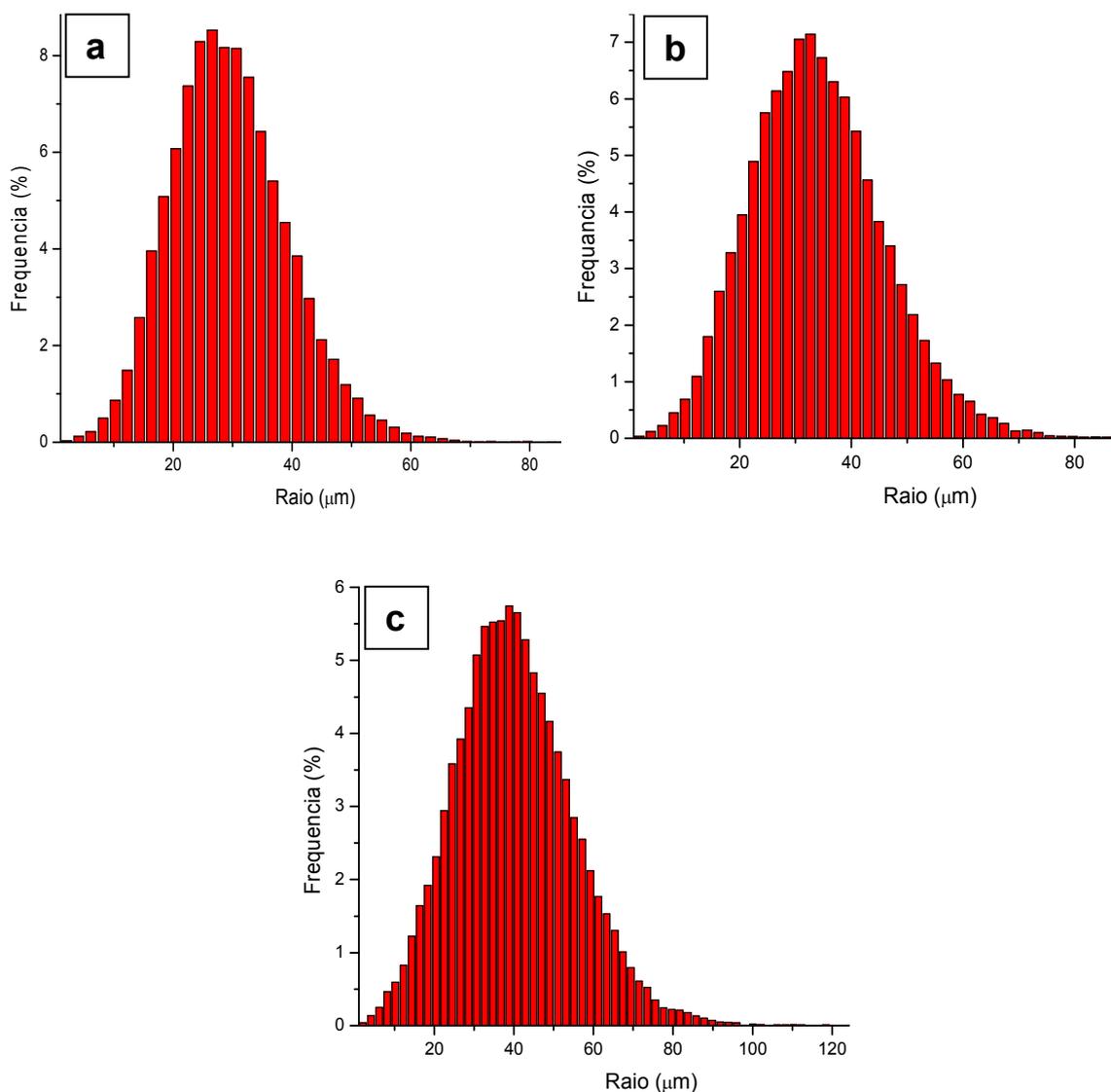


Figura 5.13: Distribuição do tamanho de poros obtidos por μCT , nas matrizes de quitosana com 0%, 10% e 20% m/m de vidro bioativo, (a), (b) e (c) respectivamente.

Imagens de MEV das matrizes híbridas com 10% de vidro bioativo (Fig. 5.14) revelaram uma microestrutura porosa e bastante homogênea, apresentando poros regulares com uma morfologia de predominância esférica/celular (fig 5.14b). Portanto, o resultado foi uma matriz com poros mais isotópicos principalmente nas regiões mais internas. Na Figura 5.14a foi observado o amostra da matriz fraturado revelando sua estrutura interior, mostrando também que de fato ocorrem diferenças na configuração dos poros. A região próxima à superfície da matriz apresenta um material mais denso e no interior um material mais poroso conforme indicado pelas setas. O tamanho de poros obtido na região analisada por MEV se

encontra entre 64,11 μm e 212,7 μm (Fig. 5.14c). As interconectividades foram identificadas na matriz 10% de vidro com cavidades mais profundas (Fig. 5.14d).

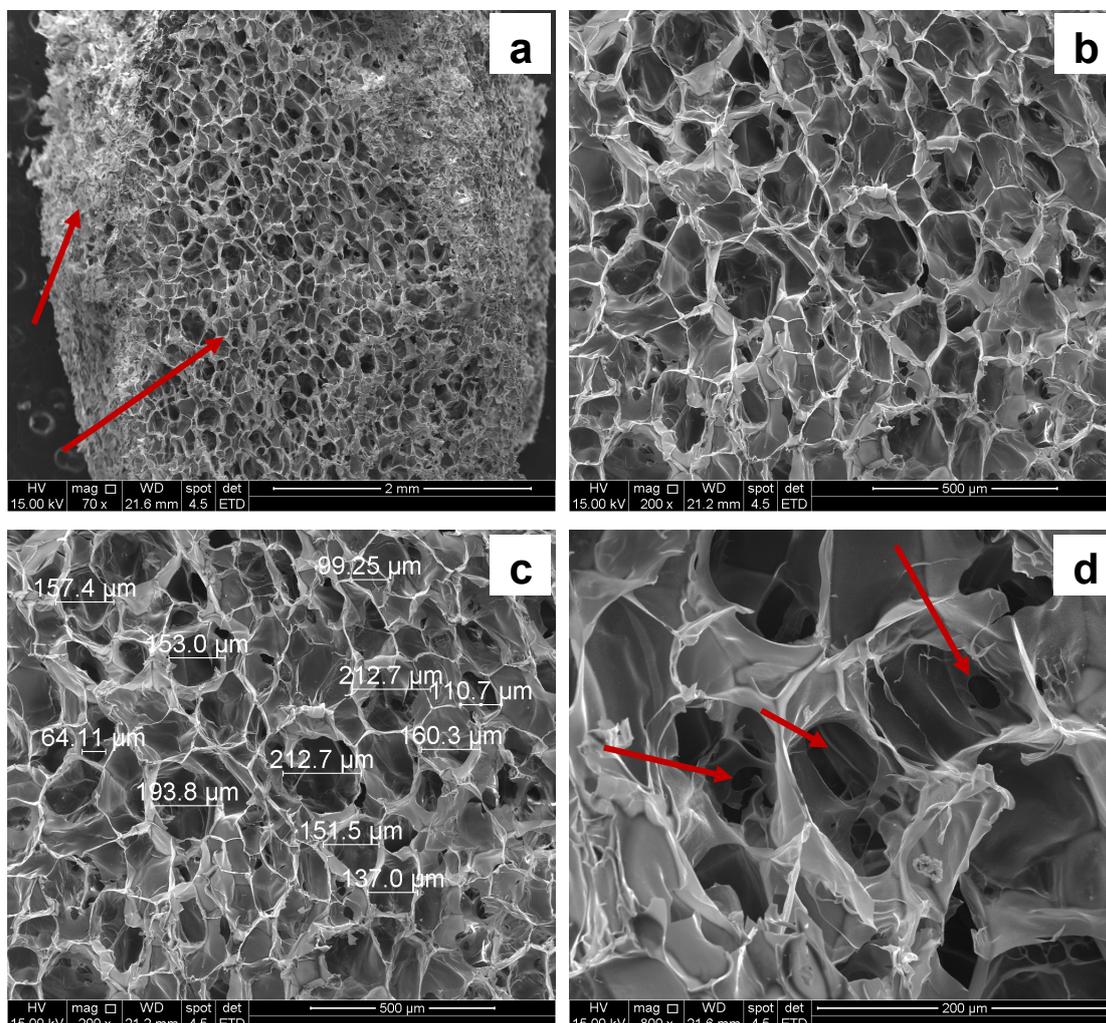


Figura 5.14: Imagens de MEV das matrizes com 10% de vidro bioativo: amostra da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 800x (d).

A porosidade total da matriz 10%VB obtida por μCT foi de $96,01 \pm 0,39 \%$ (Tab. 5.2) resultado similar ao percentual da matriz de quitosana pura. A distribuição do tamanho de poros mostrou uma predominância de 65% dos poros com dimensões entre 46 e 84 μm . A maioria dos poros apresentaram dimensões abaixo de 100 μm e o restante cerca de 35% dos poros apresentaram tamanhos variados com dimensões menos que 40 μm e mais que 100 μm (Fig. 5.13b).

Imagens de MEV da matriz com 20% de vidro (Fig. 5.15) revelaram uma morfologia na qual os poros sofreram um leve achatamento, o que pode ter sido ocasionado pelo manuseio que as amostras recebem durante seu preparo (a matriz foi congelada em nitrogênio líquido a -196°C e posteriormente fraturada para expor sua estrutura interior rica em poros) ou devido à própria configuração morfológica formada durante a síntese da matriz com 20% de vidro (Fig. 5.15b). O interior da matriz também apresenta regiões distintas com a superfície mais densa e o interior da matriz mais rico em poros (Fig. 5.15a). O tamanho de poros obtido na região analisada por MEV se encontra entre $90,34\mu\text{m}$ e $104,9\mu\text{m}$ (Fig. 5.15c). As interconectividades também foram observadas na matriz com 20% de vidro, mostrando uma quantidade significativa de cavidades (Fig. 5.15d).

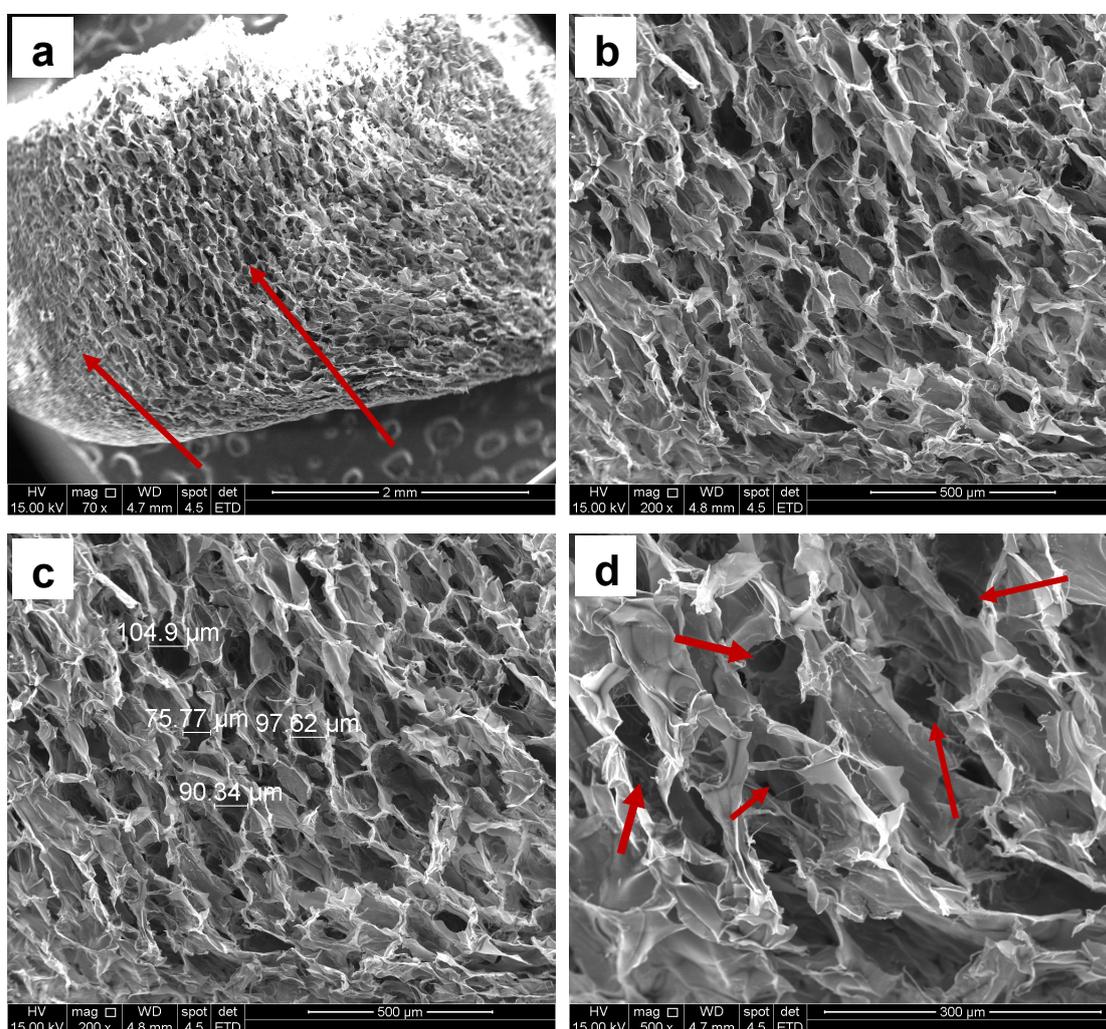


Figura 5.15: Imagens de MEV das matrizes com 20% de vidro bioativo: interior da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 200x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 500x (d).

As matrizes com 20% de vidro apresentaram uma porosidade total obtida por μCT de $95,74\% \pm 0,68$ (Tab. 5.2), ou seja, também bastante similar ao percentual da matriz de quitosana pura e da matriz de quitosana com 10% de vidro. A distribuição do tamanho de poros mostrou uma predominância de 60% dos poros com dimensões entre 50 e $110\mu m$. O restante cerca de 40% dos poros apresentaram tamanhos variados com dimensões menos que $40\mu m$ e mais que $140\mu m$ (Fig. 5.13c).

Imagens de MEV das matrizes com 30% de vidro bioativo (Fig. 5.16a) revelaram uma estrutura bastante compacta e densa que pode ser atribuída ao alto teor de vidro na sua composição.

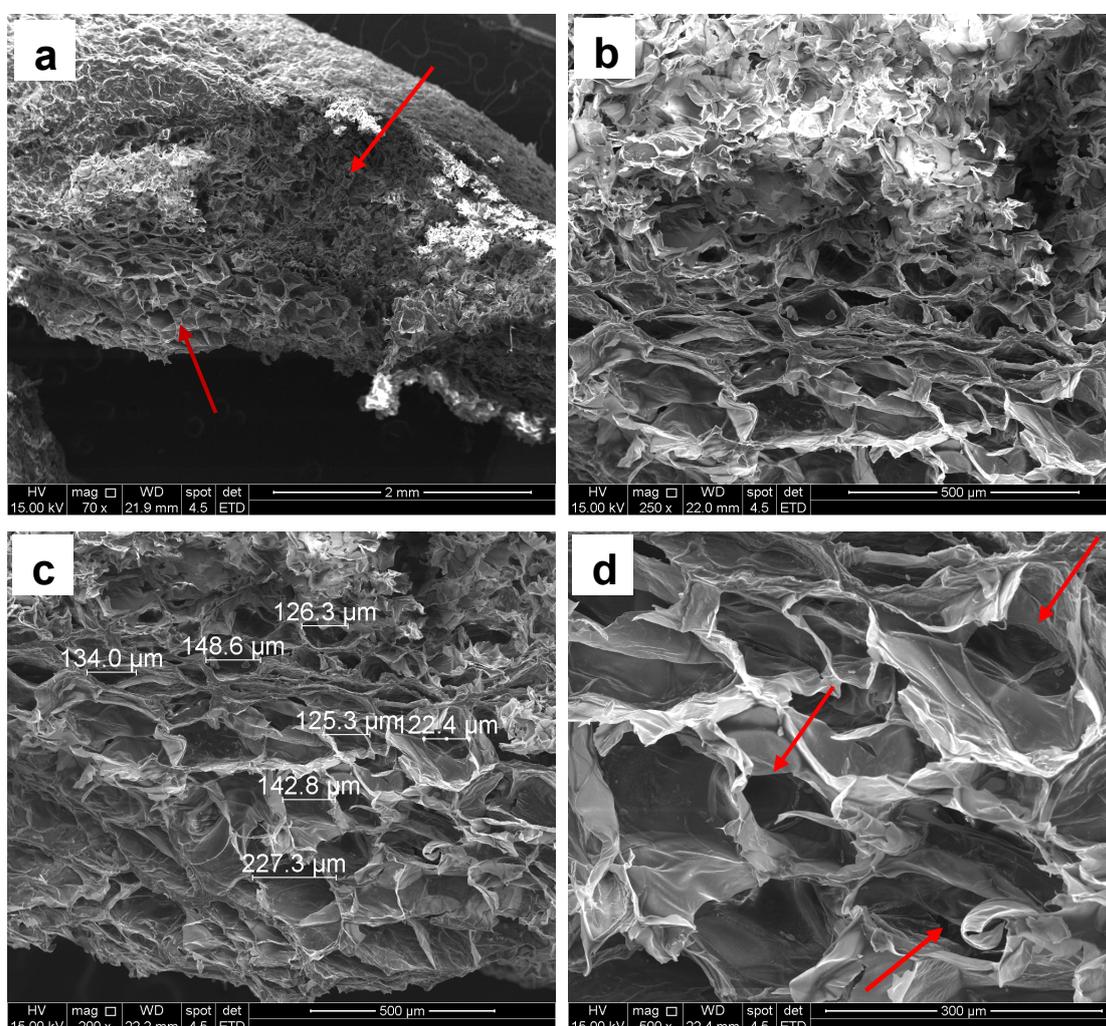


Figura 5.16: Imagens de MEV das matrizes com 30% de vidro bioativo: interior da matriz fraturado - 70x (a), morfologia dos poros - 250x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 500x (d).

Embora densa, foram observadas algumas regiões com poros mais uniformes e sua morfologia foi anisotrópica com predominância do aspecto alongado/achatado (Fig. 5.16b). O interior da matriz não apresentou regiões muito distintas. O tamanho de poros obtido na região analisada por MEV se encontra entre 122,4 μ m e 227,3 μ m (Fig. 5.16c). Pouca interconectividade foi observada na matriz com 30% de vidro com raras cavidades (Fig. 5.16d).

Nas matrizes com 10, 20 e 30% de vidro ocorreram diferenças na configuração dos poros, a região próxima à superfície da matriz apresentou-se como um material mais denso e no interior como um material mais poroso. Segundo S. Deville *et al.* (2006) normalmente para amostras de elevada porosidade (>64%), a microestrutura torna-se quase celular (interconectividades e paredes têm dimensões semelhantes). As paredes podem ter uma espessura muito fina (<5 μ m) para rápidas taxas de velocidade de resfriamento (>5°C/min) e sua espessura pode ser muito homogênea em todo o conjunto da amostra. A primeira zona da amostra (densa) em contato com a fonte de frio, ou seja, na sua superfície aconteceu uma cinética de congelamento mais rápido e o equilíbrio na difusão de calor demora a ser atingido. Assim, na interface do congelamento ocorre uma morfologia celular instável, resultando em pobres interconectividades de poros, com formação de material denso.

