



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Tese de Doutorado

“Desenvolvimento e caracterização de matrizes compósitas tridimensionais flexíveis de quitosana/vidro bioativo para aplicação potencial no tratamento e regeneração de lesões cutâneas”

Autora: Talita Martins

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior

Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Talita Martins

“Desenvolvimento e caracterização de matrizes compósitas tridimensionais flexíveis de quitosana/vidro bioativo para aplicação potencial no tratamento e regeneração de lesões cutâneas”

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais
Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior

**Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
Março de 2017**

Agradecimentos

Acho que desafio maior do que escrever essa Tese será condensar em apenas duas páginas a gratidão que tenho por tantas pessoas incríveis que fizeram parte dessa trajetória. Queria agradecer profundamente aos meus familiares, meus primos e primas, especialmente a Aline, Geórgia e Letícia, porque na verdade vocês são minhas irmãs, não há separação no nosso coração para parentes, só há amor. Meus tios Benício, Irene e Batista (*"In memoriam"*), aos meus avós Dona Tatâna e Vô Jão, eu os amo de todo meu coração. Ao meu amado irmão Fernando. E a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe Lúcia, a minha melhor amiga, a minha luz na escuridão, eu nunca terei palavras suficientes para dizer o quanto eu te amo.

A todos meus amigos, aqueles que verdadeiramente se alegram com as minhas conquistas, essa família que Deus me permitiu escolher e participar dos bons e dos maus momentos de minha vida. Especialmente a Verônica, Ana Cristina (Aninha), Franklyn, Taís, Amanda Lobato, Amanda Rocha, Nayara, Bruna, Fernanda, Nanda, Leonardo e família, Luís Matheo, Daniel, Barbara, Cadu, Karina, Luiza, Bernardo, Diego (Minduim), Paulinha, Lincoln, Luciana, Tiguilherman, Patrick, Iancor, Rafael, Filipe Massote, Júlia, Marcelly, Débora Kabuto, Marquinho, Gabi, Linda Léia, Otávio, Gustavo, Michelle, Giselle (*"in memoriam"*), Lívio (Ping Ping Livón), Tamara (minha alemoa). Triste não poder citar todos, mas sabem sinceramente que estão no meu coração. Aos meus amigos do coral do CEFET-MG, por estarem sempre na minha vida, me trazendo música e alegria. Aos meus queridos amigos intercambistas Camille, Réka, Florian, Oliver, Gérard, Diana, Etienne e Jackie obrigada por fazerem parte da minha família e por me ensinarem tanto.

Gostaria também de fazer um agradecimento especial a três pessoas que tanto me incentivaram e ainda o fazem, Gilberto, Regina Helena e Luiz Fernando Monteiro, obrigada por todo amor e confiança que depositam em mim, essa confiança me faz acreditar também.

A minha orientadora Professora Dra. Marivalda de Magalhães Pereira, pelo carinho, amizade e convivência, que tanto me ensinou e ensina, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico.

Ao meu coorientador: Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior, pelo apoio, ensinamento diário e principalmente por aceitar continuar me auxiliando durante minha carreira acadêmica, obrigada Chefe.

Aos professores Rachel Mary Osthues, Sidney Nicodemos da Silva, Joel Romano Brandão, Daniel Soares Leal, Carlos Alexandre Vieira e Ricardo José Alves, que foram também meus orientadores em vários sentidos e que acreditaram em mim desde o começo. Aos profissionais amigos Bruno Cordeiro, Patrícia Azevedo, Ilda, Sylvia (Sica) e tantos outros profissionais que com seu trabalho permitiram que essa Tese fosse concluída.

Ao Professor Rodrigo Lambert Oréfica, (LEPCOM) pela realização dos ensaios mecânicos.

As professoras Miriam Teresa Paz Lopes e Regina Maria Turchette e ao Departamento de Farmacologia (ICB-UFMG) por disponibilizarem seu laboratório e seu tempo para me auxiliar e ensinar parte dos ensaios biológicos presentes nesse trabalho. Em especial gostaria de agradecer a Luciana (Lú), que com tanta paciência e dedicação me ensinou um pouco da vastidão do seu conhecimento. Aqui também estão presentes: a profa. Maria de Fátima Leite do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB-UFMG), Sandhra Carvalho e Ana Celeste na realização do ensaio de MTT e LIVE/DEAD®.

Aos amigos do PPGEM Camila, Túlio, Tadeu, Joice, Patrícia, Vítor, Nádia, Mário e tantos outros, muito obrigada pela convivência maravilhosa! Aos meus amigos de Laboratório, pois não tenho coragem de chamá-los apenas de colegas, vocês são as pessoas mais incríveis e “Tops” do mundo! (piada interna) E eu não poderia estar em um lugar melhor e mais feliz para se trabalhar. Obrigada pelas risadas, choradeiras, conselhos, congressos e descobertas, vocês são os melhores. Gostaria de agradecer especialmente a Cheisy, Layla, Fabiana, Agda, Sandhrinha, Carol, Ana Celeste, Andréia, Paula, Nath (membro honorário) e Breno, que além de ser meu amigo tem esse lugar tão especial no meu coração.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), minha segunda casa, onde pude firmar minha personalidade e abrir minha mente para as descobertas e sempre estar atenta as mudança, agradeço pelas oportunidades.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao PPGEM agradeço pela oportunidade, apoio e suporte absoluto ao desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

E por fim e principalmente a Deus por tudo o que ele representa em minha vida, por tudo que ele me permitiu ser hoje e me permitirá fazer no futuro. A todos agradeço imensamente.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	ix
Lista de Notações	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.3 A pele.....	6
3.5 A Engenharia de tecidos no processo de cicatrização cutânea	11
3.6 Matrizes Porosas Tridimensionais (3D)	17
3.7 Espumas Porosas Tridimensionais.....	20
3.8 Quitosana.....	22
3.8.1 Estrutura e características Físico-Químicas da Quitosana	23
3.8.2 Propriedades e aplicações da quitosana	25
3.9 Vidro Bioativo	27
3.9.1 Histórico e obtenção.....	27
3.9.2 Estrutura e características físico-químicas do vidro bioativo.....	29
3.9.3 Propriedade e aplicações do vidro bioativo	30
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho	32
4.2 Materiais	32
4.3 Preparo das espumas compósitas 3D	33
4.3.1 Síntese de micropartículas de vidro bioativo (VB)	33
4.3.2 Preparo da solução de quitosana (QUI) e das espumas compósitas 3D	33
4.4 Caracterização estrutural e mecânica das espumas 3D.....	34
4.4.1 Análise estrutural dos <i>scaffolds</i>	34
4.4.2 Análise 3D da estrutura dos <i>scaffolds</i> por microtomografia de raios-X (micro-CT)	35
4.4.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	35
4.4.4 Análise por espectroscopia Raman	35
4.4.5 Análise por difração de raio X (DRX).....	36
4.4.6 Caracterização das propriedades mecânicas das espumas 3D.....	36

4.4.6.1	Ensaio de compressão.....	36
4.4.6.2	Teste de compressão por deflexão constante	36
4.5	Medida da capacidade de absorção de fluidos	37
4.6	Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)	37
4.7	Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF)	38
4.8	Análise do comportamento térmico	40
4.9	Caracterização biológica "in vitro" dos <i>scaffolds</i>	40
4.9.1	Escolha do processo de esterilização das amostras	40
4.9.2	Escolha do tempo de eluição das amostras	41
4.9.3	Cultura de Células.....	41
4.9.4	Determinação da citotoxicidade dos <i>scaffolds</i> pelo Teste de Eluição.....	42
4.9.5	Análise da viabilidade celular por MTT	43
4.9.6	Análise da viabilidade celular por LIVE/DEAD®	44
4.9.7	Atividade da Fosfatase Alcalina.....	44
4.9.8	Análise Estatística.....	45
4.10	Degradação das espumas 3D	45
4.10.1	Preparo de amostras das espumas para degradação	45
4.10.2	Preparo da solução simuladora para degradação	46
4.10.3	Análise da perda de massa por hidrólise.....	46
4.10.4	Caracterização das espumas 3D após ensaio de degradação.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Caracterização estrutural e morfologia das espumas 3D	47
5.1.1	Análise estrutural dos <i>scaffolds</i> por MEV, EDS e micro-CT	47
5.1.2	Caracterização por espectroscopia FTIR e Raman	52
5.1.3	Análise por difração de raios-X (DRX).....	58
5.2	Caracterização das propriedades mecânicas.....	60
5.2.1	Ensaio de compressão.....	60
5.2.2	Teste de compressão por deflexão constante das matrizes 3D	61
5.3	Medida da capacidade de absorção de fluidos	65
5.4	Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)	67
5.5	Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF)	71
5.6	Análise do comportamento térmico	73
5.7	Caracterização Biológica dos <i>scaffolds</i> por metodologia <i>in vitro</i>	76
5.7.1	Determinação da citotoxicidade dos <i>scaffolds</i> pelo Teste de Eluição.....	76
5.7.2	Análise da viabilidade celular por MTT	78
5.7.3	Análise da viabilidade celular por LIVE/DEAD®	80
5.7.4	Atividade da Fosfatase Alcalina.....	81

5.8	Degradação das espumas 3D	84
5.8.1	Análise da perda de massa por hidrólise	84
5.8.2	Caracterização por FTIR das espumas após degradação	86
5.8.3	Caracterização por DRX das espumas após degradação	88
5.8.4	Análise morfológica (MEV) e química elementar (EDS) das espumas após degradação.....	89
5.8.5	Caracterização por micro-CT das espumas após degradação	92
6	CONCLUSÕES	95
7	TRABALHO FUTUROS.....	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Lista de Figuras

Figura 1: Histologia da pele normal.....	6
Figura 2: Gráfico de dias e eventos de cicatrização de uma lesão cutânea desde a inflamação até o reparo.	10
Figura 3: Arquitetura de scaffolds e a influência da escala métrica na ligação e espalhamento celular.	20
Figura 4: Desacetilação alcalina da quitina, obtendo-se o produto quitosana.	22
Figura 5: Algumas das possibilidades de derivados das reações efetuadas com o grupo amino da quitosana.....	24
Figura 6: Etapas resumidas do processo de obtenção do vidro bioativo pela rota sol-gel. ...	28
Figura 7: formação da sílica tetraédrica e das partículas de vidro bioativo pela rota sol-gel.	29
Figura 8: Fluxograma das etapas de execução do trabalho.	32
Figura 9: Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da Transmissão do vapor d'água.....	38
Figura 10: Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da capacidade de movimentação de fluidos.	39
Figura 11: Imagens digitais (sem magnificação) das espumas produzidas: QU (100% quitosana) QU25VB (75% de quitosana e 25% de vidro bioativo) e QU50VB (50% de quitosana e 50% de vidro bioativo).	47
Figura 12: Fotomicrografias obtidas por MEV da espuma QU (A) 100X e (B) 400X, e das espumas compósitas QU25VB (C) 100X (D) 400X e QU50VB (E) 100X (F) 400X.....	48
Figura 13: Fotomicrografias obtidas por MEV acompanhadas pelos espectros de EDS das espumas compósitas QU25VB (A) e QU50VB (B) contendo o vidro bioativo (VB) disperso na superfície.....	49
Figura 14: Imagens e histogramas da distribuição do tamanho de poros obtidos por micro-CT das espumas 3D QU, QU25VB e QU50VB.	50
Figura 15: Fotomicrografias 3D obtidas por micro-CT das espumas compósitas QU25VB (A) e QU50VB (B) demonstrando a dispersão do vidro bioativo (VB) disperso no interior das amostras de matriz de quitosana.	51
Figura 16: Espectros de FTIR de (a) quitosana pura, (b) vidro bioativo, (c) QU e espumas compósitas (d) QU25VB e (e) QU50VB.	53
Figura 17: Espectros de FTIR comparativo ampliado das espumas QU (c), QU25VB (d) e QU50VB (e) e principais deslocamentos de onda observados.....	56
Figura 18: Espectros Raman obtidos de (a) quitosana pura, (b) vidro bioativo, das espumas compósitas QU25VB (d), QU50VB (c) e a espuma de 100% de quitosana (e).....	57

Figura 19: Padrões de DRX dos materiais (a) quitosana, (b) vidro bioativo SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ , (c) espuma QU, (d) espuma compósita QU25VB e (e) QU50VB.....	59
Figura 20: Curva tensão x deformação das espumas QU (a), QU25VB (b) e QU50VB (c)..	60
Figura 21: Comportamento de recuperação de forma da espuma QU e das espumas compósitas QU25VB e QU50VB após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de compressão por deflexão constante e medidas de recuperação de forma realizadas após 30 minutos depois da liberação da carga de carga de compressão e livre recuperação de amostras. O tempo 0 corresponde à dimensão original das amostras.	62
Figura 22: Comportamento de recuperação de forma da espuma QU e das espumas compósitas QU25VB e QU50VB após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de compressão por deflexão constante e medidas de recuperação de forma realizadas após 12 horas depois da liberação da carga de compressão e livre recuperação de amostras. O tempo 0 corresponde à dimensão original das amostras.....	63
Figura 23: Avaliação do grau de absorção de água das espumas QU (a) e das espumas compósitas QU25VB (b) e QU50VB (c) nos pH's 4, 7 e 9.	66
Figura 24: Perda de massa dos sistemas através das espumas QU, QU25VB e QU50VB em função do tempo.	68
Figura 25: Transmissão de vapor de água dos sistemas através das espumas secas QU (a) QU25VB (b) e QU50VB em função do tempo de exposição.	68
Figura 26: Transmissão de vapor de água dos sistemas através das espumas previamente umedecidas QU (a) QU25VB (b) e QU50VB em função do tempo de exposição.	70
Figura 27: Demonstrativo da capacidade de movimentação de fluidos das espumas QU, QU25VB e QU50VB de acordo com os resultados de absorção e transmissão de vapor úmido.....	72
Figura 28: Curvas de DSC e TGA do polímero quitosana.	73
Figura 29: Curvas de TGA e DSC das espumas QU (a), QU25VB (b) e QU50VB (c).....	74
Figura 30: Imagens obtidas com auxílio de Microscopia Óptica das monocamadas celulares expostas aos eluatos obtidos após 72 horas de incubação de diferentes biomateriais: branco (a), PEAD - controle negativo (b), látex - controle positivo (c), QU (d), QU25VB (e) e QU50VB (f).	77
Figura 31: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 72 horas de exposição de culturas de células L929 das espumas QU, QU25VB e QU50VB. (B) Morfologia das células controles.	79
Figura 32: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 72 horas de exposição de culturas de células HEK293 T das espumas QU, QU25VB e QU50VB.	80
Figura 33: Imagens obtidas por Microscopia Óptica de Fluorescência do teste "LIVE/DEAD" realizado utilizando fibroblastos da linhagem L929 expostos por 72h aos diferentes scaffolds	

produzidos e respectivo controle. (a) Controle (nenhum tratamento); (b) QU; (c) QU25VB; (d) QU50VB. (Escala = 100 um).....	81
Figura 34: Determinação da Atividade da ALP após sete dias de exposição de culturas de células L929 as espumas QU, QU25VB, QU50VB.....	83
Figura 35: Determinação da Atividade da ALP após sete dias de exposição de culturas de células HEK293 as espumas QU, QU25VB, QU50VB.	83
Figura 36: Avaliação da perda de massa por degradação hidrolítica das espumas QU, QU25VB e QU50VB por imersão em solução tampão SBF de pH 7,4 por 84 dias. R1 é o período que compreende taxa inicial de perda de massa e R2 é o período onde as massas dos compósitos.....	84
Figura 37: Espectros de FTIR da espuma QU imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.....	86
Figura 38: Espectros de FTIR da espuma QU25VB imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.	87
Figura 39: Espectros de FTIR da espuma QU50VB imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.	87
Figura 40: Espectros de FTIR comparativo entre as espumas QU (A), QU25VB (B) e QU50VB (C) imersas em SBF no tempo de 84 dias.....	88
Figura 41: Padrões de DRX de degradação in vitro com imersão em SBF durante um período de 84 dias: QU (A0) com 0 dias de imersão (controle), (A21) após 21 dias e (A84) após 84 dias de imersão; QU25VB (B0) com 0 dias, (B21) após 7 dias e (B84) após 84 dias de imersão; QU50VB (C0) com 0 dia, (C21) após 21 dias, (C84) após 84 dias de imersão.....	89
Figura 42: Fotomicrografias por MEV para caracterização das amostras a partir da degradação in vitro por imersão em SBF durante um período total de 84 dias: QU (A0) com 0 dias de imersão (controle), (A7) após 7 dias de imersão e (A84) após 84 dias; QU25VB(B0) com 0 dias, (B7) após 7 dias e (B84) após 84 dias de imersão; QU50VB(C0) com 0 dia, (C7) após 7 dias, (C84) após 84 dias de imersão.	90
Figura 43: Imagens do MEV das formações de apatita a partir da superfície de espumas compósitas QU25VB (B84) e QU50VB (C84) após imersão em solução de SBF durante 84 dias. Espectros da caracterização dos elementos químicos por EDS para as espumas compósitas QU25VB (B0) e QU50VB (C0) embebidas em solução de SBF no tempo 0 dias (controle) e QU25VB (B84) e QU50VB (C84) após 84 dias de imersão.	92
Figura 44: Distribuição do diâmetro do tamanho de poros obtida por micro-CT das espumas QU (A0); QU25VB (B0); QU50VB (C0) antes da imersão em SBF e QU (A84); QU25VB (B84); QU50VB (C84) após 84 dias de imersão em SBF.	94

Lista de Tabelas

Tabela 1: Curativos disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; O'BRIEN, 2011; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).....	15
Tabela 2: Tipos de scaffolds poliméricos destinados a tecidos moles disponíveis no mercado e seus nomes comerciais (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).	17
Tabela 3: Aplicações do polímero quitosana (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; DUTTA; DUTA; TRIPATHI, 2004; RAVI KUMAR, 2000).....	25
Tabela 4: Curativos de quitosana disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais (JAYAKUMAR et al., 2011).....	27
Tabela 5: Visão geral do uso de vidros bioativos para aplicações em contato com tecidos moles (BAINO et al., 2016; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015).....	31
Tabela 6: Composição (p/p%) das espumas compósitas 3D	34
Tabela 7: Graus de reatividade para testes de eluição de biomateriais (ISO 10993-5:1999).....	43
Tabela 8: Porosidade total, o tamanho médio de poros e a porcentagem de poros abertos das amostras das espumas 3D QU, QU25VB e QU50VB:.....	51
Tabela 9: Bandas características obtidas do espectro no infravermelho associadas com a quitosana e com o vidro bioativo:.....	54
Tabela 10: Bandas características obtidas do espectro Raman associadas com a quitosana e com o vidro bioativo.	58
Tabela 11: Módulo de Young (E^*), resistência máxima à compressão (σ_{max}) e tenacidade (T^*) das matrizes 3D.....	61
Tabela 12: Valores de média e desvio padrão da perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água dos scaffolds secos.	67
Tabela 13: Valores de média e desvio padrão da perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água dos scaffolds úmidos.	69
Tabela 14: Valores da perda de água por evaporação encontrados por Lamke et al. (1977) e comprovados por Thomas & Young (2008) em seus estudos para determinadas condições do tecido epitelial sob injurias.	70
Tabela 15: Valores relativos a Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) a Capacidade de Absorção (CA) e a Taxa de Permeação de Vapor Úmido (TPVU) (n=3).	71
Tabela 16: Resumo dos resultados da análise do comportamento térmico das amostras QU, QU25VB e QU50VB, obtidos por TGA e DSC.....	75
Tabela 17: Grau de reatividade das espumas 3D QU (100% de quitosana), QU25VB (75% de quitosana e 25% de vidro bioativo) e QU50VB (50% de quitosana e 50% de vidro bioativo) determinado pelo teste de eluição.	78

Tabela 18: Análise quantitativa por MEV da mudança no tamanho dos poros das espumas 3D antes e após 7 dias e 84 dias de imersão em SBF.	91
Tabela 19: Análise quantitativa por micro-ct das espumas 3D antes e após 84 dias de imersão em SBF.	93

Lista de Notações

σ	Resistência a compressão
3D	Tridimensional
ALP	Atividade da fosfatase alcalina
ASTM	<i>American Society Testing and Materials</i>
ATR	Reflectância total atenuada
CA	Capacidade de Absorção
CMF	Capacidade de Movimentação de Fluidos
DEMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E	Módulo de elasticidade
EDS	Energia dispersiva de elétrons
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
Ga	Grau de absorção
GD	Grau de desacetilação
Micro-CT	microtomografia de raios X
MM	Massa Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
PEAD	Polietileno de alta densidade
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Potencial de acidez
PVA	Poli (álcool vinílico)
QUI	Quitosana
SBF	Fluido corporal simulado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEF	Solução simulada de exsudato de feridas
SFB	Soro fetal bovino
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TGA	Termogravimetria
Tg	Transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão

T	Tenacidade
TEP	Trietil fosfato
TPVU	Taxa de Permeação de Vapor Úmido
TVA	Transmissão do vapor d'água
UV	Ultra violeta
VB	Vidro bioativo

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma ciência que busca substitutos biológicos que permitam a restauração e a melhoria do funcionamento dos tecidos afetados por injúrias ou doenças. Dentre essas, as lesões cutâneas apresentam grande importância tendo em vista as várias funções da pele. Sob circunstâncias normais, a cura da lesão progride de forma ordenada, no entanto, podem ocorrer alterações chamadas desordens dermatoproliferativas. Fatores como esses apontam para a necessidade do desenvolvimento de cobertura tópica capaz de permitir a reepitelização do local lesado de forma ordenada. Uma alternativa é a produção de matrizes compósitas 3D flexíveis produzidas por formação de espuma, que dão suporte a cultura celular. Estes materiais devem ter porosidade adequada, tamanho de poro apropriado, interconectividade e comportamento mecânico compatível com as características do tecido nativo. No presente trabalho, relatamos o desenvolvimento e a caracterização de novas espumas compósitas 3D flexíveis de quitosana (QUI) combinadas com vidro bioativo (VB) ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$), produzido através da rota sol-gel. As espumas foram obtidas por agitação vigorosa e em proporções de QUI/VB de 1:0, 3:1 e 1:1. Além dos efeitos de reticulação física esperados pela incorporação do vidro bioativo, o mesmo trás consigo o caráter antimicrobiano aprimorado, desejado aos biomateriais destinados aplicação tópica. A caracterização foi realizada por FTIR, DRX, Raman, MEV e micro-CT para avaliar as características estruturais e a porosidade das amostras. Foram realizados ensaios mecânicos de compressão estática e um teste de compressão de deflexão constante. Os testes de citotoxicidade foram realizados através de MTT, eluição, LIVE/DEAD® e testes de atividade de fosfatase alcalina também foram conduzidos. Foram realizados ensaios de degradação em ambiente aquoso e análise da perda de massa e mudanças estruturas por 84 dias. Ambas as espumas obtidas apresentaram uma estrutura altamente porosa com interconectividade. As espumas com VB demonstraram um aumento da resistência a compressão e aumento do módulo de elasticidade, diminuição da perda de massa por degradação e um tamanho de poro mais homogêneo em comparação a espuma de quitosana pura. A presença do VB foi capaz de modular a capacidade de permeação e absorção de água nos *scaffolds*. Os resultados dos testes de citotoxicidade demonstraram que os compósitos não produziram efeitos tóxicos. Por conseguinte, a introdução da fase inorgânica na matriz de quitosana teve um efeito importante na resposta morfológica e mecânica das espumas compósitas flexíveis. Estes materiais produzidos podem ser considerados como potenciais para uso como curativos e *scaffolds* destinados a regeneração de tecidos cutâneos.

ABSTRACT

Tissue engineering is a field of science that researches biological substitutes to support the restoration and improvement of the functions of tissues affected by injury or diseases. The skin lesions have great importance due the several functions of this tissue. Under normal circumstances, the wound healing progresses in an orderly manner. However, alterations called dermato proliferative disorders can occur. Due to these factors, there is a necessity for the development of topical coverage capable of allowing reepithelialization of the injured site in an orderly manner, aiding the healing process. An alternative is the production of flexible 3D composite matrices produced by foaming method, which support cell culture. These materials should have adequate porosity, appropriate pore size, interconnectivity, and mechanical behavior compatible with the features of native tissue. In this work, novel flexible 3D composite foams of chitosan (CH) combined with bioactive glass (BG) ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$), in 1:0, 3:1 and 1:1 ratios, were developed using the sol-gel route and a foaming step, and characterized by several techniques. In addition to the effects of physical crosslinking expected by the incorporation of bioactive glass, it brings with it the improved antimicrobial character desired for the biomaterials intended for topical application. Physical characterization was performed by FTIR, XRD, Raman, SEM and micro-CT to evaluate the structural features, and also the porous structure of the samples. The mechanical features were evaluated by static compression and constant deflection compression tests. MTT, elution and LIVE/DEAD® assay was used to assess the cytotoxicity. Alkaline phosphatase activity was also measured. In vitro hydrolytic degradation of foams was evaluated by immersions in SBF for up to 84 days. Both scaffolds obtained presented a highly porous structure with interconnectivity. Our results revealed that CH/BG foams presented increased mechanical properties, increase of mass loss by degradation process, and a more homogeneous pore size and distribution, compared with the pure chitosan *scaffold*. The addition of the BG was able to modulate the permeation and water absorption capacity in the foams. The composites did not produce toxic effects. Therefore, the introduction of the inorganic phase into the chitosan matrix had a crucial effect on the morphologic and mechanical response of the flexible composite foams. These materials may be potential alternative scaffolds for use as wound dressings and scaffolds for tissue regeneration and healing stimulation.

1. INTRODUÇÃO

No passado as pesquisas ligadas ao desenvolvimento de biomateriais eram direcionadas a obtenção de materiais que fossem inertes e que evitassem quaisquer reações do organismo à presença dos mesmos. Esse conceito foi reformulado com o advento dos materiais bioativos, que não somente são biocompatíveis, mas também aumentam a atividade celular, aumentando a velocidade de cura ou regeneração de tecidos lesionados (BAINO et al., 2016).

As lesões caracterizam-se por anormalidades do tecido provocadas por doença ou injúria, que podem acarretar na perda de sua integridade e/ou funcionalidade. Quando essas anormalidades ocorrem na pele, são chamadas de lesões cutâneas. Essas podem ocorrer em vários níveis de gravidade e sob várias formas. Em circunstâncias normais, a cura dessas lesões se faz de forma ordenada sendo as etapas do processo de cicatrização divididas em hemostasia, inflamação, proliferação e maturação (Contração) (GABRIEL, 2011). No entanto os processos de cicatrização que não ocorrem de forma normal, geram as chamadas anomalias, como as feridas crônicas e ainda cicatrizes elevadas ou proeminentes conhecidas como cicatrizes hipertróficas e as quelóides (BOMBARO et al., 2003; GABRIEL, 2011).

Além dos fatores estéticos envolvidos nos processos anormais de cicatrização, a probabilidade do aparecimento de infecções secundárias pós surgimento da ferida é preocupante. Esses fatores indicam a necessidade do desenvolvimento de coberturas tópicas capazes de permitir a reepitelização do local lesado de forma ordenada, auxiliando no processo de cura, não permitindo o desenvolvimento de desordens dermatoproliferativas. O curativo tópico ideal seria aquele de fácil aplicação e adaptável às varias partes do corpo do paciente, fácil remoção, que proporcione conforto, não exija trocas frequentes, mantenha o leito da ferida com umidade adequada permitindo que as áreas periféricas fiquem secas e protegidas, que controle o crescimento microbiano, estimule o crescimento celular e a regeneração do tecido e que apresente boa relação custo/benefício (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; MAYHALL, 2003; SERRA, 2010). Esse agente tópico ideal não existe, pois ainda não é possível encontrar todas essas características num único material, além disso a escolha da melhor cobertura tópica deve ser realizada com base no tipo de ferida. Devido a isso, cada vez mais pesquisas tem sido realizadas nos campos de biomateriais e engenharia de tecidos afim de desenvolver novas tecnologias que

permitam que os curativos tópicos e os substitutos dérmicos possam chegar o mais próximo possível da condição ideal a cada tipo de ferida (SERRA, 2010; SILVA, 2011).

Os curativos e coberturas tópicas são normalmente divididos em grandes grupos, cujos principais são os filmes semi-permeáveis, os hidrogéis, os hidrocolóides, curativos de alginato, as espumas e os mais recentes curativos bioativos (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). Dentro desse novo contexto de bioatividade, a engenharia de tecidos se volta para o estudo de biomateriais de suporte para o crescimento celular, principalmente os que tratam de suportes porosos chamados de *scaffolds*, que permitem a fixação biológica (APARECIDA; GUASTALDI; FOOK, 2008). Dentre os materiais que possuem maior potencial para formação desses *scaffolds*, os compósitos de matriz polimérica representam um dos mais estudados na atualidade, devido à trabalhabilidade dos polímeros sob diferentes técnicas, além de possuírem características mecânicas semelhantes às dos tecidos biológicos, particularmente dos tecidos moles (HOLLISTER, 2005).

Os polímeros mais comumente utilizados na engenharia de tecidos cutâneos e com relativo sucesso são o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímeros de PLA e PGA (PLGA), poli-anidridos, poliortoésteres, policaprolactonas, policarbonatos, e polifumaratos. Porém, as pesquisas e os avanços tecnológicos na área ainda serão necessários, tendo em vista que nenhum dos materiais produzidos terá todos os requisitos para todas as aplicações dos curativos em todos os tipos de lesões cutâneas, e ainda devem-se superar limitações principalmente relativas ao processo de fabricação (AGRAWAL; AWADHIA, 2004; DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; DUTTA; JOYDEEP; TRIPATHI, 2004).

Um dos polímeros que melhor atende os requisitos de um biomaterial para fins cutâneos é a quitosana (QUI). A quitosana é derivada da N-desacetilação da quitina, que é um polissacarídeo que exhibe propriedades tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e alta aderência. No entanto, uma das características dos *scaffolds* puros de quitosana é geralmente a baixa resistência mecânica e alta taxa de degradação, o que acaba limitando de suas aplicações (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; KURITA, 2006; MANSUR; COSTA, 2008). Uma das estratégias comumente usadas é a reticulação física, ou química da quitosana. As reticulações diminuem a mobilidade das cadeias poliméricas gerando uma rede

tridimensional. Devido a isso, o tipo e a proporção das reticulações formadas podem modular as propriedades mecânicas do material e também controlar as suas taxas de degradação, auxiliando na sua estabilização em meio fisiológico. Porém a maior parcela dos agentes de reticulação química existentes são tóxicos, ou potencialmente tóxicos e os seus resíduos têm que ser removidos ou extraídos após a preparação. Nesse aspecto, agentes reticulantes físicos constituem uma importante alternativa, pois não produzem subprodutos, podem ser vários, e são de fácil incorporação, uma vez que o mesmo deve ser apenas misturado à solução de quitosana e ionizar-se no pH ao qual será submetido (HENNINK; NOSTRUM, 2002; GONSALVES et al., 2011).

