

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso De Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de mestrado

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E DEGRADAÇÃO DE MATRIZES DE
POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)/ QUITOSANA/ VIDRO BÍOATIVO OBTIDAS POR
LIOFILIZAÇÃO**

Autora: Taís Lício Macedo

Orientadora: Prof. Dra Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Agda Aline Rocha de Oliveira

Julho/ 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso De Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Taís Lício Macedo

Características Estruturais e Degradação de Matrizes de Poli(álcool
vinílico)/ Quitosana/ Vidro Bioativo Obtidas por Liofilização

**Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Engenharia de Minas e Metalúrgica de
Minas da Universidade Federal de Minas Gerais**

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof. Dra Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Dra. Agda Aline Rocha de Oliveira

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

Julho de 2013

Aos meus pais com
muito amor e carinho

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	x
Lista de Notações	xi
Resumo	xiii
Abstract	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Tecido ósseo	5
3.2 Engenharia de Tecido ósseo	7
3.3 Matrizes para a Engenharia de tecidos	8
3.4 Poli (álcool vinílico)	10
3.5 Quitosana	12
3.6 Vidro Bioativo	17
3.7 Reticulação Polimérica	20
3.8 Matrizes porosas PVA/ Qui/VB obtidas por liofilização	21
3.9 Liofilização	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais	26

4.2	Síntese das matrizes	26
4.2.1	Preparo da Solução de PVA	27
4.2.2	Preparo da Solução de Quitosana	27
4.2.3	Preparo da Solução Precursora de Vidro Bioativo	28
4.2.4	Preparo da Solução de Glutaraldeído	28
4.2.5	Fabricação das matrizes	28
4.2.6	Caracterização das matrizes extracelulares	29
4.2.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	29
4.2.6.2	Espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	30
4.2.6.3	Porosidade aparente – Método de Arquimedes	30
4.2.7	Ensaio mecânico	31
4.2.8	Ensaio de degradação	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Avaliação qualitativa das matrizes	34
5.2	Avaliação morfológica através da Microscopia Eletrônica de Varredura	35
5.3	Espectroscopia na região do infravermelho	39
5.4	Avaliação da Porosidade	47
5.5	Ensaio mecânico	48
5.6	Ensaio de degradação <i>in vitro</i>	51
6	CONCLUSÕES	57
7	TRABALHOS FUTUROS	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.0	Anatomia do osso trabecular e cortical	6
Figura 3.1	Esquema da obtenção de quitina e quitosana e suas aplicações	13
Figura 3.2	Comparação das estruturas moleculares da quitosana, quitina e celulose	14
Figura 3.3	Célula unitária da quitosana evidenciando as três projeções	15
Figura 3.4	Desenho descritivo do processo sol gel para obtenção do (1) gel coloidal e do (2) gel polimérico	19
Figura 3.5	Ilustração do comportamento da porosidade nas 3 zonas de uma matriz durante o processo de liofilização	25
Figura 4.0	Fluxograma das etapas seguidas para a obtenção das matrizes	33
Figura 5.0	Matrizes 1:3 F, 1:1 F e 3:1 F descartadas devido à estrutura física irregular, com fissuras e heterogênea	34
Figura 5.1	Solução precursora da matriz 1:1 reticulado com 1% de glutaraldeído que até o momento não geleificou	35
Figura 5.2	Estrutura da matriz 1:1, 1:3 e 3:1 obtidas neste trabalho com sucesso, com estrutura física homogênea, regular e sem a presença de trincas	35

- Figura 5.3** Imagem de MEV mostrando o corpo de prova e a porosidade e arquitetura dos poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C) 36
- Figura 5.4** Imagem de MEV mostrando o tamanho dos poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C) obtidos na região analisada por MEV 37
- Figura 5.5** Imagem de MEV mostrando a morfologia dos poros e a interconectividade entre os poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C) 38
- Figura 5.6** Espectros de FTIR do material PVA utilizado na fabricação das matrizes 39
- Figura 5.7** Espectros de FTIR do material quitosana utilizado na fabricação das matrizes 40
- Figura 5.8** Espectros de FTIR do material vidro bioativo utilizado na fabricação das matrizes 40
- Figura 5.9:** Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} das matrizes 1:1, 1:3 e 3:1, e do reticulante glutaraldeído (GA) 43
- Figura 5.10** Espectros de FTIR das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 normalizados na banda 1450 cm^{-1} 44
- Figura 5.11** Ligação do grupo amino da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando base de Schiff 45

- Figura 5.12** Ligação do grupo hidroxila do PVA com o grupo aldeído do glutaraldeído, formando ponte acetal 46
- Figura 5.13** Representação do intumescimento apresentado pelas matrizes 1:1 e 1:3 antes da imersão em água deionizada (A) e após a imersão de 20 minutos em água deionizada (B) para realização do ensaio de porosidade aparente 48
- Figura 5.14** Gráfico tensão x deformação apresentando as curvas das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 49
- Figura 5.15** Variação de massa das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 submetidas ao ensaio de degradação 51
- Figura 5.16** Esquema mostrando as possíveis etapas que ocorreram nas matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 submetidas ao ensaio de degradação em solução SBF por sete dias 53
- Figura 5.17** Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} antes (1:3 (a)) e após o período de 168 horas (1:3 (b)) de degradação 54
- Figura 5.18** Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} antes (1:1 (a)) e após o período de 168 horas (1:1 (b)) de degradação 54
- Figura 5.19** Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} antes (3:1 (a)) e após o período de 168 horas (3:1 (b)) de degradação 55

Figura 5.20 Aspectos macroscópicos das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 após os períodos do ensaio de degradação. Observa-se a integridade da estrutura física das matrizes que se manteve durante todo o ensaio

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.0	Relação entre as propriedades e parâmetro estruturais da quitosana	16
Tabela 4.0	Concentrações da composição, identificação, nomenclatura dos tipos de matrizes e a forma como foram colocadas para gelificarem	29
Tabela 4.1	Concentração iônica (10^{-3} mol) das soluções de SBF e Plasma sanguíneo	32
Tabela 5.0	Bandas vibracionais de FTIR associadas ao PVA, à quitosana e ao vidro bioativo	42
Tabela 5.1	Razão da intensidade das bandas 1650 cm^{-1} e 1110 cm^{-1}	45
Tabela 5.2	Resultados de porosidade e densidade obtidos	47
Tabela 5.3	Resultado das propriedades mecânicas obtidas através do ensaio de compressão	49
Tabela 5.4	Proporção de perda de massa por tempo das matrizes 1:1 e 1:3 durante os períodos do ensaio de degradação. O sinal (+) indica que a matriz ganhou massa.	52

LISTA DE NOTAÇÕES

ρ	- Densidade
ATR	- Reflexão total atenuada
FTIR	- <i>Fourier Transformed Infrared</i>
GA	- Glutaraldeído
GD	- Grau de desacetilação
GH	- Grau de hidrólise
GPa	- Gigapascal
HA	- Cristais de hidroxiapatita
HCA	- Camada de hidroxiapatita carbonatada
ID	- Índice de degradação
MEC	-Matriz extracelular natural
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MPa	- Megapascal
MSI	- Balança analítica
P	- Porosidade
PVA	- Poli(álcool vinílico)
Qui	- Quitosana

SBF	- <i>Simulated body fluid</i> - Fluido corporal simulado
Tg	- Temperatura de transição vítrea
TEOS	- Tetraetilortosilicato
TEP	- Trietilfosfato
VB	- Vidros Bioativo

RESUMO

O aumento da expectativa de vida das pessoas levou ao aumento do interesse científico pela área de engenharia de tecidos, que cresceu muito nas últimas décadas na busca de se criar biomateriais capazes de auxiliar o crescimento de tecidos danificados por alguma razão. A frequência da utilização desses biomateriais diminuiria significativamente as longas filas de espera por transplantes de tecidos e evitaria os possíveis riscos de rejeição de implantes; principalmente na área ortopédica, grande foco da engenharia de tecidos, que busca criar matrizes extracelulares artificiais tridimensionais para regeneração e crescimento do tecido ósseo. A matriz desenvolvida pela engenharia de tecido ósseo deve promover um perfil biomecânico inicial para a reposição tissular até que as células produzam uma matriz extracelular adequada; proporcionar a formação, deposição e organização da nova matriz orgânica gerada e se degradar proporcionalmente ao crescimento do novo tecido. Este estudo desenvolveu e caracterizou morfológicamente e quimicamente matrizes híbridas tridimensionais a base de álcool vinílico / quitosana (em concentrações diferentes) e vidro bioativo, reticulados com glutaraldeído. Por fim estudou a degradação destas matrizes *in vitro*, no intuito de colaborar com uma opção de biomaterial na área ortopédica.

As matrizes obtidas neste estudo apresentaram resultados promissores. Apresentaram cerca de 96% de porosidade, tamanho de poros variando na faixa de 20 a 300 μm e interconectividade entre poros. A perda de massa apresentada pelas matrizes 1:3 e 1:1 durante o ensaio de degradação *in vitro*, foi em torno de 10% após uma semana de ensaio, com preservação (macroscópica) de sua estrutura física.

ABSTRACT

The increase in life expectancy of people led to increased scientific interest in the area of tissue engineering, which has grown in recent decades in the quest to create biomaterials capable of assisting the growth of tissues damaged for some reason. The frequency of use of these biomaterials would significantly reduce the long queues waiting for tissue transplants and avoid possible risks of graft rejection. Mainly in orthopedic major focus of tissue engineering, which seeks to create three-dimensional artificial extracellular matrices for regeneration and growth the bone tissue. The matrix developed by bone tissue engineering should promote an initial profile biomechanical tissue replacement cells to produce an extracellular matrix proper; provide the formation, deposition and organization of new organic matrix generated and degrade proportionally to the growth of new tissue. This study developed and characterized morphologically and chemically three-dimensional extracellular matrices based on Poly (vinyl alcohol) / chitosan (in different concentrations) and bioactive glass, cross-linked with glutaraldehyde. Finally the study of the degradation of these matrices *in vitro* was made, in order to collaborate with one more option in the orthopedic biomaterial area.

The matrices obtained in this study showed promising results. Showed about 96% porosity, pore size varying in the range 20-300 m and interconnectivity between pores. The mass loss presented by the matrices 1:3 and 1:1 during the degradation test *in vitro*, was around 10% after a week of testing, with preservation (macroscopic) of their physical structure.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida das pessoas levou ao aumento do interesse científico pela área de engenharia de tecidos, que cresceu muito nas últimas décadas na busca de se criar biomateriais capazes de auxiliar o crescimento de tecidos danificados por alguma razão. A utilização desses biomateriais diminuiria significativamente as longas filas de espera por transplantes de tecidos e evitaria os possíveis riscos de rejeição de implantes; principalmente na área ortopédica, grande foco da engenharia de tecidos, que busca criar matrizes para a regeneração e crescimento do tecido ósseo ⁽¹⁾.

O tecido ósseo exige um suporte para sua formação/ regeneração a partir de células, chamado de matriz óssea. Além de servir de suporte para o crescimento ósseo, essa matriz auxilia a proliferação, diferenciação e biossíntese de células. A engenharia de tecido ósseo, na tentativa de acelerar a regeneração do tecido lesionado, desenvolveu matrizes artificiais com morfologia similar a da matriz óssea, chamadas de matrizes tridimensionais ⁽²⁾. Atualmente, a engenharia de tecido ósseo vem aprimorando cada vez mais a fabricação dessas matrizes.

As matrizes artificiais fornecem um microambiente adequado para a proliferação, adesão e diferenciação celular garantindo o crescimento tecidual em seu interior. Para isso, necessitam entre outras propriedades, apresentar biocompatibilidade com o tecido humano, interconectividade entre os poros, possuírem resistência mecânica similar a do tecido ósseo e serem biodegradáveis na velocidade em que o tecido é regenerado ^(3,4).

Polímeros e vidros bioativos têm sido utilizados na produção de matrizes tridimensionais devido à possibilidade de combinação, formando híbridos orgânico-inorgânicos biocompatíveis com o tecido ósseo, com boa resistência mecânica, porosidade adequada para o crescimento tecidual e biodegradabilidade ⁽⁵⁾.

A quitosana (Qui) por ser biocompatível, biodegradável, além de favorecer a osteocondução e ser quimicamente similar à fase orgânica do osso tem sido muito utilizada na fabricação de matrizes. Porém por apresentar baixa resistência mecânica e

baixa flexibilidade, geralmente são utilizadas associadas a outro polímero ⁽⁶⁾, como por exemplo, com o poli(álcool vinílico) (PVA), polímero sintético que apresenta resistência à compressão e flexibilidade superiores as da quitosana, além de possuir sítios de adesão de moléculas bioativas e solubilidade em solventes biológicos ⁽⁷⁾.

Os vidros bioativos (VBs) são materiais que demonstram excelente potencial no reparo e regeneração do tecido ósseo, formando ligações diretas com os tecidos moles e duros. Formam uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do implante, a qual é responsável pela ligação interfacial do implante com o tecido humano. No entanto, sua fragilidade, baixa biodegradabilidade e a baixa resistência mecânica, quando comparada à resistência do tecido ósseo, restringe sua aplicação clínica. Uma possível alternativa é a produção de compósitos e sistemas híbridos ^(8,9).

Em trabalhos anteriores realizados, o VB foi utilizado na produção de matrizes com fases orgânicas Qui/PVA, observando-se a formação de paredes e cavidades bem definidas e organizadas, e uma morfologia com alta uniformidade ⁽¹⁰⁾. O grupo de pesquisa NDBio UFMG, fabricou matrizes com a utilização do vidro bioativo na concentração de 20 % (p/p), obtendo como resultado, matrizes com morfologia uniforme, isotrópica e mais rica em interconectividades quando comparadas a matrizes com 10 e 30% de vidro ⁽¹⁰⁾.

A secagem por liofilização representa uma rota bastante interessante para obtenção de matrizes poliméricas e híbridas para uso na engenharia de tecidos, por favorecer a síntese de biomateriais com alta porosidade e complexa arquitetura hierárquica. As principais razões que tornam a liofilização muito atraente são o fato de não requerer a utilização de solvente orgânico porogênico, além de aumentar a estabilidade do material, principalmente quando este é dissolvido em meio aquoso ⁽¹¹⁾.

A preparação de matrizes híbridas a base de PVA/Qui/VB tem resultado em matrizes com tamanho de poros na faixa de 100 a 300 μm , elevada interconectividade entre os poros, resistência mecânica similar à resistência apresentada pelo tecido ósseo trabecular e biocompatibilidade e biodegradabilidade controladas ^(10, 12). *Lemos* ⁽¹⁰⁾ estudou a preparação de matrizes sintéticas tridimensionais com 20% de massa cerâmica e 80% de massa polimérica (PVA/Qui na razão 3:1) por rota sol-gel e secagem

por liofilização, e obteve como resultado amostras com arquitetura homogênea, elevada porosidade e poros esféricos bem distribuídos ⁽¹⁰⁾. Neste trabalho, é dada continuidade aos estudos de matrizes do sistema PVA/Qui/VB. Investigamos aqui a obtenção, por rota sol-gel, de matrizes PVA/Qui com 20% de VB (m/m), e com diferentes relações de massa polimérica PVA/Qui (1:3, 1:1 e 3:1), reticuladas com glutaraldeído e secas por liofilização. Além de avaliar o efeito da variação da composição da blenda polimérica sobre as características estruturais das matrizes obtidas, este trabalho tem como objetivo avaliar a degradação *in vitro* das diferentes matrizes produzidas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito da variação da composição da blenda polimérica poli(álcool vinílico) (PVA)/Quitosana (Qui) sobre as características estruturais e taxa de degradação de matrizes porosas híbridas contendo 20% de vidro bioativo.

2.2 Objetivos Específicos

Obtenção de matrizes porosas híbridas com variação da proporção de polímeros (PVA/ Qui) mantendo a proporção fixa de vidro bioativo.

Caracterizações das matrizes.

Avaliação da degradação *in vitro* das matrizes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecido ósseo

O osso é um composto natural constituído de aproximadamente 30% de matriz orgânica e 70% de mineral rígido. É um tecido estrutural auto-reparador, capaz de adaptar a sua massa, forma e propriedades à evolução das exigências mecânicas, e suportar os impactos das atividades físicas do dia a dia. Serve também de suporte para os músculos estriados e de proteção para o sistema nervoso central e os órgãos vitais ⁽¹³⁾. Suas principais células são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos provenientes das células osteogênicas são responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea (colágeno glicoproteínas e proteoglicanos). São encontrados na membrana que recobre a cavidade medular do osso juntamente com as células osteogênicas. Possuem a forma cuboide quando estão em máxima atividade celular e a forma colunar quando suas atividades estão reduzidas ^(14,15).

À medida que os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica, acabam ficando presos em meio à matriz recém- sintetizada. O aprisionamento de um osteoblasto e de seus prolongamentos formam as lacunas e os canais de Havers (canalículos). Neste momento, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito, e se torna responsável não mais pela síntese da matriz, e sim pela nutrição e manutenção do osso.

Através dos canalículos ocorre a comunicação entre os osteócitos e as trocas de moléculas e íons (cálcio, magnésio, potássio, sódio, bicarbonato e fósforo) entre os capilares e os osteócitos. O fósforo e o cálcio formam os cristais de hidroxapatita (HA), localizados ao longo das fibras de colágeno, e são envoltos por substâncias amorfas. Os osteoclastos são provenientes da matriz óssea, e são responsáveis pela reabsorção da própria matriz orgânica ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

O tecido ósseo em si é organizado em dois padrões: trabecular (osso esponjoso que possui uma porosidade na faixa de 75%) e compacto (osso cortical) (Figura 3.0). No osso esponjoso, as lamínulas ósseas são irregulares em forma e tamanho, e seu arranjo é

constituído de modo a deixar lacunas (trabéculas ósseas) que se comunicam umas com as outras e abriga a matriz óssea, razão esta de ser bem vascularizado. Já no osso cortical, as lamínulas encontram-se fortemente unidas umas às outras pelas suas faces, sem que haja espaço livre interposto. Por este motivo, esta forma é a mais densa e rígida. Externamente os ossos são revestidos pelo perióstio e, internamente, pelo endócito (onde se localizam os osteoclastos). O osso esponjoso fornece ao tecido ósseo a elasticidade para suportar as forças de tração e flexão, enquanto o osso cortical fornece a dureza para suportar as forças de compressão, forças estas as quais os ossos estão submetidos no dia a dia ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

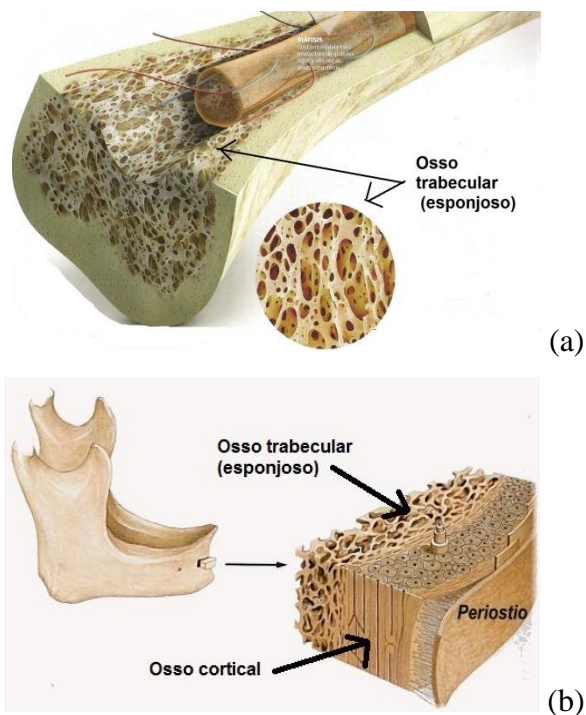


Figura 3.0: Anatomia do osso (a) trabecular e (b) cortical ⁽¹⁸⁾.