As diferenças que ocorrem nas morfologias dos poros das matrizes com 10 e 20% de VB em relação a matriz de quitosana pura, que apresenta um aspecto morfológico bastante indefinido, provavelmente está relacionada à adição de vidro em sua estrutura, pois todas as matrizes sofrem processo de síntese e liofilização idênticos. Segundo Al-Sagheer e Muslim (2010), híbridos formados a partir de quitosana e sílica apresentam um aumento na interação interfacial que leva a obtenção de melhores propriedades mecânicas. As interações entre a quitosana e o TEOS sugerem a formação de ligações de hidrogênio entre grupos amida da quitosana e os grupos silanol, ligações iônicas entre os grupos amina da quitosana e os grupos silanol, e ligações covalentes devido à esterificação de grupos hidroxilas da quitosana com os grupos silanol da rede de sílica (Fig.5.17).

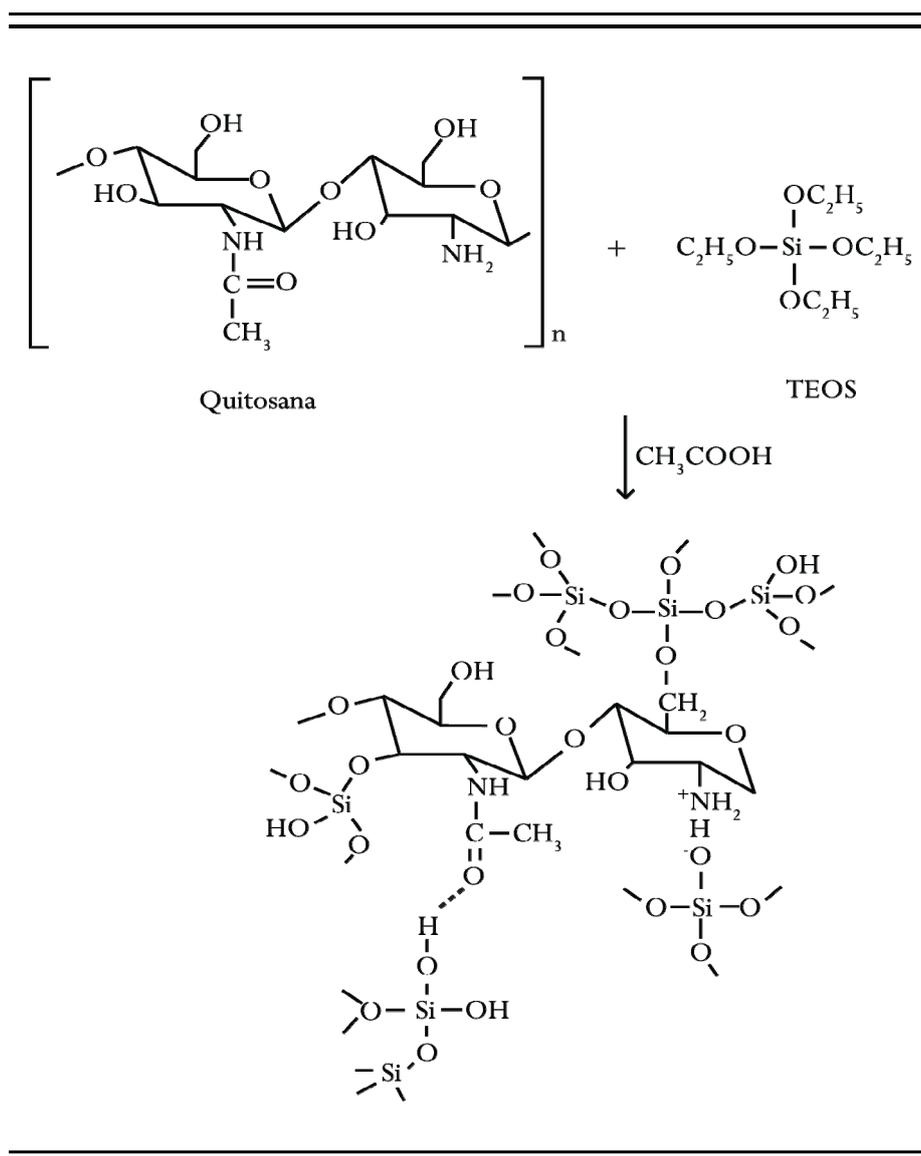


Figura 5.17: Sugestão esquemática proposta por Al-Sagheer & Muslim (2010), sobre a interação da quitosana e o precursor TEOS.

Não foi possível através de μCT obter resultados relativos a distribuição do tamanho de poros para a amostra com 30% de vidro bioativo. Embora nas imagens de MEV mostre razoável porosidade.

5.4.2 Morfologia e Porosidade das Matrizes Nanocompósitas de Qui-BGNP

A estrutura de poros das amostras com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP é apresentada nas Figuras 5.18, 5.19, 5.20 e 5.21. Nas matrizes nanocompósitas não foi medido o percentual de porosidade e o tamanho de poros por μCT . No entanto, foi calculada a

porosidade aparente pela técnica da Balança de Arquimedes. Como já esperado devido ao alto volume de líquido contido nas matrizes de quitosana com 1% de BGNP (Fig. 5.18a) estas apresentaram elevada porosidade aparente com aproximadamente 62% (Tab. 5.3). Na superfície do filme foi observada uma morfologia com poros acentuadamente regulares com uma porosidade mais esférica/celular e com razoável regiões de interconectividades conforme indicado em imagem ampliada (Figura 5.18b). A superfície das paredes dos poros apresentou um aspecto homogêneo e liso. A faixa de tamanho de poros obtida na região analisada por MEV se encontra entre 131,4 μm e 330,9 μm .

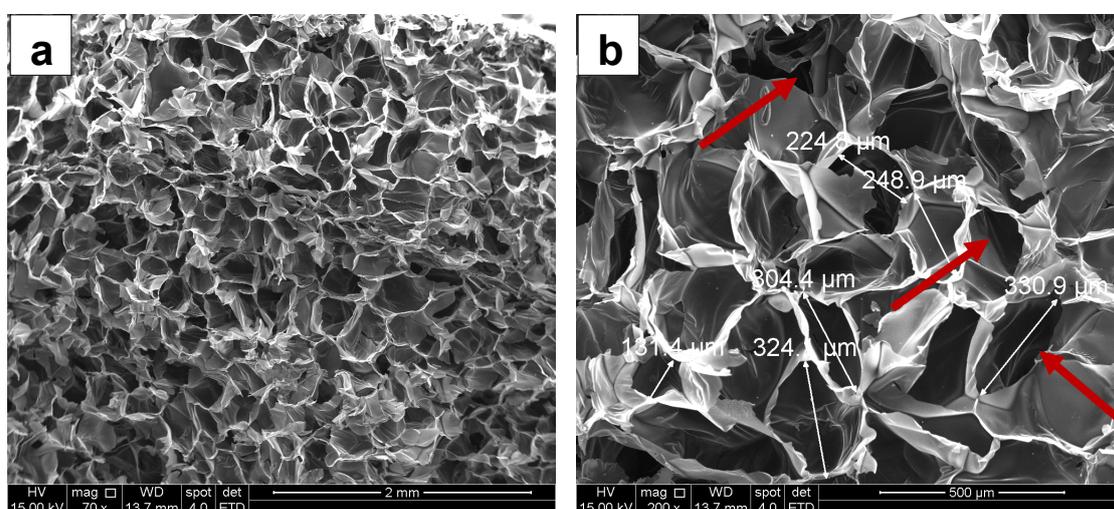


Figura 5.18: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 1% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros e cavidades das interconectividades - 200x (b).

Tabela 5.3: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por μCT e MEV.

Amostra	Porosidade		Tamanho médio de poros	Faixa de tamanho de poros
	aparente (%)	total * (%)	* (μm)	** (μm)
Qui 0%	72,08 \pm 2,0	96,03 \pm 0,36	50 – 80	63,1 – 192,3
Qui 1%BGNP	78,51 \pm 2,9	x	x	131,4 – 330,9
Qui 3%BGNP	77,68 \pm 6,1	x	x	160,6 – 445,9
Qui 5%BGNP	63,43 \pm 2,3	x	x	89,1 – 237,0
Qui10%BGNP	62,25 \pm 1,6	x	x	108,1– 254,6

* Obtidos por μCT

** Obtidos por MEV

Imagens de MEV das matrizes com 3% de BGNP apresentaram uma morfologia homogênea com poros uniformemente distribuídos e também apresentou uma estrutura altamente porosa atingindo aproximadamente $77,68 \pm 6,10$ % (Tab. 5.3). A faixa de tamanho de poros obtida na região analisada por MEV foi de 160,6 a 445,9 μm . Embora essa faixa tenha sido escolhida aleatoriamente, foi possível perceber que o tamanho dos poros atingiu valores elevados em relação às demais composições das matrizes, mesmo em relação as matrizes híbridas, chegando a 445,9 μm . Também foram observadas algumas interconectividades com cavidades profundas conforme indicado pelas setas (Fig. 5.19b).

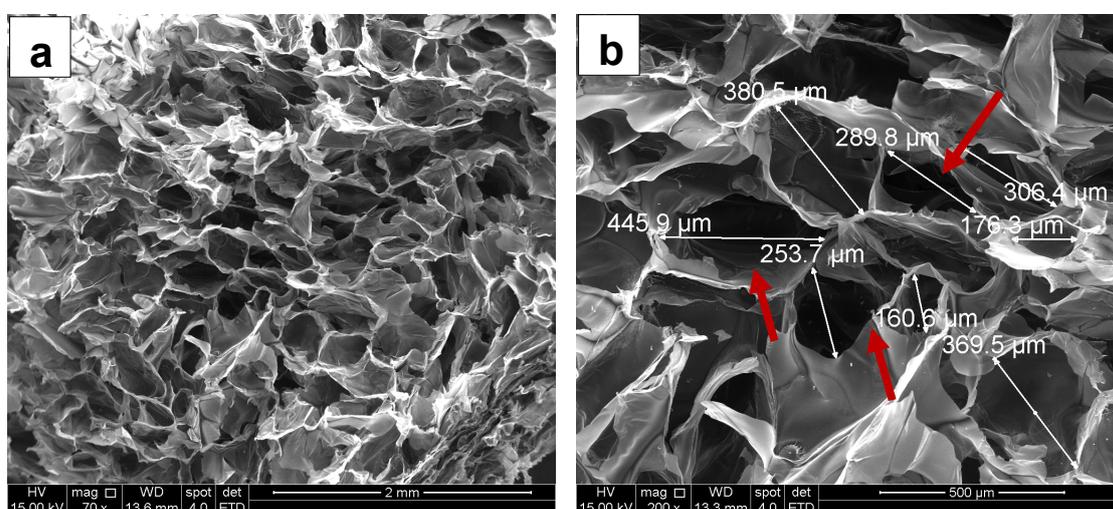


Figura 5.19: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 3% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros e cavidade das interconectividades - 200x (b).

No entanto, na matriz de 5% de BGNP (Fig. 5.20) a porosidade reduziu para $63,43\% \pm 2,3$ e a faixa de tamanho de poros obtida na região analisada por MEV foi bem inferior em relação a matriz com 3%, reduzindo para 89,1 a 237 μm (Tab. 5.3). A morfologia também foi bastante satisfatória contendo poros uniformes e interconectividades.

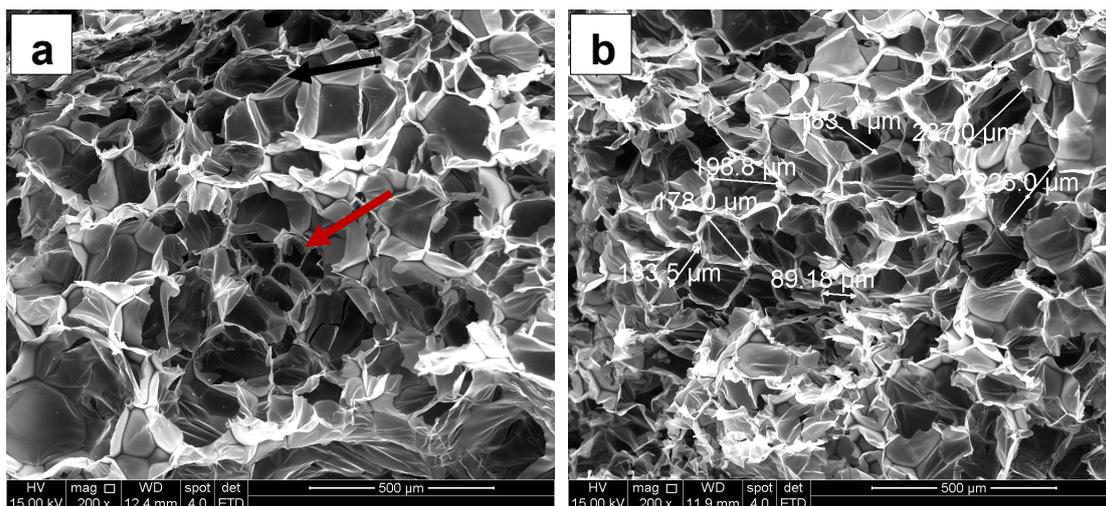
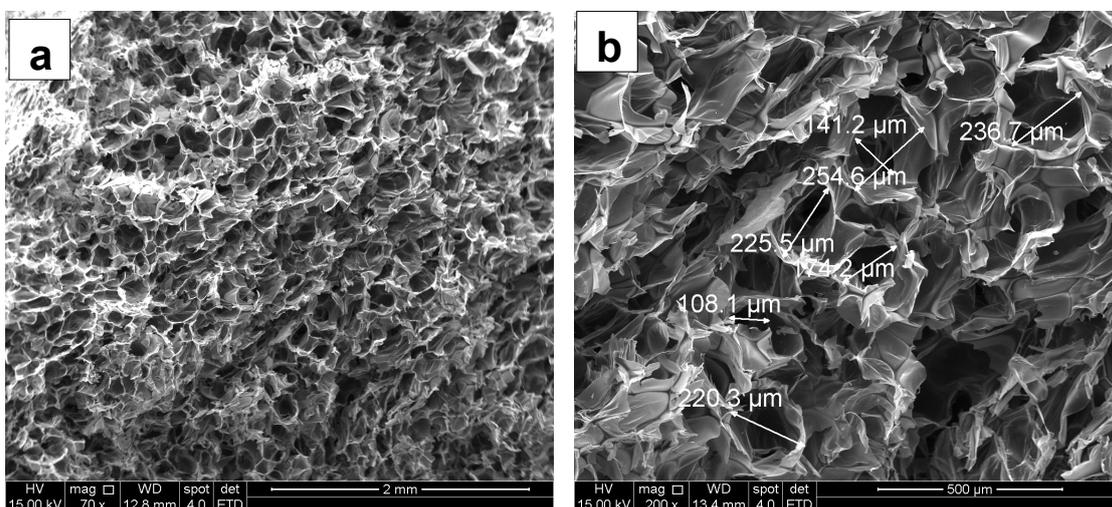


Figura 5.20: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 5% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 200x (a), tamanhos dos poros e cavidade das interconectividades - 200x (b).

A matriz com 10% de BGNP (Fig. 5.21) apresentou um valor de porosidade aparente bem próximo da matriz contendo 5%, aproximadamente de $62,25\% \pm 1,6$ e com uma faixa de tamanho de poros obtida na região analisada por MEV de 108 – 254 μm , também bastante similar a de 5% (Tab. 5.3).



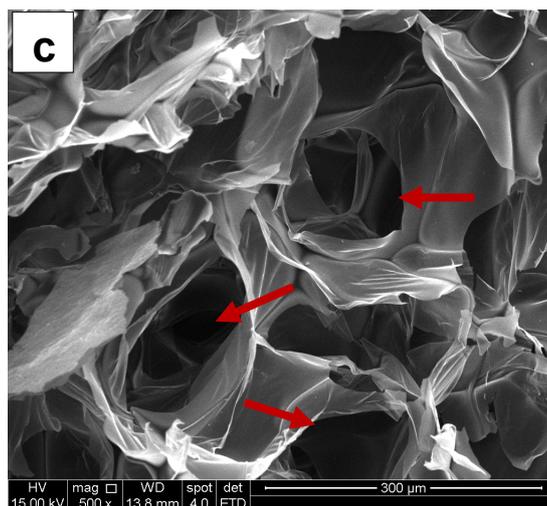


Figura 5.21: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 10% de BGNP: morfologia dos poros da matriz fraturada - 70x (a), tamanhos dos poros 200 x (b) e cavidade das interconectividades - 500x (c).

Um aspecto importante que foi observado na formação da porosidade nas matrizes foi justamente a influência da taxa de congelamento do líquido no tamanho final e na morfologia dos poros. De modo comparativo foi realizada um ensaio de congelamento apenas das matrizes nanocompósitas com 10% de BGNP em duas temperaturas diferentes. Após gelação das matrizes elas foram submetidas ao congelamento no refrigerador à -20°C (Fig. 5.21) e no nitrogênio líquido à -196°C (Fig. 5.22), ou seja, com baixa e alta taxa de congelamento, respectivamente. O resultado obtido revelou que o tamanho dos poros foi modificado principalmente através do aumento ou diminuição da velocidade de congelamento. Portanto, para altas taxas de congelamento ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a matriz com 10% de BGNP obteve tamanho de poros com dimensões inferiores em relação a matriz obtida a -20°C . O tamanho de poros foi medido aleatoriamente por MEV e alcançou apenas a faixa de 22,8 a 29,1 μm , enquanto as matrizes que foram congeladas com baixas taxas ($<1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), obtiveram poros variando de 124,2 a 254,6 μm . Ocorreram também diferenças na microestrutura dos poros que apresentaram uma morfologia lamelar cilíndrica, conforme Figura 5.22 (Ren, *et al.*, 2001, 2002; Kang, *et al.*, 1999; Ho, *et al.*, 2004; Shirotsaki, *et al.*, 2008).