Uma das alternativas não reacionais para modulação da resistência mecânica da quitosana é a adição de uma fase cerâmica, com a formação final de um material compósito. Uma das cerâmicas que mais se adequaria a essa aplicação é o vidro bioativo (VB), em especial aqueles produzidos pela rota sol-gel, que devido a sua estrutura química polifuncionalizada, com vários grupos silanol (Si-OH), agiria não somente como agente de reforço na matriz polimérica, mas também como um potencial agente reticulante físico. Além disso, os vidros bioativos apresentam um comportamento antimicrobiano que aprimoraria ainda mais os efeitos de um material destinado ao tratamento de lesões da pele, impedindo as infecções secundárias geradas pela exposição ao ambiente. Essa ação antibacteriana está ligada, provavelmente ao ambiente alcalino criado pela libertação inicial de íons a partir da superfície de vidro (TILOCCA, 2010). Essa cerâmica especial é também capaz de reagir com fluidos fisiológicos, promovendo a estimulação da cicatrização nos tecidos moles lesados e a angiogênese local (GORUSTOVICH; ROETHER; BOCCACCINI, 2010; TILOCCA, 2010).

Estudos anteriores já utilizaram essa associação, porém Maji et al. (2016) investigaram o efeito de nanopartículas de VB incorporadas em gelatina/quitosana como compósitos para engenharia de tecido ósseo usando um processo de liofilização para fabricar as espumas. Além disso, Mansur e Costa (2008) estudaram a incorporação de vidro bioativo em PVA e *scaffolds* de quitosana, e estes sistemas híbridos mostraram melhorias físicas, mecânicas e biológicas. No entanto, em ambos os sistemas, o glutaraldeído foi utilizado como um agente de reticulação, e este componente foi capaz de aumentar a rigidez e diminuir a flexibilidade das matrizes, limitando o tipo de tecido para o qual o material poderia ser usado. Além disso, a

possibilidade de efeitos do glutaraldeído e de seus resíduos em matrizes de biomateriais é freqüentemente um tema de debate.

No intuito de produzir suportes porosos com a combinação de quitosana e vidro bioativo e dentre as várias técnicas para obtenção de *scaffolds* adequados para uso cutâneo e como suportes de células, inclui-se a técnica de formação de espumas por agitação vigorosa. Devido a sua simplicidade de execução, essa técnica pode ser feita a partir de uma grande variedade de materiais, tendo uma vasta aplicabilidade na engenharia de tecidos produzindo *scaffolds* com alta porosidade e baixa densidade relativa e, especialmente relacionado às espumas poliméricas, alta flexibilidade (ZHANG; MA, 1999).

O presente trabalho enfoca no desenvolvimento de um biomaterial capaz de ser usado como um curativo cutâneo com ação antimicrobiana e capaz de auxiliar o processo de cicatrização do tecido. Destaca-se como caráter inovador o desenvolvimento de uma nova espuma compósita de quitosana com incorporação de alto teor de micropartículas de vidro bioativo (50% m/m) por uma abordagem acessível e rápida. A fase vidro bioativo atua como um reforço mecânico e também como um agente reticulante físico, sendo uma alternativa ao uso de reticulantes tóxicos como o glutaraldeído, buscando assim produzir *scaffolds* porosos com as características adequadas a adesão e proliferação celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo proposto para este trabalho é estudar a produção de espumas compósitas com matriz do polímero quitosana reforçada e reticulada fisicamente com micropartículas de vidro bioativo e avaliar o impacto dessa reticulação nas características estruturais, físico químicas, mecânicas e biológicas dos *scaffolds* produzidos.

2.2 Objetivos específicos

Com o intuito de atingir o objetivo geral, é proposto o seguinte plano de trabalho:

- Caracterizar as matérias primas por meio de técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, comportamento térmico, espectroscopia Raman e difração de raios X visando identificar as propriedades e características físicas e químicas dos mesmos.
- Obter matrizes 3D por meio da agitação vigorosa e formação de espumas compósitas flexíveis do polímero QUI associado à micropartículas de vidro bioativo previamente disperso em glicerina.
- Caracterizar as matrizes 3D obtidas por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia Raman, difração de raios-X, avaliar as propriedades mecânica dos *scaffolds* através de ensaio de compressão, analisar seu comportamento térmico, porosidade, grau de absorção de fluidos, capacidade de movimentação de fluidos e a transmissão do vapor d'água.
- Verificar por meio de ensaio *in vitro* os padrões de degradação que as matrizes sofrem em meio à solução fisiológica simulada.
- Avaliar a citotoxicidade dos *scaffolds* obtidos *in vitro* utilizando os ensaios de MTT, Teste de eluição, LIVE/DEAD® e avaliar diferenciação celular através da atividade da Fosfatase Alcalina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.3 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e funciona como uma barreira imunológica. Suas funções incluem a regulação da temperatura, pigmentação, detecção tátil e a prevenção da perda de água em associação com a sua rede vascular, tendo relevância inclusive com a capacidade de socialização do indivíduo (MORI; MORIMOTO; TAKEUCHI, 2017). Derivada da Ectoderme e Mesoderme é anatomicamente constituída por três camadas (Figura 1):

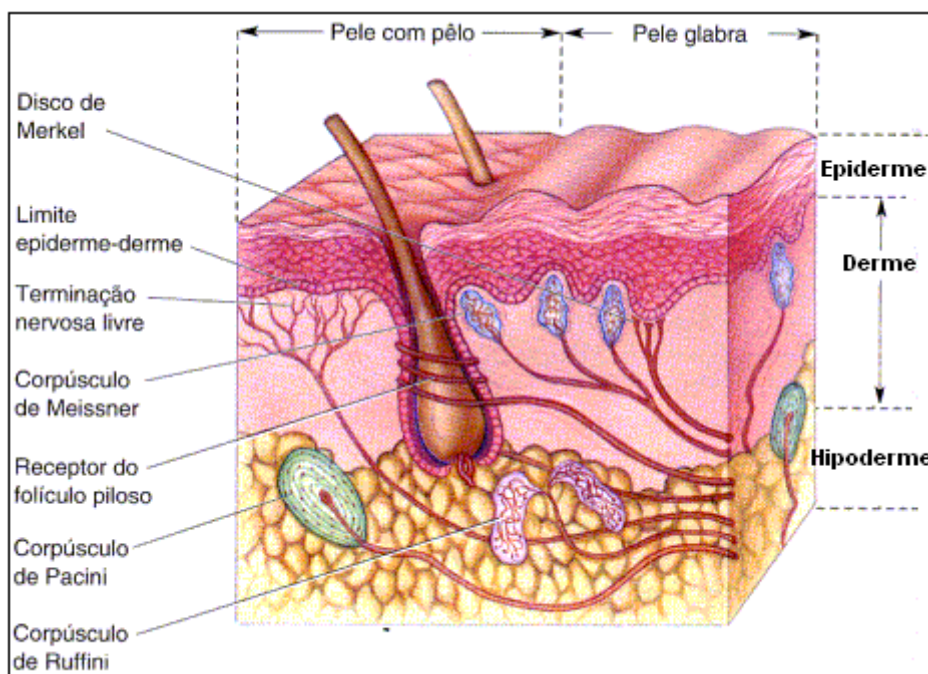


Figura 1: Histologia da pele normal.

Fonte: Adaptado de BEAR, CONNORS e PARADISO, 2002.

Epiderme: Originada na ectoderme é a porção constantemente renovada da pele, não possui vasos sanguíneos e é de espessura variável. É constituída por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (SOUZA, 2003).

Derme: Camada formada por mucossacarídeos ácidos, que são os grandes responsáveis pela fixação da epiderme e da própria derme, por polissacarídeos glicoprotéicos, eletrólitos e diversas células conjuntivas, fibras colágenas, elásticas e

reticulares, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, além das glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos pilosos e várias terminações nervosas (SOUZA, 2003)

Hipoderme: Com propriedades protetoras e de variação térmica possui vascularização profunda. A hipoderme é a camada basicamente formada por células do tecido adiposo (SOUZA, 2003).

Sem a cobertura da pele o organismo se desarmoniza de tal forma que pode ser incompatível com a vida, como ocorre com algumas doenças congênitas e em casos de queimaduras, por exemplo. Sendo considerada por muitos como o reflexo da saúde e das emoções da pessoa (SERNA; VITALES, 2013).

Quando a pele é lesionada, ou seja, passa por trauma oriundo de acidente ou enfermidade, isso pode vir a acarretar na perda de sua integridade e/ou funcionalidade. Justamente por isso, o organismo inicia o processo de cicatrização, logo após a ocorrência do trauma. Esse processo de reparação do local afetado é o mecanismo de sobrevivência que ocorre por meio da regeneração do tecido dérmico, ou pela reparação do tecido conjuntivo (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SOUZA, 2003).

Além dessas camadas, a pele é constituída pelas glândulas sudoríparas e pilosebáceas responsáveis pela liberação de secreções que são constituídas quimicamente por água, sódio, potássio, magnésio e cloro, bem como por carboidratos, lipídeos, especialmente o colesterol e proteínas como colágeno e a elastina (SERNA; VITALES, 2013; SOUZA, 2003).

Quando se trata de lesões leves, ou seja, de menor profundidade a regeneração da epiderme é realizada por processo rápido acarretando na cura aparentemente total e normal do tecido. No entanto quando se trata de uma lesão de grande profundidade a regeneração do tecido, tal como era, não ocorre, levando a formação de um tecido conjuntivo no local para que ocorra o fechamento da lesão (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MUTSAERS et al., 1997).

3.4 As lesões cutâneas e seu processo cicatricial

Dá-se o nome de lesão, ferida ou injúria à anormalidade promovida pela descontinuidade da integridade do tecido epitelial, incluindo pele e mucosas. Quando essas anormalidades ocorrem na pele, são chamadas de lesões cutâneas.

Após a lesão, inicia-se a cascata de ocorrências bioquímicas que se mantém ininterruptas até que ocorra o reparo do tecido, e a esse tipo de lesão é dado o nome de lesão aguda.

O reparo tecidual ocorre com as seguintes etapas: Hemostasia, Inflamação, Proliferação e Maturação (Contração). A lesão profunda causa o sangramento local, assim inicia-se o processo de cicatrização com a contração dos vasos sanguíneos e a coagulação, ou seja, o início da resposta inflamatória, essa fase é chamada de hemostasia (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). A resposta inflamatória é baseada na liberação de mediadores inflamatórios como histaminas e citocinas que levam a vasodilatação local, aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo a migração de leucócitos pertencentes à corrente sanguínea para a área lesada, bem como a passagem de fluido para o interior da ferida acarretando na formação do edema. Os neutrófilos liberados no leito da lesão fagocitarão as bactérias presentes “limpando o ferimento”. Esses neutrófilos por sua vez, desaparecerão devido ao processo de apoptose. A célula responsável por dar continuidade na limpeza da lesão e sua cicatrização são os macrófagos, consideradas as células mais importantes envolvidas no processo de reparo, por atrair células responsáveis pela angiogenese (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; HUNT; HOPF; HUSSAIN, 1988)

A fase de proliferação é marcada pela presença do tecido de granulação responsável pela degradação do coágulo formado durante a hemostasia (Figura 2). Esse tecido de granulação possui em sua constituição importantes células de reparo chamadas fibroblastos, esses fibroblastos secretam colágeno na área lesionada. O colágeno liberado trata-se principalmente do de tipo 3 que será convertido em colágeno do tipo 1, comum em tecidos epiteliais. Na ocorrência da maturação desse colágeno ocorrerá a contração do mesmo, a fim de aproximar as bordas da lesão. No entanto existem ainda duas teorias para a contração que ocorre na borda da ferida, uma delas sugere que miofibroblastos geram forças contráteis que seriam responsáveis pela

aproximação das bordas da lesão, e a outra teoria sugere que os próprios fibroblastos, agindo coletivamente, seriam responsáveis por contrair a matriz de tecido conjuntivo (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GABRIEL, 2011; HUNT; HOPF; HUSSAIN, 1988).

Porém, existem lesões cujo processo ordenado de reparo é, por algum motivo, interrompido e a essas é dado o nome de lesões, ou feridas crônicas, como por exemplos as úlceras de pressão e diabéticas que representam um problema de saúde pública, fortemente associada a custos significativos e risco aumentado de morte dos pacientes (CHOW; LEMOS; EINARSON, 2008; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). As queimaduras são outro exemplo de lesões cujo processo de reparo é alterado de forma a criar anomalias locais e cujo o número de casos gira em torno de 265.000 mortes por ano em todo mundo. No Brasil cerca de 1 milhão de acidentes com queimaduras ocorrem todos os anos sendo desses casos aproximadamente 100.000 os que buscam o serviço de saúde e em torno de 2.500 vão a óbito em decorrência das lesões (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; FUJISAWA, 2016; GABRIEL, 2011).

Sob circunstâncias normais, a cura da lesão progride de forma ordenada com a substituição do coágulo formado inicialmente, por tecido que se aproxime ao máximo das propriedades mecânicas e funcionais do tecido original. No entanto, podem ocorrer alterações chamadas desordens dermatoproliferativas. Dentre essas desordens destacam-se as queloides e as cicatrizes hipertróficas, essas diferenciam-se clinicamente das queloides por se desenvolverem dentro do limite das bordas da ferida, enquanto que as quelóides ultrapassam os limites de borda da lesão, criando “cicatriz alta” (GABRIEL, 2011).

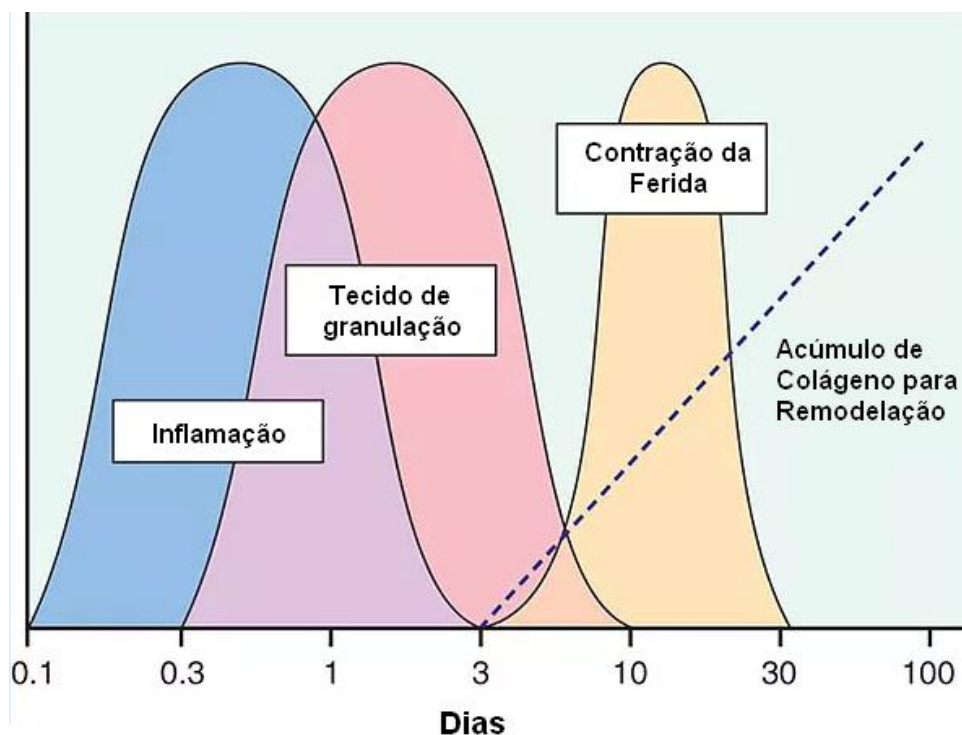


Figura 2: Gráfico de dias e eventos de cicatrização de uma lesão cutânea desde a inflamação até o reparo.

Fonte: (KUMAR V, ABBAS AK, 2008).

As cicatrizes hipertróficas são muito comuns em casos de queimaduras, principalmente as de média e grande profundidade, ou seja, que acometem a epiderme e a derme de forma parcial ou completa. São cicatrizes comumente dolorosas, pruriginosas e contráteis. Não apresentam mais a funcionalidade do tecido dérmico normal, não possuem glândulas sudoríparas, queratinócitos ou melanócitos, e apresentam por tal motivo coloração, textura e termoregulação diferenciadas do tecido circundante. Além disso, a formação das cicatrizes hipertróficas pode levar o paciente a traumas emocionais, prejudicando sua socialização (BOMBARO et al., 2003; GABRIEL, 2011).

Apesar de não haver forma confiável de prever se a lesão apresentará ou não cicatriz hipertrófica, o que há de evidente é que lesões com processos de inflamação prolongado, ou seja, que após 3 semanas o tecido ainda não se apresenta epitelizado e continua liberando exsudato, possuindo maior tendência a essa desordem (GABRIEL, 2011; MATSUMURA et al., 2011).

Além do fator tempo de cicatrização, os estudos demonstram que a formação de miofibroblastos a partir dos fibroblastos presentes na lesão cutânea é mediada pelo Fator transformador de crescimento (TGF- β 1), além disso citosinas pró-inflamatórias como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão diretamente ligados aos processos de patogênese da fibrose, bem como o tempo necessário para que os queratinócitos proliferativos da camada basal possam chegar e proliferar-se no leito da ferida (NAKAZATO et al., 2002; SCHOUTEN; NIEUWENHUIS; VAN ZUIJLEN, 2012).

Além dos fatores relativos à formação da fibrose, a perda da proteção da pele devido à lesão por queimadura e às úlceras interfere no equilíbrio da sua microbiota natural, promove abertura para entrada de microrganismos patogênicos que podem formar foco de crescimento ao encontrarem proteínas degradadas e tecido desvitalizado, acarretando desde infecções locais até processos de sepse. O paciente queimado possui outros fatores que favorecem às situações infecciosas de maior gravidade, como a hipovolemia, a imunossupressão, a possibilidade de translocação bacteriana gastrointestinal, bem como ao processo de internação que o expõe a vasta gama de micro-organismo presentes no ambiente hospitalar além do uso inadequado de antimicrobianos que levam ao aparecimento de cepas multirresistentes (REMPEL; TIZZOT; VASCO, 2011).

3.5 A Engenharia de tecidos no processo de cicatrização cutânea

Durante vários séculos as feridas eram tratadas através de debridamentos que posteriormente foram dando lugar aos primeiros curativos, que baseavam-se no uso de tecidos, fluidos, argilas e resinas de origem natural, como tiras de linho embebidas em óleo ou graxa, água, leite, vinagre e mel. A assepsia local começou a ser praticada em meados do século 19 com o advento dos antibióticos. No entanto somente no século 20 foram desenvolvidos os primeiros curativos oclusivos que passaram a proteger e proporcionar ambiente úmido no leito da ferida (SHAH, 2011). Em meados da década de 80 surgiram os curativos modernos feitos a partir de espumas de poliuretano, hidrocolóides e géis contendo iodo, até que na década seguinte se expandisse ao uso de materiais de origem sintética ampliando os tipos de coberturas tópicas que agora incluem hidrogéis, adesivos, hidrocolóides, alginatos, curativos de espuma sintética, malhas de silicone, filmes adesivos permeáveis ao vapor e curativos associando prata e colágeno (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; SHAH, 2011).

Porém, fatores como os citados anteriormente indicam a necessidade do desenvolvimento de coberturas tópicas capazes de permitir a reepitelização do local lesado de forma ordenada, auxiliando no processo de cura, não permitindo o desenvolvimento de desordens dermatoproliferativas. Portanto a escolha da melhor cobertura tópica deve ser realizada com base no tipo de ferida. Além disso, deve-se basear na sua capacidade de proporcionar ou manter o local da ferida com umidade ideal permitindo que as áreas periféricas fiquem secas e protegidas, permitir/aumentar a migração epidérmica, promover a angiogênese e a síntese do tecido conjuntivo, permitir a troca de gases entre o tecido ferido e o ambiente, manter a temperatura apropriada dos tecidos, proporcionar proteção contra a entrada de microorganismos e infecções secundárias, devem ser biodegradáveis ou quando não aderentes, serem fáceis de remover após a cicatrização da ferida, devem ser estéreis, atóxicas e hipoalergênicas. É ideal também que a cobertura tópica seja de fácil aplicação e adaptável às varias partes do corpo do paciente e que apresente boa relação custo/benefício (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; SERRA, 2010).

A fim de atender a essa necessidade a engenharia de tecidos vem a anos trabalhando em substitutos biológicos que não somente preencham, mas que permitam a restauração e a melhoria do funcionamento do tecido afetado, ou seja possuam alguma bioatividade e participem do processo de cura da injúria. Para isso, a utilização dos biomateriais em determinados tecidos exige estudo minucioso que vai desde o local onde será implantado, o tipo de material a ser utilizado em sua confecção, a tecnologia de fabricação do biomaterial, até o processo de confecção do produto final. Os curativos e coberturas tópicas são normalmente divididos em grandes grupos, cujos os principais são:

Filmes semi-permeáveis: Normalmente compostos de derivados do nylon, ou de poliuretano ou transparente e aderente, permitem a transmissão de vapor de água e gases (O_2 e CO_2) pela ferida e também fornecem desbridamento autolítico de escara constituindo uma barreira contra microorganismos. São altamente elásticos e flexíveis, porém não devem ser utilizados em feridas altamente exsudantes devido à sua capacidade de absorção limitada. Os curativos desse tipo diferem em sua permeabilidade ao vapor, suas características adesivas e extensibilidade de aplicação (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; SARABAH, 2012).

Os hidrogéis: são materiais hidrofílicos insolúveis feitos a base glicerina, géis aquosos, polímeros naturais ou sintéticos tais como quitosana, poli (metacrilatos) e ou polivinilpirrolidona. Quando umidecidos adquirem elevado teor de água (70-90%) o que auxilia os tecidos de granulação e o epitélio no processo de cicatrização, pois mantêm o leito da ferida com umidade. Uma de suas grandes vantagens está associada a alta propriedade elástica e maciez o que favorece à aplicação e à fácil remoção do local da ferida assim que a mesma é curada além de promoverem diminuição da temperatura local e por isso são comumente utilizados para feridas crônicas secas, feridas necróticas, úlceras de pressão e queimaduras. Suas desvantagens estão ligadas a sua baixa capacidade de absorção e transmissão do vapor de água dos exsudatos e à baixa resistência mecânica o que dificulta a sua manipulação (SARABAH, 2012).

Os hidrocolóides: são constituídos pela combinação de agentes formadores de gel como carboximetilcelulose, gelatina e pectina com outros materiais, tais como elastômeros e adesivos. São coberturas impermeáveis à água, bactérias e outros contaminantes, mas permeáveis ao vapor de água. Estão entre os curativos mais utilizados e consistem em duas camadas, uma camada coloidal interna e uma camada impermeável externa. Possuem propriedades importantes como o debridamento e boa absorção sendo por isso usados em feridas dos tipos leve a moderadamente exsudativas, tais como úlceras de pressão e queimaduras de segundo grau e baixa extensão. São capazes de manter o ambiente úmido o que ajuda na proteção do tecido de granulação. No entanto, não são indicados para úlceras neuropáticas ou feridas altamente exsudantes, além disso, existe uma tendência ao uso dos hidrocolóides ligada à formação de exsudatos com fortes odores, o que pode levar à idéia errônea de infecção local (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; SARABAH, 2012; THOMAS; LOVELESS, 1997).

Curativos de Alginato: São formados a partir dos sais de sódio e cálcio com unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico. Os curativos de alginatos quando colocados sobre a ferida úmida promovem reação local de troca de íons entre o cálcio do alginato e o sódio do exsudato da ferida produzindo massa gelatinosa, o que auxilia na manutenção da umidade local facilitando o debridamento autolítico minimizando a contaminação bacteriana. São indicados para feridas de drenagem moderadas a pesadas, porém não são ideais no uso em feridas secas, queimaduras de terceiro grau

e feridas graves com osso exposto. A possibilidade de ressecamento local é sua maior desvantagem tendo em vista que devem ser utilizados de forma associada a curativos secundários para que seja evitada a desidratação local e o retardamento da cicatrização (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; SARABAHI, 2012).

Espumas: São normalmente constituídas de poliuretanos altamente absorventes, disponíveis como almofadas, folhas e curativos para feridas profundas. São capazes de criar ambiente úmido e com isolamento térmico no leito da ferida, porém são não aderentes e por tal motivo são de fácil aplicação e remoção, destinadas às feridas com alta exsudação, pois permitem a troca gasosa e a eliminação do vapor de água. A sua capacidade de absorção de fluido varia com a espessura da espuma tendo sua transmissão de vapor de água variando entre 800-5000g/m²/24hrs. As espumas tem efeito de amortecimento, mas não são um substituto para dispositivos de alívio de pressão local. São indicadas para o tratamento de úlceras de pressão e para feridas de moderada a altamente exsudantes, também indicadas para feridas com tecido de granulação. Normalmente não exigem a aplicação de curativos secundários. Não são indicadas para tratamento de feridas com baixa produção de exsudato, feridas secas e cicatrizes secas, uma vez que as mesmas dependem da alta umidade para sua cura. Sua principal desvantagem está ligada à possibilidade de causar drenagem desagradável e excessiva, necessitando de trocas frequentes (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; RUBIN et al., 1990; SARABAHI, 2012).

Curativos bioativos: Considerada a mais nova classe dos curativos da era moderna, são produzidos com base em biomateriais que possuem propriedades que aceleram o processo cicatricial. São geralmente produzidos a partir de substâncias naturais ou semi-sintéticas como colágeno, ácido hialurônico, quitosana, alginato, elastina sendo combinados também na forma de compósitos. Suas características mais importantes são a biocompatibilidade, biodegradabilidade e natureza atóxica podendo ter os polímeros destes materiais atuando sozinhos ou em combinação dependendo da natureza e do tipo de ferida. Os curativos bioativos tem por vezes incorporados a eles fatores de crescimento e antimicrobianos para melhorar o processo de cicatrização das feridas (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Na Tabela 1 estão representados os tipos de curativos disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais.

Tabela 1: Curativos disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; O'BRIEN, 2011; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).

Tipo de curativo	Exemplos disponíveis no mercado
Filmes semipermeáveis	<i>CView®</i> , <i>Tegaderm®</i> , <i>Hydrofilm®</i> , <i>Opsite®</i> , <i>Bioocclusive®</i> .
Filmes semipermeáveis almofadados	<i>Hydrofilm Plus®</i> , <i>Opsite post op®</i> , <i>Tegaderm®</i> , <i>Film and pad®</i> , <i>Mepore®</i> <i>Ultra®</i> , <i>Coflex®</i> , <i>Copa®</i> , <i>Dermaform®</i> , <i>Xtrasorb®</i> , <i>Polymem®</i> , <i>Repara®</i> , <i>Hydrofera Blue®</i> , <i>Mepilex®</i> , <i>Allevyn®</i> .
Contato não aderente	<i>NA Ultra®</i> , <i>Mepitel®</i> , <i>Atrauman®</i> .
Hidrocoloide	<i>Comfeel®</i> , <i>Granuflex®</i> , <i>Tegasorb®</i> , <i>Duoderm®</i> , <i>Medihoney®</i> , <i>Xtrasorb®</i> , <i>Flexicol®</i> , <i>Restore®</i> , <i>Exuderm®</i> , <i>Nuderm®</i> .
Alginato	<i>Sorbsan®</i> , <i>Kaltostat®</i> , <i>Algisite®</i> , <i>Sorbion®</i> , <i>Aquacel®</i> , <i>Silvercel®</i> .
Espumas de Hidrofibra	<i>Aquacell®</i> , <i>Allevyn®</i> , <i>Biatain®</i> , <i>Mepilex®</i> , <i>Tielle®</i> , <i>Lyof foam®</i> , <i>Allevyn®</i> e <i>Tielle®</i> .
Hidrogel	<i>Activheal®</i> , <i>Intrasite®</i> , <i>Actiform Cool®</i> , <i>Nu-gel®</i> , <i>Aquaform®</i> .
Antimicrobiano	<i>Acticoat®</i> , <i>Iodoflex®</i> , <i>Inadine®</i> , <i>Honey®</i> .
Desodorizante	<i>Carboflex®</i> , <i>Actisorb Silver®</i> , <i>Clinisorb®</i> .
Terapia Larval	<i>LarvE®</i> .
Terapia tópica de tensão negativa	<i>V.A.C. Therapy®</i> , <i>Renasys Go®</i> , <i>Venturi®</i> .
Matriz de modulação de proteases	<i>Promogran®</i> .

Apesar da existência de uma série de curativos no mercado, nenhum atende integralmente às necessidades descritas para a cobertura tópica ideal. Portanto, a engenharia de tecidos continua estudando novos tipos de materiais que possam reunir de forma completa essas necessidades. Tendo em vista esse fator, os estudos voltados para matrizes tridimensionais (3D) tem se ampliado cada vez mais pois imitam as estruturas extracelulares nativas. Os *scaffolds* em escala micro e nano, possuem maior interação com as membranas celulares e maior capacidade de

absorção de proteínas (AGRAWAL; AWADHIA, 2004; SABREE; GOUGH; DERBY, 2015).

Os *scaffolds* produzidos na engenharia de tecidos fornecem a opção de trabalho com cultivo celular, ou seja, o material que é capaz de tratar o local não só como curativo mas também como matriz para proliferação celular, servindo como veículo para o crescimento celular, fornecimento de fatores de crescimento e ainda outras biomoléculas sinalizadoras que por sua vez acelerarão o processo cicatricial ou regenerativo. É assim como os curativos tópicos tornam-se ideais para que nessas matrizes ocorra a degradação com taxas conhecidas e para que as mesmas sejam do tipo matrizes 3D e que posteriormente os locais que ocupam sejam substituídos pelo tecido hospedeiro regenerado (AGRAWAL; AWADHIA, 2004).

Scaffolds com características próximas às ideais em termos de resistência, taxas de degradação, porosidade e tipo de microestrutura são mais facilmente produzidos e reproduzíveis quando usados polímeros em seu desenvolvimento. Os biomateriais têm evoluído com o passar dos anos e cada vez mais os estudos têm se voltado ao desenvolvimento de materiais destinados à renovação ou restauração tecidual. Com isso os *scaffolds* poliméricos tem ganhado grande atenção tendo em vista suas características como elevada porosidade com poros de tamanhos relativamente pequenos, biodegradação e propriedades mecânicas cada vez mais aprimoradas pelas diferentes associações com diferentes polímeros. As propriedades dos polímeros dependem da composição, estrutura e organização do respectivo constituinte macromolecular. Os polímeros utilizados como biomateriais, por sua vez, podem ser classificados em polímeros naturais, polímeros sintéticos biodegradáveis e polímeros sintéticos não biodegradáveis (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; FUCHS; NASSERI; VACANTI, 2001).