O osso cortical, ao ser submetido à compressão, possui resistência mecânica entre 131 e 224 MPa no sentido longitudinal e de 106 a 133 MPa no sentido transversal. Ao ser submetido à tração, sua resistência mecânica passa a variar de 78,8 a 151 MPa no sentido longitudinal, e de 51 a 56 MPa no sentido transversal. Seu módulo de

elasticidade na direção longitudinal varia de 17 a 20 GPa e na transversal varia de 6 a 13 GPa. Já o osso trabecular, devido à sua morfologia porosa, possui um comportamento mecânico mais complexo que o osso cortical, sendo sua resistência mecânica muito baixa (varia de 2 a 5 Mpa). Em contra partida, possui módulo de elasticidade variando de 90 a 400 MPa ⁽¹⁶⁾.

3.2 Engenharia de Tecido ósseo

A engenharia de tecidos é uma área de conhecimento em rápida evolução, que procura reconstituir, substituir ou regenerar tecidos específicos ou órgãos, através da transformação de conhecimentos da física, química e biologia em materiais eficazes e práticos ⁽³⁾, responsáveis tanto pela manutenção da estrutura tecidual existente, quanto por viabilizar o crescimento tecidual, atuando como matrizes auxiliares à proliferação de tecidos vivos ^(4,19).

No início deste século, a facilidade de se produzir materiais sintéticos, desenvolvidos quimicamente e mecanicamente para cada tipo de tecido humano, levou a realização de várias experiências de implantação, a maioria delas com o intuito de se estudar a citotoxicidade dos biomateriais ^(19,20).

O termo engenharia de tecidos surgiu em 1987, para definir um campo de estudos multidisciplinar que abrange principalmente os conhecimentos de engenharia de materiais e de ciências biomédicas. No final da década de 80, a engenharia de tecidos começou a ser ministrada em centros de ensino com o objetivo de avançar nos conhecimentos e pesquisas para o tratamento de doenças utilizando abordagens celulares. Durante a década de 1990, a engenharia de tecidos progrediu rapidamente com o desenvolvimento de alguns substitutos biológicos de tecidos, como tecidos, órgãos artificiais e matrizes para crescimento tecidual ^(21,22).

Para regeneração do tecido ósseo, matrizes extracelulares artificiais tridimensionais são desenvolvidas para serem implantadas no tecido danificado no intuito de servirem de suporte para que células do tecido adjacente migrem através das interconectividades de

seus poros e promovam o crescimento tecidual. As matrizes, também podem ser utilizadas para induzir e sustentar o crescimento tecidual *in vitro* utilizando células do próprio paciente para depois serem implantadas no tecido danificado.

Uma matriz desenvolvida pela engenharia de tecidos deve promover um perfil biomecânico inicial proporcionando a formação, deposição e organização da nova matriz orgânica gerada e degradar-se proporcionalmente ao crescimento do novo tecido ⁽⁵⁾.

A arquitetura tridimensional da matriz artificial é fundamental para que haja desenvolvimento de funções biológicas específicas nos tecido em crescimento. É projetada para proporcionar condições nutricionais adequadas e organização espacial para as células teciduais ⁽⁴⁾.

3.3 Matrizes para a Engenharia de tecidos

As matrizes sintéticas possuem a finalidade de substituírem temporariamente a matriz extracelular natural (MEN), composta por uma malha intrínseca de colágeno e fibras elásticas incorporadas em um material de gel altamente hidratado com glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas ^(7,23).

As matrizes utilizadas pela engenharia de tecidos podem ser projetadas na composição e na estrutura (micro e macroestrutura), e precisam apresentar propriedades biológicas e físicas compatíveis com as condições fisiológicas *in vitro* e *in vivo* do tecido danificado. A principal função da matriz é fornecer um suporte temporário com integridade mecânica suficiente para manter sua arquitetura enquanto conduz à proliferação, diferenciação e biossíntese celular no local em que foi implantada ⁽²⁾. Para isto, devem apresentar algumas propriedades essenciais: serem atóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis, capazes de orientar e organizar a forma das células desejadas, possuírem alta porosidade, estrutura porosa interconectada e resistência mecânica similar à resistência mecânica do tecido danificado ^(1,19,24).

A taxa de degradação do material deve ser proporcional à taxa de crescimento tecidual. A cinética de absorção é fundamental e depende do tecido a ser regenerado. A degradação da matriz utilizada para a engenharia de tecido ósseo deverá ser relativamente lenta, para que mantenha a resistência mecânica até que a regeneração do tecido esteja praticamente toda concluída ^(1,3,19,24).

Matrizes tridimensionais possuem uma extensa área superficial e tamanho de poros que promovem a união, migração, proliferação e diferenciação de células teciduais do tecido conjuntivo em toda a região onde o tecido novo é necessário, assim como a remodelação deste ⁽¹⁹⁾.

A quantidade de estímulo mecânico realizado pela matriz depende de sua porosidade, tamanho dos poros, arquitetura e das propriedades mecânicas dos materiais que a compõem. A presença de microporos (<100µm) é importante para a sobrevivência das células por viabilizar a formação vascular, adesão celular, adsorção biológica de metabólitos e reabsorção das taxas controladas para corresponder ao reparo tecidual. Já a presença dos macroporos (> 100µm e < 500µm) são ideias para habitar o crescimento do tecido e a liberação dos nutrientes para o centro do tecido em formação ^(1,20).

Para o crescimento do tecido ósseo o ideal são poros com tamanho entre 75 e 250µm. Já para o crescimento do tecido cartilaginoso, o ideal são poros na faixa de 200 a 300µm. Vale ainda lembrar que os osteoblastos apresentam excelente resposta celular em poros com tamanho entre 200 a 400 µm ^(7,25). Além da presença dos poros (que devem ser preferencialmente abertos), é necessário haver uma interconectividade entre eles viabilizando a vascularização do tecido em crescimento, o transporte adequado de metabólitos e resíduos e a reabsorção do biomaterial na proporção do crescimento tecidual ^(24,26).

Matrizes tridimensionais possuem uma extensa área superficial e tamanho de poros que promovem a união, migração, proliferação e diferenciação de células teciduais do tecido conjuntivo em toda a região onde o tecido novo é necessário, assim como a remodelação deste ⁽¹⁹⁾.

No caso do tecido ósseo, os materiais utilizados na fabricação das matrizes devem ser preferencialmente osteoindutores (capazes de promover a diferenciação de células progenitoras para células osteoblásticas), osteocondutores (sustentarem e induzirem o crescimento do osso circundante), e capazes de osseointegração (se interagirem com o tecido ósseo adjacente). Os materiais substitutos de osso em geral consistem em cerâmicas bioativas, vidros bioativos, polímeros naturais e/ou sintéticos, e compósitos destes. A bioatividade do compósito, fornecida pelo seu componente bioativo, promove o crescimento do tecido adjacente ao material implantado e a formação de um forte vínculo entre o tecido e o material após o implante ⁽¹⁾.

Compósitos orgânico-inorgânicos combinam a flexibilidade de uma fase polimérica com a resistência à compressão de um inorgânico para gerar materiais bioativos com melhores propriedades mecânicas e perfis de degradação ⁽¹⁾.

3.4 Poli(álcool vinílico)

O poli(álcool vinílico) (PVA) é o polímero sintético produzido em maior volume no mundo através da polimerização do acetato de vinila e hidrólise do poli (acetato de vinila) em poli (álcool vinílico – co-acetato de vinila) ^(29,30). Foi obtido pela primeira vez em 1924, por *Herrman e Haehnel* ⁽²⁹⁾. Em 1961, *Staudinger* ⁽²⁹⁾, por meio das reações de esterificação e saponificação, realizou pela primeira vez a transformação reversível entre o poli(álcool vinílico) e o poli(acetato de vinila). O PVA é hoje amplamente utilizado na produção de adesivos, fibras, emulsificantes e materiais plásticos descartáveis. É um excelente adesivo, possui boa resistência a solventes, óleos e graxas, e sua resistência à passagem de oxigênio é superior a de qualquer polímero conhecido ⁽⁴²⁾. Tem sido muito utilizado na engenharia de tecido ósseo para a fabricação de biomateriais devido a sua baixa toxicidade, disponibilidade de sítios de adesão de moléculas bioativas, solubilidade em solventes biológicos; possuir características interfaciais e mecânicas; além de apresentar grupos OH capazes de se ligarem para fortalecer as ligações de hidrogênio com moléculas bioativas ⁽³²⁻³⁴⁾.

O grau de hidrólise (GH) desse polímero é dado pela relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final e o número inicial total de grupos acetila ^(30,31). Diante disso, é classificado em parcialmente hidrolisado (GH na faixa de 80%) ou totalmente hidrolisado (GH 100%). Quanto ao grau de polimerização, pode apresentar baixa viscosidade (5cp), média viscosidade (20-30cp) ou alta viscosidade (40-50cp) ⁽²⁹⁻³²⁾. Aumentando o grau de hidrólise do PVA, este apresenta redução da solubilidade, do poder de dispersão e da flexibilidade; e aumento da resistência à água, de adesão em superfícies hidrofílicas, da viscosidade, da resistência à tração e da cristalinidade ⁽³³⁾.

O PVA é utilizado principalmente em solução, e é solúvel em solventes altamente polares e hidrófilos, sendo a água seu melhor solvente. Sua solubilidade depende do grau de hidrólise, do grau de polimerização e da temperatura da solução. Para o PVA completamente hidrolisado, o elevado número de hidroxilas (grupos hidrofílicos) conduz a formação de fortes ligações de hidrogênio entre os grupos de hidroxilas inter e intramoleculares, impedindo sua solubilidade em água fria. Por outro lado, os grupos acetato residuais no PVA parcialmente hidrolisado são essencialmente hidrofílicos, e enfraquecem as ligações inter e intramoleculares dos grupos vizinhos hidroxila, favorecendo a entrada de água nos novelos poliméricos e, dessa forma, aumentam a solubilidade em água, a frio. Quanto maior a quantidade de grupos acetato residuais no PVA, maior será sua solubilidade em água, a frio. Após a dissolução, o PVA mantém-se estável em solução aquosa, mesmo em temperatura ambiente ⁽¹⁾.

A temperatura possui uma grande influência na solubilidade do PVA. O aumento da temperatura promove o rompimento das ligações de hidrogênio intra – e intermoleculares, diminuindo essas forças, aumenta a solubilidade do PVA. Se após a quebra dessas ligações de hidrogênio a temperatura continuar elevada, pode ocorrer rompimento das ligações de hidrogênio com a água, e neste caso, acaba por diminuir a solubilidade do PVA ^(32,34,35).

Devido à alta energia associada à dissolução da fase cristalina, a solubilização do PVA (100% hidrolisado) somente ocorre em temperaturas elevadas ⁽³²⁾.

Para o PVA 98% hidrolisado, a diminuição do grau de polimerização aumenta a solubilidade. Para o PVA parcialmente hidrolisado (88%), a solubilidade é relativamente independente do grau de polimerização. Para o PVA 80% hidrolisado, a

solubilidade a baixa temperatura é muito maior que para o PVA 88% hidrolisado, mas decresce rapidamente a partir de 30 °C ^(31,32,34)

As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização, do grau de hidrólise e da massa molar. A combinação principalmente da massa molar e do grau de hidrólise influencia a solubilidade, a viscosidade, a resistência mecânica, a adesão em superfícies e a flexibilidade, entre outras propriedades ⁽³⁷⁾.

3.5 Quitosana

A quitosana (Qui) é um biopolímero originado da desacetilação da quitina (Figura 3.1), polímero natural existente em três formas (β , α e γ), e presente principalmente nos exoesqueletos de crustáceos. A quitosana e a quitina são produtos naturais de baixo custo, renováveis e biodegradáveis, de grande importância econômica e ambiental ^(6,33,38-41). Os exoesqueletos de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que os consideram poluentes. Assim, sua utilização reduz o impacto ambiental ⁽⁴¹⁾.

A origem e o tratamento da quitina durante sua extração determinam a cristalinidade e o polimorfismo da quitosana. A extração da quitina ocorre através de etapas de desmineralização e desproteínização dos exoesqueletos, resultando em um biopolímero em forma de pó incolor, com uma parte de sua estrutura amorfa e outra cristalina. A quitina contém grupos acetil (NHCOCH_3) e, ao sofrer N-desacetilação termoquímica com solução concentrada de NaOH m/v a 90-120 °C por 4 a 5 horas, resulta na quitosana ⁽⁴⁰⁾.

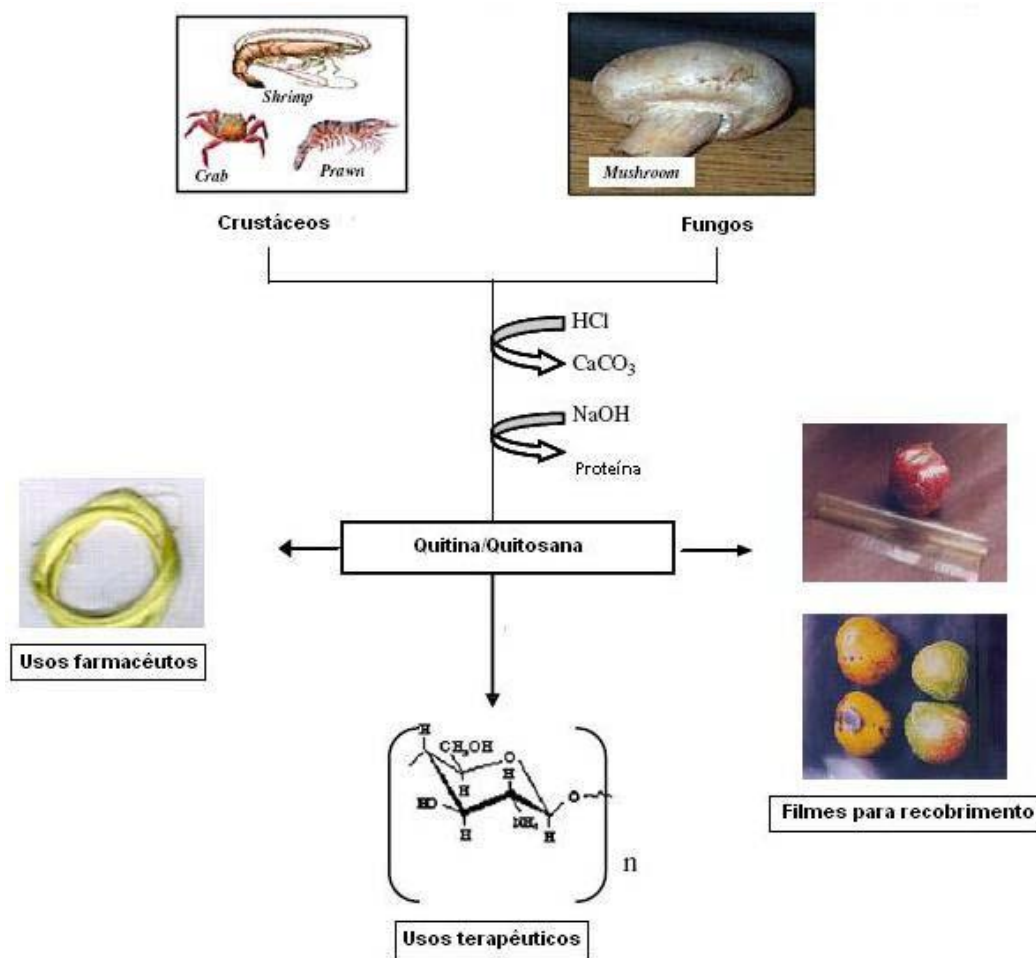


Figura 3.1: Esquema da obtenção de quitina e quitosana e suas aplicações ⁽⁴⁰⁾

As condições utilizadas para a desacetilação da quitina determinam o peso molecular e o grau de desacetilação da quitosana. O produto N-desacetilado da quitina somente passa a ser considerado quitosana quando o grau de desacetilação (GD) se torna igual ou superior a 60%, percentagem a partir da qual o biopolímero se torna solúvel em soluções ácidas diluídas ^(33,38,40).

Tanto a quitina quanto a quitosana são polímeros do tipo polissacarídeos, e apresentam estrutura química constituída por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Porém a quitina apresenta mais unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e a quitosana apresenta mais unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose ^(6,33,38-40). Ambas

apresentam estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal celulose diferenciando-se somente nos grupos funcionais ligados ao carbono 2 de cada unidade glicosídica; grupos amino (NH_2) para a quitosana, grupos acetil (NHCOCH_3) para quitina e grupos hidroxila (OH) para a celulose (Figura 3.2) ^(6,33,38-40).

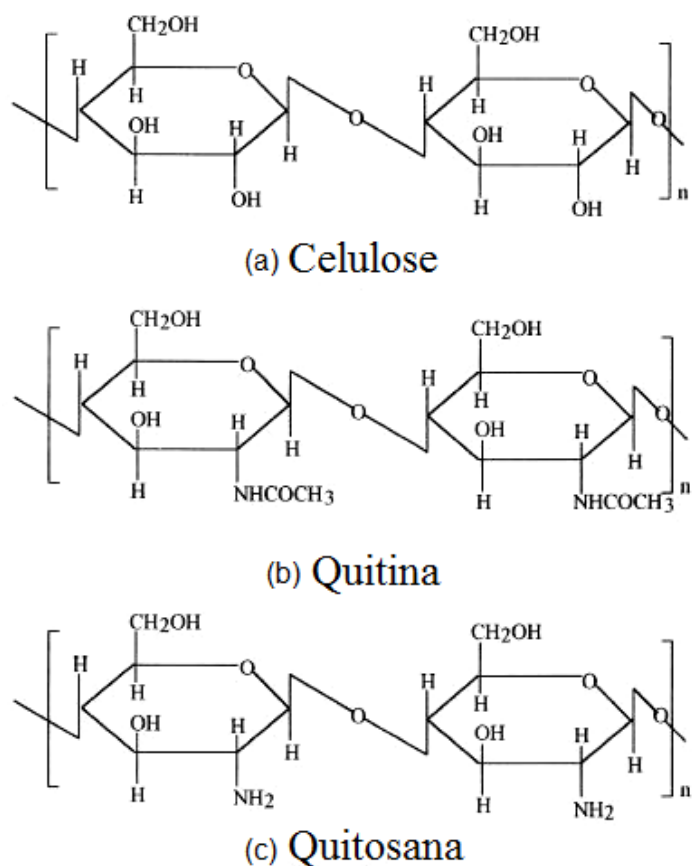


Figura 3.2: Comparação das estruturas moleculares da (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana ⁽⁴⁰⁾.