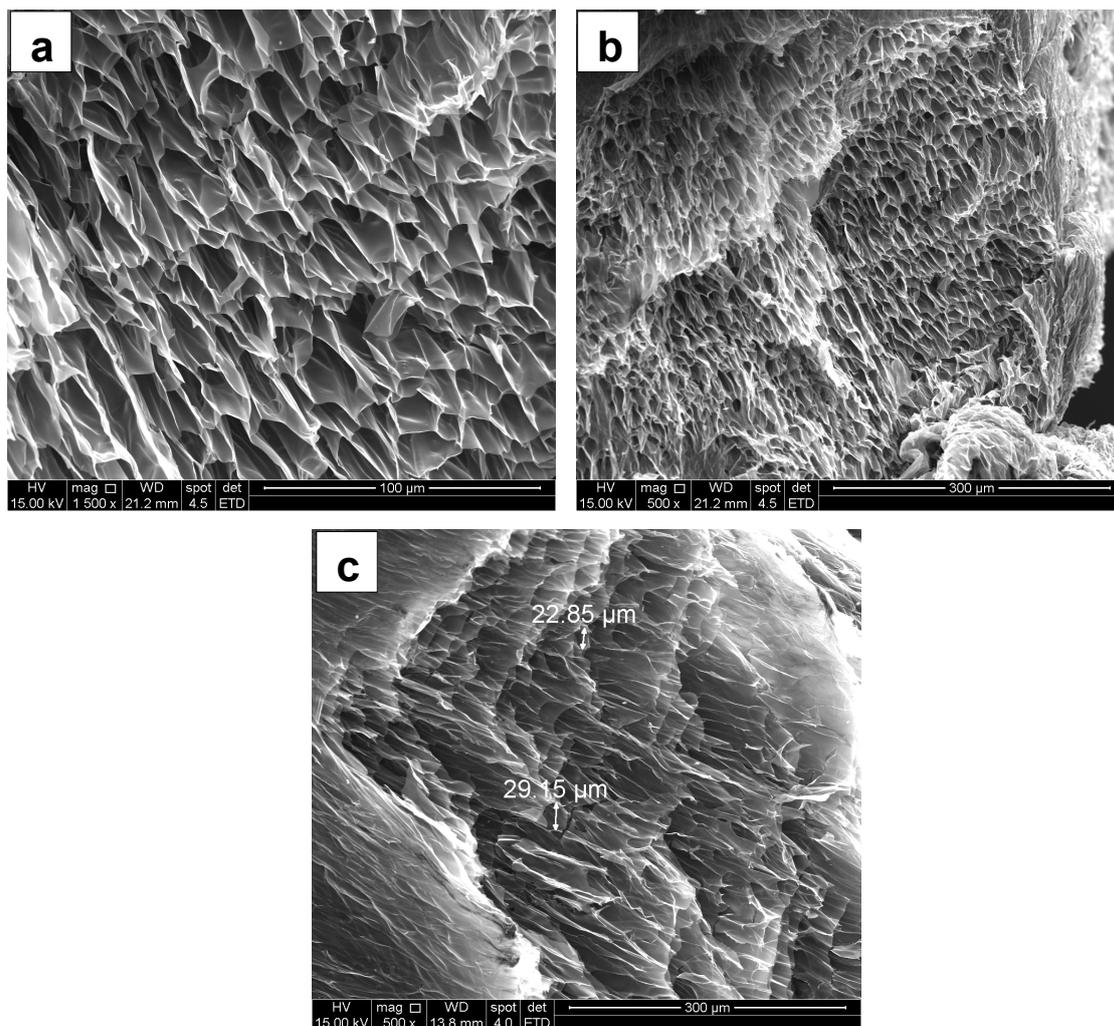


Figura 5.22: Imagens de MEV das matrizes de quitosana com 10% de BGNP congeladas em nitrogênio líquido a -196°C : matriz fraturada 1500x (a), 500x (b), tamanho de poros 500x (c).

5.4.3 Morfologia e Porosidade das Matrizes Qui- PVA- VB

Comparando-se a matriz de quitosana contendo PVA (Fig. 5.23b) com as matrizes de quitosana pura foi possível identificar uma porosidade mais homogênea na matriz contendo PVA, que embora seja anisotrópica, podem-se distinguir as unidades ou cavidades dos poros. Ao contrário, na quitosana pura as cavidades e paredes dos poros estavam desorganizadas com aspecto de laminas (Fig. 5.23a). Diferenças significativas na estrutura dos poros das matrizes de quitosana com PVA e 20% de vidro bioativo foram observadas comparadas à matriz de quitosana pura e a quitosana com PVA, a qual apresentou uma morfologia com alta uniformidade, paredes e cavidades bem definidas e organizadas (Fig. 5.23c).

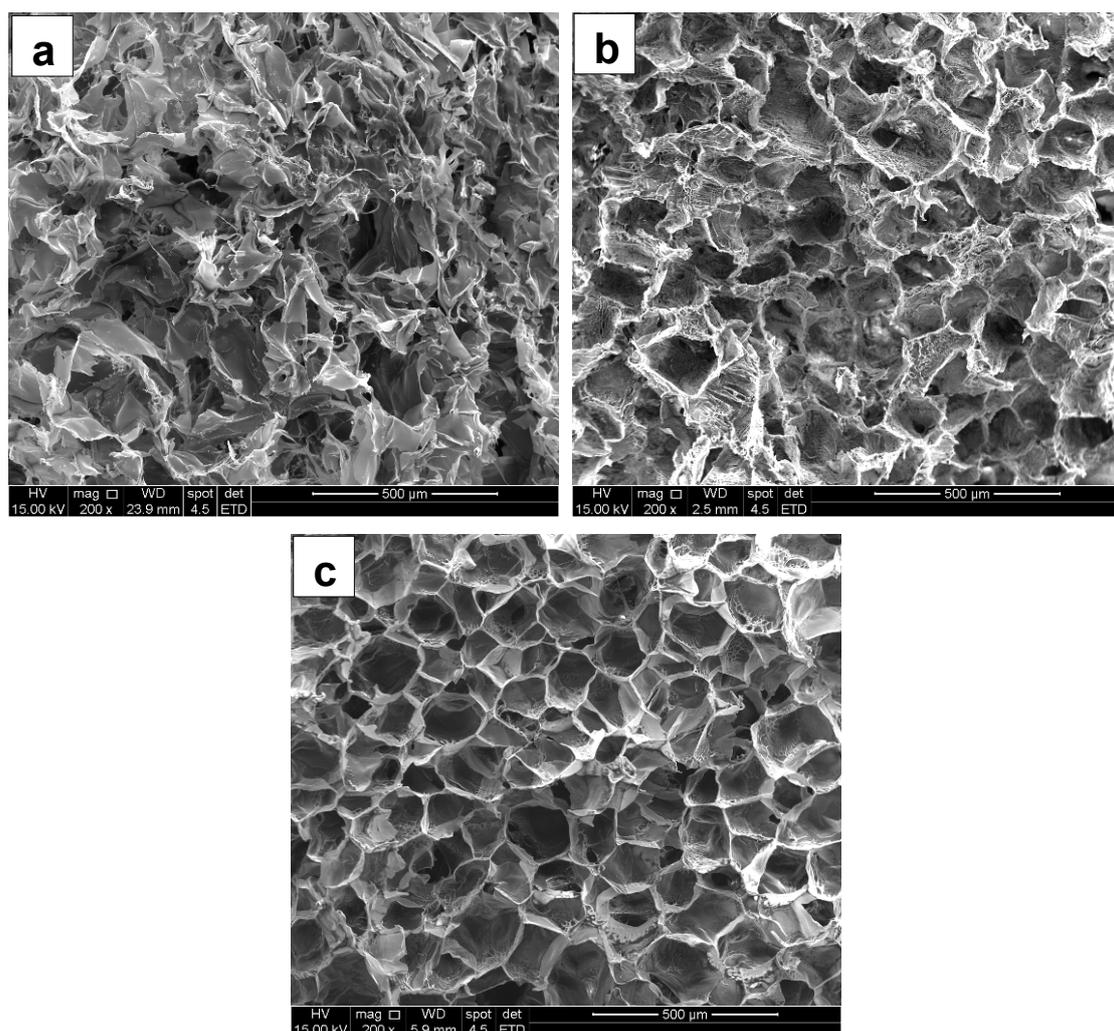


Figura 5.23: Imagens de MEV mostrando as diferenças morfológicas de poros das matrizes compostas por quitosana pura - 200x (a), quitosana com PVA - 200x (b), e por quitosana com PVA e 20% de vidro bioativo - 200x (c).

O tamanho de poros das matrizes de quitosana e PVA obtido na região analisada por MEV se encontra entre 98,50μm e 167,3μm. Foram observadas interconectividades na estrutura dos poros conforme indicado na Fig. 5.24b, revelando uma quantidade significativa de cavidades. As paredes dos poros dessa matriz não apresentam um aspecto tão liso quanto o das matrizes que não contém PVA.

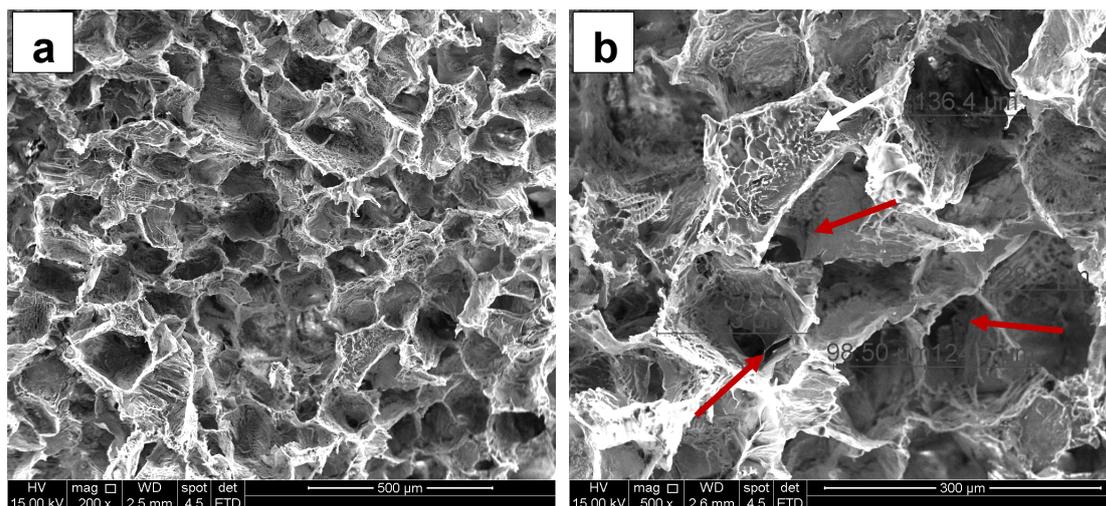


Figura 5.24: Imagens de MEV da matriz de quitosana e PVA: corpo da matriz fraturado - 200x (a), diâmetro dos poros e interconectividades - 500x (b).

As matrizes de quitosana e PVA apresentaram uma porosidade total obtida por μCT de $93,62\% \pm 0,52$ (Tab. 5.4). Portanto a blenda contendo Qui- PVA não apresentou um percentual total de porosidade significativamente diferente em relação aos demais valores obtidos para as matrizes que contém vidro. A distribuição do tamanho de poros mostrou uma predominância de 70% dos poros com dimensões entre $40\mu m$ e $86\mu m$ (Tab. 5.4). O restante cerca de 30% dos poros apresentaram tamanhos variados com dimensões $<30, >100\mu m$ conforme Figura 5.25a.

Tabela 5.4: Percentual de porosidade e tamanho de poros obtidos por μCT e MEV.

Amostra	Porosidade		Tamanho de poros	Faixa de tamanho de poros
	Aparente (%)	Total * (%)	* (μm)	** (μm)
Qui Pura	$72,08 \pm 2,0$	$96,03 \pm 0,36$	50 – 80	63,14 – 192,3
Qui-PVA	$91,68 \pm 1,7$	$93,62 \pm 0,52$	40 – 86	98,50 – 167,3
Qui-PVA-20%VB	$68,02 \pm 4,3$	$95,56 \pm 0,51$	40 – 120	78,68 – 176,3

* Obtidos por μCT

** Obtidos por MEV

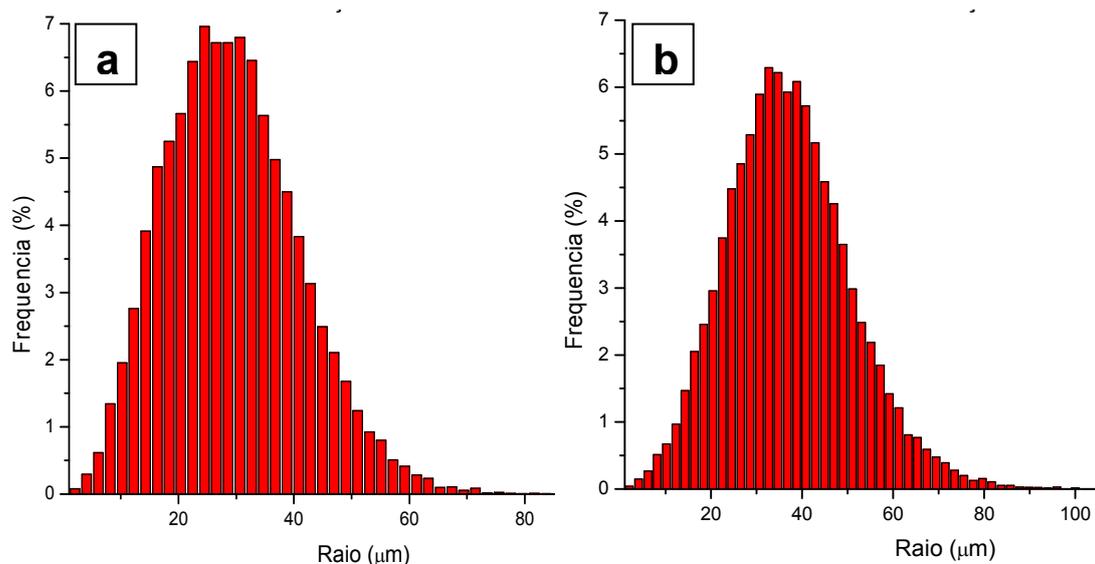


Figura 5.25: Distribuição do tamanho de poros da matriz de Qui-PVA (a) e da matriz de Qui-PVA 20%VB (b) obtidos por μCT .

As matrizes de quitosana com o PVA e 20% de vidro bioativo (Fig. 5.26) apresentaram uma morfologia muito homogênea com poros extremamente bem definidos, regulares, sendo mais isotópicos, com uma porosidade mais esférica/celular e com muitas regiões de interconectividades conforme indicado na Figura 5.26d. A superfície das paredes dos poros apresentou pouca rugosidade. O tamanho de poros obtido na região analisada por MEV se encontra entre 78,68 μm e 176,3 μm (5.26 c).

As matrizes de quitosana e PVA contendo 20% de vidro bioativo apresentaram uma porosidade total obtida por μCT de $95,56 \pm 0,51$ % (Tab. 5.4) também bastante similar ao percentual da matriz de quitosana pura. A distribuição do tamanho de poros mostrou uma predominância de 80% dos poros com dimensões entre 40 μm e 120 μm e o restante cerca de 20% dos poros apresentaram dimensões maiores que 20 μm e menores que 140 μm conforme Figura 5.25b. Assim a matriz compósita de quitosana, PVA e 20% de vidro bioativo oferece requisitos que atenda a engenharia de tecido ósseo na produção de biomateriais.

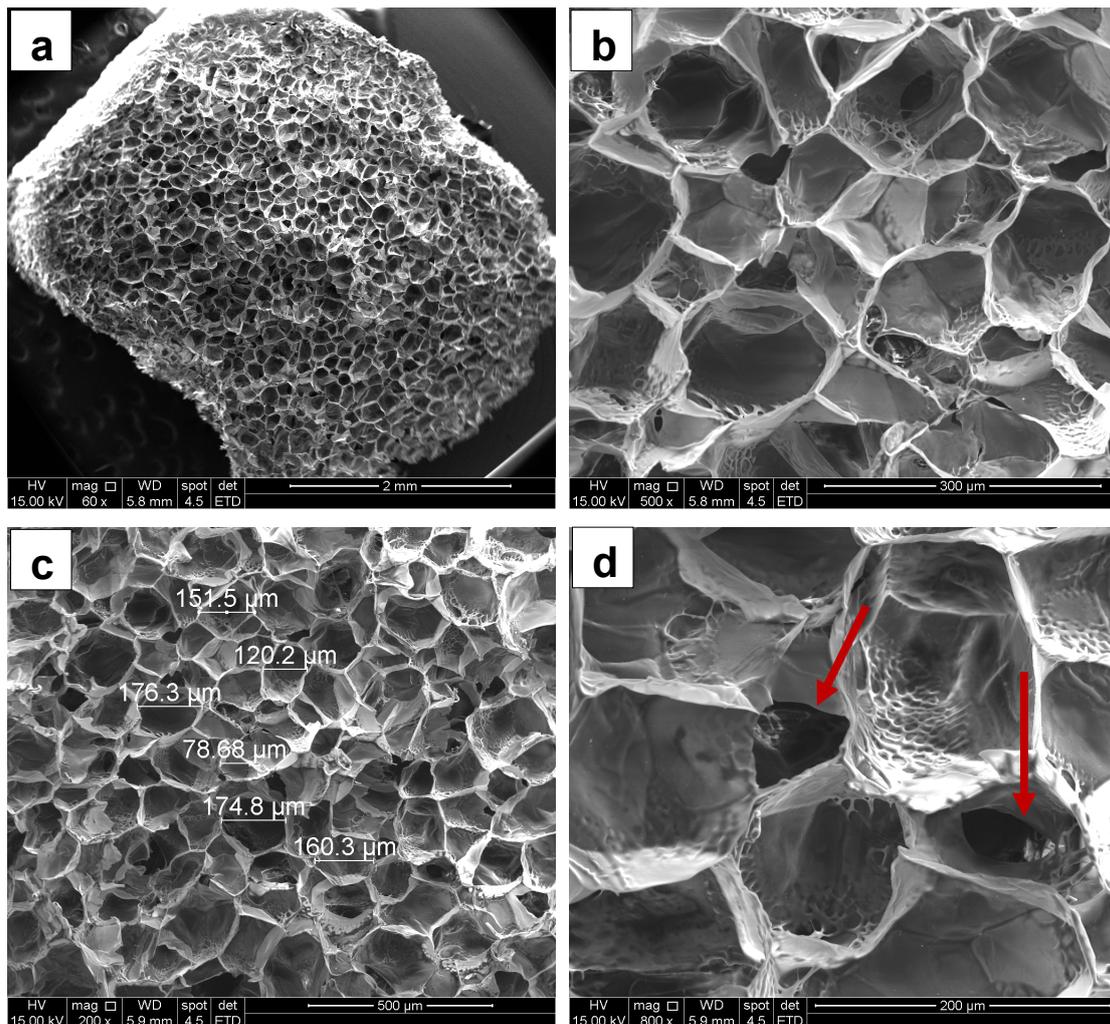


Figura 5.26: Imagens de MEV da matriz de quitosana e PVA com 20% de vidro bioativo: corpo da matriz fraturado - 60x (a), morfologia dos poros - 500x (b), tamanhos dos poros - 200x (c) e interconectividades - 800x (d).

Esta matriz com PVA em comparação as demais matrizes de Qui-VB e Qui-BGNP obteve um resultado de porosidade adequado para a aplicação em engenharia de tecido. O percentual de 20%VB não possui excesso de material inorgânico e não compromete sua flexibilidade ao contrário do comportamento das matrizes com 30% de vidro. Por outro lado as matrizes sem vidro ficam saturadas de líquido não oferecendo configuração de poros com microestrutura homogênea e regular.