Os tipos de *scaffolds* mais comumente produzidos são os *scaffolds* porosos (espumas), *scaffold* de microesfera, *scaffold* de hidrogel, *scaffold* fibroso, *scaffold* de associação polímero e biocerâmica entre outros tipos que têm como característica principal a possibilidade de distribuição e crescimento celular ordenado e distribuição de nutrientes (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Na tabela 2 estão representados os tipos de *scaffolds* poliméricos destinados aos tecidos moles disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais.

Apesar de já existirem no mercado substitutos poliméricos 3D, com a função de regeneração tecidual, pesquisas e avanços tecnológicos na área ainda serão necessários tendo em vista que nenhum dos materiais produzidos terá todos os requisitos de todas as aplicações, e por isso apesar das recentes melhorias principalmente nas propriedades mecânicas, porosidade, na bioatividade e biocompatibilidade dessas matrizes novas pesquisas são necessárias a fim de superar limitações principalmente relativas ao processo de fabricação (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Tabela 2: Tipos de *scaffolds* poliméricos destinados a tecidos moles disponíveis no mercado e seus nomes comerciais (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Polímero	Tipo de <i>scaffold</i>	Exemplos disponíveis no mercado
PLLA	Fibras não degradáveis	<i>Dracon®</i> , <i>Dexon</i>
PLGA	Fibras de alta degradação <i>Scaffold</i> do tipo malha	<i>Vicryl®</i> , <i>Vicryl Rapid & CRYL®</i> <i>Vicryl Mesh®</i>
PLGA- colageno	Matriz membranosa	<i>CYTOPLAST Resorb®</i>
PCL	<i>Scaffold</i> de microesfera	<i>Capronor®</i>
PDLLA-CL	Fibra de baixa rigidez	<i>MONACRYL®</i>
PEU	<i>Scaffolds</i> e nanofibras, membrana e espuma porosa.	<i>Degrapol®</i>
PEAs	<i>Scaffold</i> poroso	<i>CAMEO®</i>
POE	Microesferas	<i>Alzamer®</i>
PCA	<i>Scaffold</i> poroso	<i>Dermabond®</i> , <i>Integra Dermal</i> <i>Regeneration Template®</i> , <i>Biobrane</i> & <i>Alloderm®</i> .
Colageno	<i>Scaffold</i> de membrana	<i>TransCyte®</i> .
Quitosana	<i>Scaffold</i> poroso	<i>TraumaStat®</i>

3.6 Matrizes Porosas Tridimensionais (3D)

O estudo de matrizes porosas tridimensionais (*scaffolds*) se dá principalmente pela necessidade atual de se criar ambiente adequado para a regeneração do tecido

lesado. Com isso, a implementação de estruturas 3D que proporcionem o microambiente adequado para a incorporação e adesão celular, sua sobrevivência e crescimento, a proliferação e a migração de fatores de crescimento para regeneração dos tecidos ou órgãos maculados tornou-se fonte de vários estudos pelo mundo (BICHO, 2012; GIBSON, 2005).

Com o tempo as células cultivadas em matriz 3D tem que ser capazes de criar sua própria matriz extracelular, e o material deve ser capaz de se biodegradar na medida que a geração da nova matriz se procede e ao mesmo tempo possuir propriedades mecânicas próximas às do tecido o hospedeiro. As matrizes devem imitar o ambiente real *in vivo* onde as células interagem e se comportam de acordo com os sinais mecânicos obtidos a partir do ambiente 3D circundante. Assim, as propriedades dos materiais dos *scaffolds* são vitais na determinação da resposta celular. Para isso vários tipos de materiais tem sido usados na busca de matriz que possua essas características como metais, cerâmicas, polímeros sintéticos e naturais. Para trabalhar esses materiais e conseguir desenvolver esses *scaffolds*, várias técnicas podem ser utilizadas e vem sendo desenvolvidas com o passar do tempo, sendo que as que podem produzir *scaffolds* são basicamente os tipos a seguir (GIBSON; ASHBY; HARLEY, 2010):

- Membranas Fibrosas: Produzidas através da técnica de *eletrospinning*, as membranas fibrosas mimetizam as estruturas do colágeno e da elastina, presentes naturalmente na estrutura de matriz extracelular. Essas membranas possuem diâmetros micrométricos ou nanométricos o que permite boa adesão e proliferação celular. Os materiais utilizados nessa técnica são os polímeros, justamente por possibilitarem a formação de fios (GIBSON; ASHBY; HARLEY, 2010).
- Hidrogéis Tridimensionais (3D): Produzidos pela mistura de polímeros e normalmente combinando processos de reticulação de cadeias poliméricas, apresentam uma rede de polímeros capazes de absorver a água do meio sem solubilizar-se na mesma, criando material ideal para liberação controlada de fármacos (GIBSON; ASHBY; HARLEY, 2010).

- Matrizes Tridimensionais (3D): Produzidos por processos como lixiviação, *gas foaming*, *freeze drying* e *freeze casting*, são matrizes possuidoras de poros que devem suportar a adesão, movimentação e crescimento de células no seu interior. O tamanho dos poros dependerá do tipo de tecido ao qual deseja-se regenerar. Podem ser produzidos a partir de cerâmicas, metais, polímeros e muitas vezes de híbridos desses materiais (GIBSON; ASHBY; HARLEY, 2010).

Independente do tipo de matriz produzida, quando se deseja criar *scaffolds* para o cultivo de células se torna imprescindível analisar se a arquitetura do mesmo permitirá a movimentação das células no seu interior, caso contrário as mesmas podem vir a crescer apenas na superfície, o que não é desejado em termos de regeneração tecidual 3D. Para que tal necessidade seja atendida, os poros ou lamelas presentes nos *scaffolds* devem ter tamanho mínimo maior que o tamanho da célula que o habitará. Além disso, os *scaffolds* devem possuir interconexão entre os poros para passagem de nutrientes, proteínas e das próprias células, devem possuir também geometria apropriada, semelhante a do tecido que será regenerado (BICHO, 2012).

O tamanho médio dos poros da matriz, sua distribuição, volume e interconectividade são muito importantes tendo em vista que dependendo do tipo celular a ser cultivado na matriz pode ocorrer desde oclusão dos poros, caso esses sejam muito pequenos impedindo a penetração das células e a formação da matriz extracelular. Caso sejam grandes demais, podem não permitir a adesão celular satisfatória. A figura 3 demonstra como a escala métrica do tamanho dos poros pode influenciar nos padrões de adesão e espalhamento celular. Devido a isso estudos têm enfatizado como tamanho ideal os poros com diâmetro de 5 μ m para neovascularização local, 5-15 μ m para crescimento de fibroblastos, 20 μ m para o ingresso de hepatócitos, 200-350 μ m para osteocondução e 20-125 μ m para a regeneração da pele de mamíferos adultos (BICHO, 2012; DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; SERNA; VITALES, 2013).

Além dos fatores já mencionados, quando se trata de *scaffold* de polímero biodegradável, a taxa de degradação e os produtos de degradação apresentados pela matriz devem ser analisados a fim de se determinar sua utilização e mesmo modificar sua estrutura e modular esse processo de acordo com a aplicação da matriz. A degradação pode ocorrer por mecanismos físicos, químicos ou por atividade enzimática e nada mais é do que a desmontagem do material, sendo os *scaffolds* de

polímeros degradados por perda gradativa de massa. No entanto a taxa de degradação do polímero depende principalmente das suas propriedades intrínsecas como sua estrutura química, a presença de ligações hidroliticamente instáveis, se é hidrofílico ou hidrofóbico, seu grau de cristalinidade, morfologia, temperaturas de transição vítrea (T_g), se se trata de copolímero e sua razão de monômeros, bem como o peso molecular de cada monômero podem fazer a diferença nessas taxas. Além disso, quando trata-se de *scaffolds* com culturas celulares, as taxas em questão devem coincidir com as taxas de crescimento do tecido a ser regenerado (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

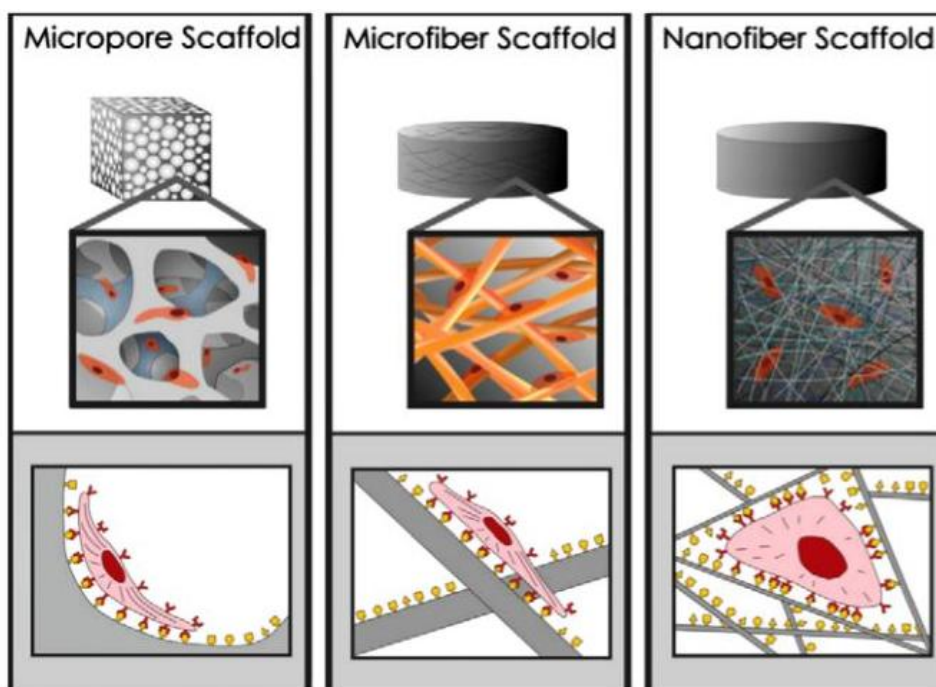


Figura 3: Arquitetura de scaffolds e a influência da escala métrica na ligação e espalhamento celular.

Fonte: (STEVENS; GEORGE, 2005).

3.7 Espumas Porosas Tridimensionais

Espumas podem ser feitas a partir de grande variedade de materiais. Vários autores têm utilizado diferentes técnicas para sintetizar espumas com tipo de material distinto, incluindo metais como titânio para aplicações de tecido ósseo (BOTTINO, 2005; GIBSON, 2005); Cerâmica, como vidro bioativo (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; JONES, 2015); Polímeros, como Policaprolactonas (PCL) (ZHANG et al., 2015); Compósitos (MAQUET et al., 2003); e híbridos (JONES, 2015). O interesse em

espumas para aplicações de engenharia de tecidos está ligado à sua alta porosidade e baixa densidade relativa. Outra propriedade importante, especialmente relacionada às espumas poliméricas, é a sua flexibilidade (NISOLA et al., 2015; SUN et al., 2006; ZHANG et al., 2015). Este tipo de comportamento tem sido estudado para desenvolver nova classe de materiais inteligentes. Zhang et al. (2015) provaram que o *scaffold* de espuma PCL fabricado usando a técnica de microondas foi facilmente comprimido e foi capaz de recuperar sua forma original após certos estímulos.

As coberturas tópicas produzidas a partir de espumas vêm sendo utilizadas desde 1970 e são consideradas como um dos primeiros curativos “modernos” destinados ao tratamento de feridas com leve, moderado ou mesmo forte nível de exsudado formado. Superam as tradicionais gazes em termos de tempo de remoção, sendo possível sua permanência local por mais dias. Permitem também a incorporação de substâncias destinadas ao processo de tratamento local da ferida e que podem ser liberadas de forma gradual pela espuma (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MAYHALL, 2003).

Dentro dos critérios estabelecidos para o curativo ideal as espumas cumprem de forma rigorosa as necessidades de remover o excesso de exsudato e os componentes tóxicos da ferida, bem como mantêm a alta umidade na interface ferida com o curativo, permitindo que ocorram as trocas gasosas, fornecendo isolamento térmico e possibilitam que sua remoção seja feita sem geração de novo trauma, comum em troca de curativos, além de proteger a lesão de possíveis infecções secundária e de partículas tóxicas (MAYHALL, 2003; ZHONG; ZHANG; LIM, 2010). A flexibilidade das espumas aumenta a capacidade de suportar as interações mecânicas. A flexibilidade permite ao material voltar à sua forma original, mesmo parcialmente, e permite adaptação adequada à anatomia do tecido hospedeiro, onde o implante será inserido. Todas estas vantagens permitem a aplicação deste tipo de material para a engenharia de tecidos duros e moles (NISOLA et al., 2015; SUN et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

As espumas disponíveis no mercado são dos tipos adesivas e não adesivas e normalmente feitas de poliuretano e silicone que permitem a manutenção de leitos com grande quantidade de exsudado, podendo também ser usadas em associação com hidrogéis e cremes (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011).

3.8 Quitosana

A quitosana (QUI) constitui-se de polímero de origem natural proveniente da quitina. A quitina foi o primeiro polissacarídeo descrito sendo, depois da celulose,. Descoberta por Henri Braconnot em 1811, sua descrição foi baseada em algumas reações realizadas sobre o material bruto isolado a partir de fungos, posteriormente, foi descoberta sua presença também em crustáceos e artrópodes (MUZZARELLI et al., 2012). Somente em 1859, ao submeter a quitina ao tratamento com hidróxido de sódio a quente, o pesquisador C. Rouget acabou por produzir a quitosana (Figura 4). Quando essa alcalinização, denominada N-Desacetilação, ocorrer superando 50% de desacetilação dos grupos N-acetil da quitina, essa passa a ser considerada quitosana (MUZZARELLI et al., 2012; RINAUDO, 2006).

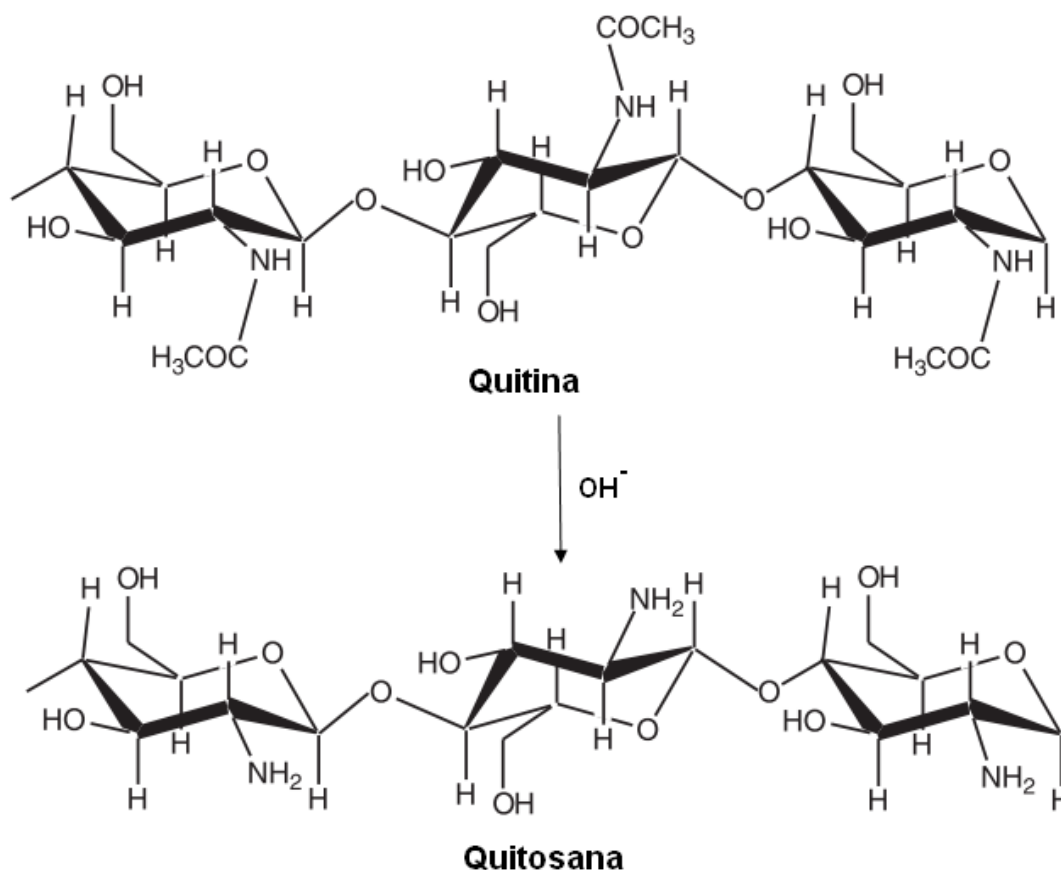


Figura 4: Desacetilação alcalina da quitina, obtendo-se o produto quitosana.

Fonte: Adaptado de (SHALUMON et al., 2011).

A quitosana é constituída predominantemente por unidades D-glicosamina, e possui propriedades diferentes do polímero original quitina, sendo sua solubilidade em soluções ácidas uma das características mais importantes, pois permite que esse polímero seja utilizado em número de aplicações às que não são possíveis para a quitina. Além disso, suas características estruturais permitem que a quitosana tenha aplicação em diversas áreas, sendo constantemente tema de estudos por todo o mundo (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; DUTTA; DUTA; TRIPATHI, 2004).

A produção comercial da quitina e da quitosana exige baixo custo e é realizada principalmente pelo reaproveitamento dos rejeitos da indústria pesqueira a partir da carapaça de caranguejos, camarões, lagostas e krills. No entanto, o controle adequado do processo de produção da quitina e da quitosana são importantes para manutenção da qualidade dos polímeros gerados, sendo as propriedades da quitosana altamente dependentes do controle das etapas de sua produção e da região de origem do polímero (DUTTA; DUTA; TRIPATHI, 2004; ISHIZAWA HIGUCHI; UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE., 2002).

3.8.1 Estrutura e características Físico-Químicas da Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicose ligadas por ligações do tipo β -(1-4) e, portanto de estrutura linear. Possui como grupos funcionais grupos amino ($-NH_2$) na posição C-2, grupos hidroxila primários ($-OH$) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Devido à presença desses grupos ao longo de toda extensão de sua cadeia, a quitosana interage com as moléculas de água através de ligações secundárias do tipo ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico, porém não solúvel. É devido também à presença desses grupos, a reatividade deste polímero e a possibilidade de ligação com outras moléculas e formação de novos tipos de materiais através de sua estrutura utilizada como precursora. A ordem de reatividade desses grupos segue de forma decrescente do $C2 > C6 > C3$, permitindo assim que em menor ou maior proporção seja possível reagir os três grupos funcionais presentes na estrutura e com isso possibilitar a ocorrência de diversas ligações com outras moléculas e reticulações (Figura 5) (ALVES; MANO, 2008; COSTA-JÚNIOR et al., 2009; DUTTA; JOYDEEP; TRIPATHI, 2004).

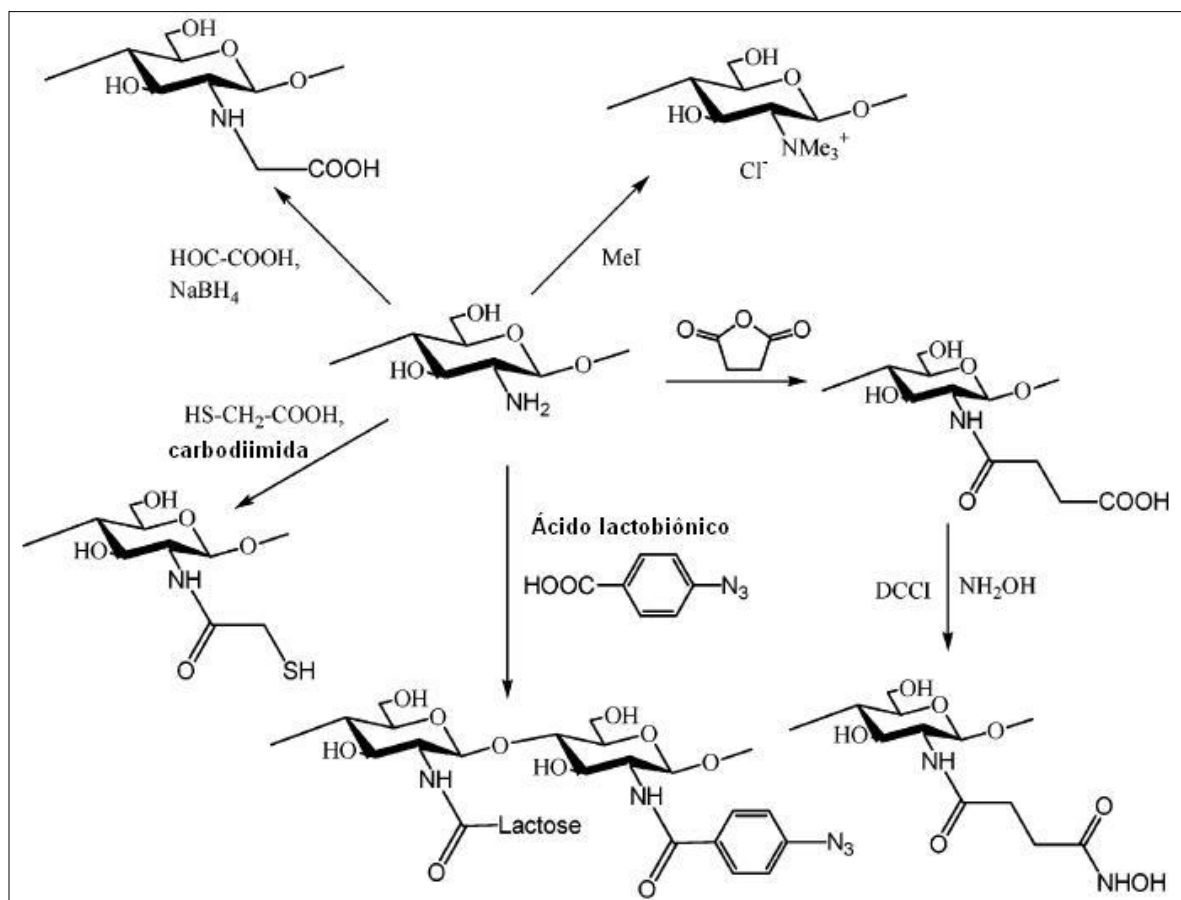


Figura 5: Algumas das possibilidades de derivados das reações efetuadas com o grupo amino da quitosana.

Fonte: (DUTTA; JOYDEEP; TRIPATHI, 2004).

Porém, mesmo com dois diferentes grupos funcionais de maior importância em sua estrutura, é a presença dos grupos amino que leva a quitosana a apresentar a maioria de suas propriedades. Devido à presença dos grupos amino e em meios apropriados, a quitosana é polieletrólito catiônico, o que a diferencia da maioria dos polissacarídeos de ocorrência natural que são polianiónicos e de natureza ácida. Essa característica físico-química leva a quitosana a apresentar natureza relativamente básica ($pK_a = 6,3$) que é também a responsável por sua solubilidade em soluções ácidas (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

Como trata-se de um polímero, a quitosana pode ser encontrada na forma semicristalina e amorfa. Além dessas características, o grau de desacetilação (GD), que representa a percentagem de grupos NH_2 livres, apresentado pelo polímero é, provavelmente o parâmetro mais importante, pois a maioria de suas propriedades são

dependentes desse fator. A solubilidade deste polímero em soluções de ácidos orgânicos ou inorgânicos exige que o pH esteja entre 3-6 devido a desacetilação do polímero, isso ocorre porque nessa faixa de pH os grupos amino da cadeia do polímero estão protonados e os mesmos encontram-se carregados positivamente. Isso leva à repulsão entre as cadeias e a maior solvatação, portanto, quanto mais grupos amino carregados positivamente, maior a solubilização da quitosana no meio e quanto maior o grau de desacetilação da quitosana maior a quantidade de ácido necessária para levar à completa solubilização (RINAUDO, 2006; SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

3.8.2 Propriedades e aplicações da quitosana

A quitosana vem sendo largamente utilizada nos estudos de engenharia de tecidos por possuir propriedades importantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana, boa adsorção, solubilidade dependente do pH do meio, grande adesividade, características essas relacionadas a sua natureza policatiônica e ao seu grau de desacetilação (DUTTA; JOYDEEP; TRIPATHI, 2004). Além disso, estudos demonstram que a adesão celular, bem como a proliferação pode ser acelerada quando cultivadas em *scaffolds* desse polissacarídeo, tornando-o candidato a matéria-prima para confecção de peles artificiais, curativos, suportes para regeneração de cartilagens nervos e ossos. As aplicações da quitosana estão listadas na tabela 3 (CHEN, 1996; DUTTA; JOYDEEP; TRIPATHI, 2004; TANIGAWA; MIYOSHI; SAKURAI, 2008).

De acordo com os estudos de Paul e Sharma (2004) a quitosana fornece matriz não protéica para o crescimento de tecidos ativando macrófagos para atividade tumoricida, estimulando a proliferação celular e a homeostasia histoquímica do tecido ao qual é aplicado, auxiliando também na coagulação. Ainda de acordo com esse estudos durante a degradação e despolimerização da quitosana há a liberação de N-acetil-p-D-glucosamina, que induz a proliferação de fibroblastos, auxilia na deposição ordenada de colágeno e estimula o aumento do nível de síntese de ácido hialurônico, ou seja, de forma geral age aumentando a velocidade da cicatrização do tecido lesado. Na tabela 4 estão listados os curativos de quitosana disponíveis para comercialização.

Tabela 3: Aplicações do polímero quitosana (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006; DUTTA; DUTA; TRIPATHI, 2004; RAVI KUMAR, 2000).

Área	Emprego
Cosmética	Nos cuidados da pele, cabelos e boca Umectante Antimicrobiano
Indústria de alimentos	Películas conservadoras Embalagens biodegradáveis
Engenharia da água	Tratamento de efluentes industriais Remoção de íons metálicos Tratamento de esgoto doméstico
Indústria têxtil e do papel	Substituto da celulose Tratamento de superfícies
Agricultura	Liberação controlada de agroquímicos Defensivo agrícola
Farmacêutica	Liberação controlada de fármacos Agente antimicrobiano Aditivo em formulações Controle do colesterol
Biomédica e Engenharia de Tecidos	Membranas semipermeáveis (hemodiálise) Scaffold para crescimento celular de tecidos duros ou moles Desenvolvimento de pele artificial Curativos cutâneos

Tabela 4: Curativos de quitosana disponíveis como produto acabado e seus nomes comerciais (JAYAKUMAR et al., 2011).

Tipo de curativo	Função	Nome comercial
Curativo tipo gaze	Contenção de hemorragias	<i>HemCon®</i> , <i>Chitoflex®</i>
Thermogel (Hidrogel)	Contenção de hemorragias com revestimento de celulose	<i>Chitoseal®</i> <i>Chitodine®</i>
Hidrofibra	Agente Hemostático para Cateterização Vascular	<i>Syvek-Patch®</i>
Hidrocolóide	Cobertura tópica com auxílio no reparo de feridas	<i>Tegasorb®</i> , <i>Tegaderm®</i>
Filme semipermeável	Cobertura tópica com auxílio no reparo de feridas	<i>Trauma DEX®</i>
<i>Scaffold</i> compósito poroso	Utilizado na reparação e regeneração de tecidos	<i>TraumaStat®</i> , <i>BST-CarGel®</i>

No Brasil a utilização da quitosana é regulamentada como alimento funcional, sem mudanças até a publicação do presente trabalho, sendo comercializada na forma de cápsulas para o auxílio na redução da absorção de gordura e colesterol (BRASIL, 2008).

3.9 Vidro Bioativo

3.9.1 Histórico e obtenção

O vidro bioativo é uma cerâmica sintética de caráter amorfo produzida pela primeira vez em 1969 quando Hench e seus colaboradores descobriram que a composição com 45% de sílica poderia ligar quimicamente os ossos de ratos lesionados com certas composições de vidro à base de silicato. A composição mais bem sucedida que possuía 45%SiO₂-24,5%Na₂O-24,5%CaO-6%P₂O₅ (p/p) foi chamada de 45S5 e posteriormente patentada como Bioglass®, devido ao caráter bioativo apresentado pelo vidro quando imerso em solução de fluido corporal simulado (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A formação de cristais de hidroxiapatita na superfície do material pós imersão, comprovou não somente sua bioatividade como se tornou material destinado a aplicações clínicas em engenharia de tecidos (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; JONES, 2015).

A obtenção do vidro bioativo é realizada a partir de duas técnicas fundamentais: técnicas de fusão e técnicas sol-gel. A técnica sol-gel surgiu na década de 90 e é até os dias de hoje a mais utilizada, pois os vidros assim produzidos, além de apresentar maior pureza, apresentam também alta bioatividade, taxa de reabsorção controlada e potencial para estimular a diferenciação celular. A técnica sol-gel é uma sequência de etapas que envolve a combinação de precursores de alcóxidos metálicos e água na presença de solvente e catalisador promovendo assim a reação de hidrólise e posterior gelificação. Os geis produzidos são então levados a tratamento térmico para eliminação de água e resíduos orgânicos do processo de produção, no entanto esse tratamento é realizado a baixas temperaturas (600-700°C) o que constitui vantagem desse método, quando comparado às técnicas tradicionais como a de fusão, que trabalha com altas temperaturas e tende a produzir vidro com menor pureza (ANDRADE; DOMINGUES, 2006; JONES, 2015; PEREIRA; CLARK; HENCH, 1994). A figura 6, demonstra resumidamente as etapas do processo de produção do vidro bioativo pela técnica sol-gel.