A quitosana apresenta estrutura cristalina rígida, através de ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Através da difração de raios-X podemos observar que a quitosana tem uma célula unitária ortorrômbica, com parâmetros de rede $a = 0,807\text{nm}$, $b = 0,844\text{nm}$ e $c = 1,034\text{nm}$ (Figura 3.3) ^(33,40).

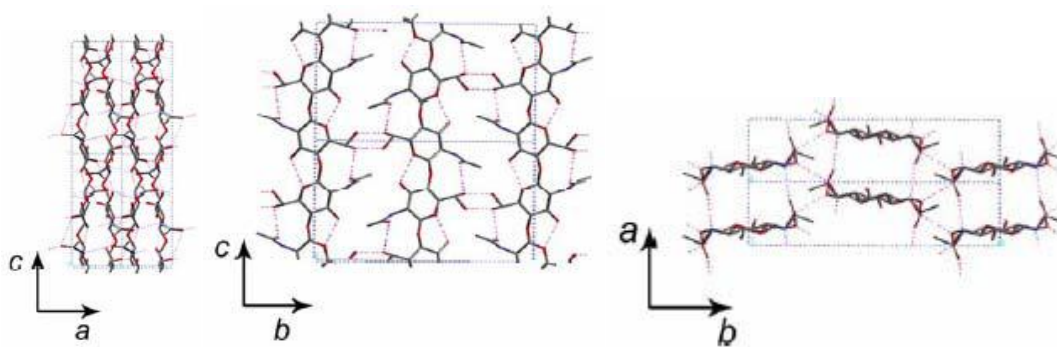


Figura 3.3: Célula unitária da quitosana evidenciando as três projeções ⁽⁴⁰⁾.

Normalmente, a quitosana é insolúvel em soluções alcalinas. Entretanto, em soluções ácidas ($\text{pH} < 6$) os grupos aminos livres e protonados na glicosamina facilitam a solubilidade da molécula ^(6,38).

A quitosana possui três grupos reativos funcionais: o grupo amino na posição C(2), o grupo hidroxil primário na posição C(3) e secundário na posição C(6). Estes grupos permitem modificações na quitosana para aplicações específicas, que podem ser utilizadas na produção de diversas matrizes artificiais pela engenharia de tecidos. A química natural da quitosana por sua vez, oferece muitas possibilidades para modificações covalentes e iônicas que permitem um amplo ajuste de suas propriedades mecânicas e biológicas ⁽⁶⁾.

O grau de desacetilação (GD) da quitosana expressa o conteúdo médio de unidades de glicosamina nas cadeias desse biopolímero, e influencia suas características físicas, químicas e biológicas; assim como a hidrofobia, solubilidade, viscosidade de suas soluções, e a capacidade de reticulação na presença de determinados agentes reticulantes ⁽⁴²⁾. Conforme o grau de desacetilação aumenta, as interações entre a quitosana e as células também aumentam, pela presença dos grupos amino. Conseqüentemente, a desacetilação da quitosana favorece uma maior adesão e proliferação celular ⁽³⁸⁾.

A quitosana pode ser agrupada em dois grupos: (i) baixo peso molecular, entre 20 kilodaltons (kDa) e 190kDa, com $\text{GD} < 75\%$; (ii) alto peso molecular, de 190kDa a

375kDa, com grau de desacetilação >75%. O peso molecular e o GD afetam diretamente as propriedades químicas e biológicas do polímero. A tabela 3.1 mostra a relação do GD e do peso molecular com as propriedades da quitosana⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Tabela 3.0: Relação entre as propriedades e parâmetro estruturais da quitosana⁽³⁸⁾.

Propriedades	Características estruturais
Solubilidade	↑GD
Cristalinidade	↓GD
Biodegradabilidade	↓GD e ↓ Peso molecular
Viscosidade	↑GD
Biocompatibilidade	↑GD
Antioxidante	↑GD e ↓ Peso molecular
Aumento do efeito de permeação	↑GD

Sua estrutura linear, não ramificada e de elevado peso molecular é um excelente intensificador da viscosidade em ambientes ácidos, e é responsável pela quitosana se comportar como um material pseudoplástico, que apresenta diminuição da viscosidade com o aumento das taxas de cisalhamento⁽³⁸⁾.

A presença dos grupos amino, indica que o pH modifica substancialmente o estado de carga e as propriedades da quitosana, que se dissolve facilmente em soluções ácidas (pH<6.0)⁽⁵⁹⁾. Em pH baixo (pH<6.0), os grupos amino protonados tornam-se carregados positivamente, o que faz da quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Por outro lado, à medida que o pH aumenta (pH >6,0), as aminas se desprotonam e o polímero perde a sua carga, tornando-se insolúvel. Além do GD, o peso molecular também é um parâmetro importante que afeta de forma significativa a solubilidade e outras propriedades da quitosana⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾.

A viscosidade de uma solução de quitosana aumenta com o aumento da concentração de quitosana e com o aumento do grau de desacetilação, e diminui com o aumento da temperatura. Pode ser influenciada por diferentes condições de desacetilação, através da alteração das forças de repulsão inter e intramolecular ^(50,51). A viscosidade também influencia propriedades biológicas, como propriedades cicatrizantes, aumento e aprimoramento da osteogênese, assim como a degradação por lisoenzimas ⁽³⁸⁾.

O controle do grau de degradação é essencial para a aplicação de biomateriais a base de quitosana na regeneração tecidual. A degradação aumenta quando o GD diminui ⁽⁵⁰⁾. A cinética de degradação parece ser inversamente proporcional ao grau de cristalinidade, que é essencialmente controlado pelo GD. A distribuição dos grupos acetil também afeta a biodegradabilidade, o arranjo dos grupos acetil e sua distribuição aleatória em vez de em bloco, e resulta em taxas muito baixas de degradação enzimática ⁽³⁸⁾.

A desvantagem de se fabricar uma matriz artificial de quitosana pura é a dificuldade de se controlar sua taxa de degradação. Uma taxa de degradação rápida pode causar uma resposta inflamatória crônica, enquanto que uma taxa de degradação lenta induz apenas a uma resposta inflamatória aguda. Uma opção é combinar a quitosana com outros polímeros, para se controlar a taxa de degradação ⁽⁵²⁾.

A engenharia de tecidos tem utilizado muito a quitosana associada a outros materiais na fabricação de biomateriais devido a suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, inércia fisiológica, grande afinidade com proteínas, antibacterianas entre outras ^(6,38-40).

3.6 Vidro Bioativo

Os vidros bioativos (VBs) são materiais de grande relevância para a produção de matrizes artificiais, pela possibilidade de se controlar uma variedade de propriedades químicas e, assim, a taxa de bioreabsorção. A estrutura química dos vidros, em particular os vidros derivados da rota sol-gel, pode ser adaptada a nível molecular, variando-se sua composição, o processo térmico e/ou o processo ambiental. É possível

projetar vidros bioativos com propriedades de degradação específicas para uma aplicação na engenharia de tecido ósseo ^(19,52,53).

Descobertos em 1968 por *Hench et. al.* que utilizaram o termo bioatividade para descrever a habilidade que certas composições de vidros contendo SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 possuem de se ligarem ao tecido ósseo circundante ao implante, induzindo a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) em sua superfície, em meio fisiológico. A HCA é quimicamente e estruturalmente similar à fase mineral do osso ⁽⁶⁶⁾, e é responsável pela ligação interfacial entre o implante e o tecido ósseo circundante ao implante ⁽⁵²⁾.

Os VBs suportam atividade enzimática e vascularização, promovem a adesão dos osteoblastos, e o crescimento e diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. Porém, apresentam baixa resistência mecânica e à fratura, especialmente na forma porosa, quando comparados ao osso trabecular e esponjoso, fator que muitas vezes limita seu uso pela engenharia de tecido ósseo. Uma alternativa é sua utilização associada a um ou mais polímeros, na fabricação de híbridos orgânico-inorgânicos ^(66,69,70).

Os VBs mais utilizados para aplicações biomédicas são compostos de sódio, cálcio e fósforo, em diferentes proporções. O vidro bioativo 45S5, conhecido como Bioglass[®], é composto por 45 mol% SiO_2 , 24.5 mol% Na_2O , 24.5 mol% CaO e 6 mol% P_2O_5 . Outras composições de vidro bioativo não possuem o sódio em sua composição, como o 77S e o 58S, que se diferem na quantidade de sílica e de óxido de cálcio. O 77S possui 80 mol% SiO_2 , 16mol% CaO e 4 mol% P_2O_5 e o 58S possui 60 mol% SiO_2 , 36 mol% CaO e 4 mol% P_2O_5 ^(8,9).

A técnica de fabricação dos VBs mais comumente empregada é o processo sol-gel, que surgiu no fim da década de 90 e composto de uma sequência de processos químicos inter-relacionados, que envolvem a mistura de alcoóxidos e água deionizada na presença de solvente e catalizador, resultando na síntese de uma rede tridimensional interconectada inorgânica ^(21,24).

O processo sol-gel trata de qualquer rota de síntese de materiais onde, em um determinado momento, ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é utilizado para definir uma suspensão de partículas coloidais com dimensões entre 1nm a 100nm, estáveis em um fluido (formadas a partir da hidrólise de uma solução de tetraalcoxissilanos em um solvente orgânico que leva a formação de partículas com função silanol); o termo gel denomina a rede tridimensional interconectada criada a partir de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) ^(21,54).

Nos géis coloidais, a gelatinização ocorre através da agregação linear de partículas primarias (Figura 3.4-1), que somente ocorre pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão, como a mudança de pH do sol ou por um precursor, como o Si(OR)_4 , usado para fornecer a rede Si-O-Si de vidros bioativos, onde R pode ser CH_3 , C_2H_5 ou C_3H_7 ^(21,52,55). Nos géis poliméricos preparados geralmente a partir de soluções poliméricas, a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Figura 3.4-2) ⁽⁵⁴⁾.

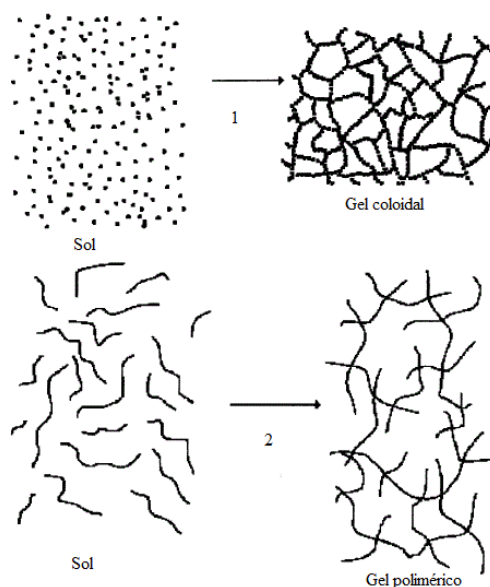


Figura 3.4: Desenho descritivo do processo sol gel para obtenção do (1) gel coloidal e do (2) gel polimérico ⁽⁵⁴⁾.

A técnica sol-gel permite a síntese de materiais com elevada área superficial, elevado grau de hidrólise SiOH e elevada bioatividade ⁽²⁴⁾. Possui a vantagem de poder ser executada em temperatura ambiente, além do baixo custo operacional. VBs obtidos pelos métodos de fusão possuem concentração de sílica no máximo em torno de 60% em mol, enquanto que os vidros obtidos pela técnica sol-gel apresentam concentração de até 90% em mol. Comparando-se a mesma composição de vidro bioativo fabricado pelo método sol-gel e pelo método de fusão, notou-se que o vidro produzido pelo método sol-gel apresentou bioatividade e velocidade de formação da camada de hidroxiapatita maiores que o produzido pelo método de fusão ⁽⁵⁶⁾.

O método sol-gel permite a incorporação de polímeros em um volume de sílica inorgânica, resultando na produção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos ^(8,53,57). Além do mais, o comportamento de dissolução de um vidro bioativo em fluido humano pode ser controlado quando estes são preparados com polímeros ⁽⁵⁸⁾.

3.7 Reticulação Polimérica

A reticulação polimérica, também conhecida como “*crosslinking*”, é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, formando polímeros tridimensionais com alta massa molar ⁽⁵⁸⁾. Os reticulantes são moléculas que apresentam no mínimo dois grupos funcionais reativos que permitem a formação de ponte entre cadeias poliméricas. Seus pesos moleculares são sempre muito menores que o peso molecular da cadeia principal ⁽⁵⁹⁾.

Glutaraldeído (1,5 Pentanodial)

O glutaraldeído (GA) é um agente bifuncional extensivamente utilizado na reticulação de polímeros e seus compósitos. Interagindo fortemente com os grupos amino e, com menor intensidade, com o grupo tiol, confere maior estabilidade a estes materiais ^(60,61). A interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos polímeros origina a formação de bases de Schiff (C=N), que é irreversível. Acredita-se que se ao utilizar solução de glutaraldeído (glutaraldeído diluído em água deionizada), ligações

duplas etilênicas são formadas, sendo estas irreversíveis e muito resistente a variações de pH e temperatura ^(33,62).

É o agente reticulante mais eficaz. Porém, na forma livre é citotóxico ao corpo humano ⁽⁸⁴⁾. Uma solução de GA a 25% e na temperatura de 25 °C apresenta 4% de glutaraldeído na forma livre. O restante dele está na forma de mono e diidratos, hemiacetais cíclicos e forma polimérica. Sua polimerização em solução depende da temperatura, pH e concentração ⁽⁶³⁾.

A reação entre o glutaraldeído e o PVA envolve os grupos hidroxil e o aldeído para formar uma ponte acetal, enquanto que a reação com a quitosana envolve o grupo aldeído e o grupo amina, formando bases de Schiff (C=N), que aumentam a estabilidade dos híbridos PVA / Qui/VB ^(60,64).

3.8 Matrizes porosas PVA/ Qui/VB obtidas por liofilização

Híbridos de polímeros sintéticos e naturais com uma fase de vidro bioativo conseguem balancear de uma forma excelente a força e a dureza, além de melhorarem as propriedades mecânicas do híbrido, quando comparados com as propriedades isoladas cada um de cada componentes ^(57,63,64). Estes híbridos podem ser produzidos pela rota sol-gel, que permite a incorporação de uma fase polimérica (polímeros sintéticos e/ou naturais) a uma fase inorgânica (vidro bioativo). A ligação entre essas duas fases depende da força de interação entre elas, e pode ser do tipo iônico (ligações fracas envolvendo hidrogênio ou do tipo Wan der Waals) ou covalente ⁽⁶⁵⁾.

O sistema PVA/Qui/VB pode levar à preparação de nanocompósitos (híbridos orgânico-inorgânicos) com resistência mecânica, bioatividade e biodegradabilidade controladas ⁽⁶⁷⁾.

Uma vez que o PVA apresenta excelentes propriedades mecânicas, a quitosana possui um grande número de grupos amino reativo e grupos hidroxilo, que podem ser utilizados para modular a integração com o tecido hospedeiro, e o vidro bioativo apresenta excelente bioatividade, a associação desses três materiais possibilita a

formação híbridos orgânico- inorgânicos promissores para serem utilizados e estudados pela engenharia de tecido ósseo.

Na engenharia de tecidos, a secagem por liofilização é utilizada para a preparação de materiais evitando as tensões e retrações que podem levar a rachaduras e empenamento durante uma secagem convencional. O resultado é uma matriz com microestrutura porosa complexa, muitas vezes anisotrópica, gerada durante o congelamento ⁽¹¹⁾.

A quantidade, tipo, número, geometria das partículas e o tipo da solução líquida em combinação com a velocidade do congelamento e aditivos determinam a morfologia e conectividade dos poros, assim como a espessura e espaçamento da lamela e o tamanho e número de pontes entre elas. A massa das paredes celulares, as propriedades de superfície, propriedades mecânicas e a interação do tecido com a matriz liofilizada são, portanto extremamente dependente dos parâmetros de processamento ⁽¹⁾.

O grupo de pesquisa NDBio UFMG vem estudando há algum tempo a produção de híbridos PVA/Qui/VB ^(53,67). Em um dos estudos, *Mansur e Costa* ⁽⁵³⁾ obtiveram matrizes híbridas com estrutura hierárquica com macroporos interconectados (10 – 500µm) e mesoporos com estrutura típica de gel de vidro inorgânico (poros na faixa de 2 – 50µm). Já *Lemos* ⁽¹⁰⁾ obteve, variando a concentração de VB e utilizando a liofilização como meio de secagem, híbridos com porosidade na faixa de 153µm e híbridos com poros na faixa de 95µm.

3.9 Liofilização

A liofilização é considerada um processo que remove o solvente ou solução líquida do material através da solidificação destes em baixa temperatura, seguida de sua sublimação diretamente da fase sólida para a fase vapor, formando poros em consequência dos vazios deixados pelo solvente (ou solução líquida) sublimado do material liofilizado. Além da formação de poros, este processo mantém a estrutura original e aumenta a estabilidade do material ⁽¹¹⁾.

Basicamente, um liofilizador é composto de em uma câmara de secagem com prateleiras com temperatura controlada, que se conectam através de válvulas a uma câmara de refrigeração que é capaz de manter a temperatura abaixo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A câmara de secagem é conectada a um condensador que possui uma ou mais bombas de vácuo conectadas em série, para atingir pressões na faixa de $0,4$ a $4,0 \times 10^{-3}$ mbar (baixo vácuo) em todo o sistema durante a operação⁽⁶⁹⁾.

É muito utilizado pela indústria farmacêutica para manter ou melhorar a estabilidade de seus produtos, e pela indústria alimentícia, para manter as propriedades dos alimentos, entre muitas outras aplicações. Recentemente, tem sido muito utilizado na engenharia de tecidos, uma vez que através deste processo de secagem é possível se manter praticamente intactas as características estruturais das matrizes porosas tridimensionais, como as propriedades mecânicas e os poros formados pelos cristais de gelo sublimados^(10,11,66,67).

No processo de secagem convencional, alguns poros das matrizes acabam sendo danificados, conseqüentemente, isso reflete na porosidade do material. Esse problema pode ser evitado com a utilização da liofilização como método de secagem, por esta técnica preservar as características originais do material, pois não afeta diretamente a matriz sólida que envolve os cristais de gelo. Matrizes poliméricas tridimensionais altamente porosas (~97%) e com extensa interconectividade de seus poros podem ser produzidas através desta técnica que consiste de três etapas: congelamento, secagem primária e a secagem secundária^(11,68).