Klawitter e Hulbert em 1971 estabeleceram um tamanho mínimo de poros de 100 μm , o qual seria necessário para possibilitar crescimento de tecido ósseo mineralizado em estruturas cerâmicas. Porém em estudos mais recentes (Itala *et al.*, 2001) demonstrou que é possível afirmar que o crescimento ósseo ocorre em poros

tão pequenos, próximos de 50 μ m. Outros resultados da literatura, semelhantes a estes, mostraram um crescimento ósseo em poros com dimensões entre 5 a 15 μ m consideradas dimensões específicas para o crescimento de fibroblastos e 40 a 100 μ m para o crescimento de osteócitos (Tithi *et al.*, 2003; Whang, Joseph & Bonfield, 1998). Além disso, Itala *et al.*, (2001) também demonstra que matrizes porosas com diferentes tamanhos de poros (50, 75, 100 e 125 μ m) testadas em defeitos ósseos de ratos permitiram crescimento de tecido ósseo mineralizado ao contrário de outros resultados da literatura relatando que apenas poros menores (10 a 75 μ m) são penetrados por tecido fibroso (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

O percentual de porosidades típicas para matrizes de HA descritas na literatura variam entre 35% e 75% com tamanhos de poros entre 50 μ m e 400 μ m (Deville *et al.*, 2006; Tamai *et al.*, 2002; Simske *et al.*, 1997). De forma mais detalhada outros estudos da literatura revelam que o tamanho de poros de 5 μ m seria necessário para permitir revascularização, de 20 μ m para o crescimento de hepatócitos, de 20 a 125 μ m para a regeneração de tecido epitelial e de 100 a 350 μ m para permitir regeneração óssea (Yang *et al.*, 2001; Whang, Joseph & Bonfield, 1998). A preponderância de poros grandes pode tornar o material do implante bastante fraco. Além disso, mesmo pequenos movimentos no implante podem causar complicações cortando o fornecimento de sangue para o tecido nos poros, o que pode conduzir a inflamação. Foram relatados também que suportes de matrizes porosas tem, mesmo para pequenas porosidades, revelado que a conectividade dos poros e orientação dos mesmos são tão importantes quanto o tamanho de poros (Kawachi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Reis, 2007). Portanto, a variação de porosidade relatada neste trabalho pode ser bem adequada para a aplicação em regeneração óssea

5.5 Ensaio de Tração dos Filmes Híbridos Qui-VB

A Figura 5.27 apresenta o comportamento mecânico da curva de tensão x deformação relativa para filmes de quitosana pura, com 10% e com 20% m/m de vidro bioativo, todos reticulados com glutaraldeído. Foi observado que os filmes com vidro bioativo diminuem seu percentual de deformação enquanto

gradualmente aumentam sua resistência a tração. De modo geral, o comportamento das curvas tensão x deformação são típicas de um material plástico. Podemos considerar também a hipótese de ter ocorrido escoamento em regiões não definidas principalmente nos filmes com 0%VB. É possível que durante o escoamento do material, as cadeias poliméricas tenham sofrido um alinhamento, aumentando a cristalinidade do híbrido o que conduz ao fortalecimento localizado. Conseqüentemente, existiu uma resistência continuada à deformação nestes pontos de escoamento (Callister *et al*, 1991).

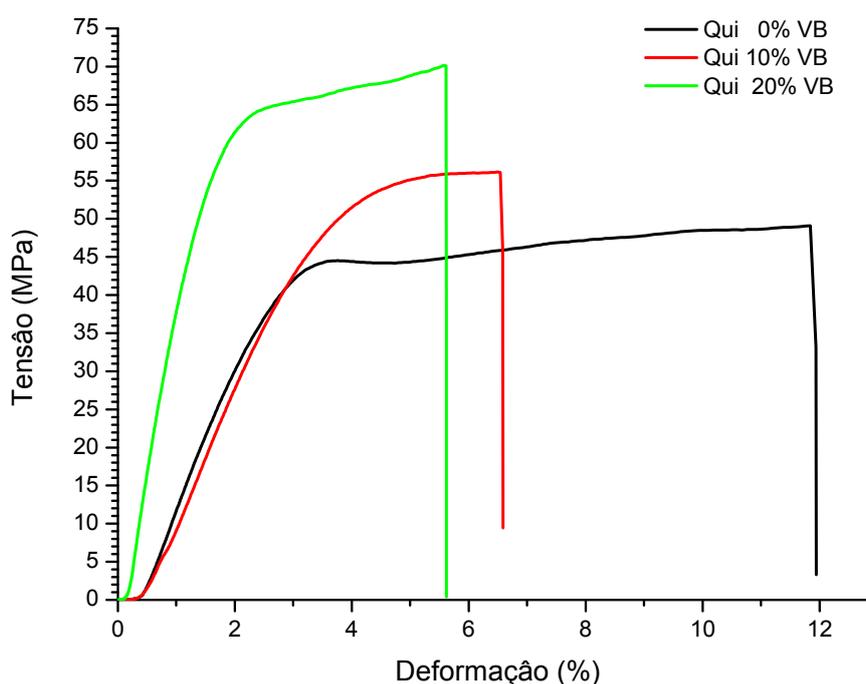


Figura 5.27: Curvas tensão x deformação dos filmes de quitosana pura e dos filmes híbridos com 10% e 20% m/m de vidro bioativo.

O filme de quitosana apresentou um valor de resistência máxima a tração de 42 MPa e deformação específica de 11% (Fig. 5.28, 5.29 e Tab. 5.5). A resistência máxima do filme com 10% de vidro bioativo foi aumentada para 53 MPa, enquanto sua deformação diminuiu para 5%. Já o filme contendo 20% de vidro sofre um aumento na resistência máxima a tração atingindo valores de 67 MPa, embora sua deformação diminua razoavelmente para 4%. Este fato ocorre devido às interações na rede polimérica com o vidro, a dispersão do sol na matriz de quitosana altera sua estrutura, deixando o híbrido com um comportamento menos flexível, diminuindo sua plasticidade em relação aos filmes que não sofreram adição de vidro bioativo.

A tensão e a deformação máxima dos filmes de quitosana pura e quitosana com vidro bioativo foram obtidas obtida pelas médias dos corpos de prova ensaiados ($n>6$), conforme Figuras 5.28 e 5.29.

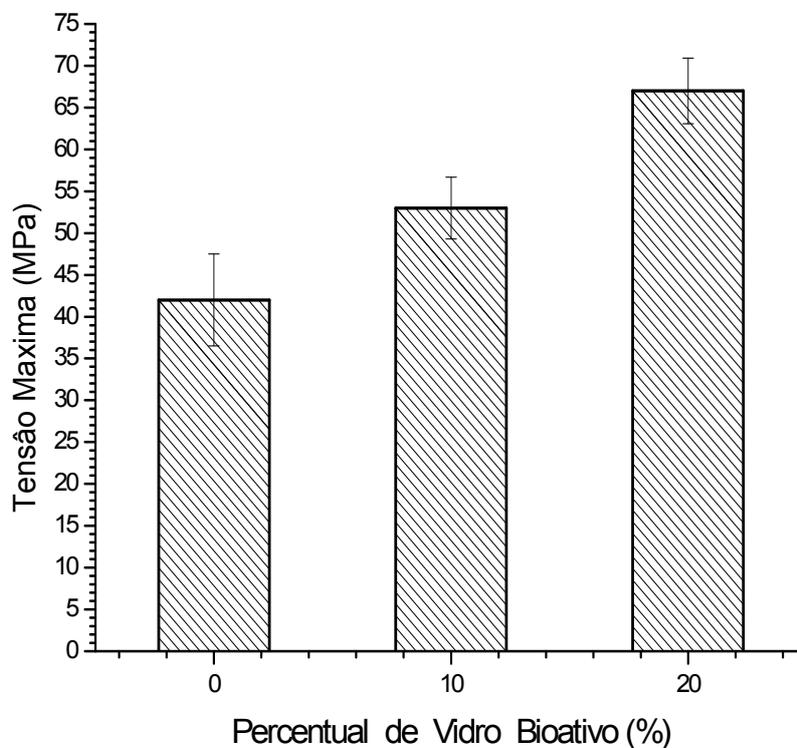


Figura 5.28: Influência do teor de vidro bioativo na tensão máxima dos filmes com 0, 10 e 20%VB.

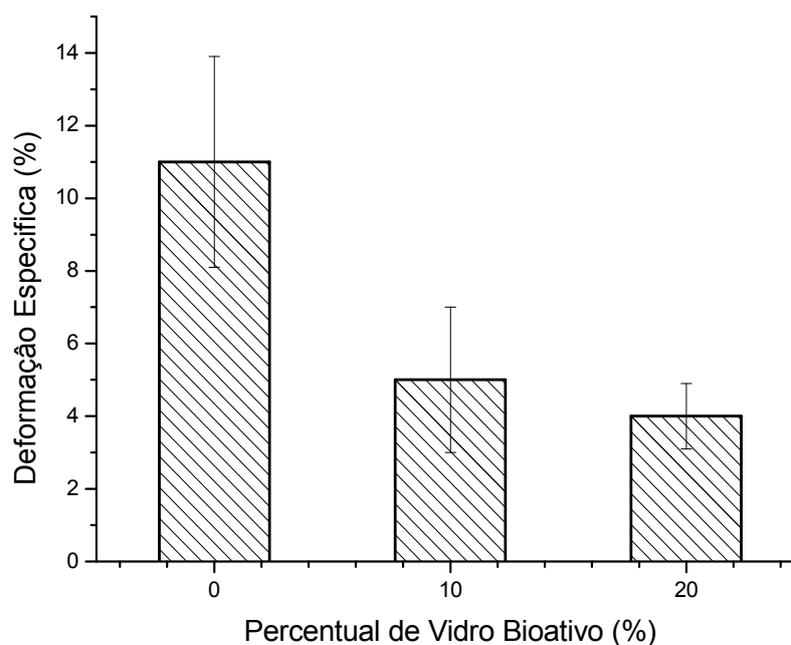


Figura 5.29: Influência do teor de vidro bioativo na deformação à tensão máxima dos filmes com 0, 10 e 20%VB.

Os resultados demonstram um melhor desempenho na resistência do híbrido com a introdução do vidro bioativo até determinado percentual, no máximo de 20%, não causando modificações como trincas ou defeitos que possam prejudicar a resistência dos filmes ensaiados. O ensaio de tração dos filmes contendo 30% de vidro não foi realizado devido a baixa flexibilidade que os filmes apresentaram após a síntese. Outro fator também limitante foi a retração que ocorreu na área superficial dos filmes, impedindo o corte regular dos corpos de prova desta composição.

5.6 Ensaios de Tração dos Filmes Nanocompósitos Qui-BGNP

A Figura 5.30 ilustra as curvas de tensão x deformação para filmes de quitosana com 1, 3, 5 e 10% de BGNP, todos reticulados com glutaraldeído. O comportamento nos ensaios de tração dos filmes nanocompósitos com BGNP é razoavelmente similar ao comportamento dos filmes híbridos com VB. Os filmes obtiveram um comportamento flexível e suas curvas de tensão x deformação são típicas de um material plástico (Callister *et al*, 1991).

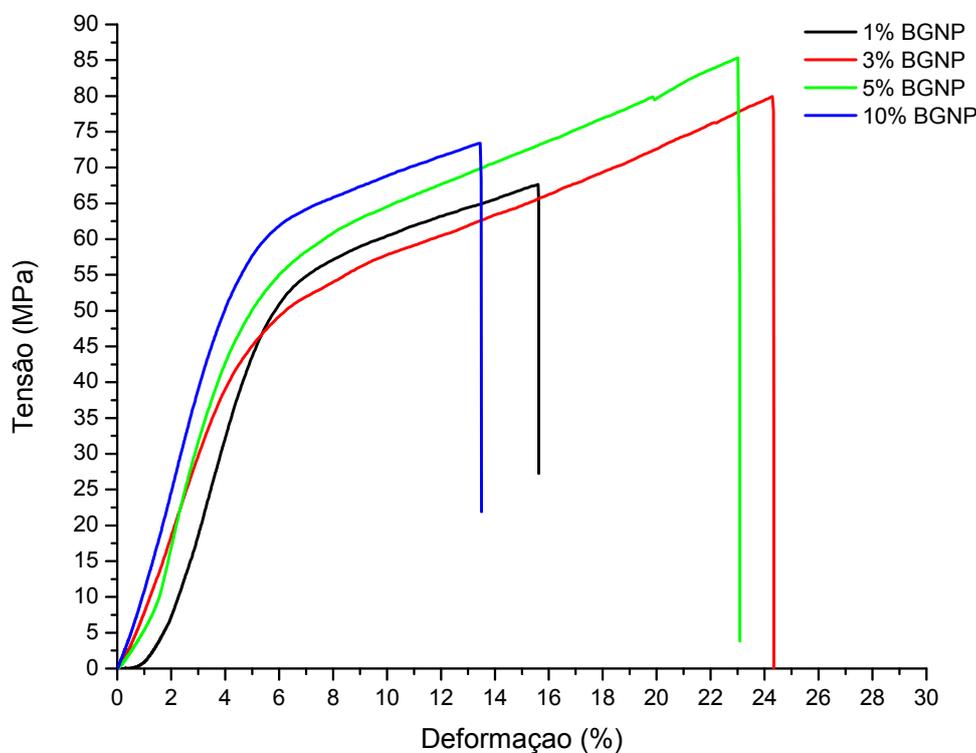


Figura 5.30: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes nanocompósitos de quitosana com 1, 3, 5 e 10% de BGNP.

As propriedades mecânicas dos filmes de nanocompósitos foram fortemente influenciados pelo conteúdo de BGNP e os resultados apresentaram alto desempenho em relação aos demais filmes híbridos ensaiados. Filmes com 3 e 5% de BGNP alcançaram valores de resistência máxima da ordem 73 e 80MPa, respectivamente. E sua deformação máxima também aumentou quando comparada com a quitosana atingindo percentuais de 22 e 21% para os filmes com 3 e 5% de BGNP, respectivamente (Fig. 5.31 e fig 5.32).

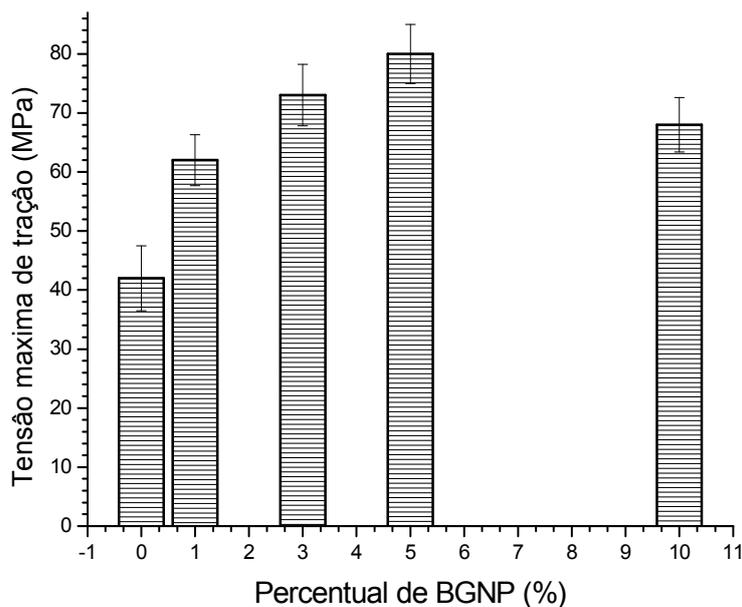


Figura 5.31: Influência das nanopartículas na tensão máxima dos filmes com 0, 1, 3, 5 e 10% de BGNP.

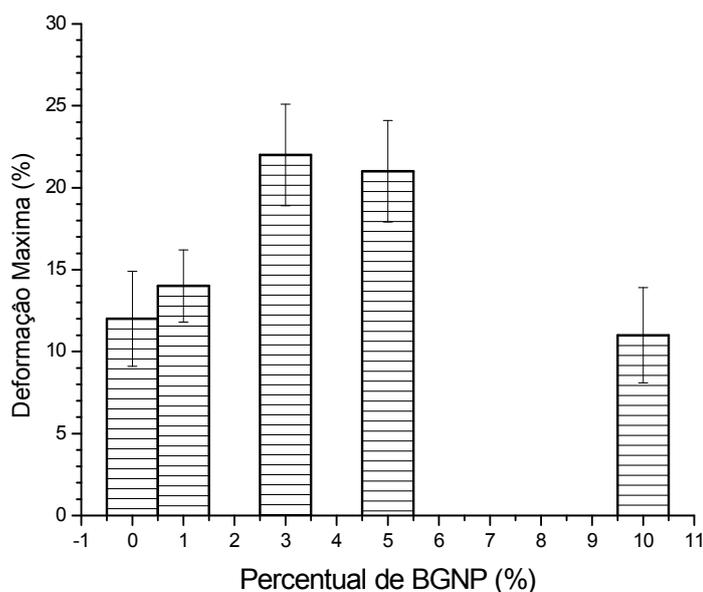


Figura 5.32: Influência das nanopartículas na deformação máxima dos filmes com 0, 1, 3, 5 e 10% de BGNP.

A tabela 5.5 apresenta resultados comparativos do comportamento mecânico de híbridos e nanocompósitos.

Tabela 5.5: Comparação dos valores médios de tensão e deformação máxima dos filmes nanocompósitos Qui-BGNP com os filmes híbridos Qui-VB.

Amostra (m/m)	Tensão máxima a tração (MPa)	Deformação máxima a tração (%)
Qui 0%	42,0 ± 5,5	12,0 ± 2,9
Qui 1% BGNP	62,0 ± 4,3	14,0 ± 2,2
Qui 3% BGNP	73,0 ± 5,2	22,0 ± 3,1
Qui 5% BGNP	80,0 ± 5,0	21,0 ± 3,1
Qui10% BGNP	68,0 ± 4,6	11,0 ± 2,9
Qui 10% VB	53,0 ± 7,0	5,0 ± 2,0
Qui 20% VB	67,0 ± 4,9	4,0 ± 0,9
Qui 30% VB	X	X

Verificou-se que os filmes com 5% m/m de BGNP foram capazes de resistir a uma tração máxima de 80 MPa enquanto que os filmes híbridos Qui-VB contendo 20% de vidro obtidos pela rota sol-gel alcançaram no máximo 67 MPa (Tab. 5.5). A diferença nos valores pode ser atribuída ao aumento da área superficial oferecido pelas nanopartículas o que resulta no aumento da área de contato com a superfície polimérica da quitosana.

Através da Figura 5.33 foi possível comparar percentuais similares de vidro, ou seja, filmes com 10%BGNP e 10%VB onde se verificou o melhor desempenho dos nanocompósitos em relação aos híbridos. Os filmes híbridos com 10%VB obtiveram valores de tensão máxima à tração de 53MPa, enquanto os filmes nanocompósitos alcançaram o valor de 67,0 MPa (Tab. 5.5).