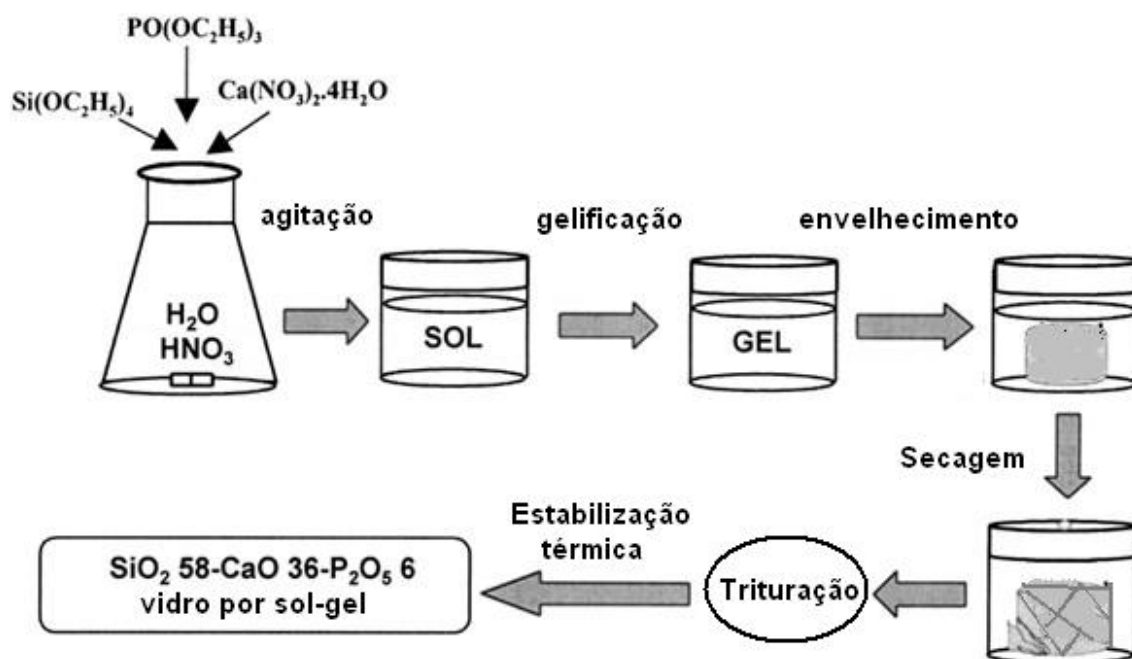


Figura 6: Etapas resumidas do processo de obtenção do vidro bioativo pela rota sol-gel.

Fonte: (MESEGUER-OLMO et al., 2002).

3.9.2 Estrutura e características físico-químicas do vidro bioativo

Durante a obtenção do vidro pela rota sol-gel as reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos resultam na formação de rede de estrutura ramificada tal como representado na figura 7. Essa estrutura possui dois agentes principais: os formadores de rede, que são os responsáveis pela formação da rede tridimensional e indispensáveis para formação do vidro, sendo que normalmente se utiliza a sílica (SiO_2), o pentóxido de fósforo (P_2O_5) e o trióxido de boro (B_2O_3). O segundo agente é o modificador de rede que age interrompendo a estrutura de rede espaçando essa estrutura e adicionando novas características relacionadas a bioatividade do vidro, são exemplos o cálcio, o sódio, estrôncio, manganês e outros íons. Essa rede tridimensional, que possui alto número de grupos hidroxilas, faz do vidro bioativo altamente polar e de estrutura amorfa, além de opticamente transparentes e quebradiços (JONES, 2015; REZABEIGI; WOOD-ADAMS; DREW, 2014).

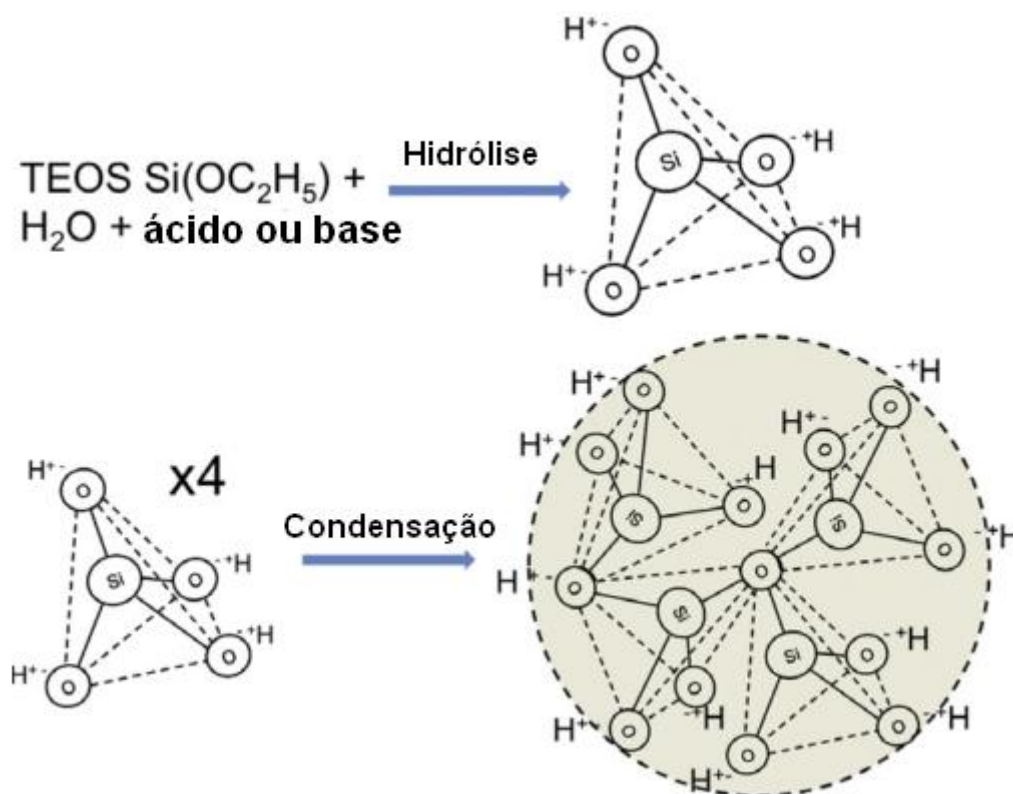


Figura 7: formação da sílica tetraédrica e das partículas de vidro bioativo pela rota sol-gel.

Fonte: (JONES, 2015).

3.9.3 Propriedade e aplicações do vidro bioativo

A utilização mais conhecida dos vidros bioativos está ligada ao uso como matriz para engenharia de tecido ósseo, isso devido aos vários estudos e produtos que o utilizam nessa área, justamente por essas cerâmicas suscitarem resposta bioativa na interface do material formando hidroxiapatita, que é o mineral natural do tecido ósseo. Um dos exemplos mais famosos é o das partículas Bioglass® que são comercializadas 1993 sob o nome comercial de Perioglas® e indicadas para tratamento de defeitos ósseos periodontais e, mais recentemente, como NovaBone® utilizado na ortopedia e aplicações dentárias (BAINO et al., 2016; LARRY; HENCH, 2006).

No entanto seu uso tem se estendido cada vez mais a diferentes órgãos e sistemas, tendo suas aplicações também destinadas aos tecidos moles. Neste sentido, os campos de pesquisa emergentes para os vidros bioativos incluem reparo neuromuscular, desenvolvimento de córnea artificial, implantes orbitais, epiteliais e cardíacos, no tratamento de úlceras gástricas e câncer não-ósseo. A tabela 5 apresenta resumidamente os tipos de estudos realizados nesse sentido além dos materiais já disponíveis no mercado (BAINO et al., 2016; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015).

O uso do vidro bioativo no tratamento de feridas cutâneas tem ganhado cada vez mais força, em parte pelo grande desafio em se desenvolver curativos que consigam dar respostas positivas aos cenários clínicos possíveis de feridas cutâneas. O primeiro estágio da ferida é crítico, pois o controle das hemorragias pode diminuir a taxa de mortalidade. Além disso, a possibilidade do uso de curativo que possua a capacidade de induzir a cicatrização é de suma importância quando se deseja não substituir, mas regenerar o tecido lesado.

Nos estudos de Gillette et al. (2001) foram determinados os efeitos das partículas de vidro bioativo sobre a cicatrização de feridas de pele de corte total em cães, onde as partículas claramente agiram induzindo o aumento dos sinais histológicos de inflamação, auxiliando na velocidade da cicatrização da pele dos cães. Vários estudos já provaram que essas cerâmicas são capazes de reagir com fluidos fisiológicos e são capazes de não só estimular a cicatrização em tecidos moles, mas também demonstram efeito angiogênico, além disso, também foi relatado comportamento antibacteriano para VB (BAINO et al., 2016; JONES, 2015).

Tabela 5: Visão geral do uso de vidros bioativos para aplicações em contato com tecidos moles (BAINO et al., 2016; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015).

Aplicação	Tipo de material	Status de comercialização/ Nome comercial
Cicatrização de feridas/Hemostático	Suturas poliméricas revestidas com Ag dopado com vidro bioativo.	Sim/QuikClot®
Reparo do nervo periférico	Tubo de vidro fosfatado, fibra de vidro fosfatado; Fibras de vidro de tamanho micro e nano particulado; Compósitos poliméricos com pó de vidro fosfatado	Não/Testes clínicos estão em andamento.
Reparo da medula espinhal	Fibras de vidro fosfatado; Compósitos a base de colágeno.	Não/Testes em animais estão em andamento.
Engenharia do tecido muscular	Fibras de fosfato isoladamente ou compósitos de matriz polimérica.	Não/ apenas testes <i>in vitro</i> com células estão disponíveis atualmente
Reparo de ligamentos	Fibras de vidro fosfatadas	Não/ apenas testes <i>in vitro</i> com células estão disponíveis.
Córnea artificial	Vidros ou revestimentos porosos; Compósitos de vidro/PMMA	Não/Testes em animais estão em andamento.
Implantes para ouvido médio	Uso de vidro ou cerâmica bioativa para substituir a estrutura dos ossículos.	Sim/ Bioglass®, Ceravital®
Implantes cocleares	Uso do vidro para ancorar o implante pelo osso temporal do paciente.	Sim/ Bioglass®
Tratamento de câncer do fígado	Microesferas de vidro injetáveis com o sistema: $Y_2O_3-Al_2O_3-SiO_2$	Sim/ TheraSphere®
Tratamento da fibrose uterina	Microesferas de vidro injetáveis com o sistema: $SiO_2-CaO-ZnO-La_2O_3-TiO_2-MgO-SrO-Na_2O$	Não/ apenas testes <i>in vitro</i> com células estão disponíveis.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho

As etapas que foram desenvolvidas neste trabalho estão resumidamente apresentadas na figura 8.

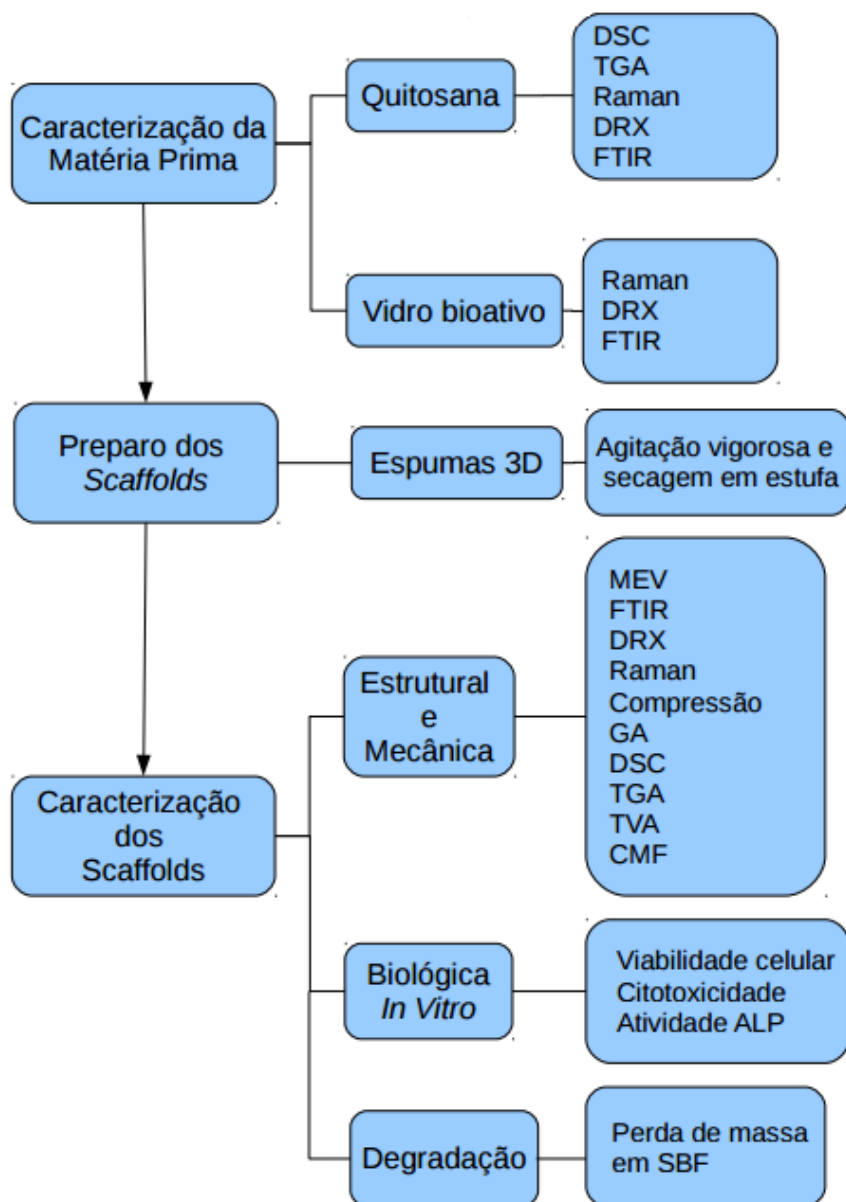


Figura 8: Fluxograma das etapas de execução do trabalho.

4.2 Materiais

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.) e água Milli-Q foi utilizada em todas as soluções com resistividade mínima de (18,0MΩ.cm) a 25 °C.

Utilizou-se quitosana em pó de elevada massa molecular (MW = 320 000 g/mol, grau de desacetilação, GD > 75%, Cat. #419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, EUA). O ácido adípico foi obtido da Vetec Química com 96% de pureza. O vidro bioativo foi sintetizado utilizando os seguintes reagentes: Tetraetil ortosilicato (TEOS: $C_8H_{20}O_4Si$ - 98% de pureza, Sigma - Aldrich, Saint Louis, EUA), ácido nítrico 2mol/L (HNO_3 - Merck), Trietil fosfato (TEP: $C_6H_{15}O_4P$ - Merck - #821141) e nitrato de cálcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, Synth - com 99% de pureza). Outros reagentes utilizados foram solução de NaOH 1M (Cromoline - FC: 0,99), glicerina (Synth - com 99,5% de pureza) e surfactante lauril éter sulfato de sódio (LESS) - Oxiteno, concentração 27%v/v.

4.3 Preparo das espumas compósitas 3D

4.3.1 Síntese de micropartículas de vidro bioativo (VB)

As micropartículas de vidro bioativo (VB) foram preparadas pelo método sol-gel, rota alcóxido, com a composição nominal, em mol de 60% SiO_2 -36% CaO -4% P_2O_5 . A solução de partida (sol) foi sintetizada misturando 132,2 mL de água deionizada, 22,4 mL de ácido nítrico 2,0mol/L (HNO_3), 13,75 mL de trietil fosfato (TEP) e 137,1 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS) durante 60 minutos. Na sequência, adicionou-se lentamente nitrato de cálcio tetrahidratado e misturou-se a solução durante 30 minutos. O passo seguinte foi a passagem do sol para recipientes de Teflon hermeticamente fechados para gelificação em estufa durante 72h a 60°C. Em seguida, as tampas dos recipientes foram trocadas por tampas com orifícios e o VB, já na forma de gel, foi seco numa estufa a uma temperatura inicial de 60°C com um aumento de 10°C a cada 24h até que fosse alcançada a temperatura de 120°C. Em seguida, o vidro bioativo foi triturado, obtendo-se um pó microparticulado, e tratado termicamente a 700°C. Os sólidos foram moídos mais uma vez e separados por peneiramento, na faixa 38-150 μ m.

4.3.2 Preparo da solução de quitosana (QUI) e das espumas compósitas 3D

Preparou-se uma solução a 3% (m/v) de quitosana dissolvendo o polímero em uma solução de ácido adípico a 1% com agitação mecânica moderada durante 24h para completa dissolução do polímero. O pH da solução foi corrigido para $5,5 \pm 0,1$ usando NaOH 1,0M e a solução foi mantida sob agitação a 40°C durante mais 1h, garantindo

a dissolução de todos os componentes e para assegurar a obtenção de uma solução límpida. As espumas compósitas foram preparadas com quitosana (QU) combinada com VB na proporção m/m% apresentada na tabela 6.

Tabela 6: Composição (m/m%) das espumas compósitas 3D

Amostras	Composição	
	Q (%)	VB (%)
QU	100	0
QU25VB	75	25
QU50VB	50	50

Adicionou-se o equivalente a 10% de glicerol em todas as espumas, valor esse que se mostrou eficaz para dispersão do VB. Para a espuma QU, foi adicionado glicerol diretamente à solução de quitosana. Nas espumas compósitas foi utilizado glicerol como dispersante de VB que foi posteriormente misturado a solução inicial de quitosana para formação dos compósitos QU25VB e QU50VB. Em seguida, foi adicionado 1% (m/m) do tensoativo lauril éter sulfato de sódio em todas as composições. As misturas foram agitadas vigorosamente para formação de uma espuma estável, as quais foram então envasadas em formas de silicone, refrigeradas em freezer a -20 °C durante 48h e posteriormente as espumas foram levadas para secagem em estufa a 55 °C durante 24h.

4.4 Caracterização estrutural e mecânica das espumas 3D

4.4.1 Análise estrutural dos *scaffolds*

A análise da microestrutura superficial dos *scaffolds* foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando o equipamento SHIMADZU SSX-550. O microscópio é acoplado ao equipamento de espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS), utilizado para análise semiquantitativa da composição química da superfície das amostras. Para a avaliação por MEV as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro por *sputtering*, foi usada tensão de 15kV e as amostras foram posicionadas de forma que estivessem à máxima distância do alvo, impedindo assim danos às espumas (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2010; JÚNIOR, 2008).

4.4.2 Análise 3D da estrutura dos *scaffolds* por microtomografia de raios-X (micro-CT)

A análise microestrutural dos poros foi conduzida através da Microtomografia de Raios-x que foi realizada em aparelho micro-CT compacto SkyScan 1174 (Bruker Micro-CT, Bélgica), utilizando-se a tensão de 40kV, corrente de 800 μ A e tamanho de pixel de 8,05 μ m. Não foram utilizados filtros. As amostras foram fixadas em um suporte e rotacionadas 180°, com imagens adquiridas a cada 0,7°. A reconstrução 2D das seções transversais das amostras foi realizada usando software NRecon (v.1.6.1.18, Bruker micro-CT, Bélgica). O software CT Analyzer (v. 1.15.4.0, Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica) foi utilizado para a análise quantitativa 3D, e a visualização volumétrica foi realizada utilizando-se software CT Vol (v. 2.3.1.0, Skyscan, Bruker Micro-CT, Bélgica).

4.4.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A caracterização química qualitativa das espumas foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As amostras sólidas foram analisadas utilizando o equipamento Nicolet 6700 (Thermo Scientific) no modo de reflectância total atenuada (ATR) utilizando um acessório OMNI-Smart. Os espectros de FTIR foram recolhidos de 4000 a 650 cm^{-1} no decurso de 64 escaneamentos com uma resolução de 4 cm^{-1} . Após a normalização dos espectros as principais bandas de vibração foram atribuídas a seus respectivos grupos químicos (JÚNIOR, 2008; SADAHIRA, 2007).

4.4.4 Análise por espectroscopia Raman

Todos os espectros Raman foram adquiridos utilizando espectrômetro Raman (LabRAM HR, Horiba Jobin Yvon Ltd, Reino Unido, com o *software* Labspec) com laser de 632,8nm, no intervalo de número de onda de 400-1400 cm^{-1} . O sinal Raman foi recolhido por microscópio Olympus BHX em objetivas de 10 X, 50 X e 100 X. O detector foi o CCD Spectrum One refrigerado com N₂ líquido. Dependendo da fluorescência de fundo da amostra, o tempo de aquisição variou de 10 a 30s. Para reduzir as relações sinal/ruído, os espectros foram adquiridos 5-10 vezes após fotobranqueamento de 5-20 minutos. Os espectros Raman coletados foram analisados e otimizados com os *softwares* Labspec 5 e Origin 6.0.

4.4.5 Análise por difração de raios X (DRX)

A análise das fases e organização estrutural das matérias primas e das amostras foi realizada pelo método de difração de raios X (DRX) em equipamento SHIMADZU XRD 7000. A metodologia de análise se procedeu em 2θ variando de 3,00 a 60,00°, com passo de 0,06, usando para isso radiação $K\alpha$ do cobre com $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ (COSTA-JÚNIOR et al., 2009).

4.4.6 Caracterização das propriedades mecânicas das espumas 3D

4.4.6.1 Ensaio de compressão

As amostras foram uniformemente cortadas da região mais homogênea da espuma para formar blocos cúbicos com as mesmas dimensões: 10mm x 10mm x 10mm. Estas amostras foram posicionadas entre placas paralelas utilizando equipamento EMIC DL 3.000 com uma velocidade de 0,5mm/min e uma célula de carga de 2000N. Cada sistema foi comprimido até uma deformação de 50%. Esse limite foi estabelecido baseando-se em ensaios feitos anteriormente, que demonstraram que as amostras não apresentaram fratura mesmo sendo submetidas a deformações e que alcançavam a distância mínima permitida entre as placas de compressão do equipamento. Os resultados foram obtidos pela média de quatro amostras ($n = 4$). O módulo elástico foi calculado como a inclinação da porção linear inicial da curva tensão-deformação. A tensão para 50% de deformação foi considerada como correspondente ao ponto máximo da curva tensão-deformação. A tenacidade foi avaliada como a área sob a curva de tensão-deformação. A fim de se avaliar a relação da densidade com as características mecânicas das espumas, a densidade volumétrica foi calculada de acordo com a relação massa/volume das amostras testadas no ensaio de compressão, medindo-se a massa seca e o volume geométrico das amostras.

4.4.6.2 Teste de compressão por deflexão constante

As propriedades de compressão por deflexão constante das espumas foram quantificadas com base na ASTM D 3574-05 (*Standard Test Methods for Flexible Cellular Materials—Slab, Bonded, and Molded Urethane Foams*) utilizando máquina universal (EMIC DL 3000) com velocidade de 0,5mm/min e célula de carga de 2000N. As propriedades de compressão por deflexão constante das amostras foram determinadas na mesma plataforma de pratos e ao mesmo tempo. As espumas foram

submetidas à seguinte sequência: compressão constante a 40% de deformação com a carga mantida durante os tempos de 1, 3, 6, 12 e 24h sob as condições ambientais de 28°C e umidade relativa de 40-50%. Depois de cada período sob compressão constante, as amostras foram retiradas do equipamento para recuperação livre de sua forma, e a medição da recuperação foi executada em dois momentos distintos, 30 minutos e 12h após retirada a aplicação da carga compressiva. Uma pequena pré-carga foi aplicada a cada amostra para assegurar que as mesmas tocaram as placas de compressão. O desempenho da recuperação da forma (RF) foi calculado utilizando a equação 1:

$$RF(\%) = \frac{E_{to} - E_{tf}}{E_{to}} \times 100 \quad (1)$$

Onde RF(%)= recuperação expressa em percentagem da espessura original, E_{to} = a espessura original da amostra de ensaio, e E_{tf} = a espessura final da amostra.

4.5 Medida da capacidade de absorção de fluidos

Para a determinação do grau de absorção de fluidos (G_a), as espumas foram pesadas antes de serem imersas em 20mL de soluções tampão com três valores de pH diferentes (4, 7 e 9) a 37°C. Após imersão por períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos, as amostras foram cuidadosamente retiradas do meio, e depois de se retirar levemente o excesso de água na superfície com papel de filtro, foram devidamente pesadas para a determinação do peso úmido (BERGER et al., 2004). Cada experimento de absorção das soluções tampão foi realizado em triplicata e o valor médio foi tomado para validar os resultados. O grau de absorção (G_a) foi calculado a partir da variação da massa inicial (M_o) e da massa final (M_f), como demonstra a equação 2:

$$G_a = \frac{M_f - M_o}{M_o} \times 100 \quad (2)$$

4.6 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)

A medida da transmissão do vapor d'água (TVA) das matrizes 3D produzidas foi conduzida de acordo com o método "B" da ASTM E96/10, em triplicata. As amostras

de 0,6mm de espessura (secas e úmidas) foram afixadas em cúpulas de permeabilidade adaptadas, onde parte das cúpulas é destinada a deposição de água e a outra parte contém o orifício destinado a permitir a permeação do vapor pelo *scaffold*. A cada cúpula adicionou-se 10mL de solução simulada de exsudato de feridas (SEF - NaCl 142mM + CaCl₂ Mm) e posteriormente foram fixados os *scaffolds* com área de 4,9cm² cada. Os conjuntos formados foram pesados e colocados em dessecador contendo sílica gel, desidratada, à temperatura ambiente. Foram realizadas novas pesagens nos intervalos de tempo 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A figura 9 apresenta o esquema do dispositivo utilizado para as análises de Transmissão de Vapor D'água.

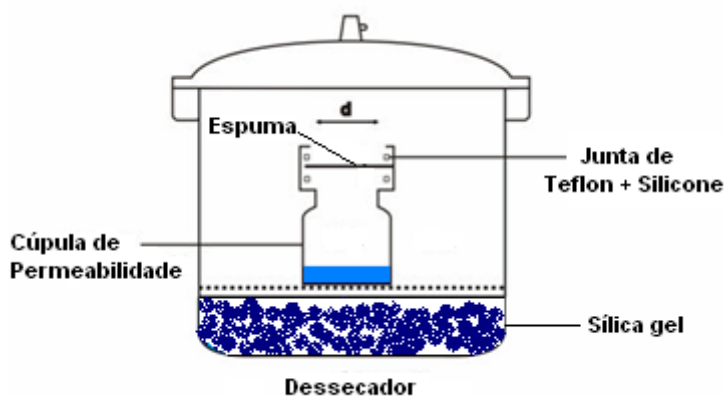


Figura 9: Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da Transmissão do vapor d'água.

Em cada intervalo, a sílica gel utilizada foi substituída por sílica desidratada em estufa. As leituras das massas nos respectivos intervalos de tempo foram registradas e aplicadas à equação 3. Essa equação padroniza a TVA para o período de 24 horas, sendo que 'g' é o peso transmitido, "t" o tempo em horas no qual foi realizada a leitura e "a" representa a área do filme polimérico (CAVALCANTI; CÍCERI, 2002).

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \quad (3)$$

4.7 Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF)

A determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) foi realizada utilizando uma solução simulada de exsudato de feridas (SEF) e conduzida de acordo com o preconizado pela norma britânica BS EM 13726-1 para hidrocolóides e

curativos. As amostras secas de 0,6mm de espessura foram afixadas em cúpulas de permeabilidade adaptadas, onde uma porção das cúpulas é destinada a deposição de água e a outra porção com orifício é destinada a permitir a permeação do fluido pelo *scaffold*. A cada cúpula foram adicionados 20mL de SEF e posteriormente foram fixados os *scaffolds* com área de 4,9cm² cada. Sobre cada *scaffold* foi afixado um pedaço de tecido do tipo tule (100% poliamida) com o mesmo diâmetro da amostra para dar maior resistência mecânica à mesma. Os conjuntos formados foram pesados e colocados na posição invertida em dessecador contendo sílica gel, desidratada, à temperatura de 37°C. A figura 10 apresenta o esquema do dispositivo utilizado para a análise de CMF.

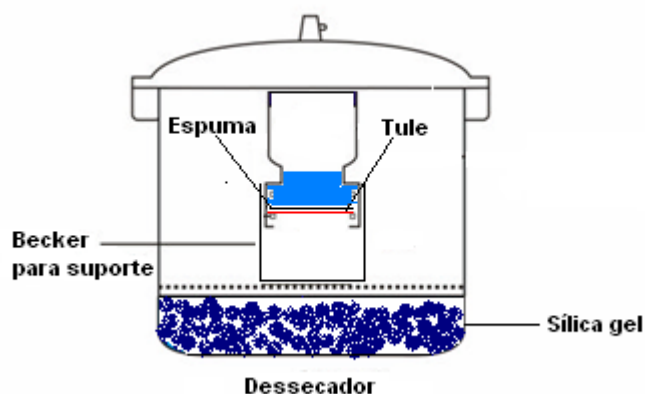


Figura 10: Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da capacidade de movimentação de fluidos.

Foi realizada nova pesagem após 24 horas de exposição dos sistemas. A leitura das massas finais foi aplicada sequencialmente nas equações 4, 5 e 6:

$$TVPU = \frac{x - y}{\text{Tempo de estocagem} \times \text{área}} \quad (4)$$

$$CA = \frac{b - a}{\text{Tempo de estocagem} \times \text{área}} \quad (5)$$

$$CMF = TVPU + CA \quad (6)$$

Onde x é o valor da massa inicial do sistema completo, y é a massa do sistema completo após 24h de exposição, b é a massa inicial do *scaffold*, a é a massa do

scaffold após 24h. A Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) é a soma da Capacidade de Absorção (CA) à Taxa de Permeação de Vapor Úmido (TPVU).

4.8 Análise do comportamento térmico

O estudo do comportamento térmico dos *scaffolds* produzidos foi realizado utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA).

As propriedades térmicas de desidratação e perda de massa das espumas foram estudadas empregando o equipamento DSC-NETZSCH Co., Alemanha. O equipamento foi calibrado utilizando recipiente vazio de platina como referência. Após a calibração, pesaram-se 15mg de cada amostra em recipiente de platina sem tampas. As espumas foram aquecidas partindo de 30°C até a temperatura de 500°C a taxa de 10°C/min. A célula DSC estava sob atmosfera de fluxo de nitrogênio a taxa de 100mL/min para manter a atmosfera inerte.

A análise termogravimétrica foi realizada usando equipamento TGA 209 F3, NETZSCH Co., Alemanha. As amostras (15mg) foram pesadas num cadinho de platina e os experimentos foram conduzidos de 30°C a 500°C com taxa de aquecimento de 10°C/min e fluxo de gás nitrogênio de 100mL/min (SANTOS, 2004; WU et al., 1996).

4.9 Caracterização biológica “*in vitro*” dos *scaffolds*.

Os testes biológicos foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 (Biological evaluation of medical devices: Tests for *in vitro* cytotoxicity).

4.9.1 Escolha do processo de esterilização das amostras

Com o intuito de escolher o melhor método de esterilização das amostras, foram realizados testes preliminares onde a amostra QU25VB foi submetida aos métodos de esterilização por exposição a radiação ultravioleta, exposição à radiação gama e ao vapor saturado de óxido de etileno. Os ensaios revelaram que as amostras esterilizadas por vapor de óxido de etileno apresentaram alta toxicidade, enquanto as amostras esterilizadas por radiação gama e ultra violeta não apresentaram citotoxicidade. Esse resultado pode estar ligado ao fato do óxido de etileno, indicado para esterilização de materiais termossensíveis, ser altamente penetrante e apresentar

alta difusividade, podendo por isso ficar retido dentro de estruturas porosas, como é o caso dos materiais desenvolvidos no presente trabalho (ANDERSEN et al., 1949; ETHRENBURG et al., 1974).