Congelamento

Durante a etapa de congelamento, a suspensão líquida é congelada a temperaturas geralmente abaixo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando em uma matriz polimérica (no caso do material submetido à liofilização ser uma matriz polimérica) com uma fase cristalina contendo gelo de pura água e uma fase amorfa contendo os materiais poliméricos e uma quantidade limitada de água não cristalina. Assim, a fase amorfa fica localizada entre os coprecipitados e os cristais de gelo que crescem formando uma rede interpenetrante em crescimento. Após o congelamento, a pressão na câmara de secagem do liofilizador é reduzida^(11,69,70).

A temperatura e a velocidade de congelamento interferem na microporosidade, morfologia dos poros e as propriedades mecânicas do material em preparação. Se o congelamento ocorre bruscamente, há o risco de ocorrer danos à estrutura do material, pois os cristais de gelo formados serão muito pequenos, ao passo que se a velocidade de congelamento for lenta, a estrutura original do material será preservada e o tamanho dos cristais de gelo formados serão maiores ^(11,65,68).

O material deverá ser congelado em sua temperatura de transição vítrea (T_g) ou abaixo dela para que o congelamento ocorra no material todo e de forma homogênea ⁽¹¹⁾. 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 ⁽⁷⁸⁾.

Secagem primária

A secagem primária envolve a sublimação, sob vácuo, dos cristais de gelo formados durante o congelamento. É a etapa mais demorada do processo de liofilização.

Nesta fase, o material já possui o aspecto esponjoso e poroso. Por ser responsável pela eliminação de cerca de 90% da água e de 85 % da umidade contida no material, é a etapa mais demorada do processo ⁽¹¹⁾.

Secagem secundária

Durante a secagem secundária, ocorre a remoção da água remanescente (a que não formou os cristais de gelo durante o congelamento), por dessorção. A temperatura é elevada e, muitas vezes a pressão é reduzida novamente, para promover a dessorção da água residual. Ocorre eliminação de 10 % de água e o material permanece com cerca de 2% de umidade. Localmente, a secagem secundária pode ocorrer simultaneamente com a secagem primária, nas regiões onde os cristais de gelo foram sublimados rapidamente ^(66,67,69).

No processo de liofilização, a microestrutura dos materiais pode claramente ser dividida em três zonas distintas (Figura 3.5), cada uma delas caracterizada por um tipo de morfologia, e com dimensões de poros distintas. 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 (zona 2), o material é caracterizado por uma morfologia celular; na terceira zona, chamada de zona superior (zona 3), o material é lamelar, com longos poros paralelos alinhadas na direção de crescimento dos cristais de gelo ^(76,77).

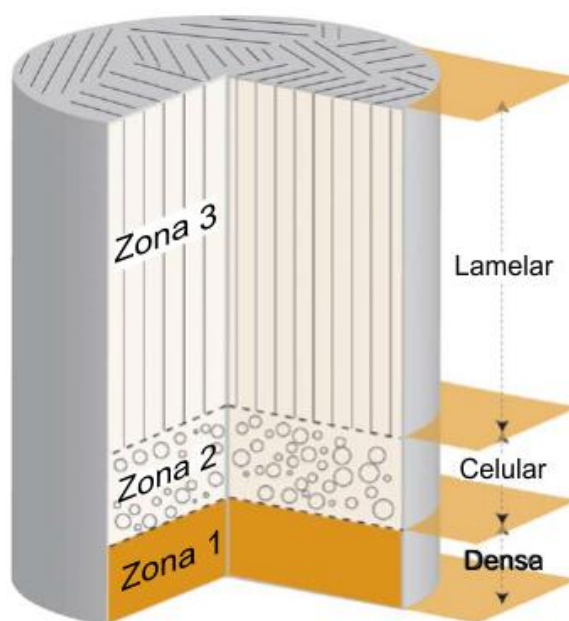


Figura 3.5: Ilustração do comportamento da porosidade nas 3 zonas de uma matriz durante o processo de liofilização ⁽¹⁰⁾.

A predominância das zonas, assim como a morfologia dos poros, dependerá do tipo de material, 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 artificiais, compostas por material polimérico e por material inorgânico, obtidas pela técnica de liofilização ^(10,76,77).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os principais reagentes utilizados foram:

- Quitosana comercial (Qui) com alto peso molecular e grau de desacetilização (GD) >75%;
- Tetraetilortosilicato (TEOS);
- Trietilfosfato (TEP);
- Poli(álcool vinílico) (PVA) com grau de hidrólise (GH) =80%;
- Glutaraldeído (25%).

Todos os reagentes foram fornecidos pela Aldrich Chemical.

4.2 Síntese das Matrizes

Seis tipos de matrizes obtidas a partir de soluções de poli(álcool vinílico) (PVA), quitosana (Qui) e solução de vidro bioativo (VB), reticuladas com solução de glutaraldeído (GA), foram estudadas neste trabalho:

- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 1:3 (20% PVA, 60% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 3% em relação à massa polimérica;
- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 1:3 (20% PVA, 60% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 1% em relação à massa polimérica;

- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 1:1 (40% PVA, 40% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 3% em relação à massa polimérica;

- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 1:1 (40% PVA, 40% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 1% em relação à massa polimérica.

- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 3:1 (60 % PVA, 20% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 3% em relação à massa polimérica.

- Matrizes com 80% de massa polimérica e razão PVA: Qui igual a 3:1 (60% PVA, 20% Qui e 20% de VB), e reticuladas com glutaraldeído a 1% em relação à massa polimérica.

Todas as amostras foram geleificadas em frascos abertos e em frascos tampados, no intuito de verificar se o fato de tampar os frascos interfere no processo de geleificação.

4.2.1 Preparo da Solução de PVA

A solução de PVA 5,0% (m/v) foi preparada pela dissolução de PVA (GH=80%) em água deionizada (100 ml) em agitação mecânica à temperatura de 70 °C (± 2 °C) por 45 minutos.

4.2.2 Preparo da Solução de Quitosana

A solução de quitosana (1%, m/v) foi preparada por dissolução do pó comercial 1g em 100 ml de água deionizada. 2 ml de ácido acético foi acrescentada a solução e em seguida submetida a agitação mecânica por 24 hs.

4.2.3 Preparo da Solução Precursora de Vidro Bioativo

O vidro bioativo 60S foi obtido pela hidrólise ácida e policondensação de tetraetilortossilicato (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 utilizado (porcentagem em mol) foi: 60% SiO_2 ; 36% P_2O_5 ; 4%CaO.

4.2.4 Preparo da Solução de Glutaraldeído

A solução de glutaraldeído (2,0% m/v) foi preparada por diluição de 2ml de glutaraldeído 25% em 23ml de água deionizada.

4.2.5 Fabricação das matrizes

As matrizes foram fabricadas pela mistura da solução de PVA com a solução de quitosana nas razões 1:3, 1:1 e 3:1 por 30 minutos de acordo com a tabela 4.0. Em seguida adicionou-se a solução de vidro bioativo (20 % da massa total da matriz) e a agitação mecânica continuou por mais 45 minutos. Por último, a solução de glutaraldeído a 2% (1 e 3% da massa polimérica) foi adicionada e a agitação mecânica permaneceu por mais 15 minutos.

A solução resultante foi vertida em frascos de 7ml de volume com auxílio de uma seringa, e mantida à temperatura ambiente por 72 horas, tempo necessário para que a geleificação ocorresse. 50% dos frascos foram mantidos abertos e os outros 50% dos frascos mantidos fechados durante o período de geleificação. Em seguida, os frascos abertos foram fechados e juntamente com os frascos que geleificaram fechados foram congelados por 72 horas em refrigerador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Após esse tempo os frascos congelados foram imersos em nitrogênio líquido por 20 minutos e em seguida colocados no liofilizador (Modelo: K105 – Empresa Liotop - SP/Brasil) por 48 h com temperatura no condensador de -98 °C e temperatura no coletor das amostras de -4 °C. A pressão no coletor foi de 30mmHg.

Tabela 4.0: Concentrações da composição, identificação, nomenclatura dos tipos de matrizes e a forma como foram colocadas para gelificarem.

Matriz	Nomenclatura	Concentração (%)				Geleificação em frasco:
		PVA	Quitosana	VB	Glutaraldeído (referente à massa polimérica)	
1:3	1:3	20	60	20	3	Aberto
1:3	1:3F	20	60	20	3	Tampado
1:1	1:1	40	40	20	3	Aberto
1:1	1:1F	40	40	20	3	Tampado
3:1	3:1	60	20	20	3	Aberto
3:1	3:1F	60	20	20	3	Tampado

4.2.6 Caracterização das matrizes tridimensionais

4.2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens das matrizes para o estudo qualitativo da morfologia foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Utilizou-se o microscópio de varredura com canhão de emissão por efeito de campo modelo FEI-Inspect-S50/Republica Tcheca para a realização das imagens. Para evitar deformação da estrutura original das amostras, estas foram imersas em nitrogênio líquido e fraturadas para obtenção da superfície

interna para análise, permitindo desta forma a integridade da estrutura original. Antes da realização das imagens, os corpos de prova foram recobertos com ouro.

4.2.6.2 Espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier

Espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para caracterizar os grupos funcionais específicos do PVA, quitosana, VB e glutaraldeído e as ligações químicas entre eles antes e após o ensaio de degradação. 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 1cm^{-1} com um média de 64 varreduras. O equipamento utilizado foi Nicolet 380 da ThermoScientific, usando cristal de seleneto de zinco. Os dados foram obtidos em transmitância e os espectros foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos.

4.2.6.3 Porosidade aparente – Método de Arquimedes

O método de Arquimedes é utilizado para se obter a porosidade aparente de materiais porosos. O método se baseia no princípio de Arquimedes que estabelece que um sólido com certo volume V , ao ser mergulhado em um fluido, realiza uma força vertical orientada de baixo para cima (empuxo), aplicada no centro de gravidade do volume de fluido deslocado. A intensidade do empuxo é igual ao peso do volume de fluido deslocado. Foram medidas as massas dos corpos das amostras secas (m_{se}), saturada com fluido (m_{sat}) e suspensa no fluido (m_{sus}) sendo que cada corpo de amostra foi medido seis vezes. Foram utilizados cinco corpos de amostras de cada tipo de híbrido com dimensão de 1,8 cm x 0,9 cm. Utilizou-se com fluido água deionizada com densidade = 0,9982 g/cm^3 . A amostra saturada foi obtida através da retirada do excesso de água deionizada na superfície do corpo de amostra com papel toalha pelo período de 2 minutos. A densidade volumétrica (ρ_{vol}) foi calculada através da equação 1 e densidade

verdadeira (ρ_{ver}) pelo cálculo estimado (equação 2). A porosidade aparente foi calculada pela equação 3 e por fim a porosidade total foi obtida pela equação 4.

$$\rho_{vol} = \frac{m_{se}}{m_{sat} - m_{sus}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\rho_{ver} = \% Qui \times \rho Qui + \% PVA \times \rho PVA + \% VB \times \rho VB \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Porosidade aparente (\%)} = \frac{m_{sat} - m_{se}}{m_{sat} - m_{sus}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Porosidade total} = \frac{\rho_{ver} - \rho_{vol}}{\rho_{ver}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

4.2.7 Ensaio mecânico

A avaliação do comportamento mecânico das matrizes foi realizado através do ensaio de compressão no equipamento Máquina Universal Instron 5882 e uma célula de carga de 5KN e velocidade de ensaio de 0,5 mm/min. Foram utilizados três corpos de prova na forma cilíndrica, cada um com dimensão de 18mm de diâmetro e 9mm de altura. Os ensaios foram realizados na temperatura de 22 °C e de acordo com a norma ASTM D 695 (Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics).

4.2.8 Ensaio de degradação

Os ensaios para a determinação do índice de degradação (ID) foram realizados com as amostras em triplicata. As amostras foram secadas por liofilização e mantidas em

dissecador à vácuo por 48 horas, para estabilização do peso. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança analítica (MSI), e colocadas em recipientes contendo fluido corporal simulado (SBF, que possui concentração iônica muito próxima da concentração iônica do plasma sanguíneo humano), obedecendo à condição de relação entre a área superficial e o volume de solução igual a $0,1 \text{ cm}^{-1}$ (78).

O SBF foi preparado conforme ISO/FDIS 23317:2007 (E) à temperatura de $36,5^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$, e apresenta concentrações iônicas próxima às do plasma sanguíneo humano conforme mostrado na tabela 4.0. Os recipientes com as amostras foram mantidos em banho-maria a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. O ensaio de degradação foi realizado em cinco períodos (0.5 horas, 2 horas, 12 horas, 24 horas e 168 horas). Após o respectivo período do ensaio, as amostras foram retiradas dos recipientes, lavadas cuidadosamente com água deionizada e secadas novamente por liofilização. Antes de serem pesadas novamente, permaneceram no dissecador a vácuo por mais 48 horas. O ID foi calculado conforme a equação 5, onde MSI é a massa seca inicial, e MSf é a massa da amostra após a secagem final.

$$\text{ID} = \frac{\text{MSI} - \text{MSf}}{\text{MSI}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Tabela 4.1: Concentração iônica (10^{-3} mol) das soluções de SBF e Plasma sanguíneo.

Íon	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

A figura 4.0 representa o fluxograma das etapas seguidas para a obtenção das matrizes

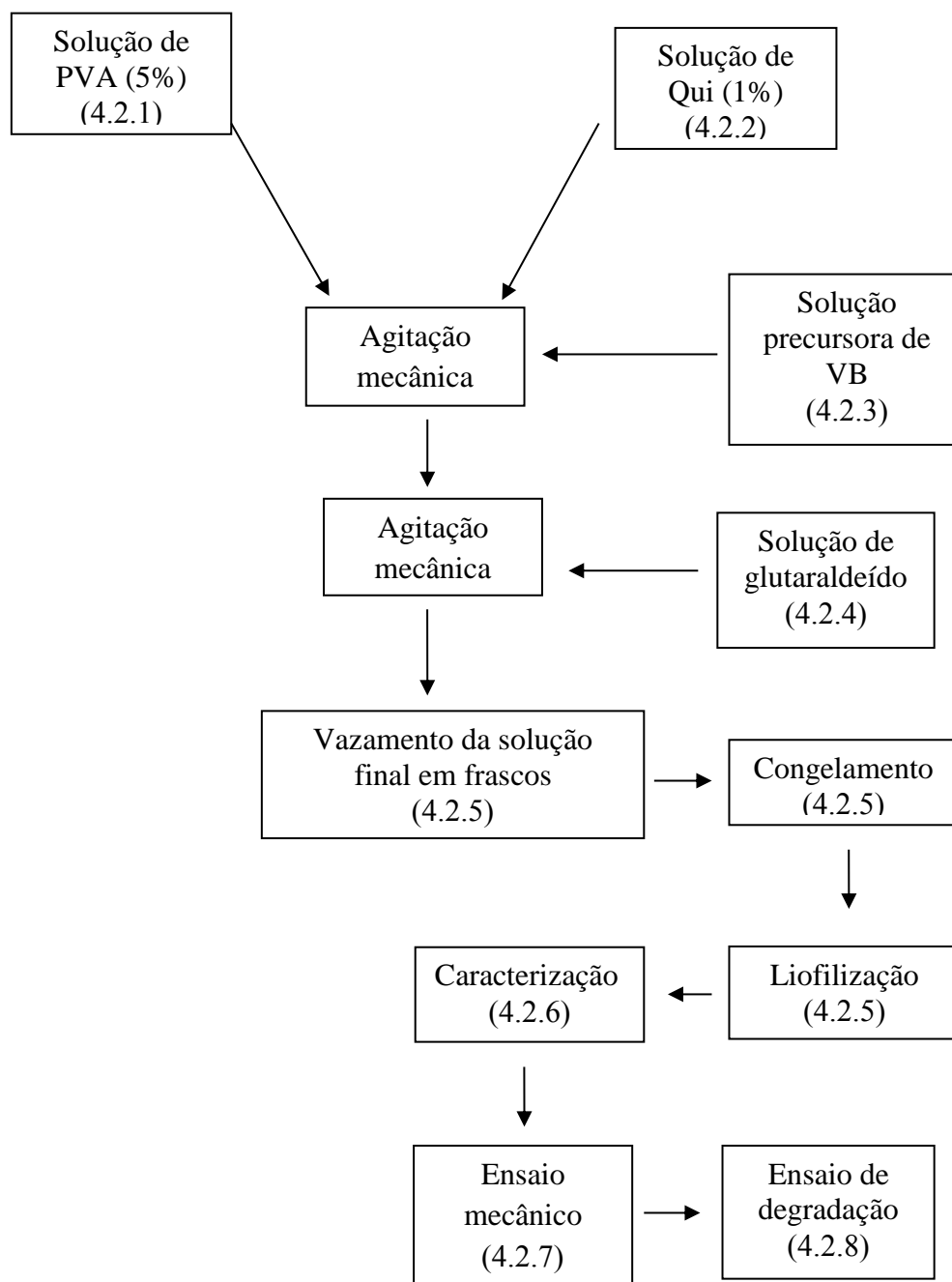


Figura 4.0: Fluxograma das etapas seguidas para a obtenção das matrizes com referência aos tópicos do texto que explica detalhadamente a realização de cada etapa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação qualitativa das matrizes

As matrizes reticuladas com glutaraldeído a 3% foram submetidas ao envelhecimento em frascos tampados e em frascos destampados. Foram descartadas deste trabalho as matrizes envelhecidas em frascos fechados por não terem apresentado estrutura física adequada (Figura 5.0). Possivelmente, isso ocorreu devido a presença do solvente não evaporado durante a geleificação, ter dificultado a formação dos cristais de gelo de forma homogênea nas matrizes durante a fase de congelamento, sendo eliminado somente durante a liofilização juntamente com a água deionizada, tornando a estrutura física das matrizes irregulares, com poros disformes e presença de trincas.

As matrizes reticuladas com glutaraldeído a 1 % que até o presente momento não geleificaram (Figura 5.1) também foram descartadas deste estudo. Na figura 5.2 estão representadas as matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 obtidas com sucesso neste trabalho. Essas matrizes geleificaram em frascos abertos, e apresentaram estrutura física homogênea, regular, poros bem definidos e interconectados, dimensões finais variando de 18 mm x 10 mm a 18 mm x 8 mm com ausência de fraturas e/ou trincas e consistência esponjosa.



Figura 5.0: Matrizes 1:3 F, 1:1 F e 3:1 F descartadas devido à estrutura física irregular, com fissuras e heterogênea.