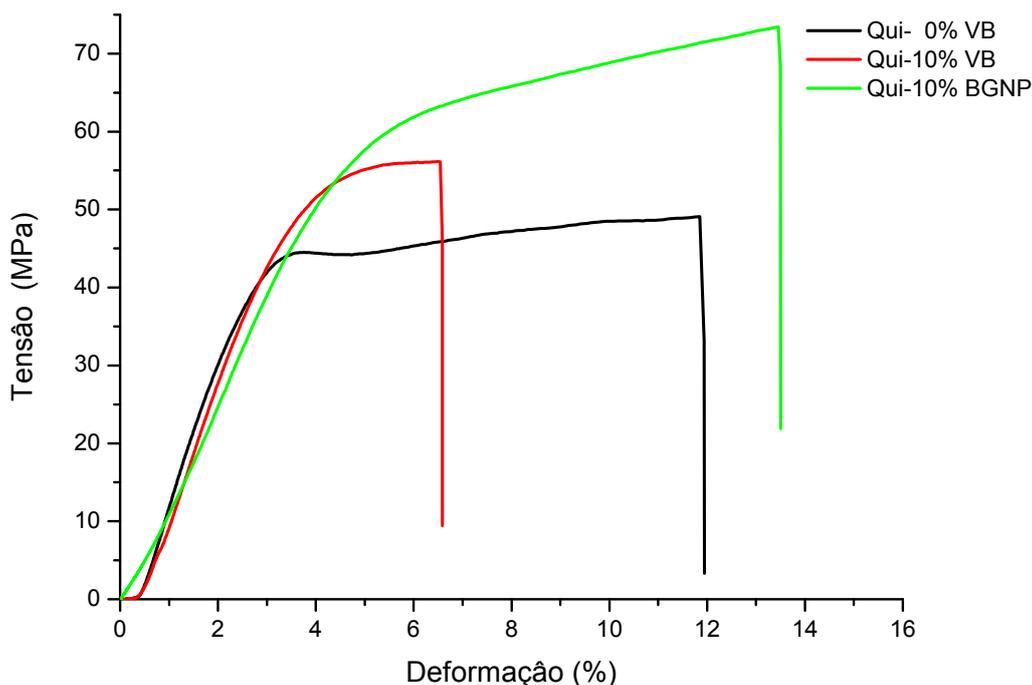


Figura 5.33: Comparação das curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes de Qui-0%VB, 10%VB com o filme 10% BGNP.

5.7 Ensaios de Tração dos Filmes Híbridos de Qui-PVA com 20% VB

A Figura 5.34 ilustra o comportamento das curvas de tensão x deformação para filmes de quitosana pura, Qui-PVA e para Qui-PVA contendo 20% m/m de VB, todos reticulados com glutaraldeído. Tal como esperado, os filmes contendo PVA sofrem um aumento na capacidade de deformação, porém por outro lado, sofrem perda de resistência a tração em relação aos filmes de quitosana pura e quitosana com vidro. O percentual de deformação foi significativamente superior nos filmes que continham PVA, aumentando de 12% (Qui 0%VB) para 28% (Qui-PVA), respectivamente.

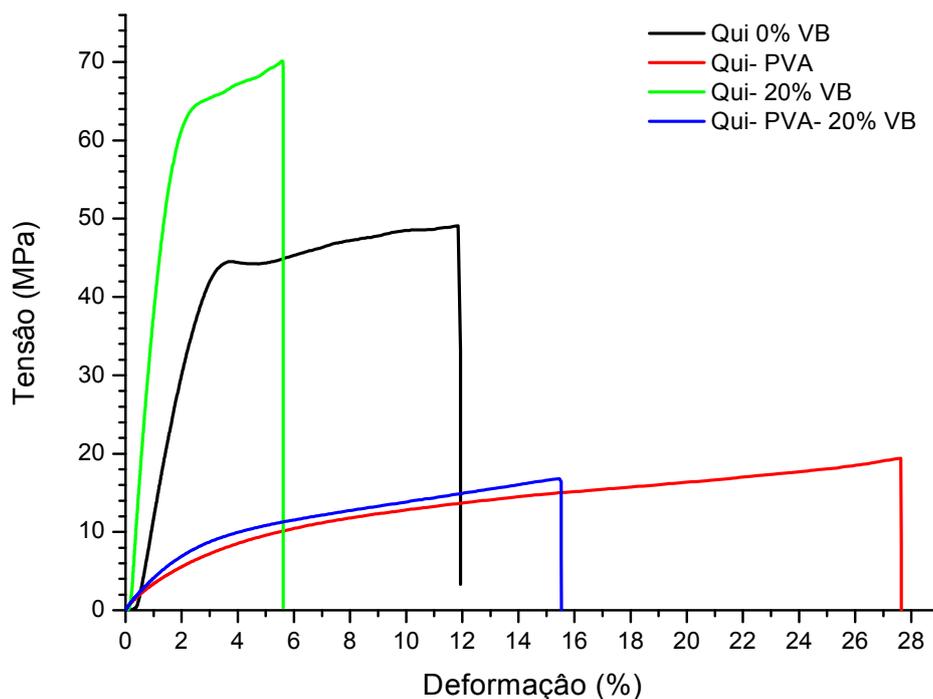


Figura 5.34: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de tração dos filmes de Qui-0%VB, Qui-PVA, Qui-20%VB e Qui-PVA-20%VB.

As Figuras 5.35 e 5.36 e a tabela 5.6 apresentam resultados comparativos do comportamento mecânico entre as blendas Qui/PVA e os híbridos Qui/PVA – 20%VB nos ensaios de tração. Pode-se perceber que, embora o PVA aumente a capacidade de deformação tanto nos filmes com quitosana quanto nos filmes com quitosana e vidro o PVA não permitiu melhorar as propriedades mecânicas dos híbridos (Qui-PVA-20%VB). Os resultados mostraram a diminuição tanto da tensão quanto da deformação. Isto mostra também que os materiais isolados como a quitosana pura obtiveram um desempenho mecânico com valores intermediários de tensão x deformação. Já a quitosana com 20% de vidro embora ganhe no aumento de resistência a tração perde muito na sua capacidade de deformação. Este resultado indica que podem ser utilizadas para a síntese de híbridos de quitosana vidros silicatos para melhorar as suas propriedades mecânicas.

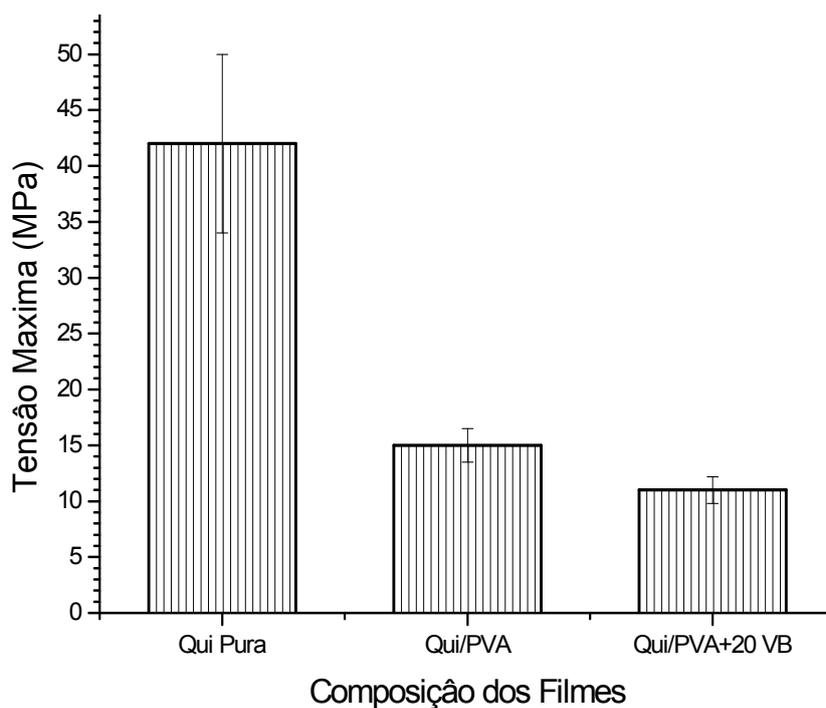


Figura 5.35: Influência do vidro bioativo e do PVA na tensão máxima dos filmes.

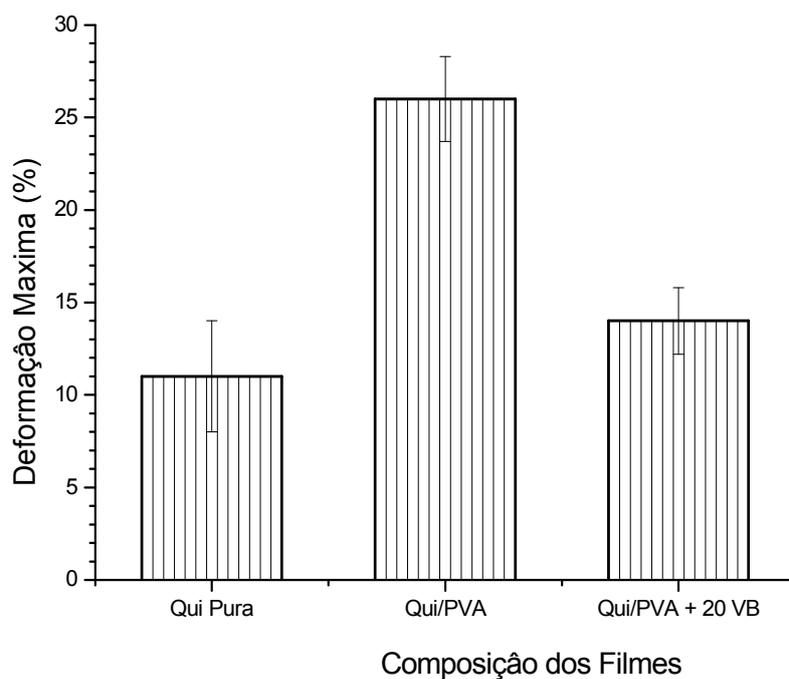


Figura 5.36: Influência do vidro bioativo e do PVA na deformação máxima dos filmes.

A tabela 5.6 apresenta resultados comparativos do comportamento mecânico entre as blendas Qui/PVA e os híbridos Qui/PVA-20%VB nos ensaios de tração.

Tabela 5.6: Valores médios de tensão e deformação máxima dos filmes.

Amostra	Tensão máxima a tração (MPa)	Deformação máxima a tração (%)
Qui 0% VB	42 ± 5,5	11 ± 3,0
Qui /PVA	15 ± 1,5	26 ± 2,3
Qui /PVA + 20% m/m VB	11 ± 1,2	14 ± 1,8

Os resultados comparativos do comportamento mecânico dos filmes híbridos e nanocompósitos apresentaram valores de resistência com uma elevada variação tanto na tensão máxima, quanto na deformação máxima. Foram obtidos valores que variaram de 11MPa correspondente aos filmes híbridos Qui/PVA+20%VB até 80MPa para os filmes nanocompósitos (Qui 5%BGNP). E também a variação da deformação máxima foi a elevada variação no percentual: 4% (Qui 20%VB) à 22% (Qui 3% BGNP). Possivelmente as nanopartículas de vidro bioativo interagiram com as cadeias lineares do polímero e em alguns filmes nanocompósitos (Qui - 1, 3 e 5% BGNP) elas contribuíram para o aumento da resistência atuando como agente de reforço. No entanto, quando o percentual de BGNP atinge cerca de 10% no nanocompósito seu comportamento torna-se inverso, o vidro funciona como concentrador de tensões e conseqüentemente diminui a tensão máxima e a deformação máxima dos filmes. Nanopartículas bem dispersas são muito menores que a dimensão da fissura crítica, não permitindo o início da falha nos polímeros. A ductilidade representa uma medida do grau de deformação plástica que foi suportado até a fratura. Um material que experimenta uma deformação plástica muito pequena ou mesmo nenhuma deformação plástica quando da sua fratura possui um comportamento frágil. A adição de cargas rígidas a um polímero frequentemente aumenta a sua resistência, mas diminui sua ductilidade como ocorreu nos híbridos com 10 e 20%VB. Estes filmes obtiveram valores de deformações inferiores aos demais filmes nanocompósitos e mesmo os filmes de quitosana pura obtiveram valores de deformação mais elevados atingindo o percentual de 12% (Callister, 1991 e Oliveira, 2011).

5.8 Ensaios de Compressão das Matrizes Híbridas Qui-VB

As amostras das matrizes de quitosana e vidro bioativo com 0, 10, 20 e 30% de vidro, todas reticuladas com glutaraldeído foram ensaiadas através de testes de compressão e o comportamento tensão x deformação foi apresentado na Figura 5.37. Também foi comparada a influência do PVA no comportamento mecânico das matrizes. As curvas obtidas demonstram que o material sofreu alteração de seu comportamento à medida que foi alterada sua composição, isto é, com o acréscimo de vidro bioativo.

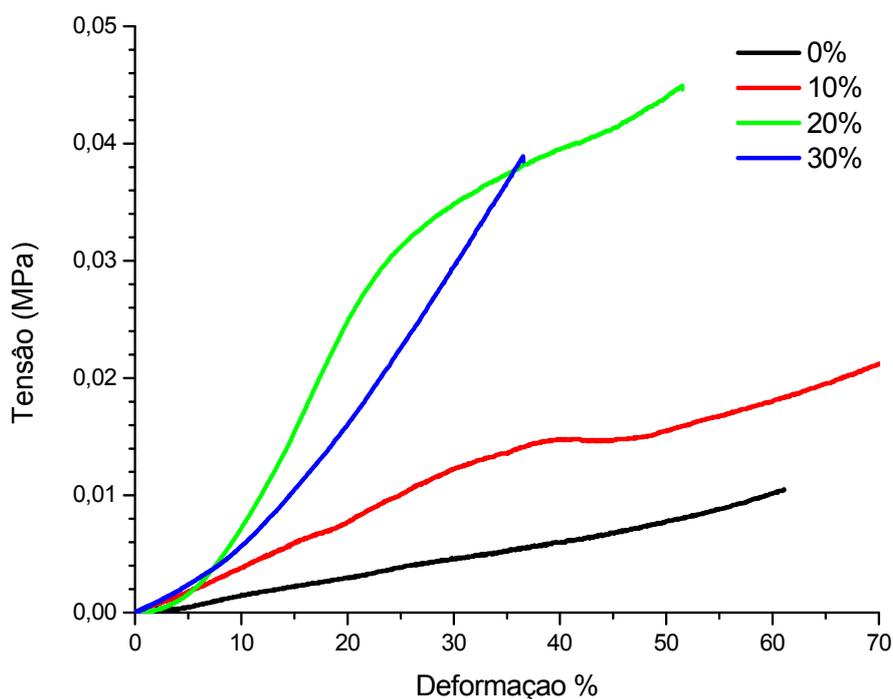


Figura 5.37: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes de Qui-0%VB e das matrizes híbridas com 10, 20, 30% m/m de VB.

Os valores médios de resistência e deformação máxima a compressão das matrizes são apresentados nas Figuras 5.38 e 5.39. A matriz de quitosana 0%VB apresenta um valor de resistência máxima a compressão de 0,011 MPa e deformação máxima de 59%. As matrizes com 10% de vidro bioativo obtiveram um crescimento na resistência a compressão, atingindo cerca de 0,019 MPa e ao contrário do comportamento dos filmes, embora não seja ideal a comparação, as matrizes com 10% de vidro obtiveram também um aumento na deformação para 68%.

As matrizes com 20% m/m de vidro aumentam seu limite de resistência máxima chegando a 0,041 MPa, mas diminui sua capacidade de deformação para cerca de 48%. A matriz com 30% m/m de vidro bioativo obteve uma diminuição na sua resistência a compressão caindo para cerca de 0,037 MPa e sua deformação diminuiu para 32%.

À medida que se aumenta o teor de vidro na matriz os valores das propriedades mecânicas alteram, comprovando que ocorre um aumento de resistência a compressão conforme acréscimo do vidro na rede polimérica. Porém o excesso de vidro leva a redução tanto da resistência quanto da capacidade de deformação. Os resultados dos ensaios apresentaram um limite de resistência à compressão que demonstram para a matriz com 10, 20 e 30% (m/m) de VB valores bem abaixo do limite de valor do osso trabecular na faixa entre 2-12 MPa, mas podemos afirmar que de fato, o vidro bioativo fornece aumento de resistência no híbrido e que o percentual mais favorável a ser acrescentado na matriz é 20% m/m, considerado razoável para gerar aumento de resistência sem no entanto, diminuir muito o percentual de deformação da matriz híbrida Qui-VB.

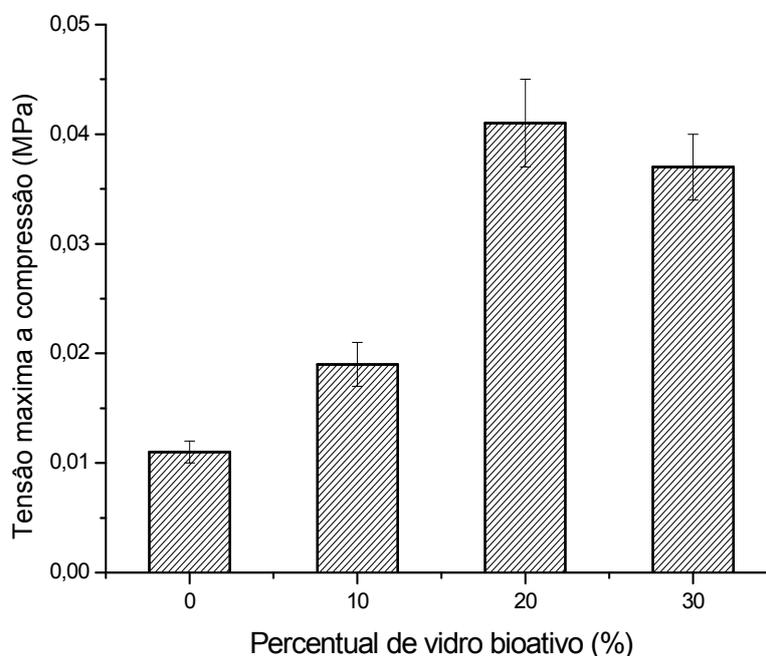


Figura 5.38: Influência do vidro bioativo na tensão máxima a compressão das matrizes com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB.

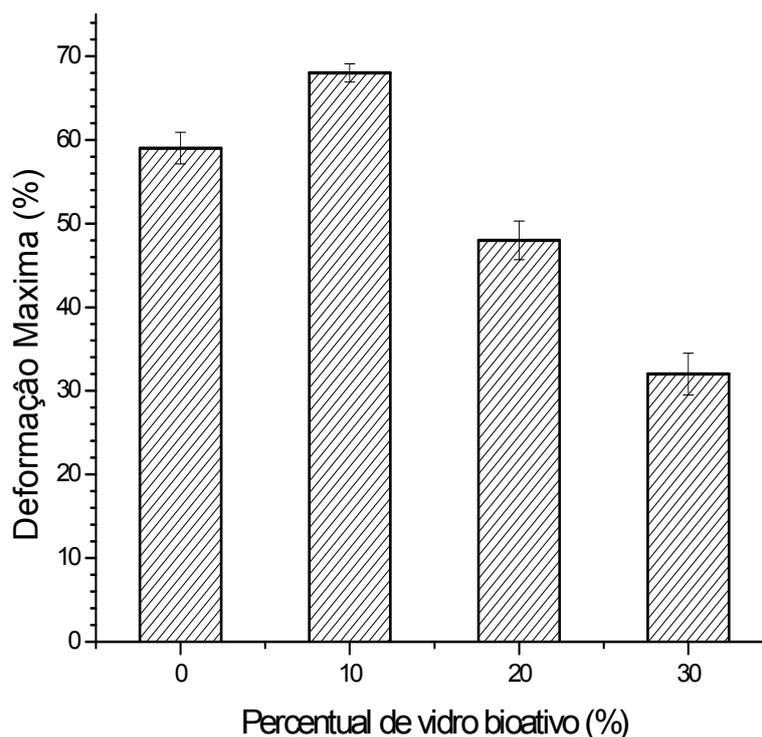


Figura 5.39: Influência do vidro bioativo na deformação máxima a compressão das matrizes com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB.