Diante dos resultados dos testes preliminares, todas as amostras submetidas aos ensaios de citotoxicidade foram previamente esterilizadas por exposição à radiação da luz ultra violeta (UV) (254 nm Light Electronics). A irradiação foi realizada em ambos os lados das espumas e a distância entre as amostras e a fonte de irradiação foi de 10cm por 30 minutos em cada lado do material em fluxo estéril.

4.9.2 Escolha do tempo de eluição das amostras

Para se determinar o melhor tempo de eluição para os ensaios de citotoxicidade foi realizado ensaio preliminar, tal como descrito no item 4.10.4, usando para isso apenas os grupos: branco no qual as culturas celulares não são expostas a nenhuma amostra, controle negativo que utiliza polímero Polietileno de Alta Densidade (PEAD) e o controle positivo Látex. A exposição dos controles aos meios foi executada por períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados desse teste demonstraram que o tempo de 72 horas de exposição é o mais adequado tendo em vista a maior expressão citotóxica do látex (controle positivo) comparado aos tempos de 24 e 48 horas de eluição.

4.9.3 Cultura de Células

A linhagem celular de fibroblastos de camundongo (L929) foi gentilmente cedida pela Professora Dr. Miriam Teresa Paz Lopes do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. As células de linhagem de rim de embrião humano (HEK293 T) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As duas linhagens foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo (10%, v/v) de soro fetal de bovino (SFB), sulfato de estreptomicina ($10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicilina G de sódio ($10\text{ unidades}\cdot\text{mL}^{-1}$), e anfotericina-b ($0,025\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), todos reagentes fornecidos pela Gibco BRL (Nova Iorque, EUA), usando uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2 a $37\text{ }^\circ\text{C}$. As células HEK293 T foram utilizadas para os experimentos na passagem 48.

4.9.4 Determinação da citotoxicidade dos scaffolds pelo Teste de Eluição

A citotoxicidade dos *scaffolds* em relação as células L929 foi determinada por contato indireto usando o teste de eluição tal como especificado pela ISO 10993 para biomateriais. As células L929 foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% (v/v) de SFB durante 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com solução de tripsina bovina, ressuspensas em meio soro e plaqueadas em placas de Petri de 35mm nas condições de 1×10^5 células em volume de 1,5mL de suspensão por poço. As placas foram incubadas por 72 horas para atingirem a confluência adequada. Os grupos controle e as amostras foram preparados para eluição paralelamente ao cultivo das células (n=3 por grupo). Para obtenção dos extratos, as amostras e controles foram expostos ao meio DMEM com 10% (v/v) de SFB por 72 horas nas seguintes proporções: amostras dos scaffolds pesando 200mg/2mL de meio soro, controle negativo PEAD 200mg/1,5mL de meio soro, controle positivo Latéx 300mg/3mL de meio soro e branco com incubação de 1,5mL de meio soro. Após as 72 horas o meio de cultura das placas foi aspirado e substituído pelos eluatos das amostras e grupos controle. As placas foram mantidas por mais 48 horas a temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% (v/v) de CO₂. Após as 48 horas de incubação os eluatos foram aspirados das placas e foi efetuada fixação e coloração da monocamada celular. A fixação das células foi realizada utilizando tampão fosfato-salino (PBS) sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1,0mL/placa). Após a fixação celular, o PBS foi aspirado. A coloração histológica das placas foi realizada adicionado 0,5mL/placa de solução do corante cristal violeta a 2% (m/v), preparada em etanol a 20% (v/v). O corante foi aspirado e a monocamada celular foi lavada com 1mL de água Milli-Q. Após remoção da água e secagem natural das placas, essas foram levadas ao microscópio óptico invertido (Leica, modelo DMIL-LED, Alemanha) para obtenção das imagens e atribuição dos valores dos graus de reatividade das amostras tal como padronizado na norma ISO10993-5 (Tabela 7).

Tabela 7: Graus de reatividade para testes de eluição de biomateriais (ISO 10993-5:1999)

Grau	Classificação	Condições da Cultura
0	Nenhuma	Discretos grânulos intracitoplasmáticos; nenhuma lise celular
1	Leve	Não mais que 20% das células são arredondadas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos; lise celular rara
2	Suave	50% das células são arredondadas e desprovidas de grânulos intracitoplasmáticos; lise celular extensa e áreas vazias entre as células
3	Moderada	70% da camada celular contém células arredondadas e/ou que sofreram lise
4	Severa	Completa destruição da camada celular

4.9.5 Análise da viabilidade celular por MTT

A análise da viabilidade celular foi realizada através da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio proporciona um modelo simples e eficaz para detectar células vivas sem o uso de elementos radioativos. A viabilidade de células L929 em contato com os scaffolds foi determinada por meio de dosagem colorimétrica, baseada na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio num produto de coloração azul escuro, a formazana. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com tripsina e semeadas (1×10^4 células/poço) sobre as amostras de formato quadrado ($4.0 \times 4.0\text{mm}^2$) com espessura média de 0.6mm em placas de poliestireno de 96 poços (n=5 por grupo). Como grupos controle foram usados as células em meio DMEM com 10% de SFB, controle positivo Triton X-100 e como controle negativo lascas de eppendorf de polipropileno estéreis (0,1mg/mL). As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% (v/v) de CO₂. Passadas 72 horas do cultivo o meio foi aspirado em cada poço e trocado por 60µL meio-soro. Foram adicionados 50µL do MTT diluído em DMSO (5mg/ml) aos poços. As placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa à 5% (v/v) CO₂ e 37°C. Subsequentemente, 40µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS)/4% de HCl foi colocada em cada poço e reincubou-se durante mais 16h (OLIVEIRA et al., 2013; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).

Completadas 4 horas de incubação, foram retirados 100µl da solução e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância usando um leitor de microplacas de absorbância (Thermo Placa, TP-reader) com um filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos como a viabilidade celular relativa utilizando a equação 7:

$$Viabilidade\ celular = \frac{Absorbância\ das\ amostras\ e\ células}{absorbância\ do\ controle} \times 100\% \quad (7)$$

4.9.6 Análise da viabilidade celular por LIVE/DEAD®

As células L929 foram carenciadas em meio isento de soro durante 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com tripsina e semeadas (1×10^4 células/poço) sobre as amostras quadradas (4.0×4.0 mm) com espessura média de 0.6mm em placas de poliestireno de 96 poços (n=5 por grupo). Após 72h, o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com 100µL de tampão PBS (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA). As culturas celulares foram então tratadas durante 15 minutos com os reagentes do kit viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo) de acordo com as especificações do fabricante. As imagens foram obtidas com um microscópio óptico invertido (Leica, modelo DMIL-LED, Alemanha), e a fluorescência foi determinada utilizando calceína em $\lambda=530 \pm 12.5$ nm e EthD-1 a $\lambda=645 \pm 20$ nm.

4.9.7 Atividade da Fosfatase Alcalina

A análise quantitativa da atividade da ALP foi realizada bioquimicamente usando 5-bromo,4-cloro,3-indolylphosphate-nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) como substrato. Este ensaio baseia-se no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina, onde o BCIP é hidrolisado e o NBT é reduzido formando um produto azul escuro (WERNER *et al.*, 2011). O tamanho de todas as amostras foi de (2,0 x 2,0 mm), com espessura média de 0,6mm (n=5 por grupo). As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a seguir as células foram semeadas (3×10^3 células/poço) sobre as amostras de 100% de quitosana QU, e as espumas compósitas QU25VB e QU50VB. As populações celulares foram antes carenciadas em meio sem soro durante 24h e após este período, o meio foi aspirado e substituído por meio contendo

10% de SFB. Foram utilizados como controle referência células tratadas com DMEM com 10% de SFB, como controle positivo Triton x-100 (1%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e como controle negativo lascas estéreis de *ependorfs* de polipropileno ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) da Eppendorf (Hamburg, Germany). Após 7 dias, $100\mu\text{L}$ de BCIP-NBT (Life Technologies do Brasil Ltda, SP) foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante e adicionados a cada poço e incubados por 2h em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e 5% (v/v) de CO_2 . Em seguida foram microfotografadas em microscópio invertido (Leica DMIL, Alemanha) e colocados $40\mu\text{L}$ de solução de SDS/4% HCL com incubação por 16h em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e 5% (v/v) de CO_2 . Depois, foram retirados $100\mu\text{L}$ de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação da absorbância foi feita em Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual da atividade da fosfatase alcalina de acordo com a equação 8:

$$AFA = \frac{ACA \times 100}{ACC} \quad (8)$$

Onde *AFA* é a Atividade da fosfatase alcalina (%), *ACA* é a absorbância das células em contato com as amostras e *ACC* absorbância das células do controle. Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de atividade da fosfatase alcalina.

4.9.8 Análise Estatística

Para a análise de dados e significância estatística, o software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi empregado usando o método ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.10 Degradação das espumas 3D

4.10.1. Preparo de amostras das espumas para degradação

As amostras foram preparadas na forma de discos, com massa aproximada de 200mg por amostra. A forma adotada buscou garantir uma área uniforme. O volume de solução utilizado seguiu a relação (massa da amostra/Volume de solução) de $0,2\text{g}/\text{mL}$ tal como estabelecido na ASTM F1635 (*Standard Test Method for in vitro Degradation*

Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants). O número de replicatas para cada ensaio foi igual a três.

4.10.2 Preparo da solução simuladora para degradação

Os reagentes utilizados para preparar a solução simuladora do fluido corpóreo (SBF) foram NaCl (7,996g), NaHCO₃ (0,350g), KCl (0,224g), K₂HPO₄.3H₂O (0,228g), MgCl₂.6H₂O (0,305g), CaCl₂ (0,228g) e Na₂SO₄ (0,071 g), (Synth-Brasil), que foram dissolvidos em 1L de água destilada. A solução foi tamponada em pH 7,4 ajustado com Trishidroximetilaminometano e HCl (Merck), na temperatura de 37°C (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

4.10.3 Análise da perda de massa por hidrólise

O ensaio de degradação por hidrólise foi utilizado para estudar a capacidade de *scaffolds* perderem massa quando expostos ao fluido corporal simulado (SBF). Neste estudo, as amostras secas foram pesadas (M_o), imersas na solução de SBF, e em seguida, mantidas a 37°C durante períodos de tempo específicos até completar 84 dias. Em seguida, as amostras foram removidas da solução de SBF, secas em estufa a 50°C e pesadas em balança analítica. A solução de SBF foi substituída de 4 em 4 dias ao longo da degradação das amostras, evitando assim a saturação da solução. Foram avaliadas três amostras para cada período de tempo. A degradação foi monitorada pela diferença entre a massa inicial (M_o) e a massa final (M_f) de cada amostra. A percentagem de peso restante (M_r) foi calculada pela equação 9:

$$M_r = 100 - \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100 \quad (9)$$

4.10.4 Caracterização das espumas 3D após ensaio de degradação

As espumas 3D foram caracterizadas após realização dos ensaios de degradação em SBF para análise da sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura e por microtomografia de raios x. A estrutura e composição química foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia por dispersão de energia de raios x. Além disso, foram verificados os padrões de cristalinidade das amostras através de ensaio de difração de raios x.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização estrutural e morfologia das espumas 3D

5.1.1 Análise estrutural dos *scaffolds* por MEV, EDS e micro-CT

A figura 11 apresenta a imagem obtida por fotografia digital das espumas 3D de QU (100% de quitosana), QU25VB (75% de quitosana e 25% de vidro bioativo) e QU50VB (50% de quitosana e 50% de vidro bioativo). A matriz QU apresenta coloração amarelada uniforme, característica de derivados de quitosana. A matriz QU25VB tem essa coloração já menos acentuada e a amostra QU50VB apresenta coloração quase branca. Todas as amostras têm como característica a flexibilidade e a alta porosidade.



Figura 11: Imagens digitais (sem magnificação) das espumas produzidas: QU (100% quitosana) QU25VB (75% de quitosana e 25% de vidro bioativo) e QU50VB (50% de quitosana e 50% de vidro bioativo).

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para avaliar a estrutura e porosidade superficial dos *scaffolds*. A Figura 12 apresenta as imagens das espumas 3D, onde é possível observar a porosidade com macroporos interconectados nos três materiais. Os macroporos foram intencionalmente obtidos por meio da adição do tensoativo lauril sulfato de sódio associado ao processo de agitação vigorosa, ao qual a solução precursora foi submetida. No entanto, houve diferença no aspecto estrutural das amostras. A espuma com 100% de quitosana tem poros mais arredondados com maior tamanho de poros, que variam entre 115-445 μm em comparação com as amostras de QU25VB e QU50VB com tamanhos de poros variando de 115-270 μm e 160-260 μm respectivamente.

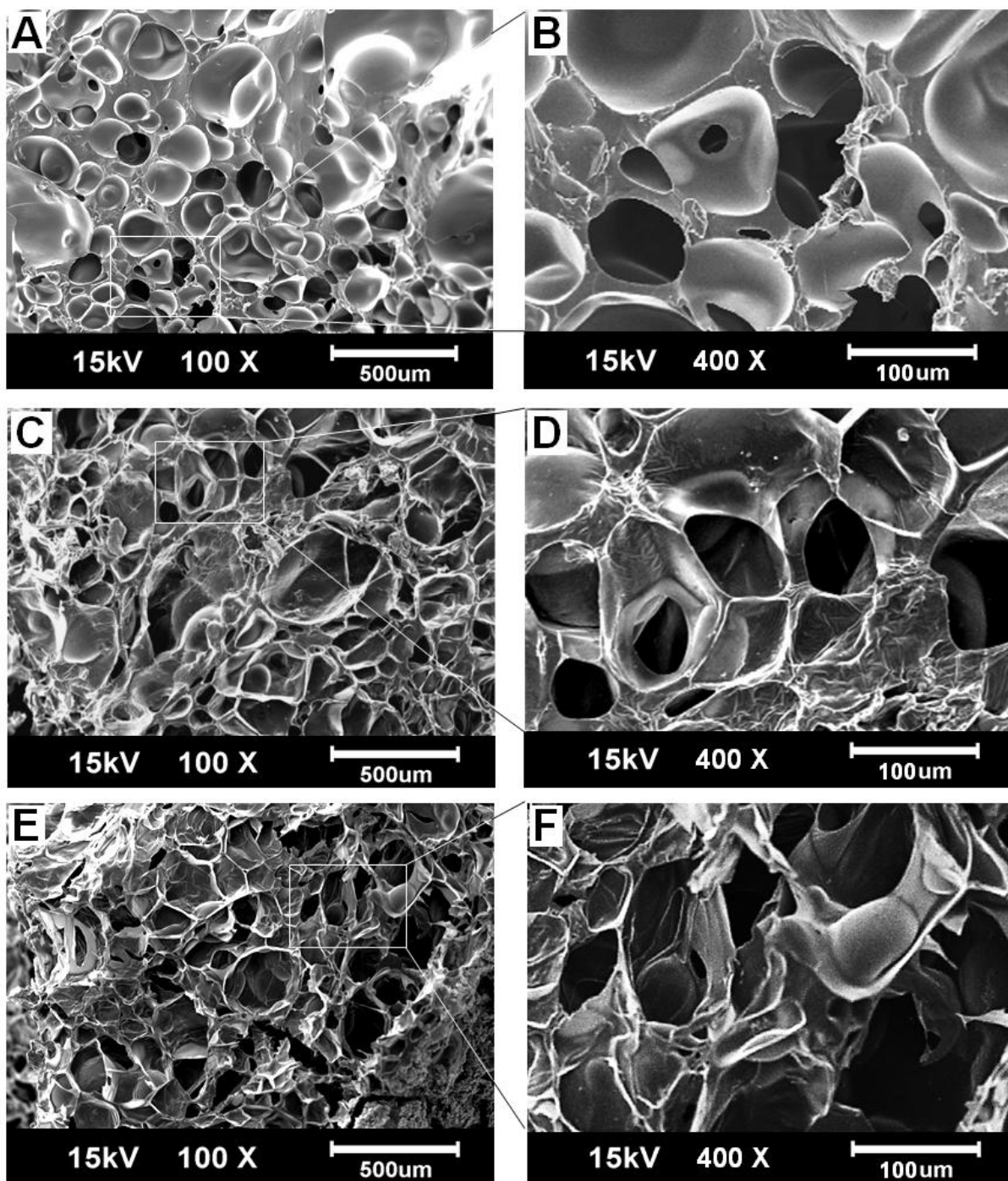


Figura 12: Fotomicrografias obtidas por MEV da espuma QU (A) 100X e (B) 400X, e das espumas compósitas QU25VB (C) 100X (D) 400X e QU50VB (E) 100X (F) 400X.

Na figura 13 é possível observar a imagem de partículas que foram associadas ao vidro bioativo presente na superfície das espumas QU25VB e QU50VB, conforme exemplos indicados pelas setas. Logo abaixo as respectivas análises de EDS da região, indicando a presença de sílica, cálcio e fósforo referentes ao vidro bioativo.

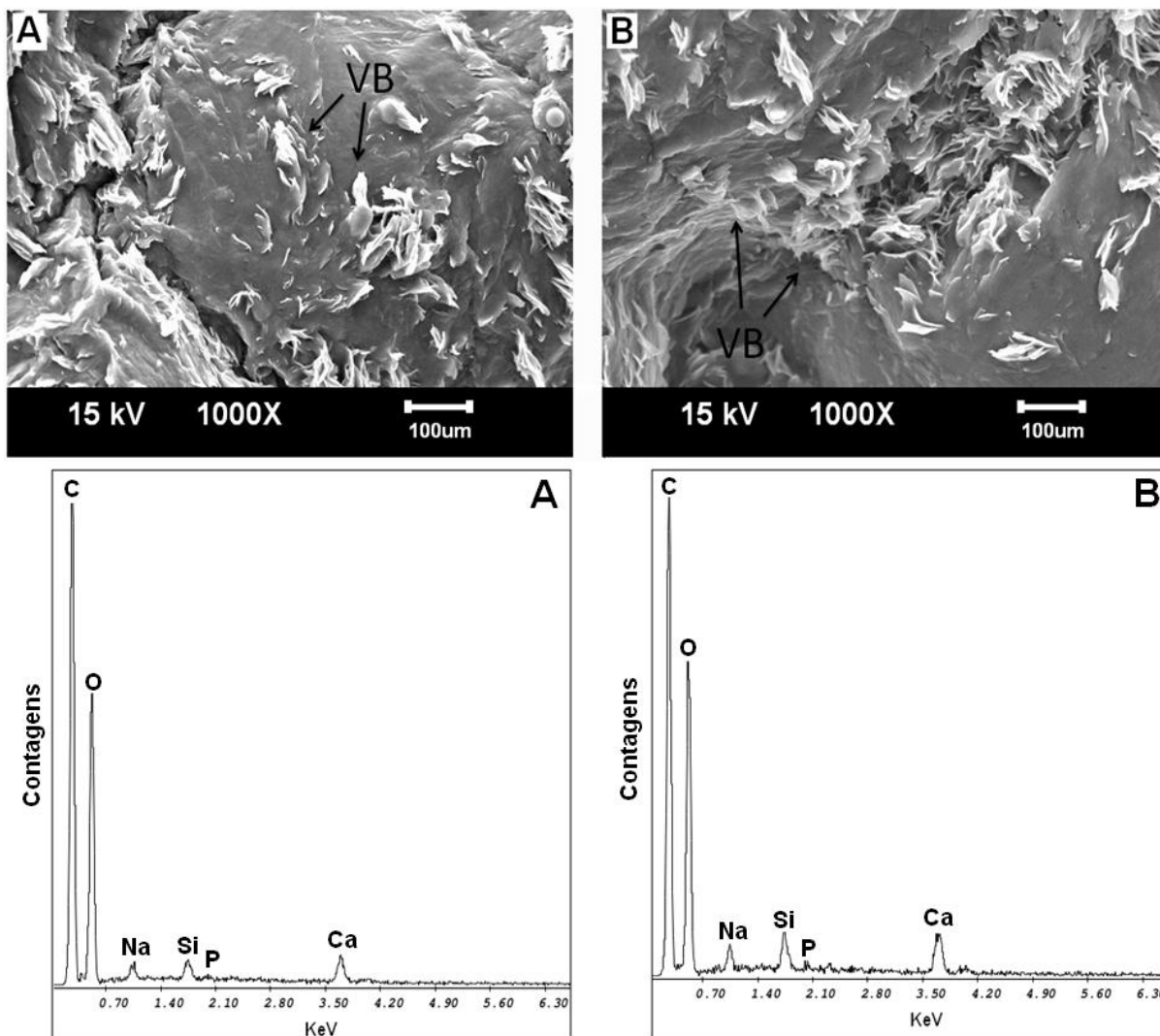


Figura 13: Fotomicrografias obtidas por MEV acompanhadas pelos espectros de EDS das espumas compósitas QU25VB (A) e QU50VB (B) contendo o vidro bioativo (VB) disperso na superfície.

A análise da arquitetura interna 3D das espumas obtidas foi realizada empregando a técnica Micro-CT. A figura 14 apresenta o histograma de distribuição de tamanho de poros e uma reconstrução de modelo 3D para as amostras QU, QU25VB e QU50VB. A porosidade total, o tamanho médio de poros e a porcentagem de poros abertos das amostras estão representados na tabela 8.

Observou-se uma estrutura porosa para todas as amostras, com até 59,7% de porosidade total, bem como uma estrutura de poros altamente interligada, sendo o total de poros abertos acima de 98% para os *scaffolds*. O histograma de distribuição de tamanho de poros mostra que as espumas de QU e QU25VB apresentaram uma distribuição de tamanho de poro mais ampla, com uma pequena fração de poros na ordem de 440-900µm, mas a

maioria dos poros ainda menores que 300 μm . Na espuma QU50VB observa-se uma distribuição de tamanho mais estreita, formando uma estrutura mais homogênea, com poros com tamanhos abaixo de aproximadamente 300 μm .

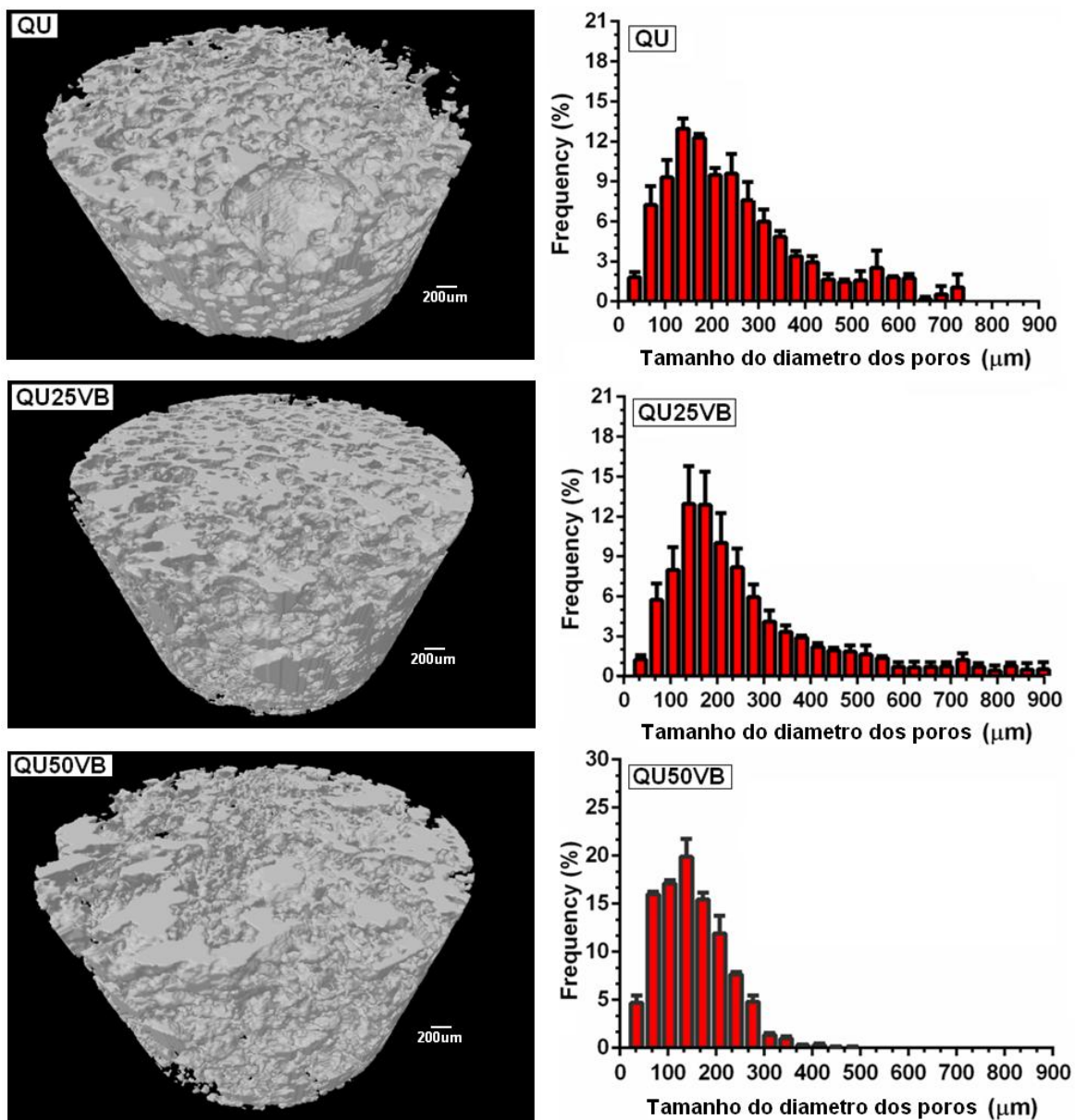


Figura 14: Imagens e histogramas da distribuição do tamanho de poros obtidos por micro-CT das espumas 3D QU, QU25VB e QU50VB.

Tabela 8: Porosidade total, o tamanho médio de poros e a porcentagem de poros abertos das amostras das espumas 3D QU, QU25VB e QU50VB:

Amostras	Porosidade total (%)	Poros abertos (%)	Média do tamanho de poros (μm)
QU	$45,2 \pm 2,8$	$98,8 \pm 1,9$	$249,6 \pm 7,9$
QU25VB	$59,7 \pm 5,7$	$99,3 \pm 1,0$	$269,4 \pm 8,1$
QU50VB	$51,9 \pm 0,7$	$98,5 \pm 1,2$	$149,8 \pm 1,6$

Na figura 15 é possível observar as imagens 3D com a distribuição do vidro bioativo no interior das espumas QU25VB e QU50VB. As imagens foram formadas a partir das diferentes densidades onde a fase orgânica está em cinza escuro e a fase inorgânica em cinza claro.

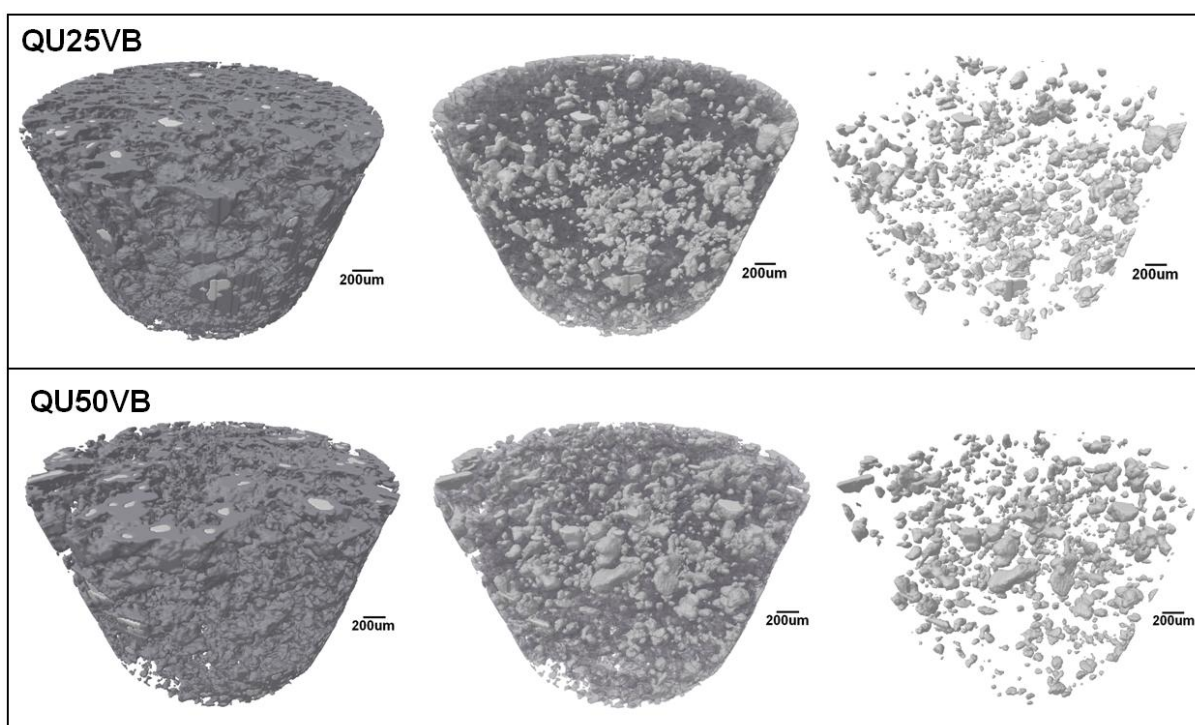


Figura 15: Fotomicrografias 3D obtidas por micro-CT das espumas compósitas QU25VB (A) e QU50VB (B) demonstrando a dispersão do vidro bioativo (VB) disperso no interior das amostras de matriz de quitosana.

É possível observar pelos resultados encontrados pelas técnicas de MEV e micro-CT que a presença da fase inorgânica nas espumas compósitas pode modular não só o tamanho dos poros, mas também o aspecto da estrutura porosa. Essa diferença estrutural é provavelmente resultado das interações intermoleculares entre a quitosana e vidro bioativo, formando uma espuma mais densa, não permitindo o crescimento e liberação de bolhas de

ar geradas durante o processo de mistura dos materiais, o que também explica a maior homogeneidade da estrutura porosa da espuma QU50VB que possui a maior proporção de vidro.

Quando comparados os valores referentes às medidas máximas e mínimas do tamanho de poro obtido por MEV e pelo micro-CT, notamos que há valores discrepantes. Essas diferenças quantitativas podem estar relacionadas à técnica, pois o micro-CT permite calcular o tamanho de poro na estrutura 3D completa e o pelo MEV se observa apenas uma pequena região superficial das amostras.