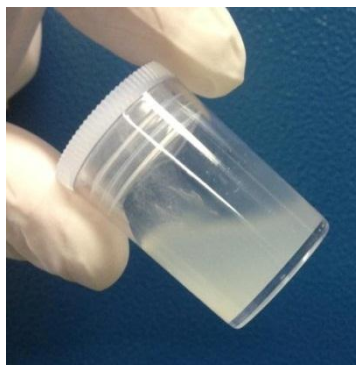


Figura 5.1: Solução precursora da matriz 1:1 reticulado com 1% de glutaraldeído que até o momento não geleificou.

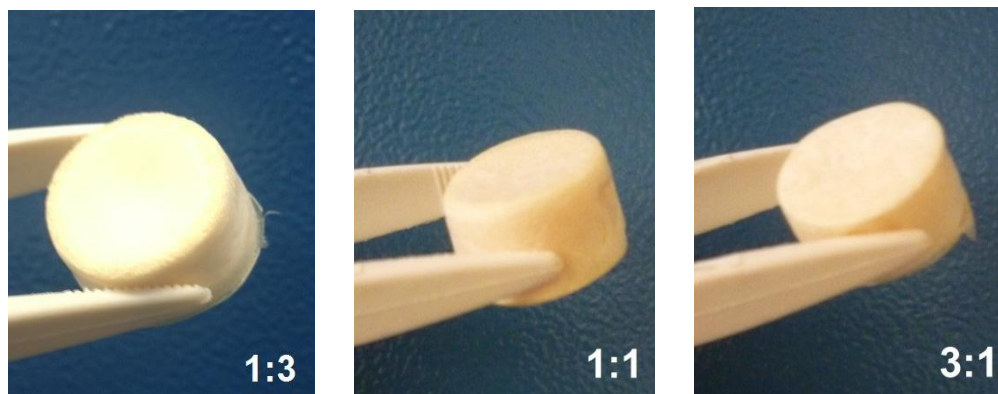


Figura 5.2: Estrutura da matriz 1:1, 1:3 e 3:1 obtidas neste trabalho com sucesso, com estrutura física homogênea, regular e sem a presença de trincas.

5.2 Avaliação morfológica através da Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das matrizes foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e está representada na figura 5.3, onde nota-se uma rede de poros interconectados, bem definidos, abertos e com paredes finas. No geral, os poros localizados na periferia da matriz apresentaram um leve achatamento em sua superfície, possivelmente provocado pelo manuseio da amostra durante o fraturamento desta para obtenção do corpo de prova, mesmo a amostra sendo fraturada imersa em nitrogênio líquido. O tamanho dos poros está representado na figura 5.4.

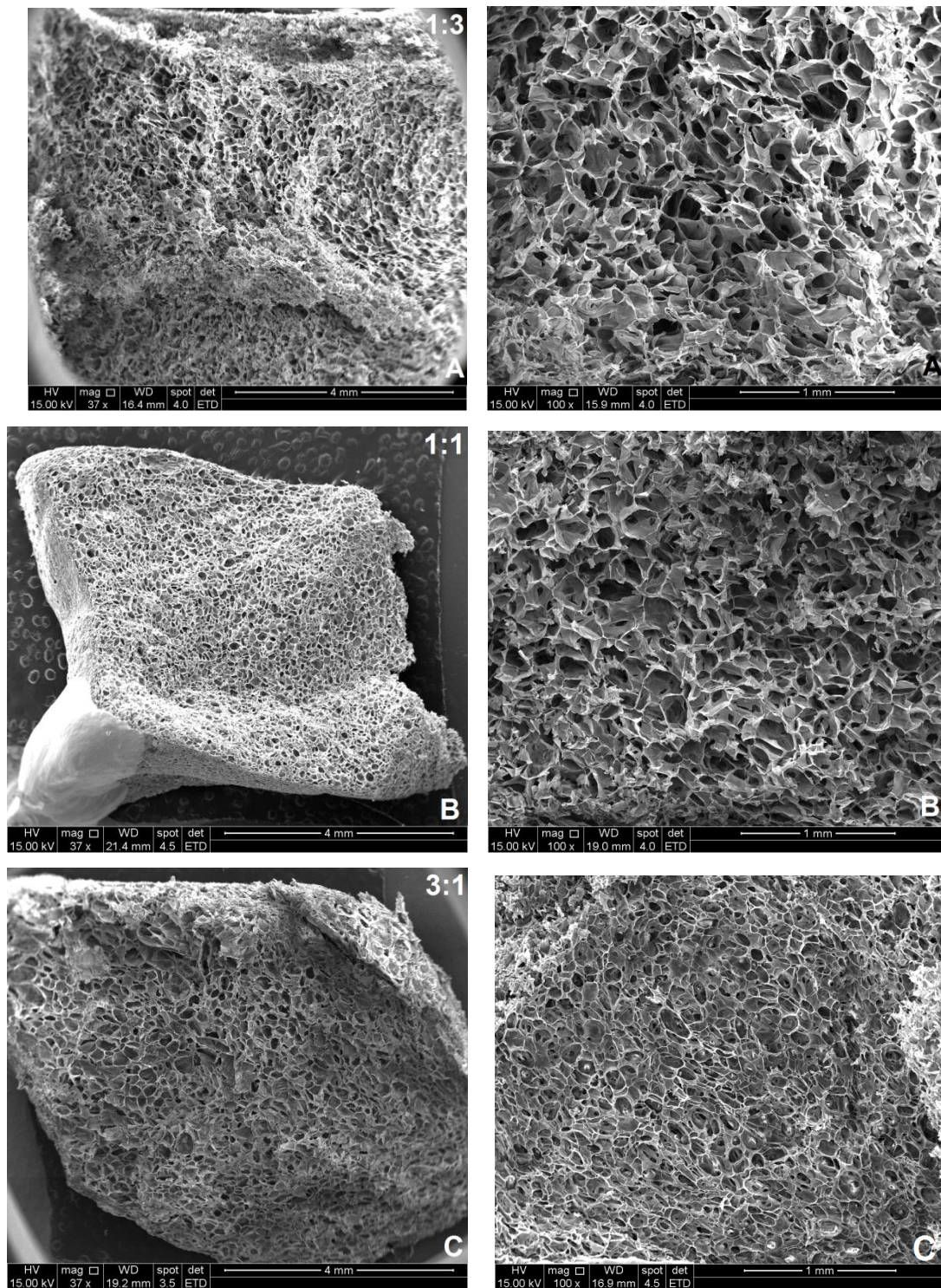


Figura 5.3: Imagem de MEV mostrando o corpo de prova e a porosidade e arquitetura dos poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C).

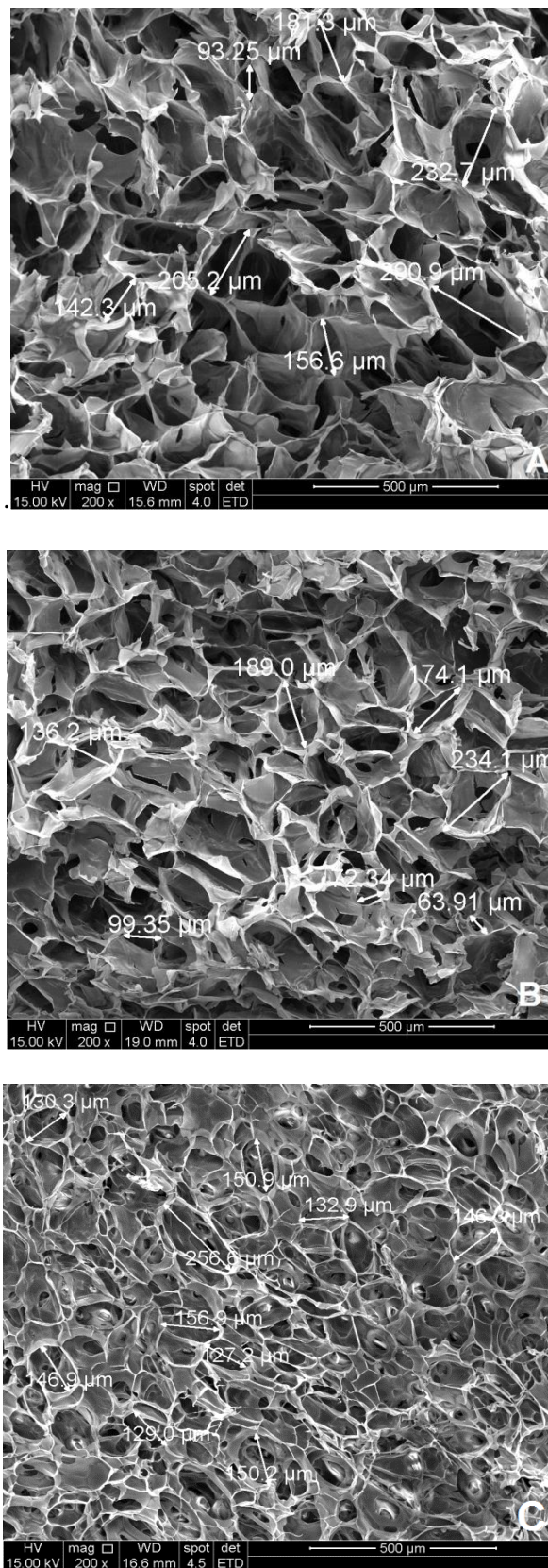


Figura 5.4: Imagem de MEV mostrando o tamanho dos poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C) obtidos na região analisada por MEV.

Os três tipos de matrizes apresentaram na região analisada, tamanho de poros na faixa de 20 a 300 μ m, e poros abertos condizentes com a literatura ⁽²⁴⁾. A interconectividade dos poros pode ser visualizada na figura 5.5.

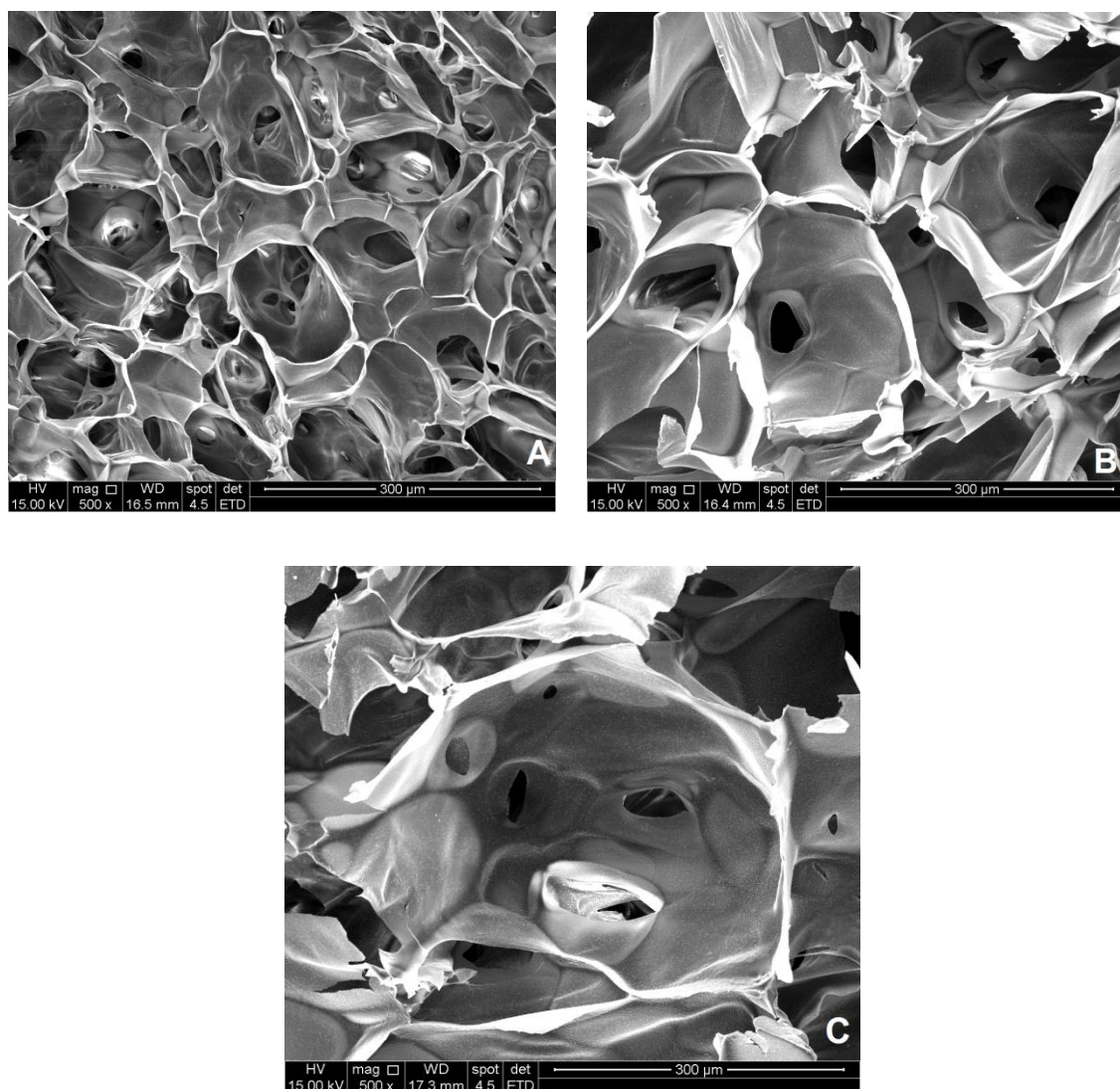


Figura 5.5: Imagem de MEV mostrando a arquitetura dos poros e a interconectividade entre os poros das matrizes 1:3 (A), 1:1 (B) e 3:1 (C).

A presença de poros de tamanhos diferentes é de grande importância, uma vez que o tecido ósseo cresce através de poros na faixa de 100 a 200 μ m interconectados,

enquanto a adesão celular e a formação vascular ocorrem em poros menores que 100 μm ⁽²⁴⁾. A morfologia e tamanho de poros das matrizes analisadas foram similares aos encontrados por *Lemos* em estudo anterior ⁽¹⁰⁾.

5.3 Espectroscopia na região do infravermelho

As figuras 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam os espectros de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) do PVA, da quitosana e do vidro bioativo respectivamente utilizados neste trabalho, onde se observam as bandas características de cada material.

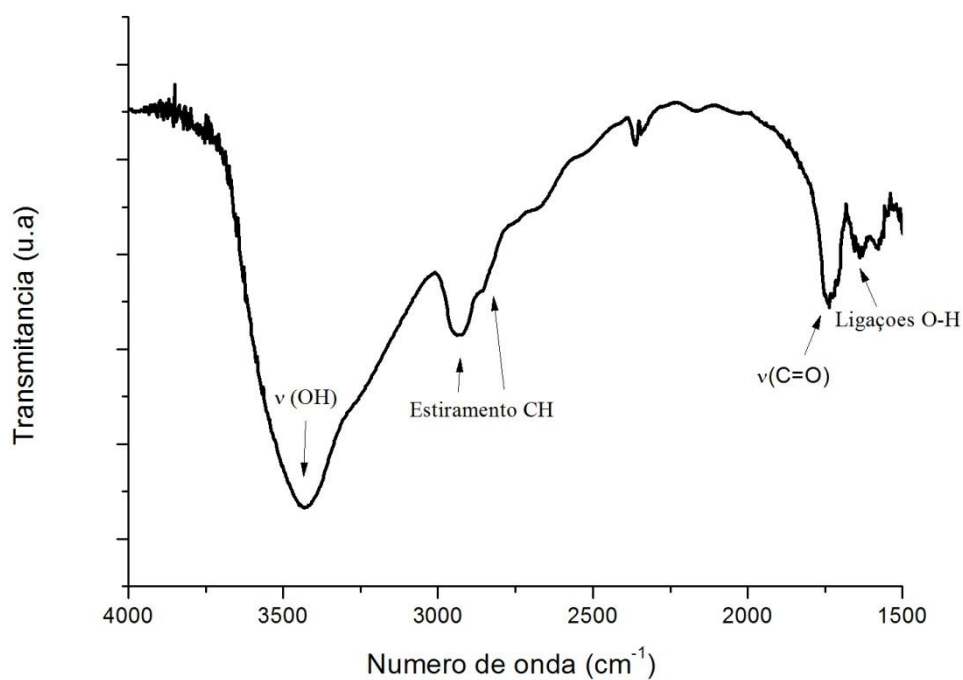


Figura 5.6: Espectros de FTIR do material PVA utilizado na fabricação das matrizes.

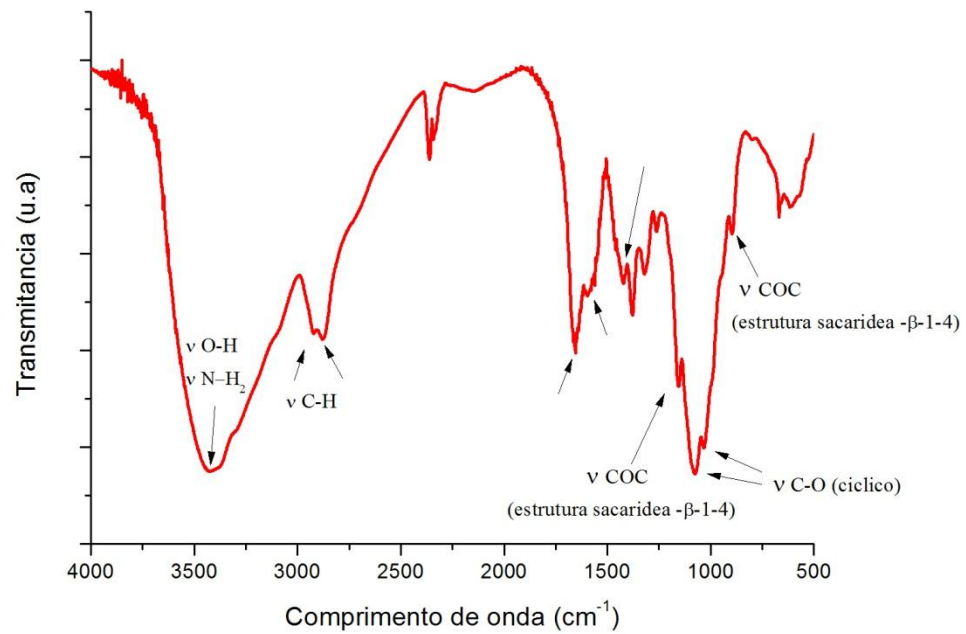


Figura 5.7: Espectros de FTIR do material quitosana utilizado na fabricação das matrizes.