5.9 Ensaios de Compressão das Matrizes Nanocompósitas Qui-BGNP

O comportamento tensão x deformação das matrizes nanocompósitas de quitosana com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP, todas reticuladas com glutaraldeído, é apresentado na Figura 5.40. As curvas obtidas demonstraram que o material sofreu alteração no seu comportamento mecânico à medida que foi alterada sua composição. Os valores médios de resistência e deformação máxima a compressão das matrizes são apresentados nas Figuras 5.41 e 5.42.

As matrizes com 1 e 3% m/m de BGNP obtiveram valores de 0,05 e 0,04 MPa, respectivamente, na tensão máxima a compressão. Este resultado demonstra o bom desempenho na capacidade das nanopartículas na atuação como agentes de reforço das matrizes nanocompósitas. Além disso, as matrizes com 5% e 10% m/m de BGNP obtiveram um elevado aumento de resistência máxima a compressão, atingindo valores da ordem de 0,12 e 0,11 MPa respectivamente e sua capacidade máxima de deformação também aumentou atingindo valores bem significativos de 71% e 60%, respectivamente.

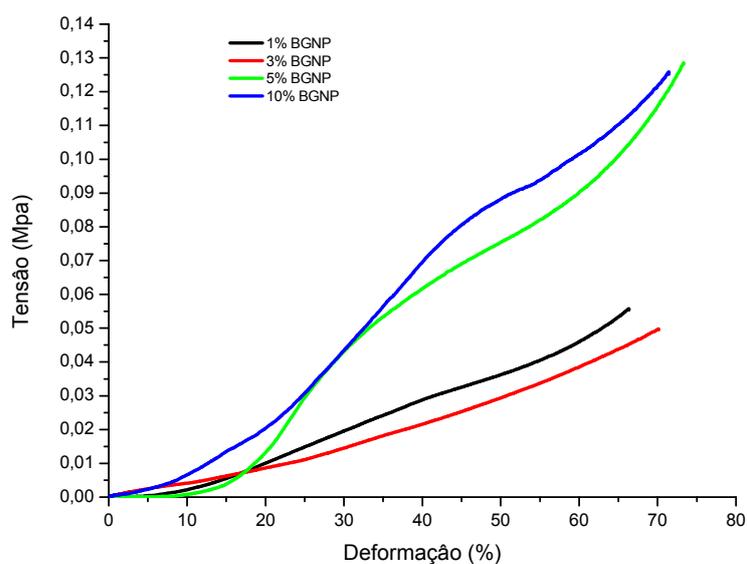


Figura 5.40: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.

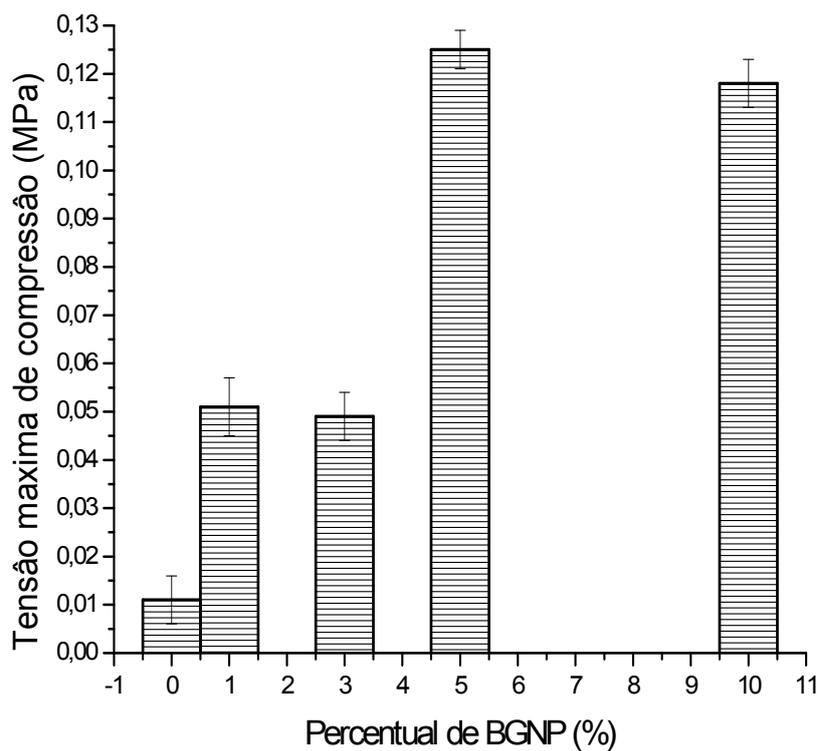


Figura 5.41: Influência das nanopartículas na tensão máxima de compressão das matrizes com 0, 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP.

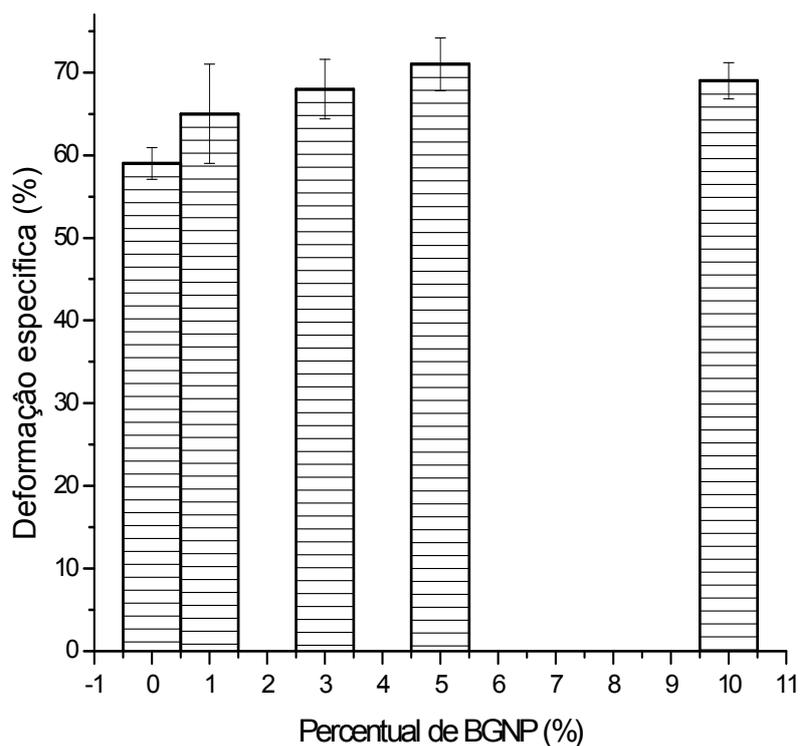


Figura 5.42: Influência das nanopartículas na deformação máxima das matrizes com 0, 1, 3, 5 e 10% de BGNP.

A tabela 5.7 apresenta resultados comparativos do comportamento mecânico das matrizes híbridas e matrizes nanocompósitas. Nota-se que os resultados das curvas de tensão x deformação para as matrizes com nanopartículas de vidro bioativo (BGNP) apresentaram um ganho nas propriedades de resistência. Os nanocompósitos com 1, 3, 5 e 10% de BGNP apresentaram maior tensão máxima de compressão em relação às demais matrizes de Qui-VB. Observa-se, no entanto, que os valores da deformação máxima obtidos para as matrizes nanocompósitas não foram tão distantes em relação aos resultados obtidos das matrizes híbridas.

Tabela 5.7: Comparação dos valores médios de tensão e deformação máxima das matrizes híbridas e nanocompósitas.

Amostra (m/m)	Tensão máxima a compressão (MPa)	Deformação máxima a compressão (%)
Qui 0%	0,011 ± 0,001	59 ± 1,9
Qui 10% VB	0,019 ± 0,002	68 ± 1,1
Qui 20% VB	0,041 ± 0,006	48 ± 2,3
Qui 30% VB	0,037 ± 0,005	32 ± 2,5
Qui 1% BGNP	0,051 ± 0,003	65 ± 6,0
Qui 3% BGNP	0,049 ± 0,004	68 ± 3,6
Qui 5% BGNP	0,125 ± 0,02	71 ± 3,2
Qui 10% BGNP	0,118 ± 0,03	69 ± 2,2

As matrizes produzidas são flexíveis, o que as torna facilmente moldada durante o implante cirurgico e adequado para utilização como suportes flexíveis em engenharia de tecidos em diversas aplicações (Oliveira, 2011). Todas as espumas ensaiadas tanto as híbridas quanto as nanocompósitas recuperaram suas dimensões iniciais.

5.10 Ensaio de Compressão das Matrizes de Qui/PVA com 20%VB

As matrizes de quitosana contendo PVA apresentaram um comportamento de tensão x deformação com elevados valores de deformação (Fig. 5.43). O resultado obtido demonstra que ocorreu pouca variação no percentual de deformação e um aumento de resistência a compressão bem significativo em relação a quitosana pura. O PVA aumenta a tenacidade da matriz alterando as propriedades mecânicas dos híbridos.

As Figuras 5.44 e Fig. 5.45 e a tabela 5.8 apresentam resultados comparativos do comportamento mecânico das matrizes com Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB. As matrizes de Qui/PVA apresentaram um valor de resistência a compressão de

0,023 MPa e deformação de 55%. Os resultados das curvas de tensão x deformação relativa para matrizes de Qui-PVA e 20%VB reticuladas com glutaraldeído foram maiores em relação à resistência máxima e obteve pouca redução na capacidade de deformação. Estas matrizes apresentaram um valor de resistência a compressão de 0,042 MPa e deformação de 45%.

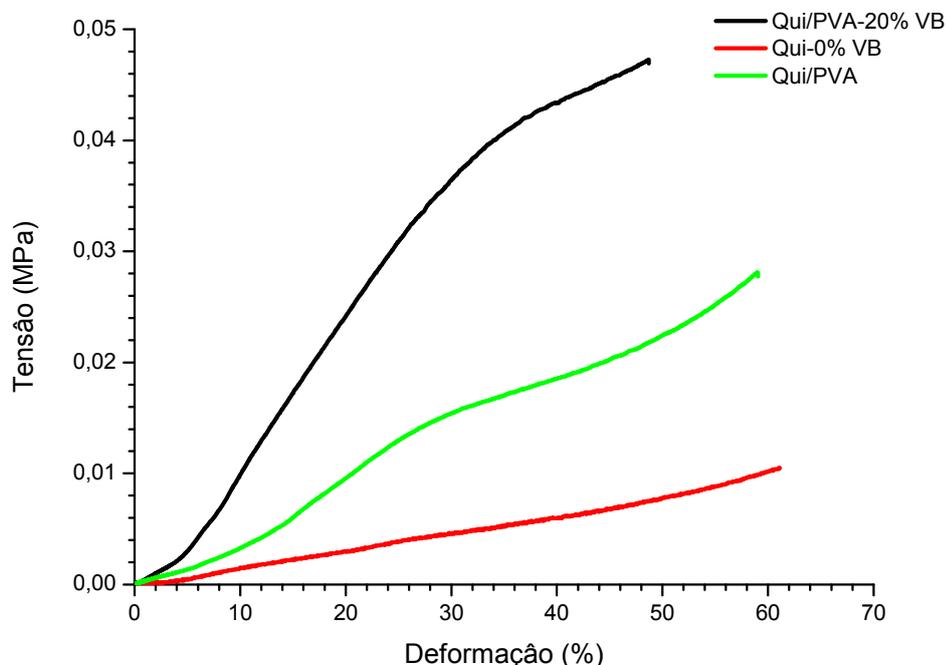


Figura 5.43: Curvas tensão x deformação obtidas do ensaio de compressão das matrizes com Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.

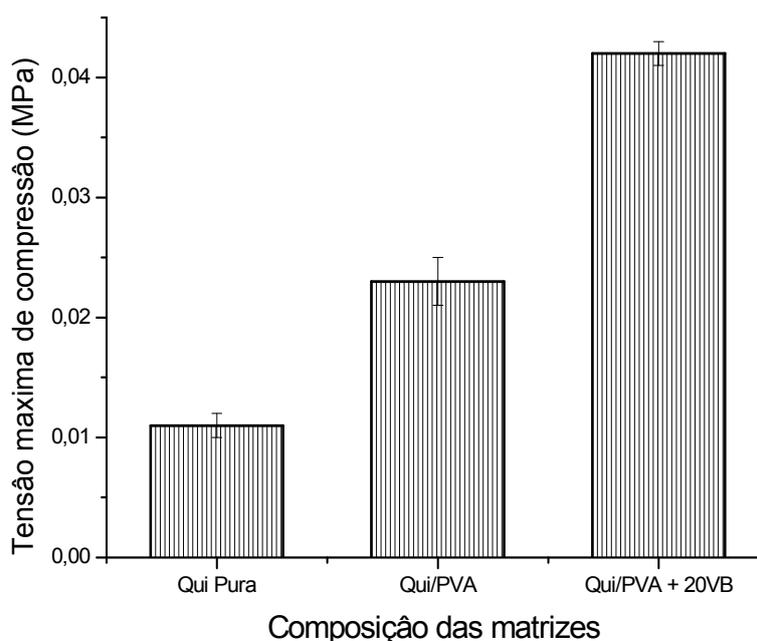


Figura 5.44: Influência do PVA e do vidro bioativo na tensão máxima de compressão das matrizes Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.

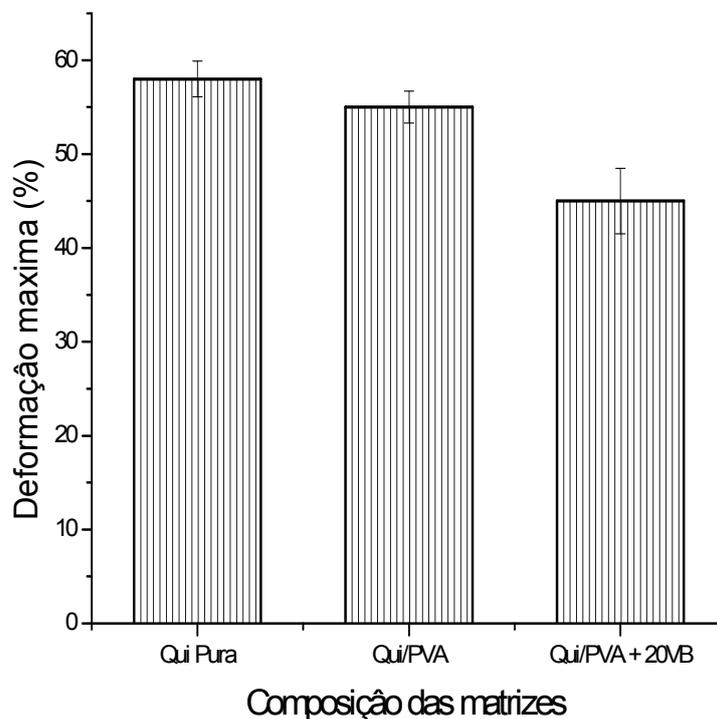


Figura 5.45: Influência do PVA e do vidro bioativo na deformação máxima de compressão das matrizes Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.

A tabela 5.8 apresenta resultados comparativos do comportamento mecânico das matrizes com Qui-0%VB, Qui-PVA e Qui-PVA-20%VB.

Tabela 5.8: Valores médios de tensão e deformação máxima à compressão das matrizes.

Amostra	Tensão máxima a compressão (MPa)	Deformação máxima a compressão (%)
Qui 0% VB	0,011 ± 0,001	58 ± 1,9
Qui /PVA	0,023 ± 0,002	55 ± 1,7
Qui /PVA+20% VB	0,042 ± 0,001	45 ± 3,5

O comportamento das curvas de tensão x deformação das matrizes híbridas e nanocompósitas foram bem similares e tanto no que diz respeito a tensão e a deformação máxima a compressão. As matrizes apresentaram um comportamento elástico, sem deformações plásticas, neste caso, o vidro atua como agente de reforço, aumentando a resistência do material obtido, sem a redução da elasticidade. Este

comportamento pode ser atribuído a forma com que a amostra é analisada, e também conforme o seu processo de produção. O processo de produção do filme permite uma mobilidade das cadeias do polímero. A matriz foi liofilizada, o que reduziu a mobilidade das cadeias de polímero, mantendo uma fronteira entre as estruturas nanocompositas. Isso levou a uma mudança no mecanismo de transferência de cargas (Oliveira, 2011). As propriedades mecânicas das matrizes obtidas utilizando como agente de reforço as BGNPs para produzir matrizes nanocompósitas, mostraram uma melhoria no seu desempenho.

5.11 Ensaio de Bioatividade

As condições de síntese dos híbridos resultam normalmente em um produto de caráter ácido e o conteúdo polimérico, sensível a altas temperaturas, impossibilita a eliminação de produtos tóxicos por tratamento térmico. Quando em contato com o meio de cultura, os produtos de dissolução dos híbridos podem alterar o pH do meio e o crescimento celular, promovendo menor viabilidade celular. Caso provoquem essa alteração, é necessária uma etapa de neutralização, para reduzir a acidez das amostras e torná-las mais biocompatíveis (Dias *et al*, 2010).

Portanto, para os ensaios de bioatividade foi realizado um pré-estudo da variação de pH dos híbridos e dos nanocompósitos em solução de SBF mantidos à 37°C. As amostras com 0, 10, 20 e 30% m/m de VB foram imersas por 1 dia, 7 e 28 dias, e as amostras com 1, 3, 5 e 10% m/m de BGNP foram imersas por 28 dias, em seguida foi realizada a medição de pH. Através da tabela 5.9 foi observado-se que os valores obtidos apresentaram uma variação de pH entre 7,22 e 7,50, e que, portanto, não houve uma variação significativa de pH na solução de SBF. Isso indicou que as amostras permaneceram estáveis nesse aspecto dispensando a etapa de neutralização.

Tabela 5.9: pH médio das amostras dos híbridos e nanocompósitos em função do tempo de imersão em SBF à 37°C.

Amostras	Tempo de Imersão em SBF			
	0 hora	1 dia	7 dias	28 dias
Qui- 0%VB	7,40	7,45	7,35	7,40
Qui- 10%VB	7,40	7,34	7,49	7,25
Qui- 20%VB	7,40	7,33	7,45	7,35
Qui- 30%VB	7,40	7,32	7,50	7,22
Qui – 1% BGNP	7,40	7,37	7,31	7,36
Qui – 3% BGNP	7,40	7,35	7,32	7,24
Qui – 5% BGNP	7,40	7,31	7,29	7,28
Qui – 10% BGNP	7,40	7,39	7,34	7,30

Os resultados da biomineralização mostraram na superfície do filme com 20% m/m de VB uma típica formação gradual de Hidroxiapatita Carbonatada (HCA) conforme o aumento dos dias de imersão no SBF (Fig. 5.46). Nas demais amostras não foram realizadas análises por MEV, no entanto foram realizados estudos de FTIR (Fig. 5.47 e 5.48).