No desenvolvimento de um *scaffold* para engenharia de tecidos a alta porosidade e uma estrutura de poros interconectada são essenciais para a movimentação e crescimento das células, formação da matriz de adesão e posterior vascularização do novo tecido (HARLEY et al., 2007; MURPHY; O'BRIEN, 2010). Baseado no desenvolvimento de matrizes destinadas a regeneração da pele o diâmetro dos poros dos scaffolds para a acomodação adequada de células como queratinócitos (30-60 μ m) e fibroblastos (10-15 μ m) devem ser superiores ao tamanho das células do tecido local. Estudos anteriores de Murphy et al. (MURPHY; HAUGH; O'BRIEN, 2010) mostraram que pode haver um intervalo crítico de tamanhos de poro entre 85 e 325 μ m. *Scaffolds* com tamanho de poros dentro deste intervalo de valor possuem estrutura apropriada para permitir o movimento livre de células e também a área de superfície necessária para o início da adesão celular (LULEVICH et al., 2010; MURPHY; HAUGH; O'BRIEN, 2010). Considerando estes requisitos, a estrutura de poros obtida nas espumas produzidas é adequada para engenharia de tecidos cutâneos, exibindo uma rede macroporosa homogênea com distribuição de tamanho de poro apropriada.

5.1.2 Caracterização por espectroscopia FTIR e Raman

A Figura 16 apresenta os espectros FTIR do polímero quitosana e das partículas de vidro bioativo (a-b), e os espectros das espumas QU e compósitas (c-e). As principais bandas de vibração presentes nos espectros FTIR são apresentadas na tabela 9. A espectroscopia por FTIR foi utilizada objetivando identificar os principais grupos químicos presentes nas matrizes porosas com e sem adição de VB e assim investigar as forças intermoleculares presentes na espuma QU (100% quitosana) e nas espumas compósitas QU25VB (75% QU e 25% VB) e QU50VB (50% QU e 50% VB), interligando essas informações as propriedades obtidas nos materiais.

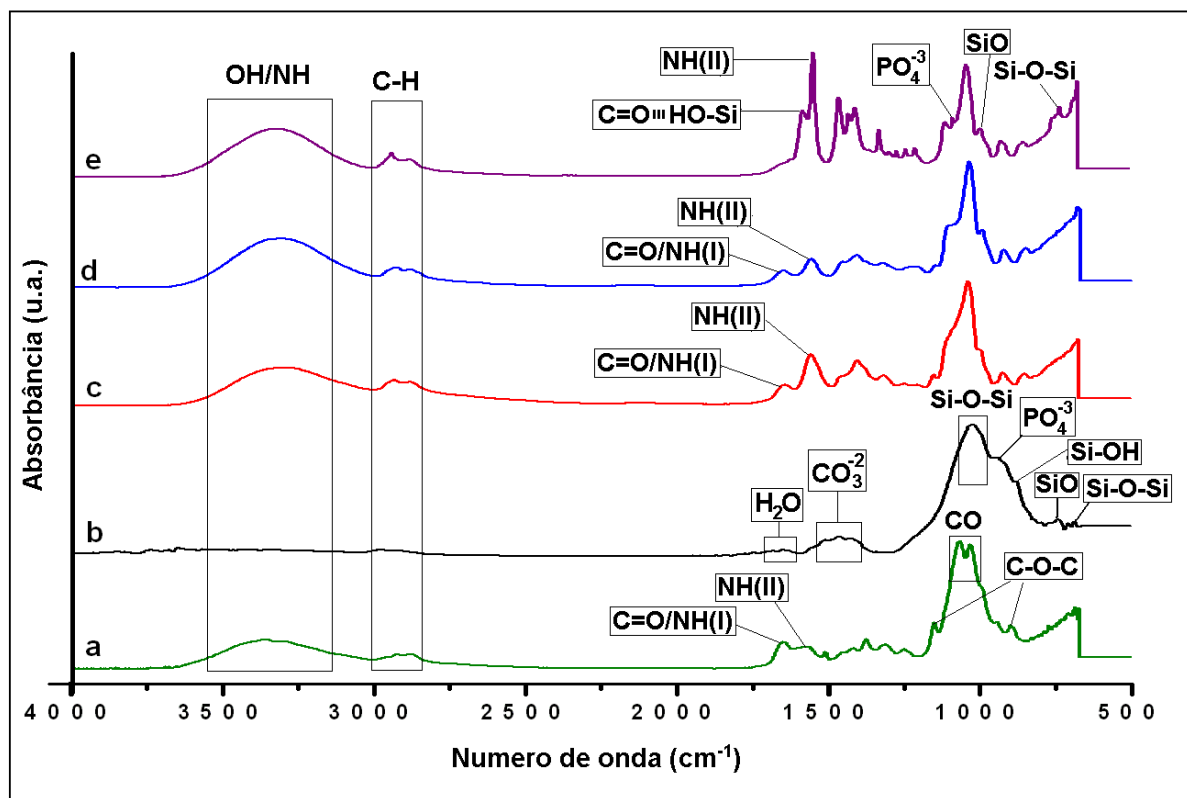


Figura 16: Espectros de FTIR de (a) quitosana pura, (b) vidro bioativo, (c) QU e espumas compósitas (d) QU25VB e (e) QU50VB.

De forma geral, os grupos funcionais característicos de cada matéria-prima foram também observados nos espectros das espumas produzidas. A figura 16a mostra as principais contribuições da quitosana com a presença de bandas características tais como as bandas de amida. A banda de amida I a aproximadamente 1648cm^{-1} é associada principalmente com a deformação axial da carbonila (C=O). A banda de amida II pode ser observada em 1570cm^{-1} e está relacionada com a deformação angular de N-H. A banda de estrutura sacarídica está relacionada com o estiramento de C-O-C e pode ser encontrada em 1151 e 893cm^{-1} . A banda de C-O cíclico pode ser encontrada aproximadamente em 1068 e 1027cm^{-1} .

No espectro do VB (Fig. 16b), os modos de vibração associados ao modo de estiramento Si-O podem ser observados aproximadamente em 873cm^{-1} . As bandas de Si-O-Si relacionadas com o modo de estiramento assimétrico são observadas a aproximadamente 739cm^{-1} e 1020cm^{-1} . A banda de estiramento associada à ligação PO_4^{3-} é encontrada em 940cm^{-1} .

A espuma QU50VB exibe mais claramente as principais vibrações atribuídas a VB como se segue: A banda associada à vibração de estiramento com a ligação PO_4^{3-} em 1085cm^{-1} e a banda a 995cm^{-1} associada ao modo de estiramento Si-O ambas presentes também no

espectro FTIR da espuma QU25VB. A banda de Si-O-Si atribuída ao modo de estiramento assimétrico é observada aproximadamente em 756cm^{-1} (MANSUR; COSTA, 2008; MOREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 9: Bandas características obtidas do espectro no infravermelho associadas com a quitosana e com o vidro bioativo:

Material	ν (cm^{-1})	Atribuição	Referências
QUI	3281 - 3355	Estiramento de OH e N-H2	(a)
QUI	2948	Estiramento assimétrico de C-H	(a)
QUI	2878	Estiramento simétrico de C-H	(a)
QUI	1648	Amida I: Deformação axial de C=O	(a)
QUI	1570	Deformação angular simétrica de NH (II)	(a)
QUI	1421	Deformação angular de CH_2 (tesoura)	(a)
QUI	1319	Deformação axial de C-N de amina primária	(a)
QUI	1265	Deformação axial de C-N de amina secundária	(a)
QUI	1151, 893	Estiramento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)	(a)
QUI	1068, 1027	Estiramento C-O (cíclico)	(a)
VB	3550–3200	Estiramento O–H de água absorvida	(b)
VB	1020	Estiramento assimétrico Si–O–Si no tetraedro SiO_4	(b)
VB	940 dubleto como $\nu = 569$ e $\nu = 658$	Fosfatos (PO^{-2} , PO_3^{-2}), (PO_4^{-3})	(b)
VB	953	Estiramento da ligação Si–OH	(b)
VB	873	Estiramento Si–O	(b)
VB	739	Estiramento simétrico Si–O–Si	(b)

(a) (BARRIONI et al., 2015; COSTA-JÚNIOR; PEREIRA; MANSUR, 2009; MANSUR; COSTA, 2008; MEHDIPOUR; AFSHAR, 2012; PAVIA et al., 2009; WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

(b) (JÚNIOR, 2008; MANSUR; COSTA, 2008; MEHDIPOUR; AFSHAR, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Todos os espectros mostram a banda larga observada entre 3500 e 3100cm^{-1} , que está associada a vibração de alongamento da O-H a partir de ligações C-OH e ligações de hidrogênio intramolecular, especialmente a partir de moléculas de água adsorvidas. Apesar

de superpostas sobre a banda de hidroxila dos *scaffolds*, outras duas bandas a 3355 e 3281 cm^{-1} ocorrem pela vibração simétrica de N-H da amina. As bandas a 2880 e 2930 cm^{-1} são típicas para as ligações C-H de grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente (MANSUR et al., 2009; MEHDIPOUR; AFSHAR, 2012).

Os espectros de todas as espumas mostram as bandas aproximadamente em 1151 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} correspondendo a região de C-O-C da estrutura sacarídica e C-O cíclico, respectivamente, por essa razão todos os espectros foram normalizados a partir da banda de C-O (cíclico) de tal forma a obter a absorção igual a 1 (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Os materiais mostram bandas de deformação em tesoura de CH_2 entre 1457-1403 cm^{-1} e bandas de deformação de N-H (I) e N-H (II) em 1315 e 1271-1207 cm^{-1} , respectivamente (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; MANSUR; COSTA, 2008).

As bandas associadas ao grupo amida II, que são características da quitosana, foram observadas em todas as espumas: com banda no número de onda 1556 cm^{-1} na espuma com 100% de CH e na amostra QU25VB, entretanto essa mesma banda surge deslocada à 1543 cm^{-1} na espuma com QU50VB. Este deslocamento pode ser o resultado da ligação de hidrogênio entre um grupo N-H (II) com um grupo Si-OH do vidro bioativo (PAVIA et al., 2009).

Outro deslocamento é observado na vibração de estiramento da banda de C=O do grupo amida (I) da quitosana e do grupo carboxilato proveniente do ácido adípico, resultando numa sobreposição das bandas. As matrizes QU e QU25VB tem as bandas de carbonila localizadas respectivamente em 1638 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . No entanto, na espuma QU50VB a banda de carbonila está localizada a 1577 cm^{-1} . Este deslocamento pode ser explicado pela ligação de hidrogênio entre um grupo C=O e o grupo silanol (Si-OH) que encontra-se em maior concentração nesse material, diminuindo a constante de estiramento e conseqüentemente reduzindo a frequência da banda de C=O (LAMPMAN et al., 2009). A Figura 17 apresenta os espectros FTIR das espumas entre 2000-500 cm^{-1} onde é possível visualizar de forma ampliada os principais deslocamentos de onda.

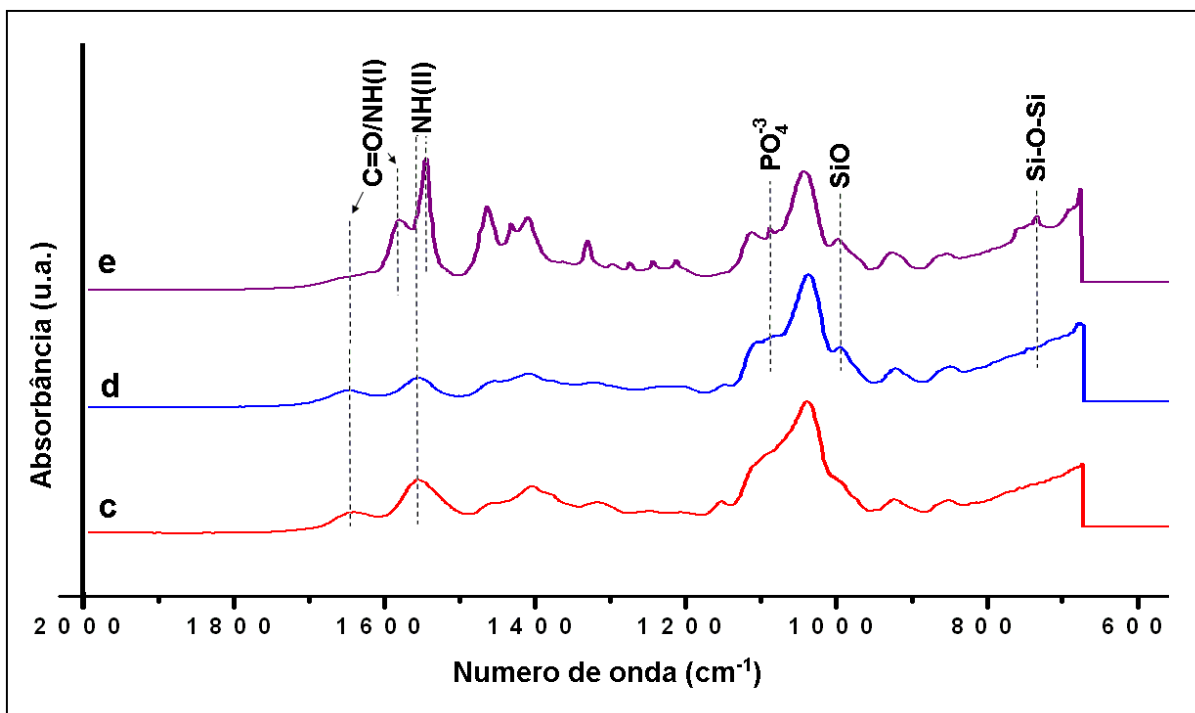


Figura 17: Espectros de FTIR comparativo ampliado das espumas QU (c), QU25VB (d) e QU50VB (e) e principais deslocamentos de onda observados.

A análise Raman foi realizada como método complementar ao FTIR a fim de se determinar as estruturas químicas e as interações existentes nas amostras. Os resultados obtidos por espectroscopia Raman das amostras do polímero quitosana, vidro bioativo e das espumas QU, QU25VB e QU50VB estão representados na figura 18. Na tabela 10, são apresentados os modos de vibração de dobramentos e estiramentos simétrico e assimétrico observados nas bandas Raman do polímero quitosana e do vidro bioativo.

Nos espectros das espumas são mostradas as bandas em aproximadamente 1108cm^{-1} e 1042cm^{-1} correspondendo a região de C-O-C da estrutura sacarídica e C-O cíclico, respectivamente, por essa razão e da mesma forma que no FTIR, todos os espectros foram normalizados a partir da banda de C-O (cíclico) de tal forma a obter a absorção igual a 1 (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Todas as espumas apresentaram bandas características de deformação em tesoura de CH_2 em aproximadamente $1461\text{-}1400\text{cm}^{-1}$. As bandas de deformação de N-H (I) em 1368 e N-H (II) em aproximadamente 1298cm^{-1} foram observadas mesmo que em baixa intensidade em todas as matrizes (BEZERRA, 2011; JÚNIOR, 2008).

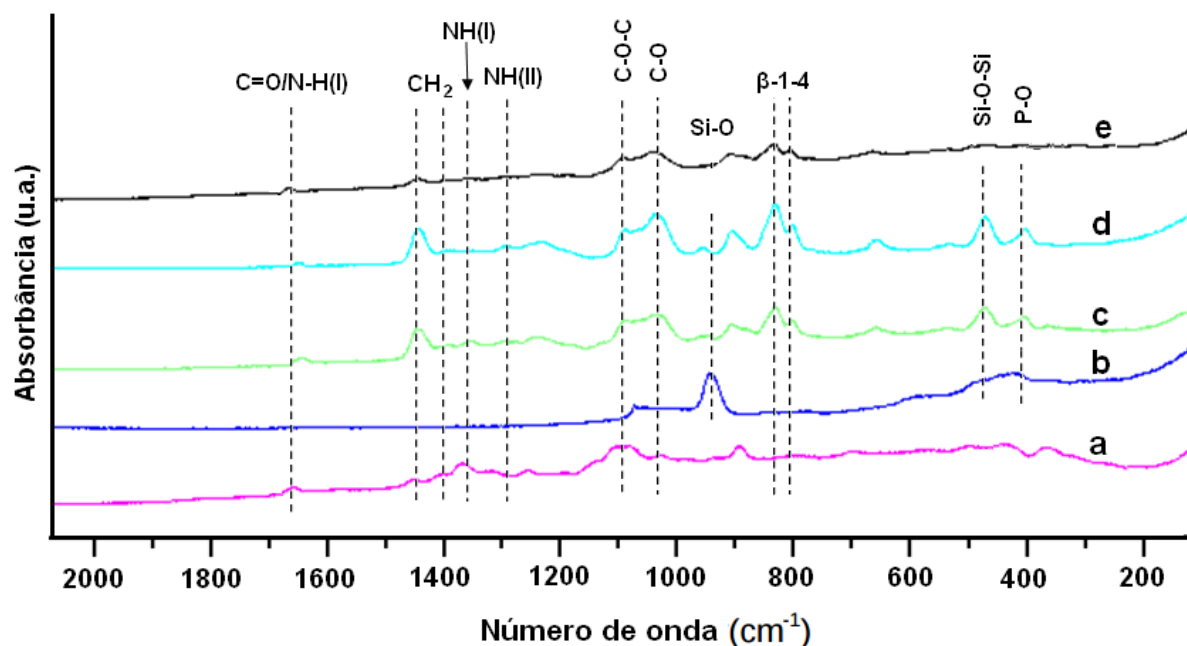


Figura 18: Espectros Raman obtidos de (a) quitosana pura, (b) vidro bioativo, das espumas compósitas QU25VB (d), QU50VB (c) e a espuma de 100% de quitosana (e).

Segundo observado no espectro, os estiramentos localizados em $847\text{-}815\text{cm}^{-1}$ em todas as amostras são atribuídos a ligação de C-O-C da estrutura sacarídea - β -1-4. É possível observar para as espumas compósitas as vibrações atribuídas ao estiramento da ligação Si-O em aproximadamente 963cm^{-1} e os estiramentos presentes em 484cm^{-1} e 415cm^{-1} atribuídas a ligações de Si-O-Si e P-O respectivamente, estas vibrações são atribuídas ao VB (MOREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

O estiramento de C=O de amida II foi observado em todas as amostras, porém com banda no número de onda 1665cm^{-1} para a espuma QU, 1632cm^{-1} para QU25VB e 1628cm^{-1} para a espuma compósita QU50VB. O deslocamento observado na espectroscopia Raman é similar ao observado no FTIR, ou seja, comprova-se que há um deslocamento ocasionado pela presença do vidro bioativo na estrutura da quitosana, provavelmente relacionado à ligação de hidrogênio entre os grupos polares N-H (II) proveniente da quitosana e os grupos Si-OH do vidro bioativo que provoca a diminuição da constante de estiramento e reduz a frequência da banda de C=O da amida I (PAVIA et al., 2009).

Tabela 10: Bandas características obtidas do espectro Raman associadas com a quitosana e com o vidro bioativo.

Material	ν (cm ⁻¹)	Atribuição	Referências
QUI	1662	Amida I: Deformação axial de C=O	(a)
QUI	1455, 1405	Deformação angular de CH ₂ (tesoura)	(a)
QUI	1335	Deformação axial de C-N de amina primária	(a)
QUI	1255	Deformação axial de C-N de amina secundária	(a)
QUI	1107	Estiramento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)	(a)
QUI	1078	Estiramento C-O (cíclico)	(a)
VB	1086	Estiramento assimétrico Si-O-Si no tetraedro SiO ₄	(b)
VB	956	Estiramento Si-O	(b)
VB	479	Estiramento simétrico Si-O-Si	(b)
VB	424	Estiramento simétrico P-O	(b)

(a) (BEZERRA, 2011; JÚNIOR, 2008) (b) (MAQUET et al., 2003; REHMAN et al., 1994)

A partir dos ensaios de FTIR e Raman é possível afirmar que há interações eletrostáticas entre quitosana e vidro bioativo. No entanto, podemos supor que o mecanismo de reticulação nos compósitos tenha ocorrido devido à formação de ligação eletrostática a partir da interação por ligação de hidrogênio entre os grupos carbonila e amina da quitosana com os grupos silanol do vidro bioativo.

5.1.3 Análise por difração de raios-X (DRX)

A Figura 19 mostra os padrões de DRX das amostras de quitosana, vidro bioativo, QU, QU25VB e QU50VB. O vidro bioativo apresenta estado totalmente amorfo pois não foram observadas linhas de difração e sim uma banda larga entre 20 e 40° (2 θ). O polímero quitosana tem duas linhas características, uma de maior intensidade em aproximadamente 19,9° e uma de baixa intensidade em 10° (2 θ) (OGAWA; INUKAI, 1987; OGAWA, 1991; OKUYAMA et al., 2000). No entanto, estes picos não foram encontrados no espectro de espuma QU e sim uma banda larga entre 12-20°. Essa mudança está provavelmente associada a existência de cristais hidratados presentes no polímero, que durante o processo de formação da espuma essa organização das cadeias do polímero acaba sendo interrompida (OKUYAMA et al., 2000).

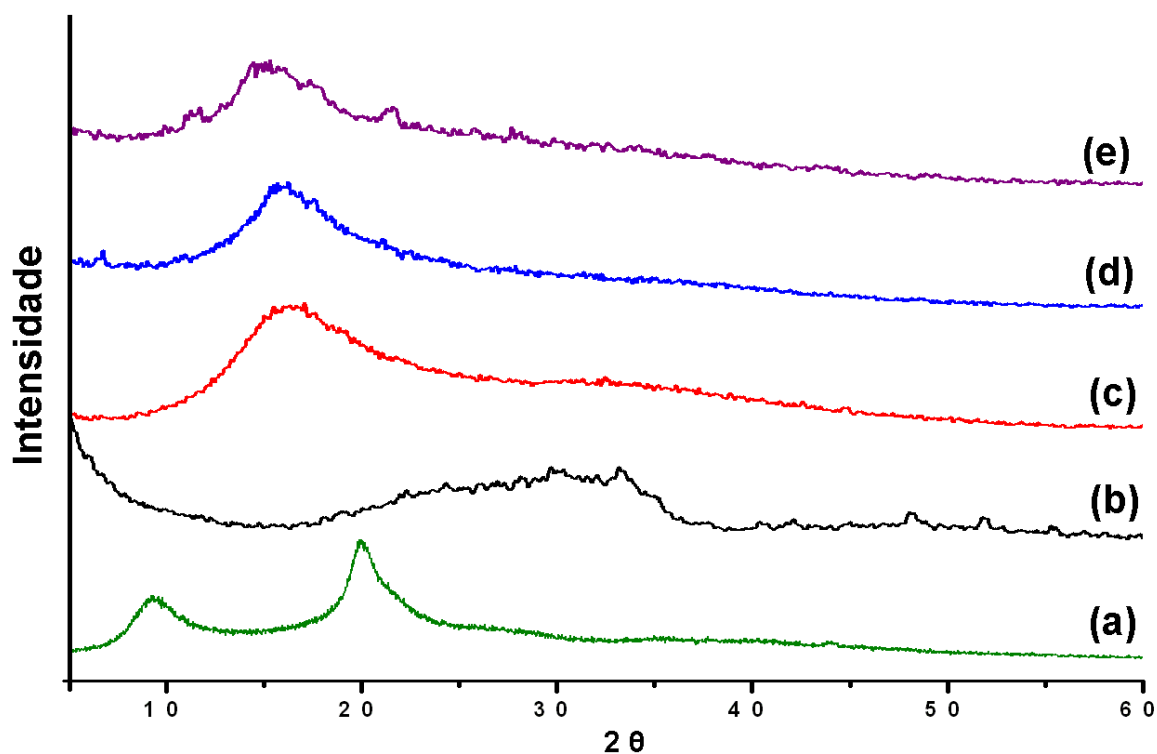


Figura 19: Padrões de DRX dos materiais (a) quitosana, (b) vidro bioativo SiO₂-CaO-P₂O₅, (c) espuma QU, (d) espuma compósita QU25VB e (e) QU50VB.

O padrão DRX de QU50VB apresenta picos de cristalinidade a 11,4° e 21,6°, que estão possivelmente relacionados com o deslocamento de picos cristalinos de quitosana puro. O material QU25VB esboça de forma leve formações nas mesmas regiões 2θ. Os picos de cristalinidade apresentados no compósito são provavelmente resultado do efeito de nucleação exercido pelo vidro bioativo na matriz polimérica de quitosana. Pei et al. (2010) relataram que, com poli (l-lático), ocorreu aumento na cristalinidade do material após a adição de nanocristais de celulose como agentes de nucleação de base biológica e observou-se também um aumento nas propriedades mecânicas dos materiais.

A adição de silicatos como agentes de nucleação já é amplamente conhecida e a presença de grupos -OH e -CONH₂ foi relatada como capaz de induzir a nucleação e aumentar a cristalinidade de um material polimérico (BASKAR; BALU; KUMAR, 2011). Esses resultados sugerem que a ocorrência do aumento da cristalinidade nos materiais compósitos é relacionado com a quantidade de VB adicionado.

5.2 Caracterização das propriedades mecânicas

5.2.1 Ensaio de compressão

A Figura 20 mostra a curva tensão de compressão versus deformação para a espuma QU e para as espumas compósitas QU25VB e QU50VB. Observou-se uma variação considerável na resposta mecânica entre as amostras. As micropartículas de vidro bioativo são agentes de reforço na espuma compósita. Estas partículas restringem o movimento da fase da matriz polimérica de quitosana, que por sua vez transfere uma fração da carga de esforço compressivo para as micropartículas de vidro. Contudo, o comportamento mecânico melhorado das espumas compósitas também depende de uma forte ligação intermolecular na interface matriz-partícula. As espumas compósitas apresentam um maior módulo de elasticidade e resistência à compressão, provavelmente resultante da interação entre os grupos funcionais da quitosana e do VB, interações essas discutidas na análise de FTIR. Os resultados estão apresentados resumidamente na tabela 11.

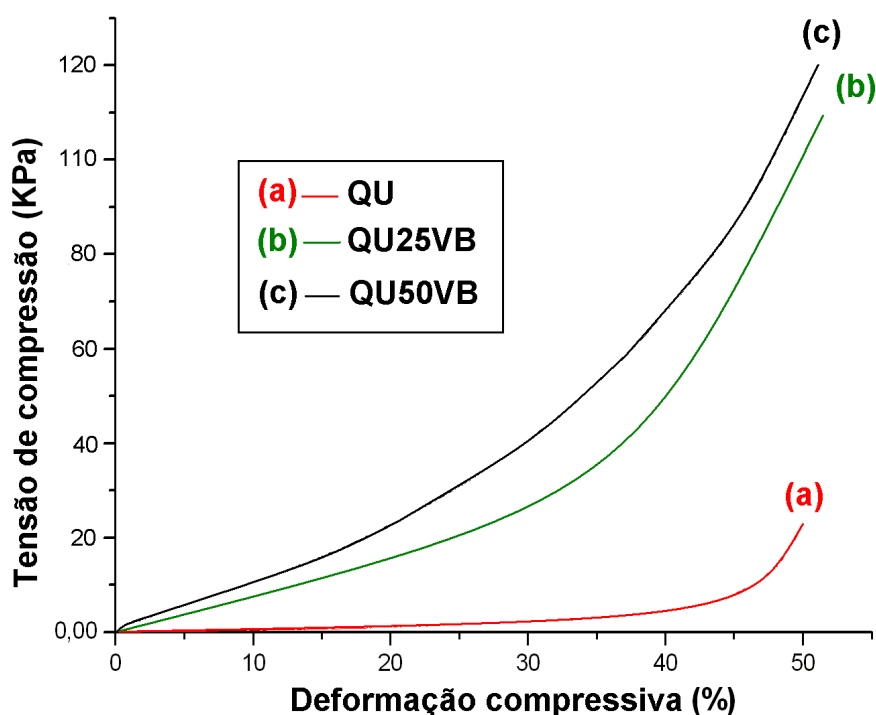


Figura 20: Curva tensão x deformação das espumas QU (a), QU25VB (b) e QU50VB (c).

Tabela 11: Módulo de Young (E^*), resistência máxima à compressão ($\sigma_{50\%}$) e tenacidade (T^*) das matrizes 3D.

Amostras	E^* (KPa)	$\sigma_{50\%}$ (KPa)	T^* (KPa)	ρ (g/cm ³)
QU	260,00 ± 0,14	34,00 ± 0,13	153,00 ± 0,2	0,46 ± 0,04
QU25VB	685,00 ± 0,07	114,00 ± 0,02	1648,00 ± 0,04	0,39 ± 0,06
QU50VB	750,00 ± 0,08	120,00 ± 0,09	1936,00 ± 0,07	0,33 ± 0,03

O aumento da densidade é um dos fatores que também aumenta a resistência mecânica das espumas poliméricas (HARLEY et al., 2007; ZHANG et al., 2015). No entanto, estudos como o de Harley et al. (HARLEY et al., 2007) mostraram que a heterogeneidade na distribuição do tamanho de poros em espumas pode reverter essa tendência, uma vez que amostras com maiores distribuições de tamanho de poro podem ter maiores densidades, mas menor resistência mecânica em comparação com o mesmo material polimérico com maior uniformidade na distribuição de tamanho de poro. Portanto, a não-uniformidade estrutural dentro da microestrutura das amostras têm um efeito significativo sobre as propriedades mecânicas da amostra. Esse efeito também explica parcialmente a baixa resistência mecânica da espuma com 100% de quitosana que tinha uma densidade maior em comparação com as espumas compósitas, que por sua vez possuem maior uniformidade na distribuição do tamanho dos poros, tal como observado na análise por micro-CT.

Além disso, a cristalinidade é outro fator que pode afetar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. El-Hadi et al. (2002) mostraram em seus estudos que uma maior cristalinidade leva à diminuição da mobilidade das moléculas devido a uma maior organização das cadeias de polímero. Por outro lado ocorre um aumento na resistência ao escoamento e no módulo de elasticidade (EL-HADI et al., 2002b; ZHANG et al., 2015). A maior cristalinidade das espumas compósitas em comparação com a espuma QU é o outro parâmetro que contribui para um aumento no módulo de elasticidade e na resistência à compressão das amostras QU25VB e QU50VB.

5.2.2 Teste de compressão por deflexão constante das matrizes 3D

A Figura 21 mostra a recuperação da forma de espumas secas obtidas após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de aplicação de carga de compressão constante e com as medidas de retorno de forma realizadas após 30 minutos e a figura 22 demonstra a recuperação após 12h de liberação da carga de compressão e recuperação livre das amostras. O tempo 0h corresponde à dimensão original das amostras. Para todos os tempos testados, as espumas compósitas QU25VB e QU50VB mostraram uma recuperação de forma mais elevada em

comparação com a espuma QU, a espuma com 50% de vidro bioativo apresentando a maior capacidade de recuperação de forma.