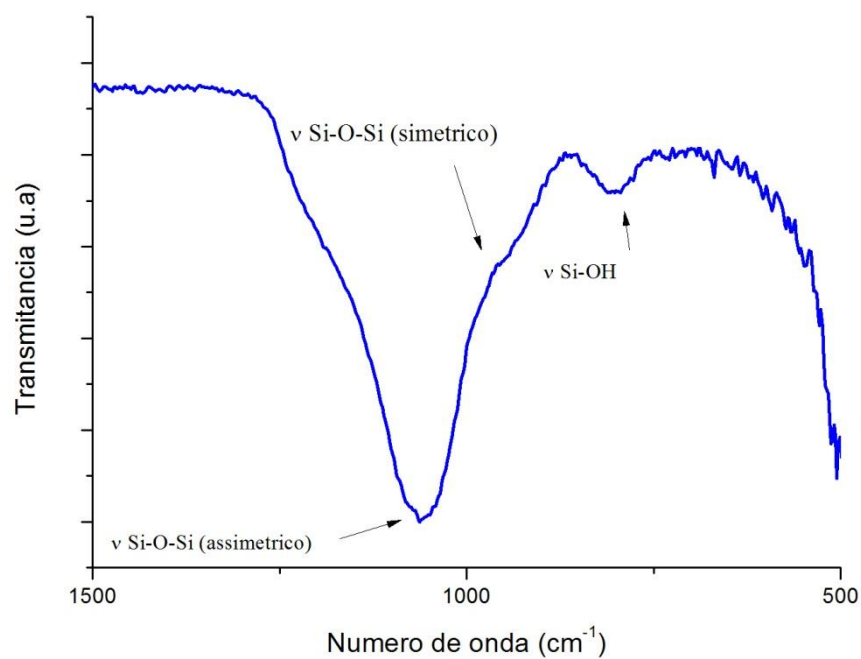


Figura 5.8: Espectros de FTIR do material vidro bioativo utilizado na fabricação das matrizes.

A banda de 3600 a 3100 cm^{-1} do espectro do PVA pode ser associada ao estiramento das ligações O-H, devido às fortes ligações intramoleculares e intermoleculares de hidrogênio^(81,82). A banda 2950 a 2850 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo alquilo (ν CH)^(81,82).

No espectro da quitosana, a banda 3600 a 3200 cm^{-1} geralmente é atribuída ao estiramento do OH, e ao $-\text{NH}_2$ e a banda em 1730 cm^{-1} ao estiramento da amida (C=O). A vibração assimétrica do estiramento C-H encontra-se na banda de 2922 cm^{-1} , enquanto a vibração simétrica está na banda de 2879 cm^{-1} referente ao estiramento do C-H. A banda característica da deformação angular do CH_2 (tesoura) está na banda de 1423 cm^{-1} ^(33,83,84).

Já no espectro do vidro bioativo, as ligações Si-O-Si assimétricas aparecem na banda 1080 cm^{-1} , e as ligações Si-O-Si simétricas podem ser vistas na banda 450 cm^{-1} aproximadamente⁽⁵³⁾. A vibração na banda 950 cm^{-1} foi associada com a presença do grupo silanol (Si-OH), encontrado geralmente em sílica sintetizada pelo método sol-gel. As bandas em 1000 cm^{-1} (νPO_2^-), 1220 cm^{-1} (νPO_3^{2-}) e 960 cm^{-1} (νPO_4^{3-}), são típicas do grupo fosfato⁽⁸⁵⁾.

Matriz contendo PVA e vidro bioativo em sua composição apresenta ampla banda de 3650 a 3000 cm^{-1} , atribuída aos grupos hidroxil (PVA) e aos grupos silanol (VB). Na região de 1500 a 900 cm^{-1} , ocorre sobreposição das bandas derivadas do vidro bioativo e do PVA^(53,81,86).

As bandas vibracionais associadas aos materiais PVA, quitosana e vidro bioativo, utilizadas como referência⁽⁵³⁾, são listadas na tabela 5.0.

O grupo de espectros normalizados das matrizes obtidas está representado na Figura 5.9, juntamente com o espectro do reticulante GA.

Tabela 5.0: Bandas vibracionais de FTIR associadas ao PVA, à quitosana e ao vidro bioativo.

Material	Banda (cm^{-1})	Grupos químicos associados
VB	461	Estiramento Si-O-Si
VB	822	Estiramento simétrico Si-O-Si
VB	953	Estiramento da ligação Si-OH
VB	1000-1220, 960 duplo em ν $=569$ e $\nu=603$	Fosfatos (PO_2^- , PO_3^{2-}), (PO_4^{3-})
VB	1080	Estiramento assimétrico Si-O-Si em SiO_4 tetraedro
PVA	1141	Estiramento C-O cristalinidade
VB, PVA	1634	Ligações O-H (água molecular)
PVA	2937-2870	Estiramento CH
PVA	1710-1740	Estiramento C=O, grupos acetato
VB, PVA	3550-3200	Estiramento O-H e água adsorvida
Qui	3570-3200	Ligações ν OH, ν N-H ₂
Qui	2955-2845	ν C-H (assimétrica)
Qui	1900-1500	Amida I: ν C=O
Qui	1650-1550, 1570-1515	δ N-H (I), δ N-H (II)
Qui	1650-1550	δ N-H (I)
Qui	1154, 896	ν COC (sacarídeos - β -1-4)
Qui	1300-1000	ν C-O (cíclico)

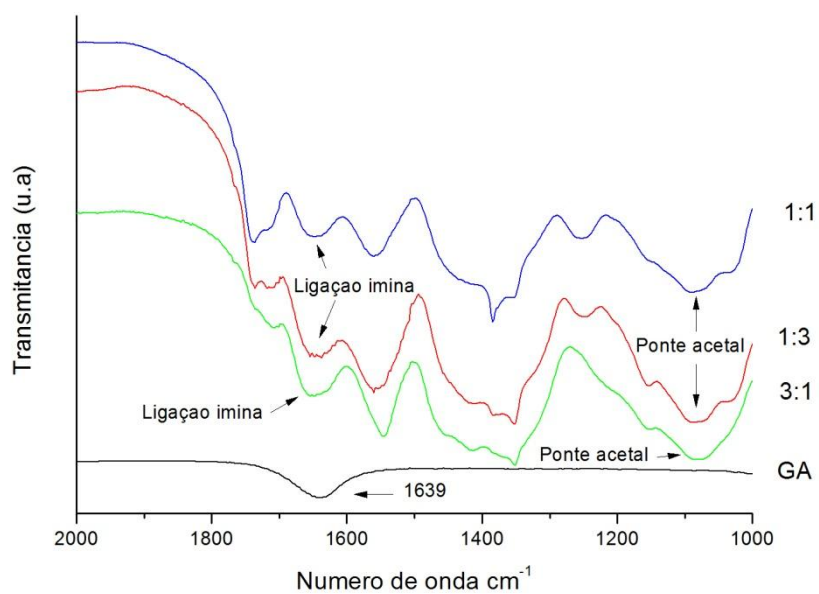


Figura 5.9: Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} das matrizes 1:1, 1:3 e 3:1, e do reticulante glutaraldeído (GA).

A figura 5.10 mostra os espectros referentes às matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 normalizados na banda de 1450 cm^{-1} . Essa banda é referente à ligação CH_2 por ela não sofrer mudança devido a alterações químicas adjacentes ^(31,53,81,87).

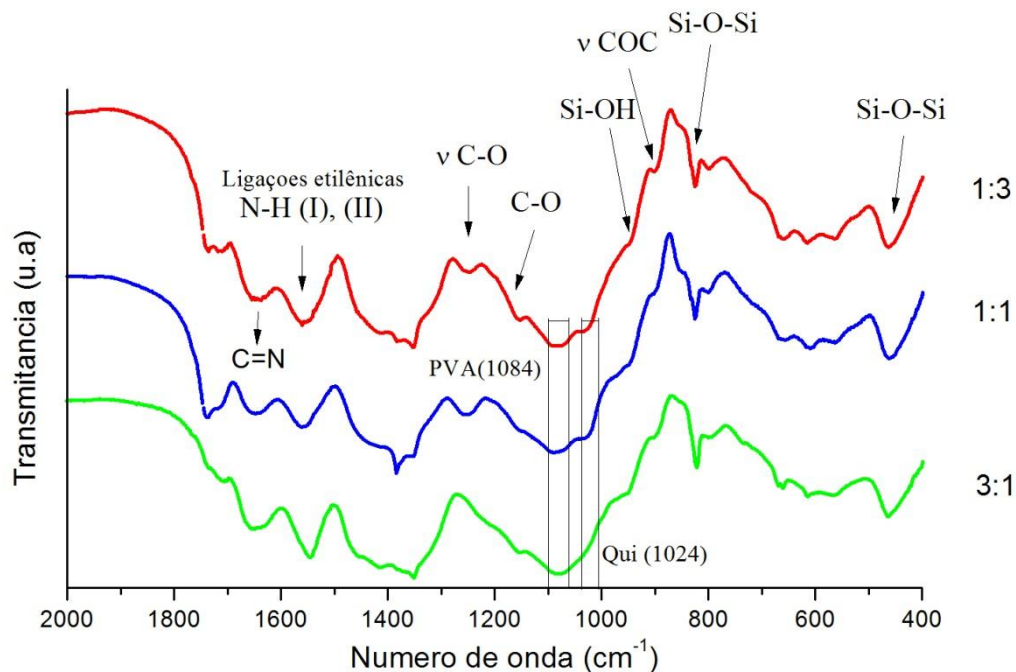


Figura 5.10: Espectros de FTIR das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 normalizados na banda 1450 cm^{-1}

O formato das bandas em 1648 cm^{-1} , associadas à ligação imina ($\text{C}=\text{N}$), e 1558 cm^{-1} , associada ao grupo amina ($-\text{NH}_2$), é similar aos encontrados por *Costa Jr e Mansur*⁽⁸⁸⁾, e por *Monteiro Jr e Wang e colaboradores*⁽⁸⁹⁾. A banda em 1720 cm^{-1} , relacionada aos grupos aldeídos livre ($-\text{COH}$), aparece nos espectros das matrizes 1:3 e 3:1. Porém, no espectro referente à matriz 1:1, esta banda não aparece, indicando possível reticulação com o grupo amina, formando a ligação $\text{C}=\text{O}$ ^(53,83). Comparando as bandas do espectro do glutaraldeído e das matrizes da figura 5.7, observa-se que a banda referente aos grupos aldeído livres na solução de glutaraldeído utilizada neste trabalho aparentemente está na região da banda 1639 cm^{-1} e os espectros das matrizes estão semelhantes entre si, indicando uma possível ligação dos grupos carbonila livres do glutaraldeído aos grupos aminos da quitosana (figura 5.11).

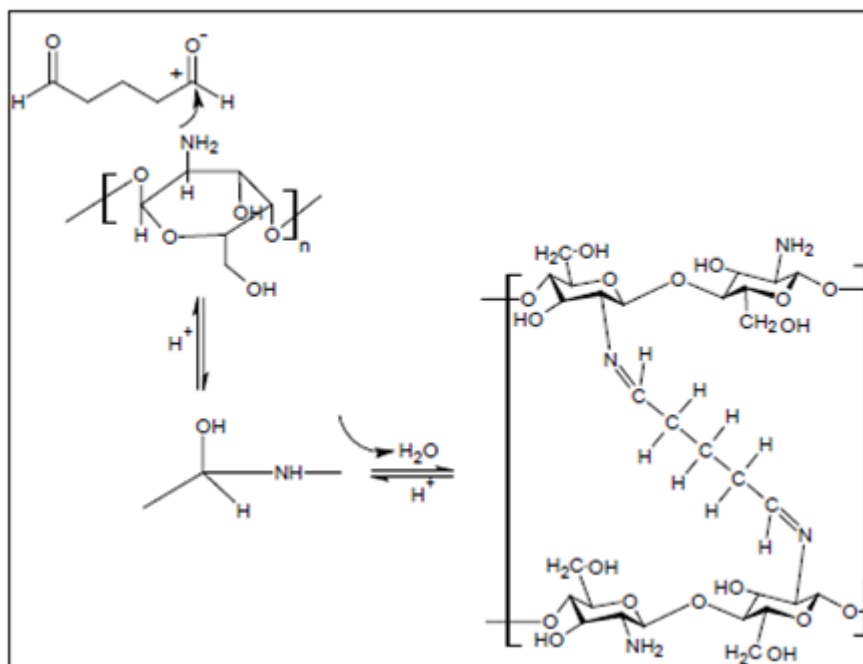


Figura 5.11: Ligação do grupo amino da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando base de Schiff ⁽³³⁾.

Através da intensidade das bandas 1110cm^{-1} e 1650cm^{-1} calculou-se a razão da reticulação do PVA e da quitosana pelo GA conforme mostrado na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Razão da intensidade das bandas 1650cm^{-1} e 1110cm^{-1}

Razão	Matrizes		
	1:3	1:1	3:1
1650/1110	1,64	1,44	1,49

Através do cálculo da razão da intensidade das bandas referente à reticulação do PVA e da quitosana pelo glutaraldeído, supõe-se a preferência da reticulação do glutaraldeído pela quitosana, formando as bases de Schiff em detrimento da formação das pontes acetal com o PVA.

Dias et al.⁽⁹⁰⁾, identificou no espectro de FTIR de seu trabalho sobre produção de filmes de Qui/PVA com 23% de VB, as bandas características do PVA (1084 cm^{-1}) e da quitosana (1024 cm^{-1}) intensificados pela presença do VB, e a banda de 1644 cm^{-1} , associada às ligações do grupo imina C=N (base de Schiff) formado através do grupo amino da quitosana com o grupo aldeído do GA.

A presença do GA causa aumento na intensidade da banda de 1562 cm^{-1} associada às ligações etilênicas; e na frequência de 2922 cm^{-1} relativa ao estiramento dos grupos C-H. Este fato pode ser atribuído ao aumento das contribuições da molécula de glutaraldeído na reação quitosana- glutaraldeído que promove o aumento na reticulação da cadeia. O aumento da intensidade das bandas relativas à ligação imina também sugere que a reticulação do GA ocorre preferencialmente via base de Schiff no carbono 2 do anel glicosídico, em detrimento da ligação com os grupos hidroxilas nos carbonos 3 e 6⁽⁸³⁾. *Ma et al.*⁽⁹¹⁾, relataram que a potente citotoxicidade do glutaraldeído pode ser reduzida com presença da quitosana devido ao grande número de grupos amino em sua cadeia molecular, servirem como uma ponte, aumentando a eficiência da reticulação pelo glutaraldeído.

A banda de 1080 cm^{-1} está relacionada com a reticulação do PVA pelo glutaraldeído, formando pontes acetais (figura 5.12).

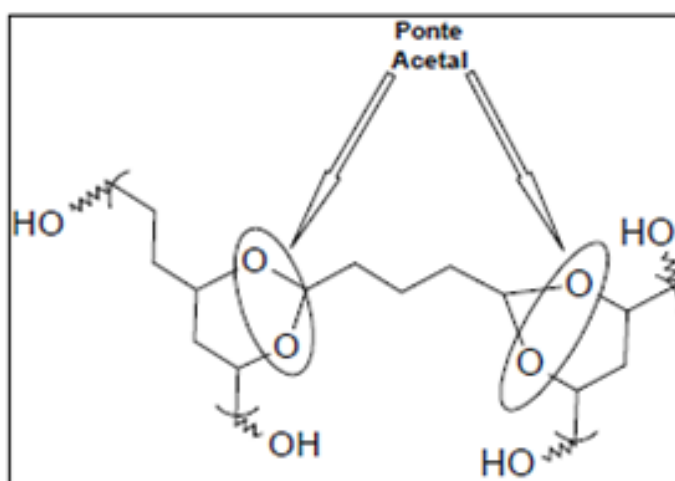


Figura 5.12: Ligação do grupo hidroxila do PVA com o grupo aldeído do glutaraldeído, formando ponte acetal⁽³³⁾.

Já as bandas de 1650 cm^{-1} e de 1638 cm^{-1} estão associadas à formação do grupo imina a partir da amina da quitosana durante a reticulação pelo glutaraldeído ⁽⁸⁴⁾. A mistura da quitosana com outros polímeros, no espectro de FTIR pode ser associada à banda 1250 cm^{-1} que é atribuída à deformação do NH_3^+ e do OH e estiramento do CO ⁽⁸⁴⁾.

5.4 Avaliação da Porosidade

A porosidade aparente (P_{aparente}), a porosidade total (P_{total}) e a densidade volumétrica (ρ_{vol}), foram calculadas através do método de Arquimedes (Balança de Arquimedes). A densidade verdadeira (ρ_{ver}) foi obtida por cálculo da densidade do compósito. Os resultados obtidos de porosidade e de densidade estão apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados de porosidade e densidade obtidos.

Amostra	$P_{\text{aparente}} (\%)$	$P_{\text{total}} (\%)$	$\rho_{\text{vol}} (\text{g/cm}^3)$	$\rho_{\text{ver}} (\text{g/cm}^3)$
1:3	50 ± 5	$97,5 \pm 0,3$	$0,04 \pm 0,01$	1,6
1:1	56 ± 3	$97,2 \pm 0,5$	$0,04 \pm 0,01$	1,5

A porosidade total de 96,6 % na matriz 1:3 e de 96,5% na matriz 1:1, está compatível com a porosidade total de 95, 56 da matriz 3:1 (matriz de referência) ⁽¹⁰⁾.

Para realização do método de Arquimedes, o líquido utilizado foi água deionizada. Durante a execução do método, as matrizes começaram além de preencherem seus poros com a água, começaram a intumescer também, como mostra a figura 5.13. Isso fez com que o tempo de imersão na água fosse fixado em apenas 20 minutos.

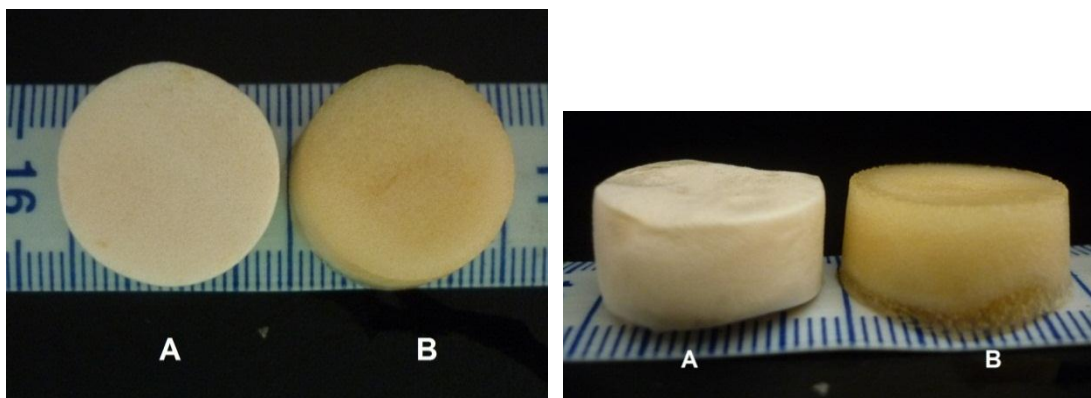


Figura 5.13: Representação do intumescimento apresentado pelas matrizes 1:1 e 1:3 antes da imersão em água deionizada (A) e após a imersão de 20 minutos em água deionizada (B) para realização do ensaio de porosidade aparente.