Através das imagens de MEV foi observado na superfície dos filmes híbridos (20%VB) uma morfologia homogênea, composta por pequenos cristais, com tamanhos menores que 5 μm , caracterizando a formação da camada de HCA. A identificação da composição química desses cristais foi realizada através de EDS encontrando-se os íons (Cálcio) Ca, (Fósforo) P, conforme mostrado na Figura 5.46-C. Também foram identificados alguns resíduos representados na imagem de MEV por grãos de cristais arredondados, cuja composição química foi avaliada pelo EDS contendo os elementos (Magnésio)Mg e (Sódio) Na. Embora os filmes tenham sido lavado com água para retirada do excesso de sais, após a secagem ainda verificou-se a presença resíduos. Inicialmente os grãos de apatita estavam mais isolados (Fig. 5.46A-a), após 7 dias apresentavam uma camada mais espessa e uniforme sobre a superfície do híbrido (Fig. 5.46B-b). Com 28 dias toda a superfície do filme estava coberta pela HCA, evidenciando uma resposta biológica mais intensa, conforme aumento do tempo de imersão (Fig. 5.46c-D-d).

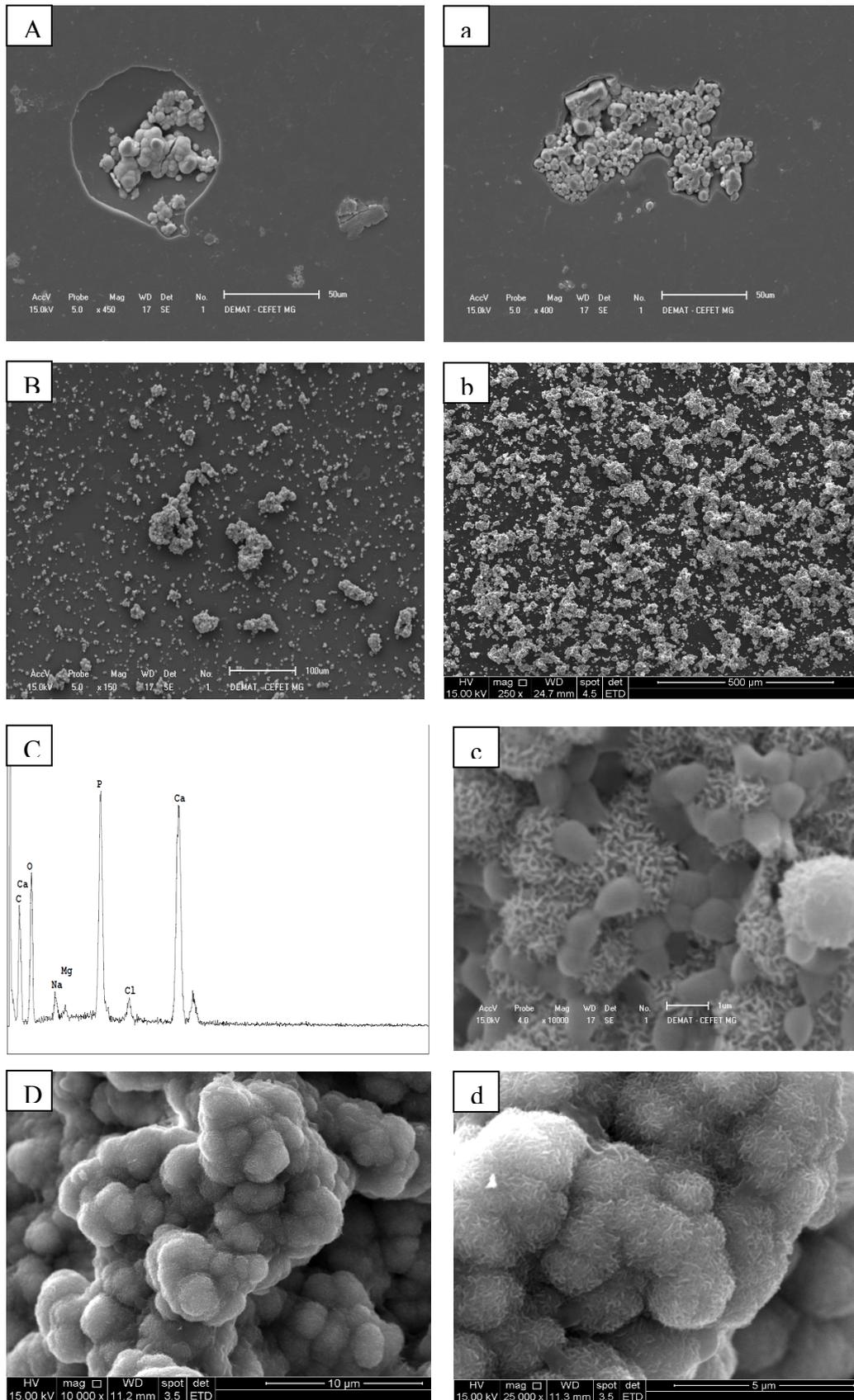


Figura 5.46: Imagens de MEV da superfície dos filmes com 20% de vidro bioativo imersos em SBF por: 1 dia (A-a), 7 dias (B-b) e por 28 dias (c-D-d). Imagem de EDS do filme imerso em SBF por 28 dias (C).

Os espectros de FTIR para os filmes com 10, 20 e 30% m/m de VB imersos em SBF por 1 e 28 dias mostraram algumas bandas de absorção a aproximadamente 520 cm^{-1} , 560 cm^{-1} e 600 cm^{-1} que correspondem a deformação vibracional do grupo P-O indicando a formação de uma camada cristalina de fosfato de cálcio, normalmente as bandas próximas a 600 cm^{-1} são referentes as deformações de P-O do grupo PO_4^{3-} (Fig. 5.47 e 5.48). A banda em 890 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-O do C-O_3^{2-} é mais evidenciada nos filmes com teor de 10, 20 e 30% m/m de VB (Fig. 5.47). Nos filmes com 28 dias de imersão com teor de 30% m/m de VB (Fig. 5.48) aparece uma banda em 520 cm^{-1} relacionada a deformação vibracional do grupo P-O. As bandas observadas no aspecto FTIR do filme com um dia de imersão (Fig. 5.47) em 1024, 1020 e 1150 cm^{-1} são indicativas do deslocamento da banda 1100 cm^{-1} atribuída ao estiramento P-O. As intensidades das bandas aumentam após 28 dias de imersão, indicando a formação da camada de HCA. Os filmes sem adição de vidro não apresentaram as bandas relacionados à formação de HCA (Pereira *et al*, 2005; Peitl *et. al*, 2001; Sepulveda, 2001).

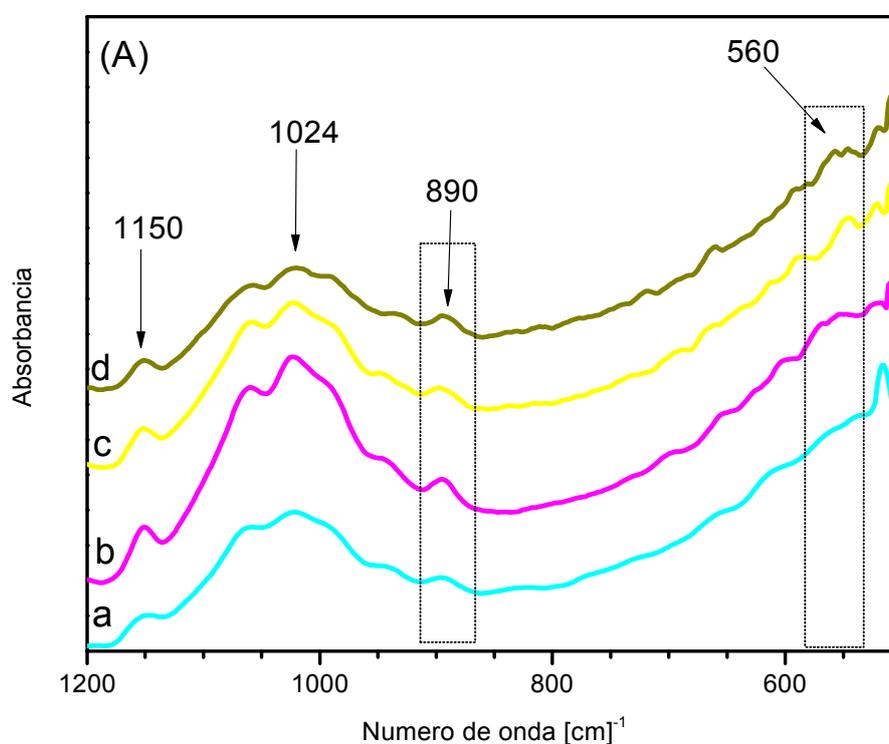


Figura 5.47: (A) FTIR de filmes após 1 dia de imersão em SBF: (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% e (d) 30% m/m de VB.

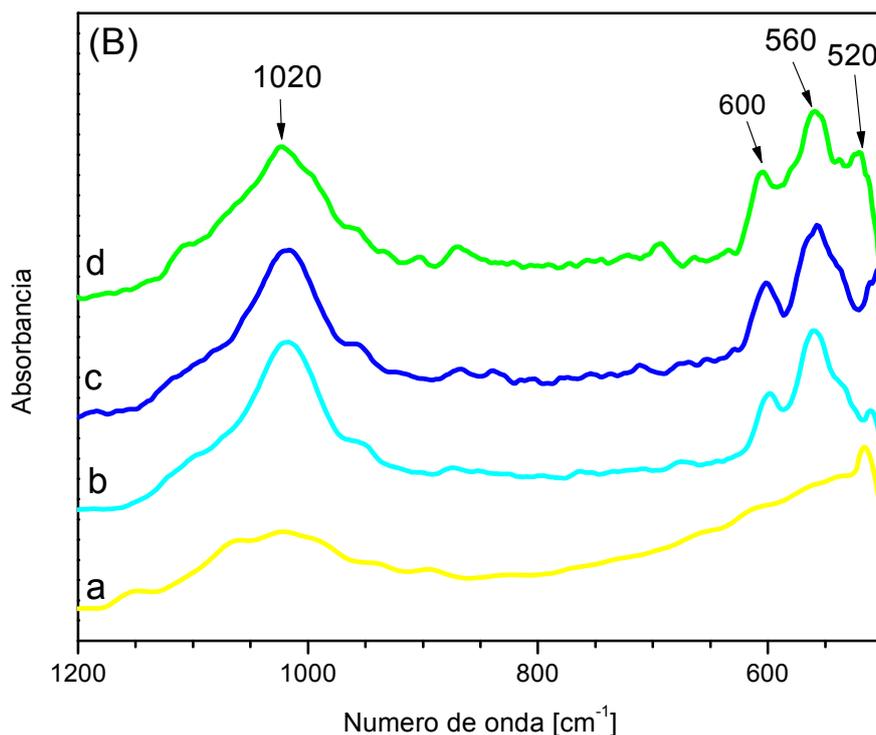


Figura 5.48: (B) FTIR de filmes após 28 dias de imersão em SBF: (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% e (d) 30% m/m de VB.

A formação de hidroxiapatita carbonatada também foi registrada por DRX (Fig. 5.49). O difratograma dos filmes evidencia um pico com alta intensidade aproximadamente em 32°C e outro pico com baixa intensidade em 26°C, associados aos planos (211) e (002), respectivamente (Hong *et al.* 2009; Peter *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2009; Cai *et al.* 2009). Estes picos são característicos da fase cristalina de hidroxiapatita carbonatada referentes à ficha 19-274 (JCPDS). Porém estes dois picos aparecem somente no híbrido com 20% de vidro. Os difratogramas dos filmes com 0 e 10% m/m de vidro mostram picos largos indicando que na região analisada existe pobre cristalinidade, portanto, possuem pouca propriedade bioativa. Os componentes orgânicos dos filmes 0, 10 e 20% m/m de VB se encontram na fase amorfa, e portanto, não mostram picos de difração de raios X. O filme com 30% de vidro não obteve sucesso na caracterização por DRX, pois as amostras estavam irregulares impedindo a análise da superfície dos mesmos.

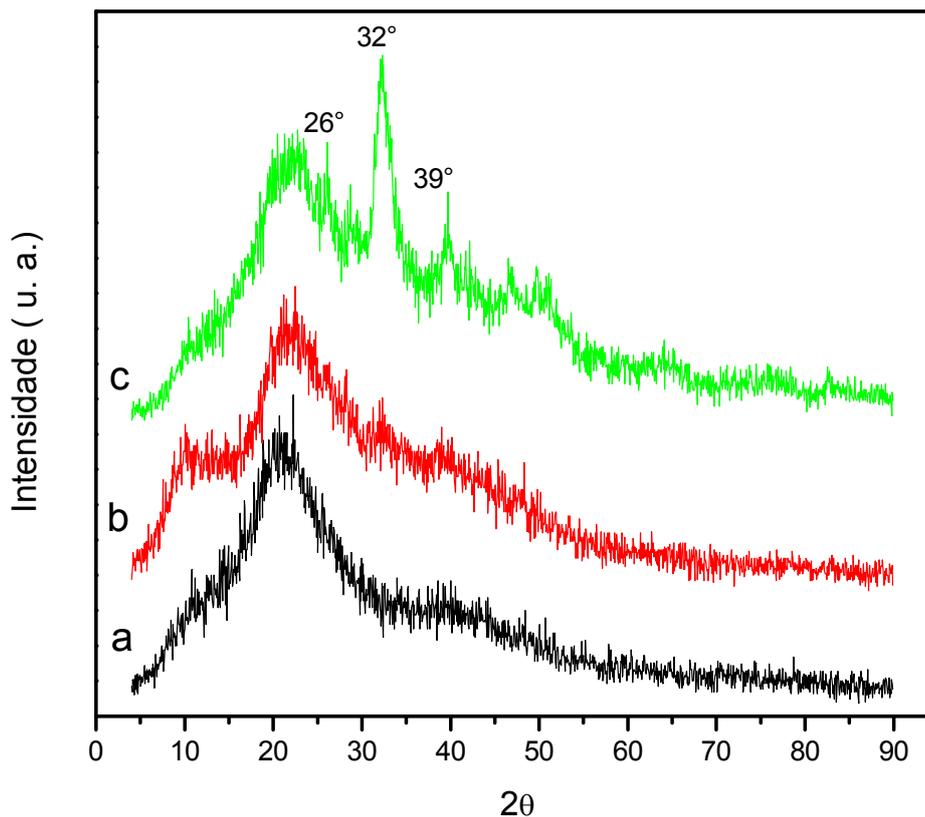


Figura 5.49: DRX para filmes com (a) 0%, (b) 10% e (c) 20% m/m de VB após 7 dias de imersão em SBF.

5.12 Ensaios Biológicos

A atividade mitocondrial das células osteoblastos, cultivadas sem e com a presença de materiais produzidos neste trabalho foi avaliada pela análise de Resazurina. Este ensaio é utilizado para avaliar especificamente a função mitocondrial e a viabilidade celular. A Figura 5.50 ilustra a viabilidade celular dos híbridos (Qui-VB) e dos nanocompósitos (Qui-BGNP). No grupo controle foram semeadas somente células de osteoblastos viáveis (sem as amostras no meio). Nos grupos comparativos as células foram semeadas sobre cada composição de filme híbrido e nanocompósito. Comparando-se os filmes analisados com o grupo de controle após 72 horas pode-se concluir que à medida que o conteúdo de BGNP aumentou no material, a viabilidade celular também aumentou no mesmo, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos filmes com 5% e 10% BGNP. Os resultados obtidos mostraram que as células plaqueadas em Qui-5% BGNP aumentaram $18,0 \pm 7,5\%$ da

viabilidade celular e as células plaqueadas em Qui-10%BGNP mostraram um aumento de $30 \pm 2\%$ em comparação ao grupo de controle. As células plaqueadas em Qui-10%VB mostraram $10 \pm 1\%$ de aumento na viabilidade das células. Estudos na literatura identificaram viabilidade celular superior em relação ao grupo controle quando da utilização de vidros bioativos com 60% de sílica que pode ser atribuído à capacidade dos produtos de dissolução destes materiais em estimular a proliferação osteoblástica (Valério *et al.*, 2005). As células plaqueadas em Qui-1% BGNP, Qui-3% BGNP após 72 horas mostraram uma viabilidade celular similar àquela do grupo controle e significativamente superior em relação à viabilidade de filmes de quitosana pura (Qui-0%VB). Não ocorreram diferenças significativas na viabilidade celular em relação ao grupo de controle das células plaqueadas sobre Qui-20%VB. Foi observada uma diminuição da viabilidade celular em comparação com o grupo de controle nas células plaqueadas em Qui-0%VB e Qui-30%VB.

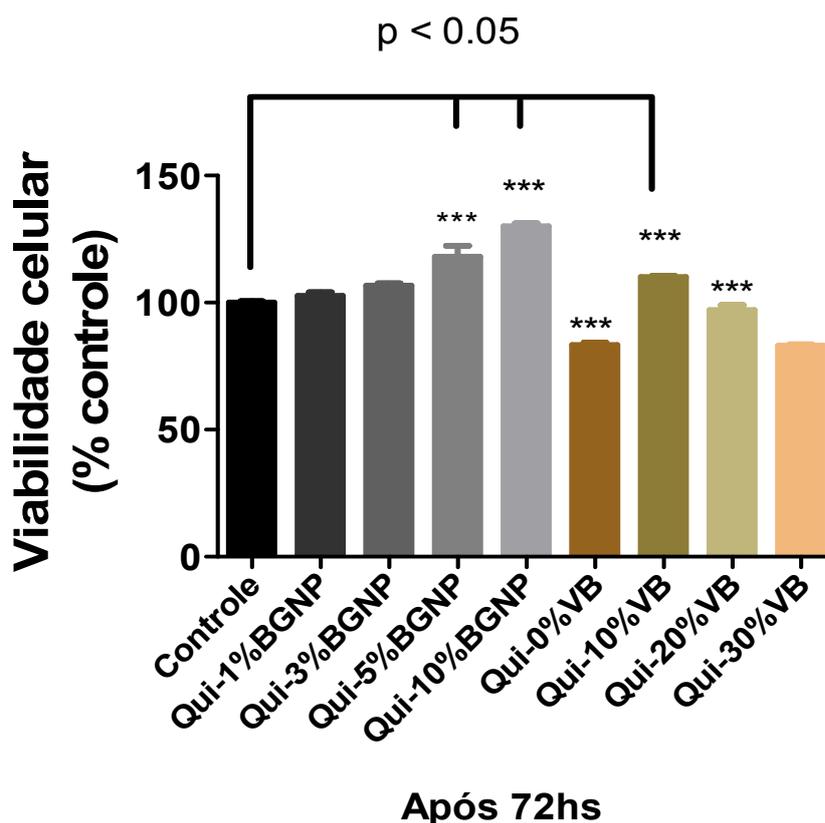


Figura 5.50: Viabilidade celular dos híbridos Qui- VB e dos nanocompósitos Qui- BGNP.

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística realizada por ANOVA/ Bonferroni/GraphPad Prism.

Os ensaios biológicos de resazurina conduzidos nas amostras mostraram que após 72 horas os resultados foram mais favoráveis para amostras contendo nanopartículas de vidro bioativo, embora também os resultados obtidos dos híbridos com VB (sol) mostraram uma resposta significativa das células, já que a morte celular não foi acentuadamente observada.