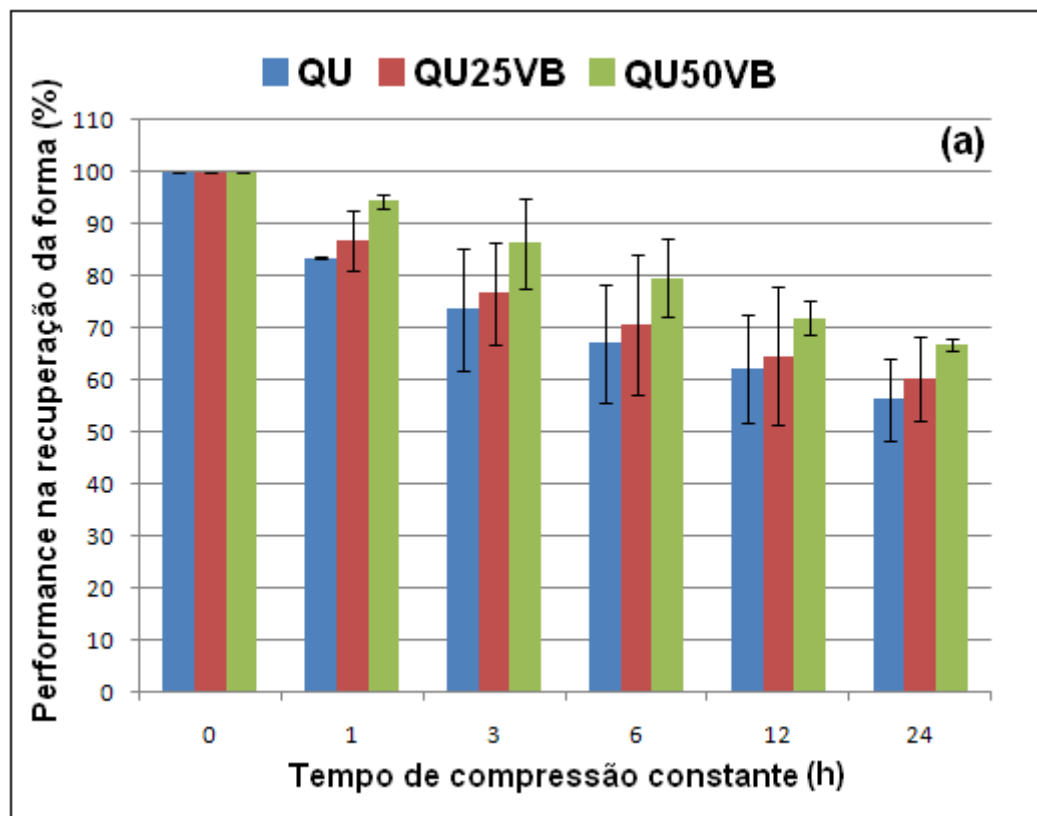


Figura 21: Comportamento de recuperação de forma da espuma QU e das espumas compósitas QU25VB e QU50VB após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de compressão por deflexão constante e medidas de recuperação de forma realizadas após 30 minutos depois da liberação da carga de carga de compressão e livre recuperação de amostras. O tempo 0 corresponde à dimensão original das amostras.

Considerando o comportamento dentro de 30 minutos após a liberação da carga de compressão, a recuperação de forma de ambos os materiais é superior a 80% em relação a dimensão original para 1h de compressão constante. Para os tempos de 3 e 6h de compressão constante, a espuma QU50VB respondeu com recuperação de forma de aproximadamente 80% e apresentou uma diminuição nos tempos de 12 e 24h de compressão constante. A espuma QU25VB exibiu diminuição da recuperação se comparada à espuma de quitosana pura e a espuma QU50VB que contém o dobro da quantidade de vidro em sua estrutura.

Todas as espumas apresentaram redução da recuperação de forma com o aumento do tempo de aplicação da tensão de compressão e apresentaram recuperação de aproximadamente 56% e 60% para as espumas QU25VB e QU50VB respectivamente, após aplicação de carga por 24h.

Os resultados obtidos 12h após liberação da carga de compressão e livre recuperação de amostras, mostram que a recuperação aumentou e foi superior a 80% para todas as amostras testadas até o tempo de 6h sob compressão constante, mantendo este valor de recuperação para a espuma compósita QU50VB mesmo para 12h de compressão constante. A explicação para este comportamento é provavelmente devido às cadeias móveis nas regiões amorfas, sustentadas pelos domínios cristalinos criados pela presença de vidro bioativo. Os resultados mostram uma diminuição na recuperação da forma das amostras submetidas a 24h de compressão constante, que exibiram deformação permanente de 40% para a espuma QU, 36% e 23% para as espumas compósitas QU25VB e QU50VB, respectivamente.

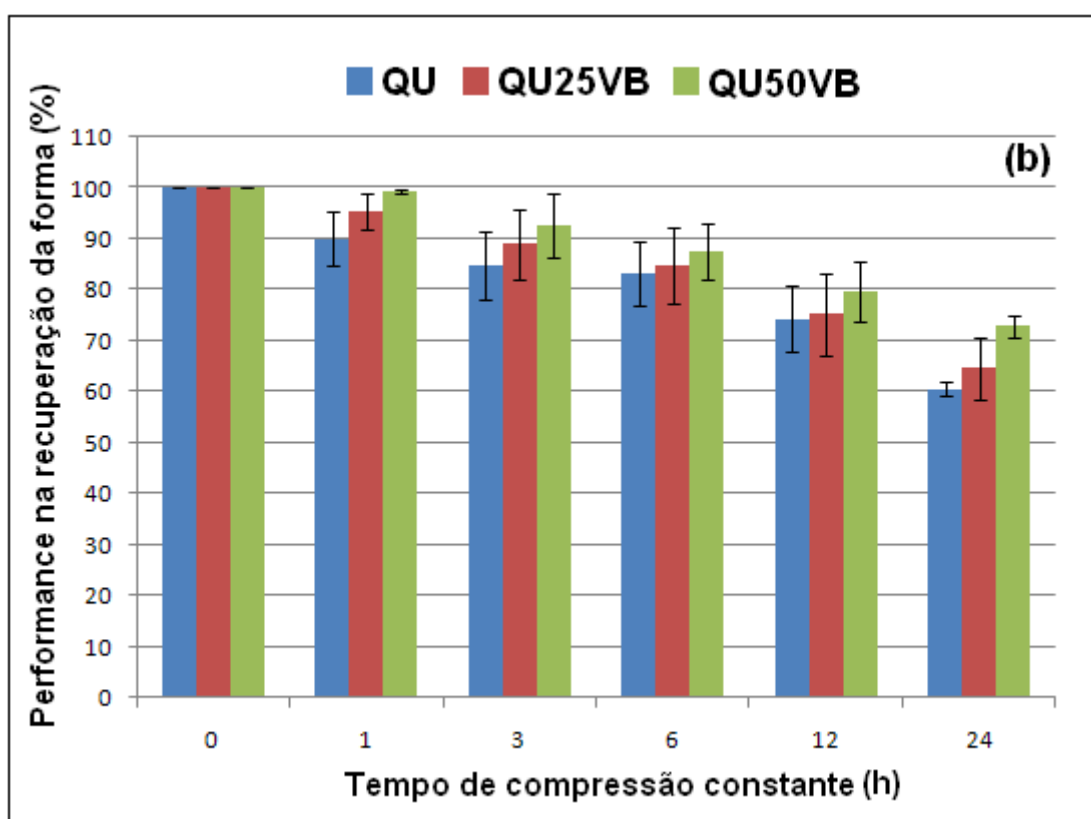


Figura 22: Comportamento de recuperação de forma da espuma QU e das espumas compósitas QU25VB e QU50VB após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de compressão por deflexão constante e medidas de recuperação de forma realizadas após 12 horas depois da liberação

da carga de compressão e livre recuperação de amostras. O tempo 0 corresponde à dimensão original das amostras.

Para todos os testes realizados, as espumas compósitas com maior teor de vidro bioativo apresentaram maior recuperação de forma em todos os tempos de aplicação de carga. Os estudos de Correia et al. (CORREIA; LEITE; MANO, 2015) mostram que os testes de compressão em matrizes compósitas de quitosana com nanopartículas de vidro bioativo apresentam valores para módulo de elasticidade e recuperação de forma maior do que os de *matrizes* de quitosana pura. Este comportamento é típico de materiais que têm reticulação em sua estrutura (MANSUR; COSTA, 2008).

O processo de reticulação ocorre por reações químicas ou por ligações secundárias entre os sítios reativos da molécula de polímero e o agente de reticulação. A reticulação química é formada por ligações covalentes irreversíveis. Por outro lado, a reticulação física é formada por interações secundárias reversíveis, como ligações de hidrogênio e interações íon-íon (KONTOU et al., 1990; MOREIRA et al., 2016).

O aumento no módulo de elasticidade e na recuperação da forma observada para as espumas compósitas em comparação com a espuma QU é notável. Isto indica a presença de forte ligação, sugerindo uma reticulação química. No entanto, os dados de FTIR não mostram evidência da formação de ligações primárias entre o polímero e o VB. Portanto, este efeito provavelmente resulta de interações intermoleculares entre os grupos C=O de amina da quitosana e os grupos silanol do vidro bioativo. Isto é confirmado por um deslocamento da banda de carbonila, previamente observada na análise de FTIR. Neste caso, os dados sugerem que as interações agem como uma reticulação física na espumas compósitas (KONTOU et al., 1990).

Quando se trata de biomateriais destinados a lesões cutâneas, a flexibilidade do material torna-se um fator de grande importância tendo em vista as características do próprio tecido e a necessidade de boa adaptação do *scaffold* ao local de ação. Portanto, ao que se destinam os materiais produzidos nesse estudo, eles possuem características mecânicas que possibilitam seu direcionamento a aplicações do tratamento do tecido cutâneo.

5.3 Medida da capacidade de absorção de fluidos

Considerando os materiais destinados ao tratamento de lesões cutâneas, as experiências de absorção de água são importantes para avaliar a capacidade de uma matriz em absorver água e em que ponto esta absorção atingirá um estado de saturação máxima. Contudo, a absorção de líquidos de forma excessiva pelo material pode ser prejudicial, especialmente em termos anatômicos e de desidratação quando implantada em tecido com injúrias cutâneas, podem apresentar variações tanto na eliminação de água quanto no pH local.

Fatores como a disponibilidade de grupos hidrofílicos, densidade de reticulação, a temperatura, variações do pH do meio podem alterar o grau de absorção de um material. O processo de adsorção ocorre em três passos principais: 1) difusão das moléculas do solvente para a rede polimérica; 2) Relaxação das cadeias dos polímeros devido ao processo de hidratação; 3) Expansão da rede e o inchamento da matriz 3D (SADAHIRA, 2007). Ressalta-se que no caso de matrizes porosas parte da água absorvida é para preenchimento dos poros existentes, e depende, portanto, da porosidade do material.

A Figura 23 mostra o comportamento de absorção de água da espuma QU e das espumas compósitas QU25VB e QU50VB em 3 diferentes pH's. Todos os *scaffolds* apresentaram uma absorção em massa inicialmente rápida para todos os valores de pH testados. Após a primeira hora de testes ocorre a estabilização da massa, exceto para as amostras imersas em tampão pH 4, que continuaram a absorver água até as 24h de teste, porém a uma taxa menor após a segunda hora de testes.

Todas as amostras apresentaram maior absorção no pH 4 em comparação aos pH's 7 e 9. O grau de desacetilação de quitosana mostra uma grande interferência na captação de água e nos fatores de solubilidade. A quitosana com um grau elevado de desacetilação tem grupos amino mais disponíveis aumentando a interação do polímero com a água em pH mais baixo, e da mesma forma ocorre a captação de água do polímero. Esse comportamento, que ocorre especialmente no intervalo de pH entre 3-6 é atribuído aos grupos amino protonados das cadeias de polímero. Portanto, quando os materiais de quitosana são expostos a soluções com pH baixo, o resultado é repulsão entre as cadeias e maior solvatação (CHEN, 1996; RINAUDO; PAVLOV; DESBRIÈRES, 1999; RINAUDO, 2006).

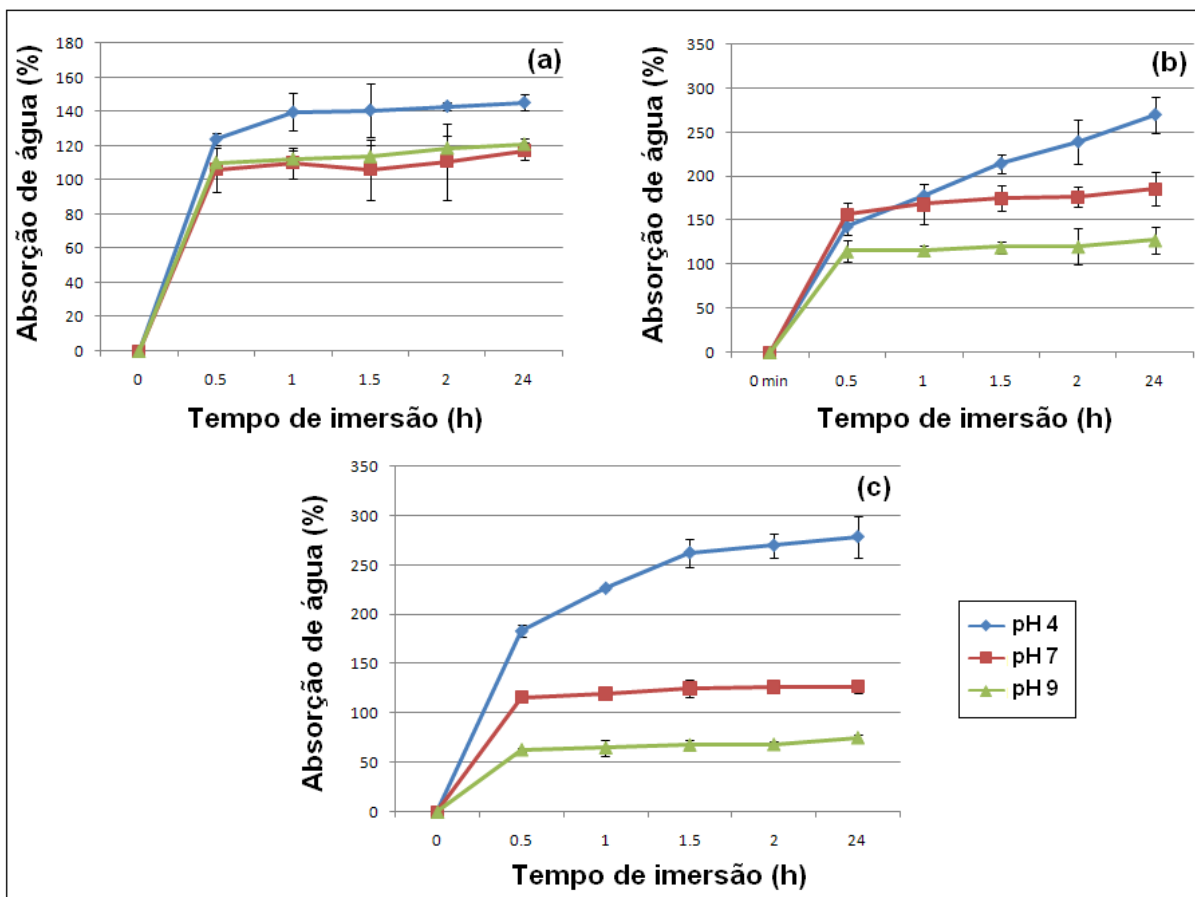


Figura 23: Avaliação do grau de absorção de água das espumas QU (a) e das espumas compósitas QU25VB (b) e QU50VB (c) nos pH's 4, 7 e 9.

Além disso, o vidro bioativo tem muitos grupos silanol (Si-OH) expostos, que aumentam o grau de interação das amostras compósitas com água. Em seus estudos, Maquet et al. (2003) observaram o mesmo comportamento: a adição de VB a um polímero aumentou a absorção de água. Por esta razão, as espumas compósitas apresentaram um maior grau de absorção em pH 4 devido à exposição de grupos mais hidrofílicos, aumentando assim as ligações de hidrogênio com água em comparação com a espuma com 100% de quitosana.

A diferença no grau de absorção de água nos pH 7 e pH 9 entre as amostras é provavelmente explicada pela existência de grupos Si-OH na superfície do vidro que aumentam o caráter básico da amostra, que também foi observado nos estudos de Cerruti et al. (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005) e conseqüentemente reduzindo as interações com água em valores de pH mais elevados. Deve se levar também em consideração que as amostras compósitas apresentam maior volume de poros, que afeta os valores de absorção de água e que também justificaria as maiores absorções para esses materiais em todos os pH's testados.

5.4 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)

A medida da transmissão do vapor d'água (TVA) das matrizes 3D produzidas, ou seja, a medida da quantidade de água que passa através dos *scaffolds* durante um período de tempo auxilia na classificação do material como oclusivo ou permeável ao vapor do fluido.

Os resultados apresentados na tabela 12 mostram que a TVA encontrada para os 3 materiais produzidos foi afetada pela presença do vidro bioativo nas amostras. A análise estatística (ANOVA) realizada sobre o conjunto de valores obtidos apresentou resultados significativos ($p < 0,05$), variando de acordo com a concentração de VB adicionado ao material.

Tabela 12: Valores de média e desvio padrão da perda de massa e taxa de transmissão de vapor d'água dos scaffolds secos.

Amostras	Perda de massa (g/120h)	TVA (g / m ² . 24h)
QU	1,74 ± 0,08	10381,5 ± 6737,8
QU25VB	1,79 ± 0,07	14314,3 ± 9635,5
QU50VB	1,83 ± 0,06	14693,1 ± 9541,4

A espuma de quitosana pura (QU) apresentou a menor taxa de transmissão de vapor d'água, que pode ser observada pela menor perda de massa durante as 120 horas de análise. Ao mesmo tempo, mesmo com intervalo dos valores baixo, ainda é possível observar um maior valor de perda de massa (Figura 24) da espuma QU50VB, seguida da espuma QU25VB. No entanto os valores de transmissão de vapor de água foram altos para todas as espumas, especialmente para as espumas compósitas, que apresentaram uma grande variação na TVA ao longo do tempo, como pode ser observado no gráfico de TVA (Figura 25) onde as primeiras 24 horas representaram o momento de maior transmissão de vapor com queda gradativa nos dias que se seguiram. Esses resultados provavelmente representam os momentos de maior absorção de vapor de água pelos materiais, que além de porosos encontravam-se secos no momento das análises, até a saturação das espumas.

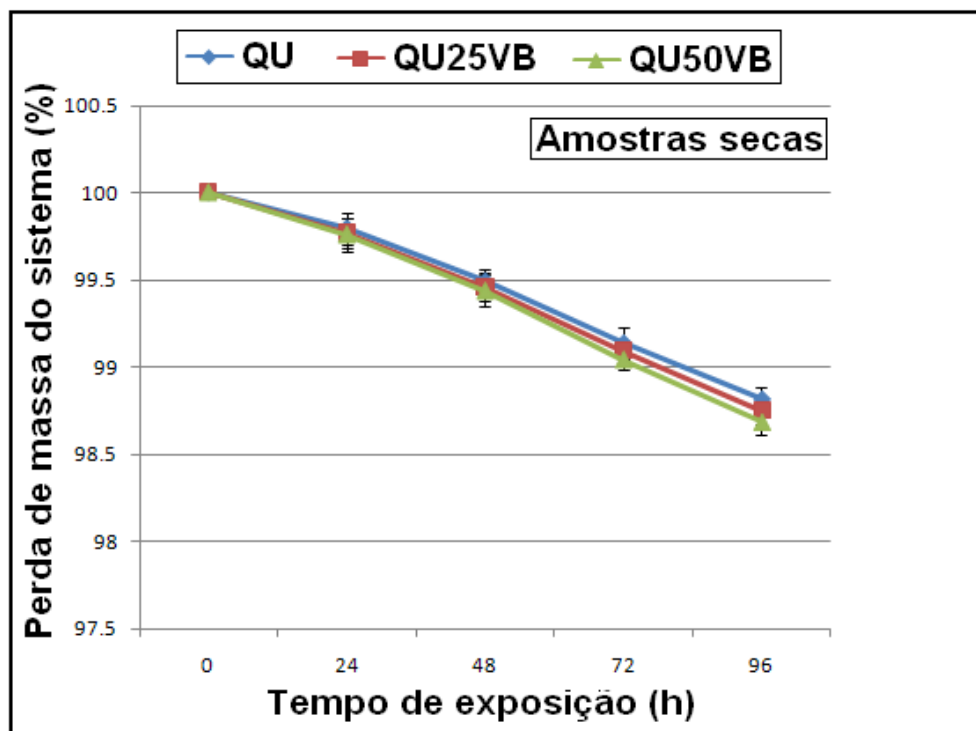


Figura 24: Perda de massa dos sistemas através das espumas QU, QU25VB e QU50VB em função do tempo.

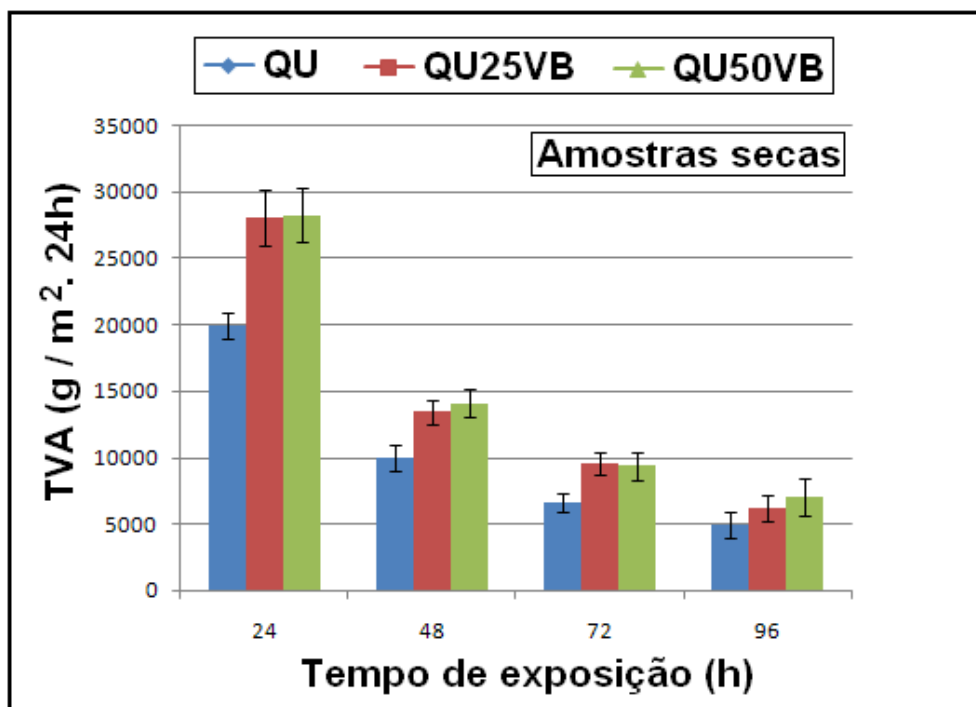


Figura 25: Transmissão de vapor de água dos sistemas através das espumas secas QU (a) QU25VB (b) e QU50VB em função do tempo de exposição.

Tendo em vista, que a proposta para o uso dos materiais é a aplicação em injúrias dos tecidos cutâneos, e que provavelmente eles serão aplicados em local úmido, a primeira etapa de ação das espumas no local da ferida será a absorção de exsudatos locais, absorção essa testada previamente. Nos estudos de Thomas & Young (2008) os pesquisadores perceberam a necessidade de analisar os materiais na condição de aplicação direta no exsudato, portanto, no presente trabalho foram realizados novos testes com as espumas previamente umedecidas. Os resultados estão representados na tabela 13, e o gráfico de TVA para os materiais úmidos está presente na figura 26.

Pode se observar que houve queda na transmissão de vapor em todos os materiais e, além disso, os resultados mostraram maior constância nos valores de liberação, refletindo em um desvio padrão menor e valores mais próximos dos sugeridos nos estudos de Lamke e seus colaboradores (1977). Esses resultados também foram comprovados nos estudos de Thomas & Young (2008), que indicaram a perda de água por evaporação em algumas condições do tecido epitelial para os tipos mais graves de injúrias, como demonstra a tabela 14.

Tabela 13: Valores de média e desvio padrão da perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água dos *scaffolds* úmidos.

Amostras	Perda de massa (g/120h)	TVA (g / m². 24h)
QU	1,52 ± 0,06	6883,30 ± 1722
QU25VB	1,64 ± 0,08	8810,61 ± 1804
QU50VB	1,70 ± 0,09	9790,10 ± 1681

As diferenças apresentadas pelas espumas com e sem adição de vidro tem ligação com prováveis dois fatores: a porosidade das amostras contendo vidro bioativo é maior do que da espuma de quitosana pura, o que já acarreta naturalmente uma maior permeabilidade. Além disso, o vidro possui uma grande quantidade de grupos silanol que, somados aos grupos amino da quitosana, promovem maior interação com o vapor de água, tal como o observado também no teste de absorção de fluidos, permitindo que as mesmas permeiem mais facilmente o material e alcancem o ambiente, liberando o vapor para o meio externo e diminuindo a concentração de fluidos no local da ferida.

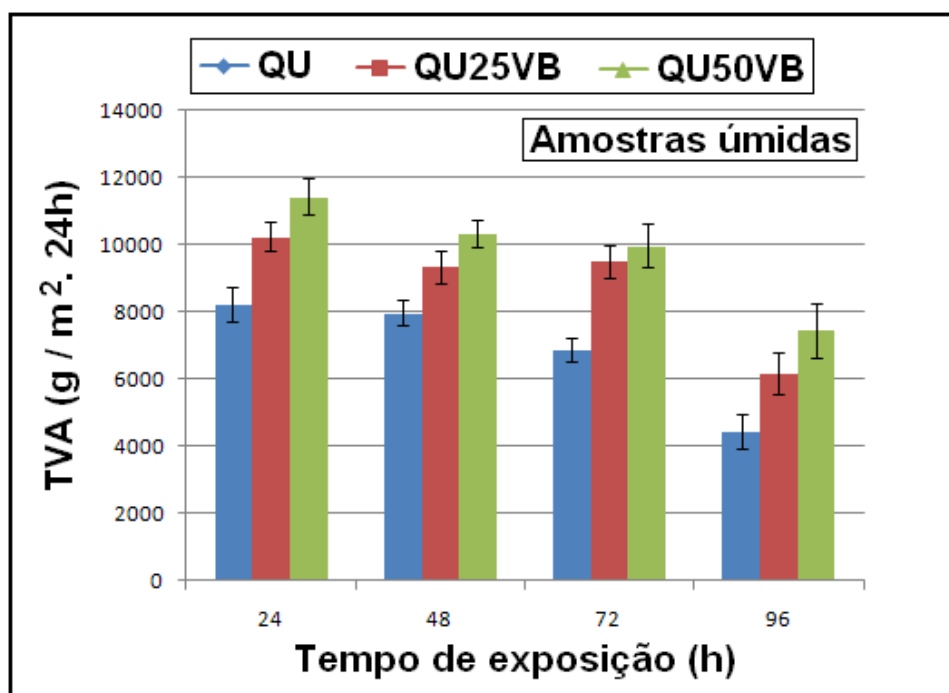


Figura 26: Transmissão de vapor de água dos sistemas através das espumas previamente umedecidas QU (a) QU25VB (b) e QU50VB em função do tempo de exposição.

Tabela 14: Valores da perda de água por evaporação encontrados por Lamke et al. (1977) e comprovados por Thomas & Young (2008) em seus estudos para determinadas condições do tecido epitelial sob injúrias.

Condições do tecido	Taxa da perda de água por evaporação (g / m ² . 24h)	Temperatura do tecido epitelial
Pele integra	204,00 ± 12	35,8 ± 0,2
Queimadura de 1° grau	278,40 ± 26	35,3 ± 0,1
Queimadura de 2° grau	4274,40 ± 132	35,3 ± 0,4
Queimadura de 3° grau	3436,80 ± 108	34,5 ± 0,4
Tecido de granulação	5138,40 ± 201	34,7 ± 0,2
Úlceras de pressão	9756,24 ± 142	35,4 ± 0,4

Valores de TVA muito baixos podem acarretar em 3 circunstâncias clinicamente indesejáveis a um curativo: oclusão e resistência do material a saída do vapor d'água levando ao aumento da pressão no local da lesão; extravasamento de líquido pelas bordas do curativo com possibilidade de maceração do tecido lesado, acarretando em demora na cicatrização e desconforto para o paciente; elevação do curativo nas extremidades resultando em exposição das bordas da ferida e conseqüentemente abertura a entrada de

microorganismos e possíveis infecções secundárias (QUEEN et al., 1987; THOMAS; YOUNG, 2008).

De acordo com os resultados obtidos, os materiais testados poderiam provocar ressecamento local nas feridas caso usados secos e em injúrias com pouca formação de exsudato, não sendo indicados para feridas que tenham padrões de TVA semelhantes as das queimaduras de profundidade igual ou inferior ao segundo grau. No entanto, em feridas com alta eliminação de exsudato, como por exemplo nas queimaduras de terceiro grau, tecidos de granulação e úlceras por pressão, os materiais teriam ação positiva mantendo a umidade local adequada para o processo de cicatrização (THOMAS; YOUNG, 2008).

5.5 Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF)

A absorção de exsudato e capacidade de permitir sua transferência e posterior evaporação para o meio é de suma importância quando da implementação de sistemas que visam cobrir e auxiliar na regeneração de injúrias cutâneas. O ensaio para determinação da capacidade de movimentação de fluidos, diferentemente do ensaio de TVA, permite que a cobertura tópica seja testada sob a condição de contato permanente com o fluido, tal como ocorreria em uma condição real de aplicação sobre um ferimento da pele, que de acordo com os estudos de Thomas (2008) pode produzir até 10g de exsudato por dia para cada 10cm² de área afetada, como em casos graves de úlceras por pressão.

Os resultados apresentados na tabela 15 demonstram a Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) a Capacidade de Absorção (CA) e a Taxa de Permeação de Vapor Úmido (TPVU) encontradas para as espumas QU, QU25VB e QU50VB (37± 2°C). A figura 27 apresenta o gráfico comparativo da CMF dos três materiais produzidos.

Tabela 15: Valores relativos a Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) a Capacidade de Absorção (CA) e a Taxa de Permeação de Vapor Úmido (TPVU) (n=3).