5.5 Ensaio mecânico

As curvas tensão x deformação obtidas no ensaio de compressão das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 são apresentadas na figura 5.14. Todas as amostras preparadas apresentaram área total de 213,8 mm² (16,5 mm de diâmetro e 7,5 mm de altura) assegurando desta forma uma seção transversal isenta de defeitos. A tabela 5.3 apresenta os valores médios da tensão máxima de compressão, da deformação máxima, do módulo de elasticidade e da tenacidade obtidos nos ensaios de resistência mecânica a compressão (n=3).

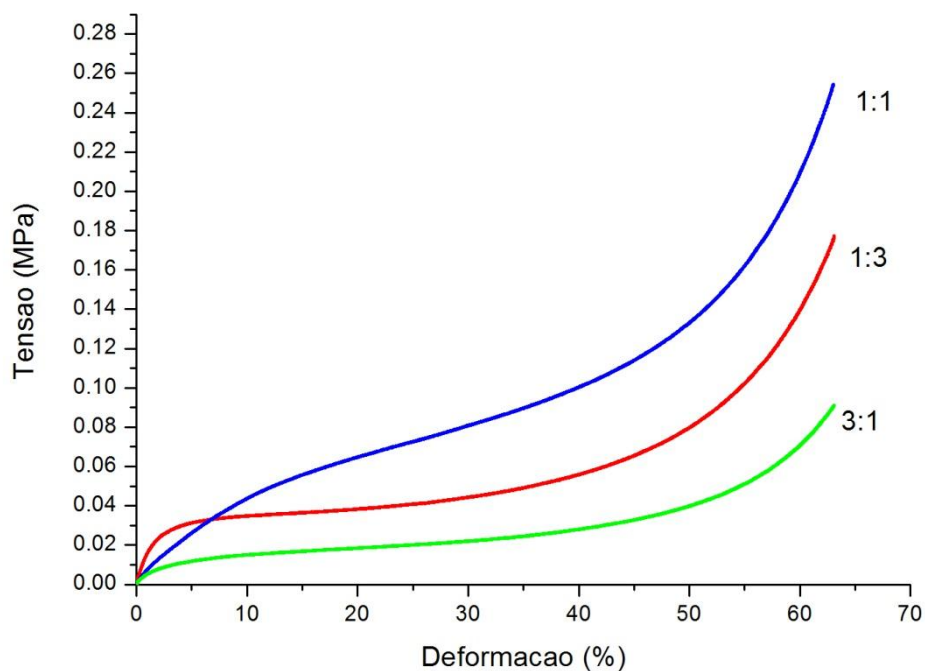


Figura 5.14: Gráfico tensão x deformação apresentando as curvas das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1.

Tabela 5.3: Resultado das propriedades mecânicas obtidas através do ensaio de compressão.

Propriedade mecânica	Matrizes		
	1:3	1:1	3:1
Tensão máxima (Mpa)	0,18 ± 0,02	0,26 ± 0,05	0,09 ± 0,01
Deformação máxima (%)	63,10	63,03	63,07
Módulo de elasticidade (MPa)	2,2 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2
Tenacidade (MPa)	3,75 ± 0,23	5,93 ± 0,29	1,83 ± 0,12

Uma estimativa do módulo de elasticidade (0,2 % de deformação) resulta nos valores de 2,2, 0,9 e 0,9MPa para as razões PVA/Qui de 1:3, 1:1 e 3:1 respectivamente. Considerando a região de até 70% de deformação, observa-se claramente a diferença de comportamento quanto à resistência à compressão para as diferentes concentrações PVA/Qui. O aumento do teor de PVA em até 50% resulta em um aumento da tenacidade, após esta concentração, a tenacidade diminui cerca de 30%. A tensão máxima suportada pelas matrizes foi de 0,18, 0,26 e 0,09 para as matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 respectivamente. Esses valores justificam os valores obtidos na tenacidade pelas matrizes. Entretanto, a redução na tensão máxima das matrizes 1:3 e 3:1 quando comparadas à da 1:1, não é tão significativa devido ao aumento do número de ligações covalentes (C=N) evidenciados pelo FTIR.

A matriz de razão 1:3 apresentou maior módulo de elasticidade (2,2MPa) em relação às matrizes 1:1 e 3:1 (0,9MPa). A diferença de comportamento das matrizes pode ser atribuída à preferência do grupo aldeído do glutaraldeído em se ligar ao grupo amina da quitosana, conferindo maior estabilidade à matriz com maior teor de quitosana. A deformação máxima sofrida pelas matrizes foi muito similar, na ordem de 63%.

A análise da alteração das propriedades mecânicas das matrizes e função de sua composição é necessária, uma vez que essas alterações geraram mudanças no comportamento mecânico das matrizes. A diferença de concentração de PVA e quitosana nas matrizes, não alterou significativamente a porosidade, o número e tamanho dos poros, assim como a arquitetura destes encontrados nas matrizes estudadas neste trabalho.

A preferência do glutaraldeído em reticular a quitosana, evidenciado pelo FTIR, parece influenciar significativamente o comportamento mecânico das matrizes. No geral, a matriz 1:3 apresentou melhor desempenho no ensaio mecânico, sua curva no gráfico evidenciou que esta consegue manter um comportamento mecânico mais uniforme por mais tempo quando comparado às outras duas matrizes, o que pode ser comprovado pelo seu módulo de elasticidade obtido (2,2MPa).

5.6 Ensaio de degradação *in vitro*

A degradação pode ser definida como a deterioração das propriedades de um material. As matrizes híbridas, destinadas à regeneração tecidual, são fabricadas com o objetivo de se degradarem na proporção que ocorre a regeneração do tecido danificado. Esta degradação ocorre preferencialmente por hidrólise. Os sinais mais comuns de que a degradação está ocorrendo, são a deterioração das propriedades mecânicas e redução da massa do material ⁽⁹²⁾. A degradação pode ser o resultado de atividades químicas (solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise) como de atividades físicas (difusão, abrasão, trincas, peeling, quebra mecânica) que podem erodir a matriz tais como, ou da combinação de atividades químicas com atividades físicas.

A figura 5.15 mostra a variação de massa ocorrida com o tempo durante o ensaio de degradação.

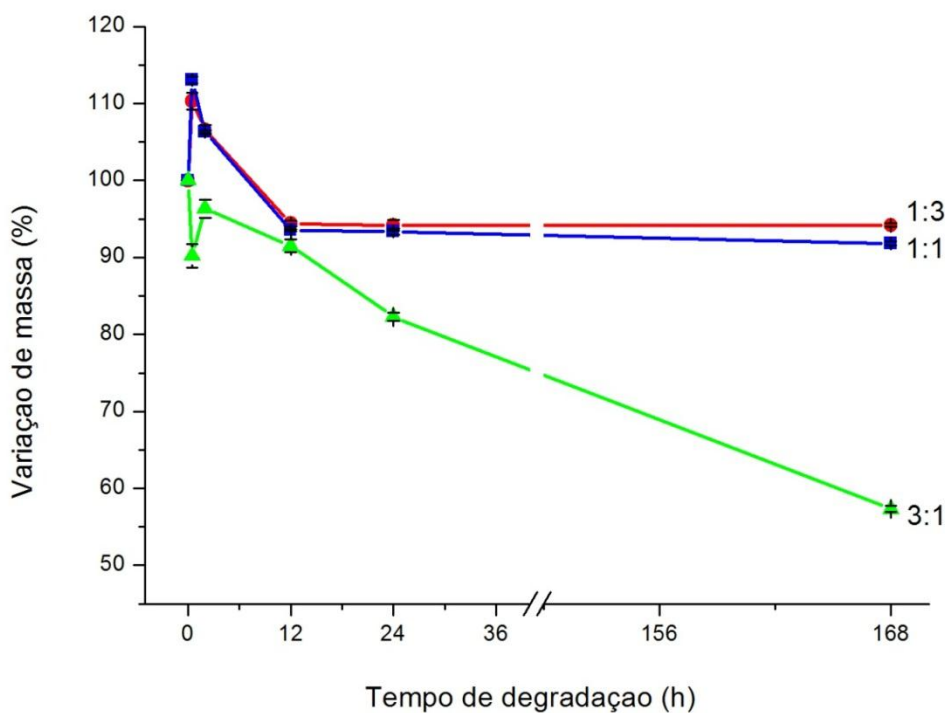


Figura 5.15: Variação de massa das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 submetidas ao ensaio de degradação.

As matrizes 1:3 e 3:1 ganharam massa na primeira 0,5 hora (1:3 ganhou 10,36% e a 1:1 ganhou 14,02% de massa), assim como a matriz 3:1 apresentou um pequeno ganho de massa no período de 0,5 a 2 horas. O ganho de massa ocorrido nas matrizes pode ser atribuído a um possível aprisionamento da solução SBF durante o intumescimento. Após o ganho de massa, as matrizes apresentaram perda de massa, conforme mostrado na tabela 5.4.

Tabela 5.4: Proporção de perda de massa por tempo das matrizes 1:1 e 1:3 durante os períodos do ensaio de degradação. O sinal (+) indica que a matriz ganhou massa.

Período da degradação (h)	% massa perdida por hora		
	1:3	1:1	3:1
2	(+) 3,30	(+) 3,18	1,8
12	0,47	0,54	0,71
24	0,24	0,28	0,74
168	0,04	0,05	0,25

A perda de massa foi mais intensa nas matrizes 1:3 e 1:1 no período entre 12 e 24 horas. Possivelmente neste período, ocorreu a solvatação dos compostos iônicos da cadeia polimérica (figura 5.16). As ligações covalentes apresentam degradação mais lenta via despolimerização⁽³³⁾. Após este período, a degradação das matrizes mostrou-se menos intensa, e a proporção da perda de massa tornou-se mais similar entre as matrizes 1:3 e 1:1; enquanto a matriz 3:1 apresentou uma perda de massa linear e mais intensa quando comparada com as matrizes 1:3 e 1:1.

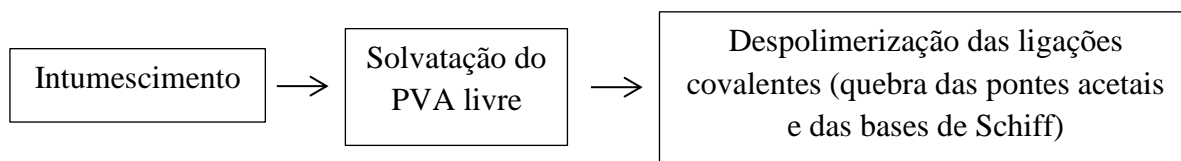


Figura 5.16: Esquema mostrando as possíveis etapas que ocorreram nas matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 submetidas ao ensaio de degradação em solução SBF por sete dias.

A perda de massa das matrizes ocorreu provavelmente por solvatação e despolimerização das cadeias. Essa premissa possui base nos resultados de FTIR, que indicam a preferência de ligações cruzadas via NH_2 (quitosana) em relação às hidroxilas (PVA) pelo grupo aldeído (GA). Assim, o PVA que se encontra fisicamente reticulado sofre rápida solvatação e o PVA/quitosana reticulados covalentemente sofrem uma degradação mais lenta via despolimerização.

A degradação da matriz 1:3 foi mais lenta e menor que a das matrizes 1:1 e 3:1; o que pode ser justificado pela preferência da reticulação do glutaraldeído pelo grupo amino da quitosana a partir da formação do grupamento $\text{C}=\text{N}$ ao invés de formar ponte acetal com o PVA ⁽³³⁾.

Ao se comparar a diferença do percentual de massa perdida por hora das matrizes, nota-se que conforme o tempo de degradação avança a diferença de percentual de massa perdida entre as matrizes 1:3 e 1:1 vai diminuindo, possivelmente, em um ensaio de degradação mais longo, esta diferença acabaria se igualando. A degradação da matriz 3:1 ocorreu de forma mais acentuada, fato que pode ser explicado pela hidrofilia do PVA, o que acelera a sua degradação por solvatação, uma vez que esta matriz apresenta um teor maior de PVA que as matrizes 1:3 e 1:1.

Através dos espectros de FTIR apresentados nas figuras 5.17, 5.18 e 5.19 podemos observar que ocorreu uma considerável redução na intensidade de transmitância das bandas das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 respectivamente após 168 horas de degradação, principalmente na matriz 1:1 e 3:1, que possuem maior teor de PVA, sugerindo que uma parte do PVA se mantém reticulado fisicamente, e o intumescimento pelo fluído

favorece sua mobilidade por lixiviação (solvatação) enquanto que a quitosana se mantém reticulada covalentemente, dificultando sua mobilidade por despolarização.

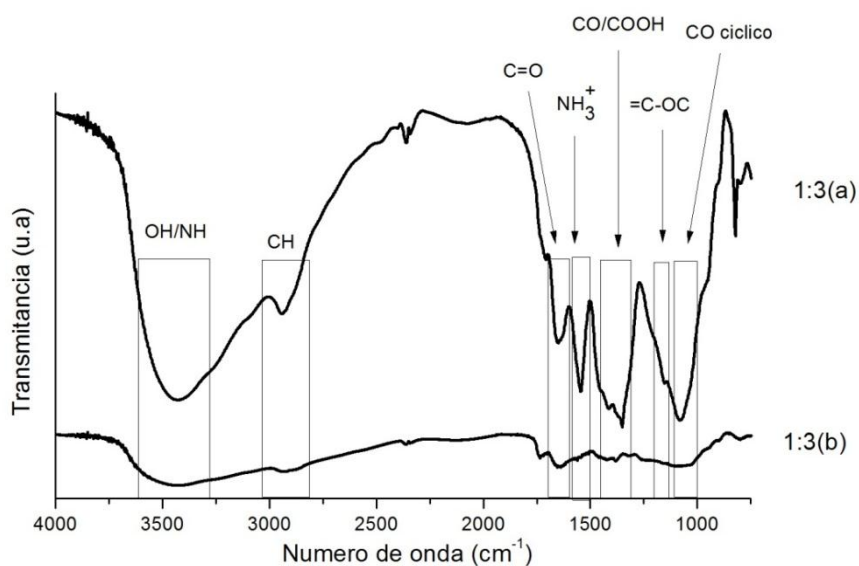


Figura 5.17: Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} antes (1:3 (a)) e após o período de 168 horas (1:3 (b)) de degradação.

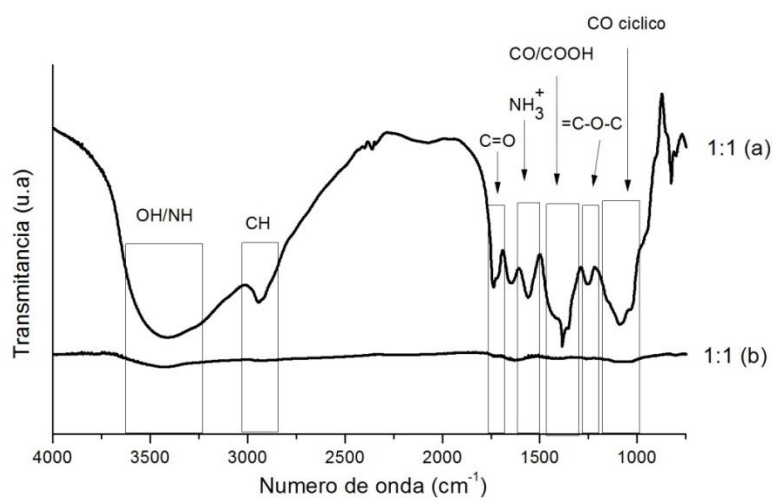


Figura 5.18: Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm^{-1} antes (1:1 (a)) e após o período de 168 horas (1:1 (b)) de degradação.

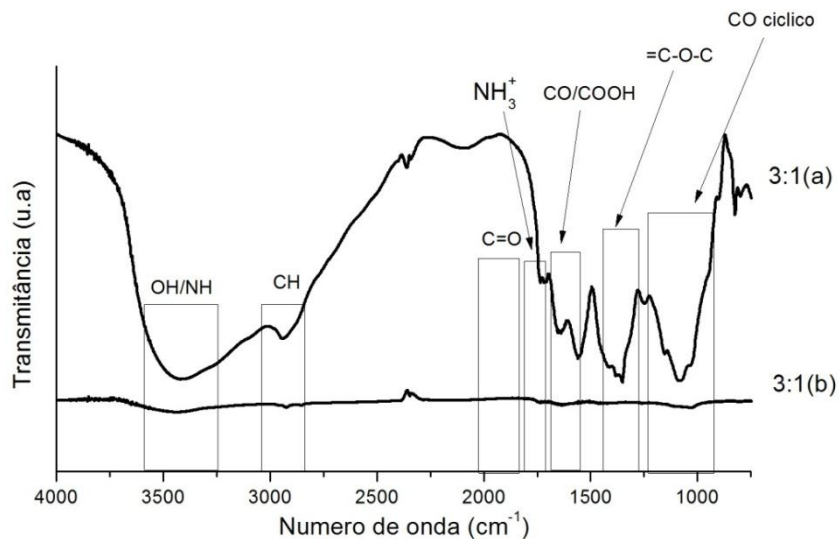


Figura 5.19: Espectros de FTIR normalizados na banda 1450 cm⁻¹ antes (3:1 (a)) e após o período de 168 horas (3:1 (b)) de degradação.

Nos espectros das bandas 1:3(b), 1:1(b) e 3:1(b), as bandas referentes ao OH/NH (2800cm-1 a 3000 cm-1), C=O (1630 cm-1 a 1750 cm-1), CH (3000 cm-1 a 3600 cm-1), NH+3 (~1550cm-1), CO/COOH (~1400cm-1), =C-O-C (1150cm-1 a 1250cm-1) e CO cíclico (1000cm-1 a 1300cm-1) apresentaram diminuição de intensidade e alargamento da banda, provavelmente pela solvatação do PVA.

As matrizes de razão 1:3, 1:1 e 3:1 apresentaram perda de massa de forma gradativa, mantendo sua estrutura física durante todo o ensaio. As matrizes 1:3 e 1:1 apresentaram apenas redução de tamanho durante todo o período do ensaio de degradação, sendo que a matriz 1:3 apresentou maior integridade física que a matriz 1:1. Já a matriz 3:1 apresentou após 168 horas de degradação apresentou além da redução de tamanho, trincas condizentes com a deterioração das propriedades mecânicas como mostrado na figura 5.20.