6. CONCLUSÕES

Filmes e matrizes porosas foram obtidos com sucesso, alcançando um desempenho adequado para a possível aplicação como suportes celulares no crescimento de tecido ósseo. Tanto as matrizes Qui-VB quanto as matrizes Qui-BGNP apresentaram elevada porosidade, estrutura homogênea com poros bem distribuídos com predominância morfológica esférica e ou lamelar. Filmes Qui-VB e Qui-BGNP mostraram um aspecto qualitativo bem homogêneo com boa distribuição de vidro na rede polimérica. Ensaio iniciais de bioatividade dos filmes mostraram um pH estável com formação de HCA e, portanto, que os materiais mostraram-se aptos ao uso em cultura celular. Os testes de citotoxicidade realizados com células humanas mostraram índices elevados na viabilidade celular. O vidro empregado como fase bioativa e como agente de reforço cumpriu sua função elevando significativamente os valores de resistência e deformação máxima dos híbridos nos ensaios de tração e compressão, atingindo valores da ordem de 80MPa e 22% nos filmes contendo nanopartículas e 0,11MPa e 71% nas matrizes contendo nanopartículas. Os dois métodos de síntese na incorporação do vidro na quitosana, quando comparados, demonstram que o melhor desempenho mecânico do vidro bioativo foi na forma de nanopartículas em relação ao vidro bioativo obtido pelo tradicional método Sol-gel.

7. AGRADECIMENTOS

A autora agradece à FAPEMIG, CAPES e ao CNPq pela bolsa e pela taxa de bancada, concedidas durante a realização deste trabalho e pelo auxílio financeiro, permitindo a concretização do mesmo. Também agradece a Rodolfo Cunha Santos pelo

desenvolvimento dos desenhos esquemáticos e pelas demais edições realizadas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelwahed, W., *et al.*: Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews*. Vol. 58, p.1688–1713, 2006.

Ahmad, Z. *et al.*: Interphase bonding in poly(hydroxyamide)-silica hybrids: effect of isocyanato-propyltriethoxysilane addition on the structure and properties. *Journal of Macromolecular Science A*, vol. 44, nº. 1, pag. 79–90, 2007.

Aimoli, G. & Beppu, M.: Deposição de compostos de cálcio sobre membranas de quitosana. III congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais, campinas, p. 108, 2004.

Airoldi, C. & Farias, F.: Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. *Química nova*. Vol. 27, n. 1, p. 84-88, 2004.

Alfaya, S. & Kubota, T.: A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química nova*, vol. 25, nº5, p.835-841, 2002.

Alsarra, A. *et al.*: Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipaseloaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*. Vol. 23, p. 3637-3644, 2002.

Al-Kandary, S. *et al.*: “Morphology and thermo-mechanical properties of compatibilized polyimide-silica nanocomposites,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 98, no. 6, pp. 2521–2531, 2005.

Al-sagheer, F. & Muslim, S.: Thermal and mechanical properties of chitosan/SiO₂ hybrid composites. *Journal of nanomaterials*, 2010.

Alves, M. *et al.*: Designing biomaterials based on biomineralization of bone. *J mater chem*; vol 20 pp: 2911–2921. 2010.

Athanasίου, A. *et al.*: fundamentals of biomaterials in tissue engineering of bone. *Tissue engineering*. Vol.6, nº4, 2000.

Atwood, R. *et al*: Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography. *Scripta Materialia*. v. 51, p. 1029-1033, 2004.

Azevedo, V. *et al*: Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de materiais e processos*. Vol. 2.3, p. 27-34, 2007.

Berger, J. *et al*: Structure and interaction in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol.57, p.19-34, 2004b.

Boccaccini, A. *et al*: polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review. *Composites science and technology*, vol. 70, pag. 1764–1776, 2010.

Bolto, B., *et al*: Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes. *Progress in polymer science*, vol.34, p.969–981, 2009.

Boury, B. *et al*: Auto-organisation of hybrid organic–inorganic materials prepared by sol–gel process. *Chem. Commun.* P.795–802, 2002.

Buckley, T. & O’Kelly, U.: *Topics in bio-mechanical engineering*. Trinity centre for bioengineering & national centre for biomedical engineering science, dublin, ireland, p.147-166, 2004.

Cai, X. *et al*: Preparation and characterization of homogeneous chitosan–polylactic acid/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties. *Acta biomaterialia*, vol. 5, p. 2693–2703, 2009.

Camacho, A *et al*: Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 82, pag 305-315, 2010.

Chen, X. *et al*: Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses. *Journal of non-crystalline solids*, vol. 355, pag. 791–796, 2009.

Coelho, B.: Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia em tecidos.

Universidade Federal de Minas, 2003. P.156. (tese, doutorado em engenharia metalúrgica e de minas).

Costa Jr.: Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application, in: congresso brasileiro de polímeros, 9, 2007, campina grande. Anais campina grande: associação brasileira de polímeros, 2007b.

Costa H.: Síntese, Caracterização e Avaliação do Comportamento Degradativo de Híbridos Porosos de Poli (Álcool Vinílico)/Vidro bioativo. *Tese de doutorado*. Orientador: H. S. Mansur, Universidade Federal de Minas Gerais, pág. 13, 2010.

Costa, Jr. E. & Mansur, H.: Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticulados quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química nova*, v.31, n.6, p.1460-1466, 2008.

Costa, R.: Influência da metodologia de síntese no controle estrutural de híbridos organo-inorgânicos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

Dalby, M. *et al.*: Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials*, 27, 1306–1315, 2006.

Dash, M. *et al.*: Chitosan – A versatile semi-synthetic polimer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. Vol. 36, pag. 981-1014, 2011.

Deville, S. *et al.*: Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 27, pag. 5480–5489, 2006.

Drury, J. & Mooney, D.: Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, vol. 24, p.4337–4351, 2003.

Dias, L. *et al.*: Síntese e caracterização de membranas compósitas de quitosana-polivinyl álcool-vidro bioativo. Congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais (colaob).6, 2010, rs-brasil.

Drosse, I. *et al.*: Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *International journal of the care of the injured*. V. 39s2, p.s9-s20, 2008.

Duarte, M.: An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 31,p. 1-8, 2002.

Esfahani, S. *et al.*: Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds. *Acta Biomaterialia*. Vol. 7, pag. 1307-1318, 2011.

Franks, F.: Freeze-drying: from empiricism to predictability, *cryo-lett*. Vol.11 93-110, 1990.

Gil, M. & Ferreira, P.: Polissacarídeos como biomateriais. *Química* 100; 72-74, 2006.

Greenspan, D. *et al.*: Bioactivity and biodegradability: melt vs. sol-gel derived bioglass® in vitro and in vivo. In: proceedings of the 11th international symposium on ceramics in medicine, 11, 1998, new york. *Bioceramics, usa (new york): world scientific*, P.345-348, 1998.

Guarino, V. *et al.*: Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert rev med dev*, vol: 4(3) pp:405-418, 2007.

Gupta, G. *et al.*: Characterization of a novel bioactive composite using advanced X-raycomputed tomography. *Composite Structures*. v. 71, p. 423-428, 2005.

Gupta, K. & Jabrail, F.: Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate polymers*. Vol.66, p.43-54, 2006.

Hirano, S. *et al.*: Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol.38, p.1214–1217, 1990.

Hirano, S. *Biotech. Ann. Res.*, vol. 2, 237-258, 1996.

Ho, P. *et al.*: Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelatin methods. *Biomaterials*, vol. 25, p. 129-138, 2004.

Ho, S. & Hutmacher, D.: A comparison of micro CT with other techniques use in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*. vol. 27, p.1362-1376, 2006.

Hong, Z. *et al.*: Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(l-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. *Acta biomaterialia*, vol. 4, p. 1297–1306, 2008.

Hong, Z. *et al.*: Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing Bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 5, p. 115 – 123, 2009.

Hu, X. *et al.*: Characterization of silica-polymer aerogel composites by small-angle neutron scattering and transmission electron microscopy. *Journal of non-crystalline solids*. V. 288, p.184-190, 2001.

Hutmacher, D.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. v. 21, p. 2529-2546, 2000.

International Organization for Standardization. ISO/FDIS 23317:2007(E): Implants for surgery - *in vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials.

Itala, A. *et al.*: Pore diameter of more than 100 m is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Masters Res*. V. 58, p. 679-683, 2001.

Jones, J. & Hench, L.: Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. *Journal Biomedical Materials Research- Part B*. v. 68B, p. 36-44, 2004.

Jones, J. *et al.*: Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. Vol. 27, p.964–973, 2006.

Jones, J. *et al.*: Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells *Biomaterials* Vol. 28,p. 1653–1663, 2007.

Jones, J.: New trends in bioactive scaffolds: the importance of nanostructure. *Journal of the european ceramic society*, vol.29, 1275-1281, 2009.

Jones, J.: Review of bioactive glass: from hench to hybrids. *Acta biomaterialia*, review. 2012.

Kalender, W.: Review - X-ray computed tomography. Institute of Physics Publishing *Physics in Medicine And Biology*, Phys. Med. Biol. 51, R29–R43 - 2006.

Kang, H. *et al.*: Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*. Vol 20, pag. 1339-1344, 1999.

Kay, S. *et al.*: Nanostructured polymer/ nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue eng*. Vol 8. Pp: 753–761. 2002.

Keaveny, T. & Hayes, W.: Mechanical properties of cortical and trabecular bone. In: Hall BK, editor. *Bone Growth*. Boca Raton, fl: crc press. P.285–344, 1993.

Khor, E. & Lim L.: Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. Vol. 24, p.2339-2349, 2003.

Kim, H.: Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current opinion in solid state and materials science*. vol. 7. p. 289-299, 2003.

Klawitter, J & Hulbert S.: Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res*. Vol 2, p. 161-229, 1971.

Kokubo, T. *et al.*: Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. V. 24, p. 2161-2175, 2003.

Krajewska, B.: Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*. Vol.35, p.126-139, 2004.

Kumar, M. *et al.*: Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*. Vol. 104, n.12, p.6017-6084, 2004.

Labconco. User's manual of freeze dry system. 2007.

Lee, Y. *et al.*: Pervaporation of water-ethanol through poly(vinyl alcohol) chitosan blend membrane. *Polymer bulletin*, vol.29, p.423-429, 1992.

Lee, S. *et al.*: Study of gelatin-containing artificial skin v: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials*; vol. 26, p.1961-1968, 2005.

Lee, K. *et al.*: Ceramic bioactivity: progresses, challenges and perspectives. *Biomedical materials*. Vol 1, p. 31-37, 2006.

Lee, E-J. *et al.*: Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials*, Vol. 30 P. 743-750, 2009.

Lenthe, G. *et al.*: Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo. *Biomaterials*. In Press, 2007.

Li, R.: Sol-gel processing of bioactive glass powders. Florida: university of florida, 1991a. (thesis, degree of doctor of philosophy, department of materials science and engineering).

Li, Z. et. al.: Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. Vol. 26, p.3919-3928, 2005.

Lima, I.: Quitosanas e quitosanas química e morfológicamente modificadas com anidrido succínico – propriedades, adsorção e termoquímica. Campinas: universidade estadual de campinas, 2005. 145f. (tese, doutorado em química inorgânica).

Lima, I. et al.: Caracterização de materiais cerâmicos através da Microtomografia computadorizada 3D. *Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação*. Vol.1, No.2, pp. 022 – 027. 2007

Madhally, S. & Matthew, H.: Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. Vol. 20, p.1133-1142, 1999.

Mamede, J. & Prado, L.: Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. *Química nova*. Vol. 28, n.2, p. 281-288, 2005.

Martinez, Y. et al.: Hybrid ternary organic-inorganic films based on interpolymer complexes and silica. *Polymer*. v. 45, p. 3257-3265, 2004.

Monteiro, Jr.: Preparação química e calorimétrica do biopolímero quitosana. Campinas: instituto de química da universidade estadual de campinas, 1999. 128f. (tese, doutorado em química).

Muzzarelli, R. et al.: Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, vol.9, p.247–252, 1988.

Muzzarelli, C. & Muzzarelli, R.: Natural e artificial chitosan-inorganic composites. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v.92, p. 89-94, 2002.

Neto, C.: Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. *Carbohydrate research*, vol.340, p.2630-2636, 2005.

Nettles, D. et al.: Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue engineering. Goldstein et al biomaterials*. Vol. 8, 1009–1016, 2002.

Notingher, I. et al.: Application of raman microspectroscopy to the characterization of bioactive materials. *Materials characterization*. Vol. 49, p. 255-260, 2003.

O'Brien, F. et al.: Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-gag scaffolds. *Biomaterials*. Vol. 25, p. 1077–1086, 2004.

Oetjen, G. & Haseley, P.: *Freeze-drying*; 2^a ed. Weinheim – Germany: wiley-vch verlag gmbh&co. Kгаа. P. 408. Isbn: 978-3-527-30620-6 , 2004.

Oliveira, A. A. R.: “Síntese e caracterização de espumas híbridas vidro bioativo/PVA para aplicação em engenharia de tecidos.” P.: 114. Dissertação de Mestrado. Orientador(a): Marivalda de Magalhães Pereira. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas – Escola de Engenharia – UFMG. Ano: 2007.

Oliveira, A. A. R.: "Nova metodologia de obtenção de nanopartículas de vidro bioativo, poliuretanas biodegradáveis e seus compósitos para aplicações biomédicas". *Tese de doutorado*. P.: 156. Orientador(a): Marivalda de Magalhães Pereira. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas – Escola de Engenharia – UFMG. Ano: 2011.

Ogawa, K.: Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. *Agric. Biol. Chem.*, vol 55, n.9, p.2375-2379,1991.

Ogawa, K. et al.: Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.56. N.6, p.858-862, 1992.

Orefice, R. et al.: *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. 1^a ed. 2006. Rj - brasil. Cultura médica

Ostomel, T. et al.: Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small*. Vol. 11, 1261-1265, 2006.

Palin, E. et al.: Mimicking the nanofeatures of bone increases. Bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology*. Vol-16(9). Pp: 1828–1835. 2005.

Peitl, O. et al.: Highly bioactive $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*. Vol 292, pag. 115-126, 2001.

Peppas, N. et al.: Poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. *European journal pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol.43, p.51-58, 1997.

Pereira, M. et al.: Materiais cerâmicos – ciência e aplicação como biomateriais. In: Orefice, R. et al.: *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. 1ª ed. 2006. Rj - brasil. Cultura médica. Cap. 3. P. 71.

Pereira, M. et al.: Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinil alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. *Key engineering materials*, vols. 589-592, p. 284-286, 2005a.

Pereira, M. et al.: Bioactive glass a hybrid scaffolds prepared by the sol-gel method for bone tissue engineering. *Advances Applied Ceramics*. v104, p. 35-42, 2005.

Peter, M. et al.: Development of novel α -chitin/nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. Vol 78, Pag. 926-931, 2009.

Peter, M. et al.: Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications. *Carbohydrate polymers*, vol 79, pag. 284–289, 2010.

Pikal, M. et al.: The secondary drying stage of freeze-drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm*, vol. 60, p. 203–217, 1990.

Pikal, M.: Freeze drying, in: J. Swarbrick (ed.), encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker, New York. Vol. 2, p. 1299–1326, 2002.

Rahmana, I. et al.: An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particles. Colloids and surfaces A: physicochem. Eng. Aspects. Vol. 294, p. 102–110, 2007.

Rámila, A. & Vallet-Regí, M.: Static and dynamic in vitro of a sol-gel glass bioactivity. Biomaterials. Vol. 22, p. 2301-2306, 2001.

Rao, K. et al.: A novel method for synthesis of silica nanoparticles. Journal of colloid and interface science. Vol. 289, p. 125–131, 2005.

Ratner, B. et al. Biomaterials science; an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press. Pag. 494, 1996.

Ratner, B. et al.: Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, 2nd edition. USA: Elsevier Academic Press. pag. 851, 2004

Reis, E.: Síntese e caracterização de híbridos porosos à base de sílica e quitosana obtidos através do processo sol-gel para aplicação em engenharia de tecidos. Universidade Federal de Minas, 2007. P.183. (tese, doutorado em engenharia metalúrgica e de minas).

Ren, L. et al.: Sol-gel preparation and in vitro deposition of apatite on porous gelatin-siloxane hybrids, J. Non-Cryst Solid. Vol. 285, pag. 116-122, 2001.

Ren, L. et al.: Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering, Biomaterials. Vol. 23, pag. 4765-4773, 2002.

Renghini, C. et al.: Micro-CT studies on 3-D bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. Acta Biomaterialia vol.5, p.1328–1337, 2009.

Rezwan, K. et al.: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. Vol. 27, p.3413–3431, 2006.

Rinaudo, M.: Chitin and chitosan: properties and application. *Prog. Polym. Sci.* Vol. 31, p.603-632, 2006.

Roco, M.: Nanoparticles and nanotechnology research. *Journal nanoparticles.* Vol. 1, p.1-6, 1999.

Sadahira, C.: Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos. Belo horizonte: escola de engenharia da ufmg, 2007. 87p. (dissertação, mestrado em engenharia metalúrgica, ciência e eng. De materiais).

Santos, J. et al.: Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. São carlos: universidade federal de são carlos, 2004. 112f. (tese, doutorado em química analítica).

Schoen, F. et al.: Tissue engineering. In: Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2nd edition. Usa: elsevier academic press. Cap.:8. P. 709-711, 2004.

Seal, B. et al.: Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Material science engineering.* Vol. 34, 147-230, 2001.

Sen, L. et al.: Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass. *J. Mater. Chem.* Vol. 19, p.1276-1282, 2009.

Shin, H. et al.: Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* v. 24, p. 4353-4364, 2003.

Shirosaki, I. et al.: Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan-silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. *Chemical engineering journal*, vol. 137, pag. 122-128, 2008.

Simske, S. et al.: Porous materials for bone engineering, in porous materials for tissue engineering. In: Dixit D-MLaV, editor. *Porous materials for tissue tissue engineering.* Enfield, NH: Transtech. Vol. 66 p. 151-82, 1997.

Sperling, L.: Introduction to physical polymer science. 3. Ed. Pennsylvania: wiley interscience. Pag. 671 , 2001.

Tamai, N. et al.: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. J Biomed Mater Res. Vol 59, pag. 110-117, 2002.

Thein-han, W. & Misra, R.: Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. Acta biomaterialia. Vol. 5, p.1182-1197, 2009.

Tithi, J. et al.: Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. J Biomed Mater Res. Vol 58, p. 283-291, 2003.

Thomson, R. et al.: In principles of tissue engineering. Texas: r.g. landes and academic press. Cap.18, p.263-272. , 1997

Vasconcelos, V. et al.: novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. Polímeros, vol.9, nº4, p.104-109, 1999.

Wang, T, et al.: Selected properties of ph-sensitive, biodegradable quitosanopoly(vinyl alcohol) hydrogel. Polymer international, vol.53, p.911-918, 2004.

Williams, D.: To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. Trends in biotechnology. vol. 24, n.1, p.4-8, 2006.

Williams, N. & Polli, G.: The lyophilization of pharmaceuticals: a literature review, j. Parenter. Sci. Technol. Vol.38 p.48-59, 1984.

Webster, J. et al.: Nanoceramic surface roughness enhances osteoblast and osteoclast functions for improved orthopaedic/dental implant efficacy j. Biomed. Mater. Res. Vol. 51, p. 475, 2000.

Yao, J. et al.: The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly(lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials*, vol 26(14) pag. 1935–1945. 2005

Yang, B. et al: Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate polymers*. doi: 10.1016. 2010.

Zhang, Y. & Zhang, M.: Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. v. 15, p. 255-260, 2004.

Zong, Z. et al. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*. v. 41, p. 899-906, 2000.