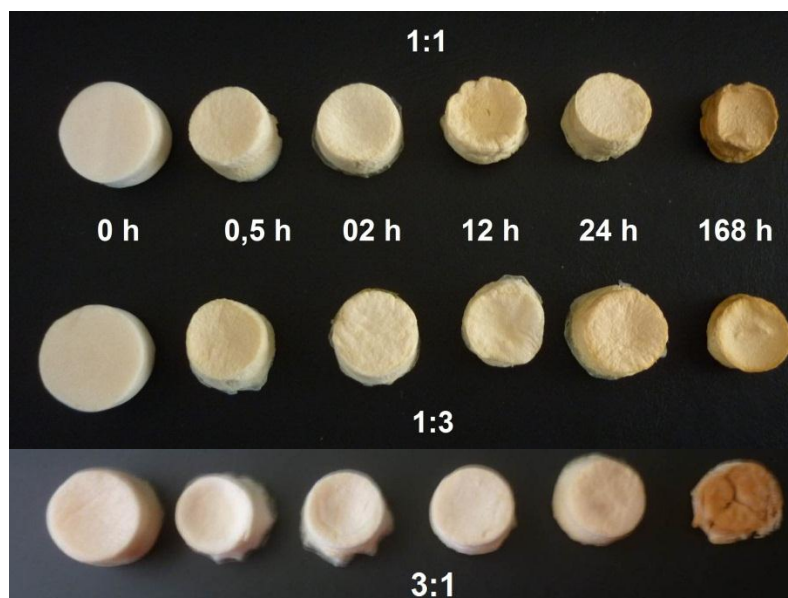


Figura 5.20: Aspectos macroscópicos das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1 após os períodos do ensaio de degradação. Observa-se a integridade da estrutura física das matrizes que se manteve durante todo o ensaio.

Apesar da matriz 1:3 apresentar porosidade total maior que as matrizes 1:1 e 3:1, apresentou menor perda de massa, possivelmente pelo fato de possuir maior teor de quitosana, conseqüentemente, um quantidade maior de ligações covalentes entre o grupo amino (quitosana) e o grupo aldeído (glutaraldeído), fato este que pode justificar também a resistência mecânica desta matriz ser superior a das matrizes 1:1 e 3:1. A arquitetura, tamanho e número de poros e a interconectividade entre eles, foram similares nas regiões analisadas por MEV nas matrizes.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas matrizes de PVA/ Qui/ VB reticuladas com solução de glutaraldeído e secadas por liofilização com o objetivo de serem utilizadas potencialmente pela engenharia de tecido ósseo como biomaterial.

As matrizes geleificadas em frascos tampados assim como as matrizes sintetizadas com 1% de glutaraldeído, foram descartadas deste trabalho por não terem apresentado a estrutura física adequada para a realização deste trabalho.

As matrizes obtidas neste estudo apresentaram porosidade, distribuição homogênea de poros, tamanho de poros adequados e interconectados para serem utilizados pela engenharia de tecido ósseo. A secagem por liofilização mostrou ser uma excelente técnica de secagem para este tipo de matriz.

A técnica de espectroscopia de infravermelho evidenciou uma similaridade entre os espectros das matrizes 1:3, 1:1 e 3:1, com a preferência da reticulação do glutaraldeído pelo grupo amina da quitosana com a formação do grupamento C=N.

A degradação das matrizes 1:3 e 1:1 foi satisfatória. No geral, a degradação das duas matrizes foi muito similar, apresentando perda de massa em torno de 10% após uma semana de ensaio, com preservação (macroscópica) de sua estrutura física.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, as matrizes apresentaram diferença significativa entre si no ensaio mecânico e no teste de degradação; nos quais a matriz de

razão 1:3 se destacou mais, sendo a melhor opção entre as matrizes estudadas neste trabalho para ser utilizada pela engenharia de tecidos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos da citotoxicidade e bioatividade não foram realizados neste trabalho, necessitando serem realizados para análise da real viabilidade das matrizes serem utilizadas como biomateriais pela engenharia de tecido ósseo.

A densidade verdadeira deveria ser calculada por picnometria de Helio, para obtenção de um resultado mais fiel.

Por último, o teste de inchamento poderia ser realizado para estudo das ligações cruzadas presentes na matriz, assim como o estudo do comportamento mecânico das amostras poderia ser feito pelo ensaio mecânico de compressão.

A realização de ensaio mecânico das amostras entumecidas com solução SBF acrescentará muita informação a respeito do possível comportamento mecânico da amostra *in vivo*; uma vez que a matriz implantada no corpo humano irá ser submetida a cargas de compressão inserida em fluido corpóreo e não na forma seca como foi submetida neste trabalho.

Apesar de ser ideal a realização de mais alguns ensaios, as matrizes estudadas neste trabalho mostraram serem boas alternativas para aplicação na engenharia de tecido, principalmente a matriz com razão 1:3 (PVA / Qui).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ikada, Y.: Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, p. 599-601, 2006.
- 2- Jones, A. J.; Arns, C. H.; Milthorpe, B. K.; et al.: The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*. vol. 30; p. 1440-1451, 2009.
- 3- Muschler, G. F.; Nakamoto. C.; Griffith, L. G.: Engineering Principles of Clinical Cell- Based Tissue Engineering. *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 86, n. 7, p.1541-1558, 2004.
- 4- Wintermantel, E.; Mayer, J.; Blum, J.; et al.: Tissue engineering scaffolds using superstructures *Biomaterials*, vol. 17, n. 2, p. 83-91, 1996.
- 5- Stock. U. A.; Cacanti. J. P.: Tissue Engineering: Current State and Prospects. *Annual Review of Medicine*. vol. 52, p. 443-451, 2001.
- 6- Kim, I. Y.; Seo, S. J.; Moon, H. S.; et al.: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, vol. 26, p. 1-21, 2008.
- 7- Cheung, H. Y.; Lau, K. T.; Lu, T. P.; Hui, D.: A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B*, vol. 38, p. 291–300, 2007.
- 8- Boccaccinia, A. R.; Erola, M.; Stark, W. J.: Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology*, vol. 70, n° 13, p. 1764–1776, 2010.

- 9- Jayalekshmi, A. C.; Victor, S. P.; harma, C. P.: Magnetic and degradable polymer/bioactive glass composite nanoparticles for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 101, p. 196-204, 2013.
- 10- Lemos, E. M. F. Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro Bioativo. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2013. 123 p.
- 11- Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H.: Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews*. Vol. 58, p.1688–1713, 2006.
- 12- Hench, L. L.: Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. vol. 74, n^o. 7, p. 1487-1510, 1991.
- 13- Stylios, G.; Wan, T.; Giannoudis, P.: Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury International Journal of The Care of The Injured*. Vol. 38, n^o. S1, p. S63-S74, 2007.
- 14- Kierszenbaum, A. L.: *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 654 p.
- 15- Amabis, J. M.; Martho, G. R.: *Biologia das células*. 1. Ed. São Paulo: Moderna, 1994.
- 16- Athanasiou, K. A.; Zhu, P. E.; Lanctot, D. R.; Agrawal, C. M.; Wang, X.: Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Engineering*, vol. 6, n^o 4, 2000.
- 17- Sodek, K. L.; Tupy, J. H.; Sodek, J.; Grynpas, M. D.: Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone*, Vol. 26, n^o 2, p. 189-198, 2000.
- 18- Alejandráguez. Densitometria óssea-para técnicos: osso trabecular e compacto. Disponível em: <<http://alejandráguezdmo.blogspot.com.br>> . Acesso em: 15 agosto 2013.

- 19- Oréface. R. L.; Pereira. M. M.; Mansur. H. S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2006, p. 538.
- 20- Bar- Cohen, Y.: *Biomimetics: Biologically Inspired technologies*. Boca Raton; Taylor & Francis Group, p. 527, 2006.
- 21- Pålsson, B. O.; Bhatia, S. N.: *Tissue Engineering*. New Jersey; Pearson Prentice Hall; 2004; p. 407.
- 22- Chapekar, M. S. Tissue engineering and opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research*. vol. 53, n. 6, p. 617- 620, 2000.
- 23- Hokugo, A.; Takamoto, T.; Tabat, Y.: Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials*. vol. 27, p. 61-67, 2006.
- 24- Mizuno. K.; Kido. H.; Narita. T.; et al.: Control of degradation rate of porous biodegradable polymers. In: Proceedings of the 8th polymer for advanced technologies international symposium, September, 2005, Budapest, Hungary, 2005, p. 13-16.
- 25- Wu. X.; Liu. Y.; Li, X.; et al.: Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*. vol. 6, p.1167-1177, 2010.
- 26- Buckley, C.T.; O'Kelly, K.U.: Topics in Bio-Mechanical Engineering. Trinity Centre for Bioengineering & National Centre for Biomedical Engineering Science, Dublin, Ireland, p.147-166, 2004.
- 27- Wu, C. L.; Zhangb, M. Q.; Rongb, M. Z.; Friedrichc, K.: Tensile Performance Imporvment of Low Nanoparticles Filled-polypropylene Composites. *Composite Science and Technology*. vol. 62, p. 1327-1340, 2002.
- 28- Zhang, M.; Singh,R.: Mechanical Reinforcemnt of Unsaturated Polyester by AL₂O₃. *Materials Letters*. vol. 58, p. 408-412, 2004.
- 29- Marten, F. L.; Vinyl alcohol polymers. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. v. 17; H.F. Mark; N. M. Bikales, C. G. Overberger & G. Menges; John Wiley; New York; 1985.

- 30- Chiellini, E.; Corti, A.; D'Antone, S.; Solaro, R.: Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, vol 28, n^o 6, p. 963–1014, 2003.
- 31- Mansur, H. S.; Sadahira, C. M.; Souza, A.; Mansur, A. A P.: FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Material Science and Engineering C*, vol.28, p.539-548, 2007.
- 32- Aranha, I. B.; Lucas, E. F.: Poli(álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbonicas : Avaliação do balanço hidrófili/lipófilo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 11. n^o 4, p. 174-181, 2001.
- 33- Costa Jr, E. S.: Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2008. 133p.
- 34- Liu, M.; Cheng, R.; Wu, C.; Qian, R.: Viscometric Investigation of Intramolecular Hydrogen Bonding Cohesional Entanglement in Extremely Dilute Aqueous Solution of Poly (Vinyl Alcohol). *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, vol. 35, p. 242, 1997.
- 35- Oliveira, E.D.; Hagan, S. A.; Gehrke, S. H.: Influence of Microstrucutre on the Permeability and Modulus of Responsive Biopolymer Gels. *Advance in Biomaterials and Drug Delivery Systems*, vol.1, p. 517-525, 2002.
- 36- Okaya, T.; Suzuki, A.; Kikuchi, K. Importance of grafting in the emulsion polymerization of MMA using PVA as a protective colloid. Effect of initiators. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 153, p. 123-125, 1999.
- 37- Isenberg, B. C.; Wong, J. Y.: Building structure into engineered tissues. *Materials Today*, vol. 9, p. 54-60, 2006.
- 38- Dasha, M.; Chiellini, F.; Ottenbriteb, R. M.; Chiellini, E.: Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, vol. 36, p. 981–1014, 2011.

- 39- Tamura, H.; Furuieka, T.; Nairb, S. V.; Jayakumar,R.: Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, vol 84, nº 2, p. 820-824, 2011.
- 40- Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra. M. V.; Fok, M. V. L.; Costa, A. C. F. M.: Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. vol. 2, nº 3, p. 27-34, 2007.
- 41- Goosen, M. E.: *Applications of chitin and chitosan*. Technomic Publishing Company, Lancaster,1996.
- 42- Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M.; Soares, N. A.; et al.: Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, vol.34, nº.7, 2011.
- 43- Ogawa K.: Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. *Agric Biol Chem*, vol. 55, p. 2375–9, 1991.
- 44- Ogawa, K.; Yui, T.; Miya, M.: Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci Biotech Biochem*, vol. 56, p. 858–62, 1992.
- 45- Yi, H.; Wu, L. Q.; Bentley, W. E.; et al.: Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, vol. 6, p. 2881–2894, 2005.
- 46- Schiffman, J. D.; Schauer, C. L.: Cross-linking chitosan nanofibers. *Biomacromolecules*, vol.8, p. 594-601, 2007.
- 47- Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A.: Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, vol.22, p. 261–268, 2001.
- 48- Khan, T.A.; Peh K.K.; Ch'ng, H. S.: Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Sci* vol. 5, p. 205–212, 2002.
- 49- Sashiwa, H.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Ogawa, R.; Tokura, S.: Distribution of the acetamide group in partially deacetylated chitins. *Carbohydr Polym*, vol. 16, p. 291-296, 1991.

- 50- Cho, Y. W.; Jang, J.; Park, C. R.; Ko, S. W.: Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, vol. 1, p. 609-614, 2000.
- 51- Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A.: Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, vol. 22, p. 261-268, 2001.
- 52- Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R.: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 18, p. 3413-31, 2006.
- 53- Mansur, H. S.; Costa, H. S.: Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, p. 72–83, 2008.
- 54- Alfaya, A. A. S, L.; Kubota, L. T.: A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol gel na construção de biossensores. *Química Nova*, vol. 25, n^o. 5, p. 835-841, 2002.
- 55- Andrade, A. L.; Domingues, R. Z.: Cerâmicas bioativas – estado da arte. *Química Nova*, vol.29, n^o. 1, 2006.
- 56- Pereira, M. M.; Clark, A. E.; Hench, L. L.: Calcium-phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses in-vitro. *Biomed Mater Res*, vol. 28, n^o 6, p. 693—698, 1994.
- 57- Pereira, M. M.; Jones, J. R.; Orefice, R. L.; Hench, L. L.: Preparation of bioactive glass- polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *Mater Sci.: Mater. Med*, vol. 16, p. 1045-1050, 2005.
- 58- Xia, W.; Chang, J.; Lin, L.; Zhu, J.: The pH-controlled dual-drug release from mesoporous bioactive glass/polypeptide graft copolymer nanomicelle composites, *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 69, p. 546-552, 2008.
- 59- Berger, J. et al. Structure and interaction in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.19-34, 2004.

- 60- Thamaraiselvi, T. V.; Rajeswari, S.: Biological evolution of bioceramic materials a review. *Trend in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 18, p. 9-17, 2004.
- 61- Wang, T, et al. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International*, vol. 53, p. 911-918, 2004.
- 62- Hokugo, A.; Takamoto, T.; Tabat, Y.; Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials*, vol. 27, p. 61-67, 2006.
- 63- Montserrat, C.; Antonio, J. S.; Mar'ia, V. R.: Amino-polysiloxane hybrid materials for bone reconstruction. *Chemical Mater*, vol. 18, p. 5676- 5683, 2006.
- 64- Pereira, A. P. V.; Wander, L. V.; Orefice, R. L.: Novel multicomponent silicate-poly (vinyl alcohol) hybrids with controlled reactivity. *Non- Cryst. Solids*, vol. 273, p. 180-185, 2000.
- 65- Sanchez, C.; Ribot, F.: Design of hybrid organic-inorganic materials synthesized via sol-gel chemistry. *New J. Chem*, vol. 18, p. 1007-1047, 1994.
- 66- Quiroga, E. L.; Antelo, L. T.; Alonso, A. A.: Time-scale modeling and optimal control of freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, vol 111, n° 4, p. 655-666, 2012.
- 67- Bossa, E. A.; Filhoa, R. M.; Toledo, E. C. V.: Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 43, n° 12, p. 1475-1485, 2004.
- 68- O'Brien, F. J.; Harley, B.A.; Yannas I. V.; GibsonInfluence, L.: Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, vol. 25, n° 6, p. 1077-1086, 2004.
- 69- Muzzio, C.R.; Dini, N.G.: Simulation of freezing step in vial lyophilization using finite element method. *Computers and Chemical Engineering*. vol. 35, p. 2274-2283, 2011.

- 70- Spieles, G; Marx, T.; Heschel, G. R.: Analysis of desorption and diffusion during secondary drying in vacuum freeze-drying of hydroxyethyl starch. *Chemical Engineering and Processing*. vol. 34, p. 351-357, 1995.
- 71- Ma, P.; Zhang, R.: Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Biomed mater res*, vol, 56, p.469–77, 2001.
- 72- Franks, F.: Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-lett*, vol. 11, p. 93–110, 1990.
- 73- Williams, N. A.; Polli, G. P.: The lyophilization of pharmaceuticals: A literature review. *J. Parenter. Sci. Technol*, vol 38, p. 48-59, 1984.
- 74- Wegst, U.K.; Drexel, U.; Schecter, M.; Donius, A.; Hunger, P.M.: Biomaterials by freeze casting. *Philosophical Transation of the Rooyal Society. A*, vol. 368, p. 2099-2121, 2010.
- 75- Pikal, M.: Freeze drying, In: j. Swarbrick (ed.), encyclopedia of pharmaceutical technology, marcel dekker, new York, vol. 2, p. 1299–1326, 2002.
- 76- Deville, S.; Saiz, E.; Tomsia A. P.: Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 27, p. 5480–5489, 2006.
- 77- Shirozakia, Y.; Okayamac, T.; Tsuruc, K.; et al.: Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan–silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, n^o 1, p. 122–128, 2008.
- 78- Orefice, R. L.; Hench, L. L.; Brennan, A. B.: In vitro bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase. *Journal of the Brazilian chemical society*, vol. 11, n^o 1, p. 78-85, 2000.
- 79- Madihally, S. V.; Matthew, H. W.: Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterial*, vol. 20, p. 1133-1142, 1999.

- 80- Huang, Y.; Stella, O.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, A. V.: In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 26, p. 7616-7627, 2005.
- 81- Andrade, G.; Barbosa-Stancioli, E.F.; Mansur, A. A. P.; Vasconcelos, W. L.; Mansur, H. S.: Design of novel hybrid organic–inorganic nanostructured biomaterials for immunoassay applications, *Biomedical Materials*, vol.1, p. 221–234, 2006.
- 82- Mansur, H.S.; Orefice, R. L.; Vasconcelos, W. L.; et al.: Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 16, p. 333–340, 2005.
- 83- Costa- Junior, E. S.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S.: Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked.: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, p. 553-561, 2009.
- 84- Rao, P. S.; Smitha, B.; Sridhar, S.; et al.: Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: Comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. *Separation and purification Technology*, vol. 48, n° 3, p. 244-254, 2006.
- 85- Martin, A. I.; Salinas, A. J.; Vallet- Regi, M.: Bioactive and degradable organic–inorganic hybrids. *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 25, n° 16, p. 3533-3538, 2005.
- 86- Pereira, M. M.; Jones, J. R.; Hench, L. L.: Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol–gel method for bone tissue engineering, *Advances in Applied Ceramics*, vol. 104, n° 1, p. 35–42, 2005.
- 87- Costa, S. C.; Mansur, A. A. P.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S.: Engineered hybrid scaffolds of Poly (vinyl alcohol)/ Bioactive glass for potential bone engineering applications: Synthesis, characterization, cytocompatibility, and degradation. *Journal of nanomaterials*, vol. 2012, p. 1-16.

- 88- Costa-Junior, E. S.; Mansr, H.S.: Preparação e caracterização de blendas de quitosana/ poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, vol. 31, n^o. 6, p. 1460-1466, 2008.
- 89- Monteiro Jr., O. A. C.; Airoidi, C.: Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol 26, n^o 2–3, p. 119–128, 1999.
- 90- Dias, L. L. S.; Mansur, H. S.; Donnici, C. L.; Pereira, M. M.: Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomatter*, vol. 1:1, p. 114-119, 2011.
- 91- Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; et al.: Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 24, p. 4833-4841, 2003.
- 92- Bispo, V. M. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2009. 206 p.