Amostras	TPVU*	CA*	CMF*
QU	1,93 ± 0,05	2,3 ± 0,7	4,3 ± 0,6
QU25VB	2,46 ± 0,30	2,4 ± 0,5	4,9 ± 0,4
QU50VB	3,23 ± 0,70	4,0 ± 0,7	7,2 ± 0,7

* g/10cm²/24horas

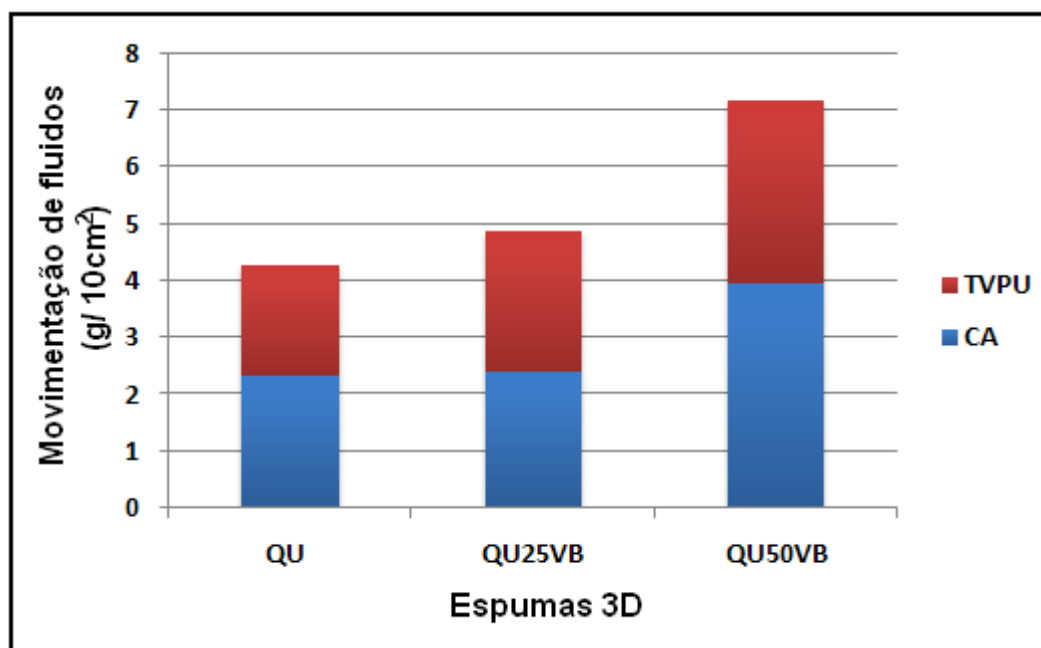


Figura 27: Demonstrativo da capacidade de movimentação de fluidos das espumas QU, QU25VB e QU50VB de acordo com os resultados de absorção e transmissão de vapor úmido.

Os resultados demonstram uma maior absorção e permeabilidade de fluidos pela espuma QU50VB que possui 50% (m/m) de vidro bioativo em sua constituição, seguido da espuma QU25VB com 25% de VB. Esses resultados são compatíveis com os obtidos nos ensaios de absorção de fluidos e TVA, que apesar de possuírem procedimentos e valores de apresentação dos resultados distintos, são consonantes em termos gerais, demonstrando a maior habilidade dos compósitos com vidro bioativo em interagir e permitir a passagem de água e umidade pelo leito da ferida em comparação com a espuma com 100% de quitosana em sua constituição. Mais uma vez, a possível explicação está na maior porosidade dos compósitos e na presença dos grupos hidrofílicos silanol, disponíveis em grande quantidade nas espumas com VB, que aumentam a probabilidade de interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio com as moléculas de água das soluções usadas nos testes.

Os resultados obtidos demonstram que as espumas produzidas são capazes de absorver e transferir a umidade de ferimentos, como queimaduras de terceiro grau e úlceras por pressão com produção de exsudatos em torno de 3 a 5 g/10cm²/24horas, sendo por isso capaz de manter a umidade adequada no leito da ferida e auxiliando a manutenção ao processo cicatricial (LAMKE; NILSSON; REITHNER, 1977; THOMAS; YOUNG, 2008).

5.6 Análise do comportamento térmico

A figura 28 apresenta as curvas de DSC e TGA do polímero quitosana. Na curva DSC é possível observar dois eventos térmicos distintos. O primeiro evento é um pico endotérmico, cujo ápice denota a temperatura de 92°C, esse evento pode ser atribuído ao processo de desidratação do polímero, e o segundo é um pico exotérmico, com ápice em 304°C, provavelmente correspondente ao processo de decomposição. Esses eventos também foram observados nos estudos de Neto et al. (2005) que analisaram o comportamento térmico da quitosana e seus derivados e perceberam que o evento de desidratação pode estar relacionado à quantidade de grupos hidrofílicos expostos e disponíveis do polímero. De acordo com os estudos de Guinesi e Cavalheiro (2006) esse fator pode não somente estar ligado ao grau de desacetilação da quitosana, mas pode também ser usado para mensurá-lo.

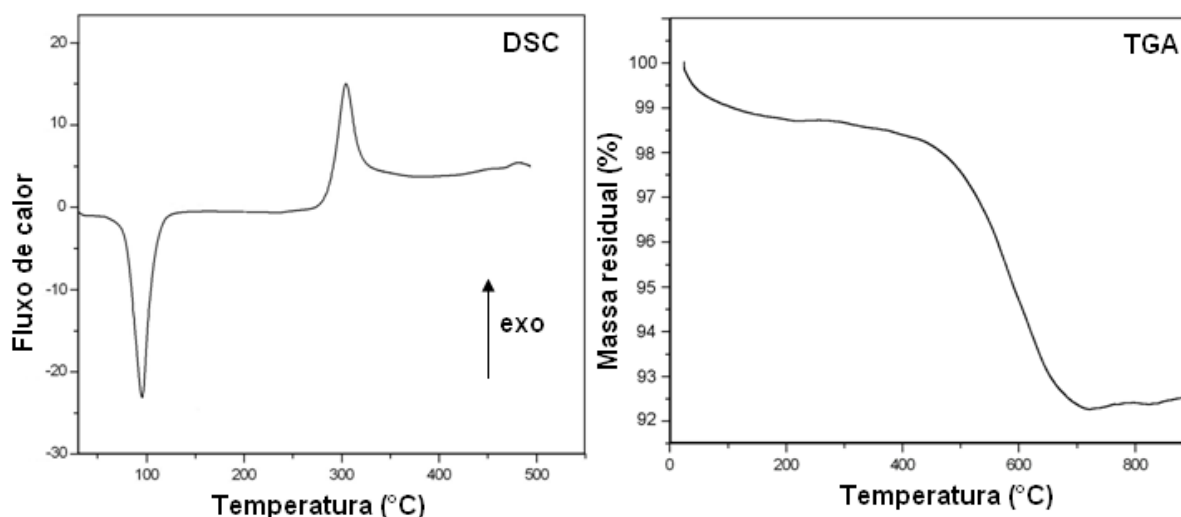


Figura 28: Curvas de DSC e TGA do polímero quitosana.

É possível observar pela curva de TGA (Figura 28) que o polímero não se degrada completamente mesmo alcançando a temperatura de 800°C, com perda de massa de aproximadamente 1,43% no primeiro evento, atribuído à desidratação, e 7,3% no segundo evento, atribuído a decomposição da cadeia polimérica da quitosana, em que ocorre à despolimerização e decomposição pirolítica da estrutura polissacarídea, liberando assim moléculas menores como água, dióxido de carbono, metano e amônia. A não decomposição completa do polímero pode estar ligada ao grau de desacetilação, onde amostras com grau de desacetilação na faixa ou abaixo de 75% possuem maior estabilidade térmica (TORRES et al., 2005).

É importante salientar que os polissacarídeos tendem a não apresentar a temperatura de fusão (T_m), devido a grande quantidade de grupos -OH presentes nestes polímeros, levando-os a degradação antes que ocorra essa transição térmica.

A Figura 29 compara as curvas de TGA e DSC obtidas para a espuma de quitosana QU com as espumas compostas QU25VB e QU50VB. A Tabela 16 apresenta um resumo dos resultados obtidos pelas análises de TGA e DSC. Para todos os materiais, a perda de massa observada na TGA ocorreu em duas fases. A primeira fase corresponde à perda de água e começa a aproximadamente 50°C, atingindo um máximo a aproximadamente 104°C, com temperaturas semelhantes para todos os *scaffolds*. A diferença na perda de massa por desidratação entre as amostras tem provável relação com a presença do vidro bioativo nas amostras compósitas. Isso se deve ao fato do vidro possuir vários grupos -OH provenientes dos grupos silanol de sua estrutura, aumentando a interação com as moléculas de água do ambiente e tornando as amostras mais suscetíveis a absorção de umidade.

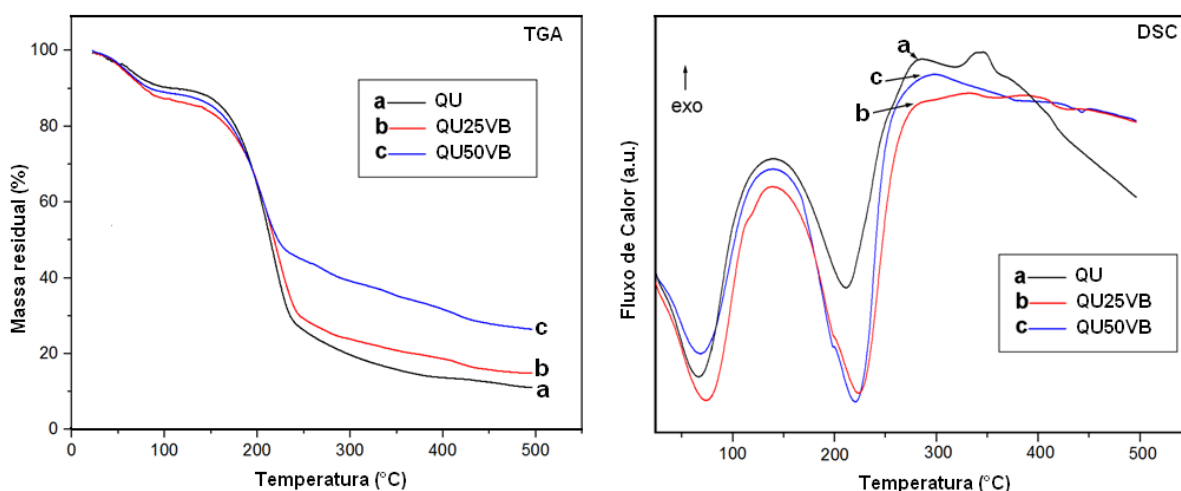


Figura 29: Curvas de TGA e DSC das espumas QU (a), QU25VB (b) e QU50VB (c).

A segunda fase de perda de massa das curvas de TGA mostra uma perda de massa de 89% para espuma QU até a temperatura máxima aplicada no experimento, enquanto a perda de peso das amostras compósitas QU25VB e QU50VB foi de 85% e 73%, respectivamente. Essa segunda fase é atribuída à vaporização e eliminação de produtos voláteis e a decomposição termoxidativa da quitosana, que se inicia a aproximadamente 128°C e ocorre até 500°C, a temperatura máxima utilizada na análise. Zhitormirsky et al. (2009) mostrou em seus estudos com adição de vidro bioativo em compósitos de matriz polimérica, que as temperaturas de degradação do VB ultrapassam os 1000°C, o que por si já justificaria uma

diminuição da perda de massa total do sistema em comparação com a amostra de 100% de quitosana. No entanto é possível perceber que a perda de massa dos materiais compósitos foi superior a porcentagem total de vidro presente nas amostras QU25VB e QU50VB. Uma explicação para esse fato é a possível segregação do material no momento do congelamento das espumas, e com isso a região das amostras testadas poderia ter menor quantidade de vidro do que o total esperado numa distribuição homogênea do material. Já a espuma de QU teve perda de massa superior a do polímero em pó. Esse fato também foi observado em estudos anteriores com filmes de quitosana reticulados com ácido adípico e na presença de EDAC (MARTINS, 2013) sendo também citado nos estudos de Horn et al. (2010) que atribuiu a diminuição da estabilidade térmica dos filmes à redução das interações intermoleculares existentes primariamente entre as cadeias da quitosana, reduzindo as interações internas e conseqüentemente aumentando o distanciamento das moléculas do polímero no material formado.

Tabela 16: Resumo dos resultados da análise do comportamento térmico das amostras QU, QU25VB e QU50VB, obtidos por TGA e DSC.

Evento térmico	TGA		DSC
	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Picos (°C)
QU.H ₂ O → QU + nH ₂ O	50 - 102	11	64 (endo)
QU.Glyc → QU + nGlyc	128 - 500	89	210 (endo)
QU → RC			279 (exo)
QU25VB.H ₂ O → QU25VB + nH ₂ O	50 - 104	15	75 (endo)
QU25VB.Glyc → QU25VB + nGlyc	127 - 500	85	220 (endo)
QU25VB → RC			286 (exo)
QU50VB.H ₂ O → QU50VB + nH ₂ O	50 - 104	13	68 (endo)
QU50VB.Glyc → QU50VB + nGlyc	128 - 500	73	219 (endo)
QU50VB → RC			294 (exo)

Legenda: X (*scaffold*); X.H₂O (*scaffold* com umidade); X.Glyc (*scaffold* com glicerina); RC (carbonização do material).

O gráfico de DSC para os *scaffolds* está representado na figura 29, onde se observa que todas as curvas exibem dois picos endotérmicos correspondentes à vaporização de água e vaporização de glicerina, respectivamente. Os picos exotérmicos correspondem à decomposição térmica do quitosana e ocorre a 279°C para espuma de quitosana pura, a

286°C para a espuma compósita QU25VB e a 294°C para QU50VB. A comparação das curvas DSC revela que mesmo com a diminuição da estabilidade térmica dos *scaffolds* em comparação a matéria prima quitosana, a temperatura de degradação é aumentada com a presença e o aumento do teor de partículas de vidro bioativo em comparação a espuma QU.

5.7 Caracterização Biológica dos *scaffolds* por metodologia *in vitro*

Foram empregados métodos que utilizam culturas celulares para avaliação *in vitro* da citotoxicidade de materiais destinados ao uso biomédico. Os ensaios de citotoxicidade baseados tanto no contato direto quanto no indireto com os biomateriais são igualmente importantes para se determinar a ação local e disseminada do material e seus possíveis produtos de degradação e assim prever os efeitos desses materiais no organismo do hospedeiro.

5.7.1 Determinação da citotoxicidade dos *scaffolds* pelo Teste de Eluição

Na figura 30 estão os registros fotográficos realizados com auxílio do microscópio óptico invertido após 72 horas de incubação com os diferentes eluatos dos *scaffolds* e respectivos controles, seguida pela coloração histológica das placas. É possível visualizar as células viáveis coloridas pelo cristal violeta. A espuma com 100% de quitosana apresentou reatividade considerada leve e não suficiente para caracterizá-la como citotóxica. É possível observar a presença de uma maior densidade celular nas placas referentes aos materiais contendo vidro bioativo. Além disso, pode se deduzir pelas imagens que o aumento da concentração de vidro influenciou na densidade final de células. Observa-se a total lise celular provocada pelo controle positivo (Latex) em comparação com os grupos controle negativo (PEAD) e branco, onde não é possível perceber tal efeito. Na tabela 17, os graus de reatividade dos materiais testados e os dados obtidos confirmam a baixa citotoxicidade das espumas.

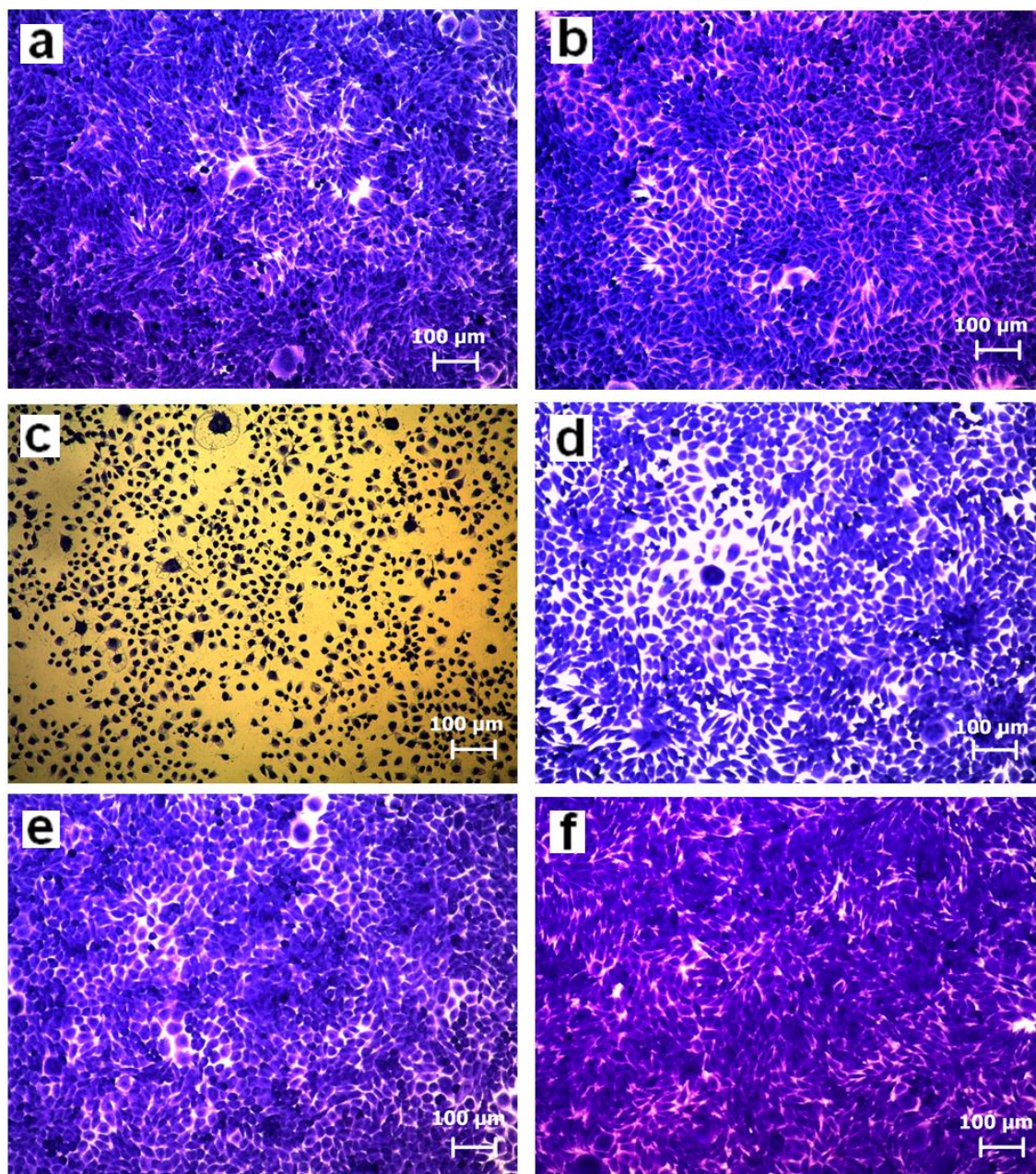


Figura 30: Imagens obtidas com auxílio de Microscopia Óptica das monocamadas celulares expostas aos eluatos obtidos após 72 horas de incubação de diferentes biomateriais: branco (a), PEAD - controle negativo (b), latéx - controle positivo (c), QU (d), QU25VB (e) e QU50VB (f).

Tabela 17: Grau de reatividade das espumas 3D QU (100% de quitosana), QU25VB (75% de quitosana e 25% de vidro bioativo) e QU50VB (50% de quitosana e 50% de vidro bioativo) determinado pelo teste de eluição.

Material	Grau de Reatividade
Branco	0
PEAD	0
Latéx	4
QU	1
QU25VB	0
QU50VB	0

Os graus de reatividade apresentados confirmam a não citotoxicidade de todas as espumas testadas, todas com reatividade menor que 2, tendo em vista que o grau de reatividade 4 considerado de alta toxicidade foi apresentado apenas pelo controle positivo (Latéx).

5.7.2 Análise da viabilidade celular por MTT

O ensaio de redução do MTT permite de forma simples que seja quantificado o metabolismo deste sal pelas células cultivadas sobre o biomaterial testado, e conseqüentemente, verificar a ação deste sobre a viabilidade da cultura celular empregada no estudo. Essa quantificação é possível, pois o MTT, quando metabolizado pelas células, tem seus derivados metabólicos acumulados na forma de cristais de tetrazólio e formazana. Os cristais, quando levados a um espectrofotômetro podem ser quantificados colorimetricamente e com isso a viabilidade celular da cultura empregada é determinada. Quanto maior a leitura, maior a viabilidade celular (COSTA-JÚNIOR; PEREIRA; MANSUR, 2009; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).

O gráfico da viabilidade das células L929 (Figura 31) demonstra que não houve diferença significativa na viabilidade celular, quando em contato com a espuma compósita QU50VB com adição de 50% de vidro. No entanto, as células L929, quando em contato com as espumas com 100% de quitosana (QU) e com as espumas QU25VB mostraram um decréscimo de $35,0 \pm 2,0\%$ e $21,0 \pm 10,0\%$ respectivamente na viabilidade, quando comparado com o grupo controle. Mesmo com essa redução, os valores de viabilidade mantiveram-se acima de 50%, classificando os materiais como não citotóxicos. Esses dados endossam as informações obtidas com o teste de eluição.

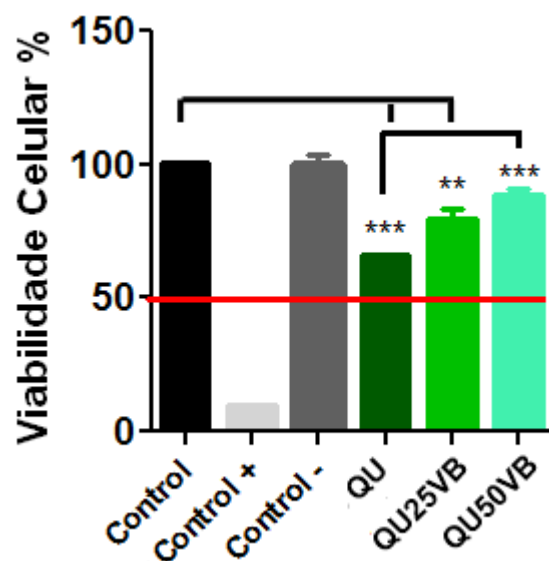


Figura 31: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 72 horas de exposição de culturas de células L929 das espumas QU, QU25VB e QU50VB. (B) Morfologia das células controles.

Após os resultados obtidos com as células L929 e considerando a aplicação dos materiais produzidos no presente trabalho, avançamos os estudos para testes com células humanas da linhagem HEK293 T. O gráfico da viabilidade das células HEK293 T (Figura 32) demonstra que não houve diferença significativa na viabilidade das células, quando em contato com as espumas compósitas QU25VB e QU50VB. No entanto, as células HEK293 T, quando em contato com a espuma com 100% de quitosana (QU) mostraram um decréscimo de $26,0 \pm 4,5\%$ na viabilidade, quando comparado com o grupo de controle. Mesmo com essa redução, os valores de viabilidade mantiveram-se acima de 50%, classificando os materiais como não citotóxicos.

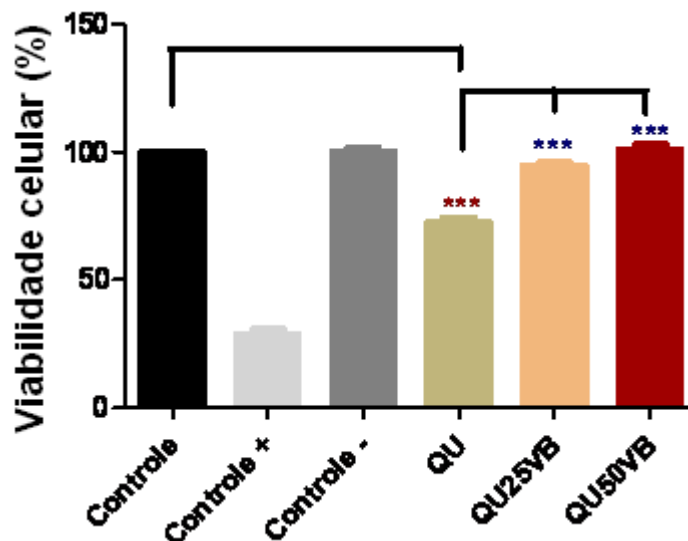


Figura 32: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 72 horas de exposição de culturas de células HEK293 T das espumas QU, QU25VB e QU50VB.

5.7.3 Análise da viabilidade celular por LIVE/DEAD®

O kit para o teste de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® constitui um ensaio de viabilidade celular de fluorescência que permite a visualização simultânea em duas cores das células: as vivas, coradas de verde, e as células mortas, coradas de vermelho. Por utilizar duas sondas distintas, a calceína AM-LIVE e etídio homodímero-DEAD. O teste permite medir parâmetros reconhecidos das células como a viabilidade pela atividade da esterase intracelular e a integridade da membrana plasmática. No presente estudo o ensaio “live e dead” foi realizado de forma qualitativa, com o fim de validar o ensaio do MTT. Na figura 33, pode ser observado que as células L929 em contato com as espumas QU50VB e QU25VB apresentaram um padrão de fluorescência semelhante ao do grupo de controle, ou seja, alta fluorescência verde (células viáveis) e pouca ou nenhuma fluorescência vermelha (células mortas). No entanto, as células em contato com a espuma QU mostram aumento da coloração fluorescente vermelho (células mortas). Assim, como esperado, os resultados ao LIVE/DEAD® confirmaram os resultados anteriores apresentados nos ensaios de eluição e de determinação da viabilidade celular por MTT.

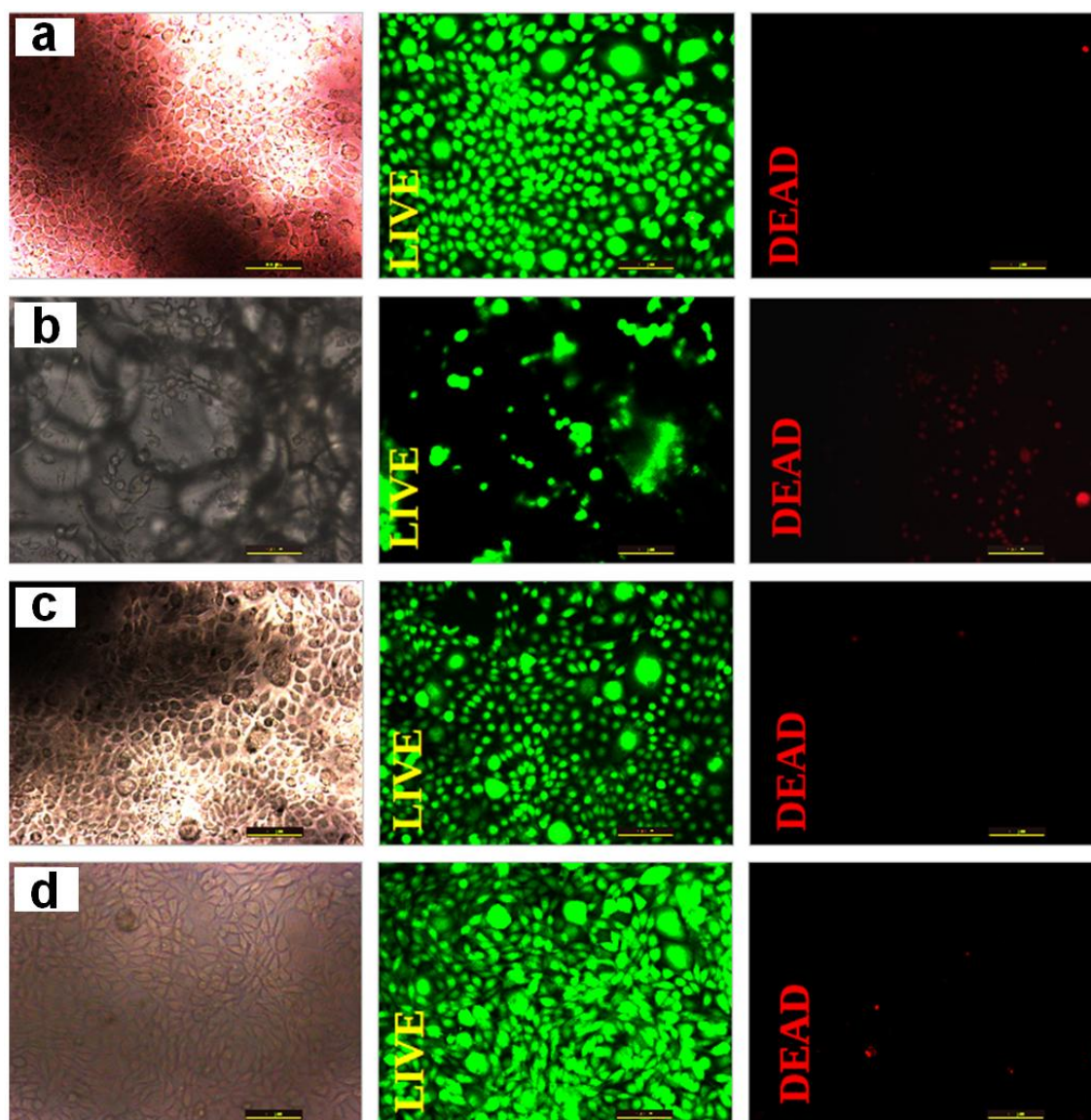


Figura 33: Imagens obtidas por Microscopia Óptica de Fluorescência do teste “LIVE/DEAD” realizado utilizando fibroblastos da linhagem L929 expostos por 72h aos diferentes scaffolds produzidos e respectivo controle. (a) Controle (nenhum tratamento); (b) QU; (c) QU25VB; (d) QU50VB. (Escala = 100 μ m).

5.7.4 Atividade da Fosfatase Alcalina

A Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) é um importante marcador precoce de diferenciação celular, e é associada, entre outros, a desenvolvimento de dentes, ossos, pêlos e formação de colágeno na pele durante o processo de recuperação de feridas (WATERS et al., 1973). Desde 1943, estudos como os de Fell e Danielli já demonstravam por técnicas histoquímicas que a fosfatase alcalina tem aumento da atividade durante a regeneração dos tecidos da pele (WATERS et al., 1973). Em injúrias cutâneas uma elevada atividade da fosfatase nos fibroblastos está associada com a formação de fibras de regeneração de colágeno, cuja

atividade se reduz após a regeneração do tecido estar completa (PRICE et al., 1979; WATERS et al., 1973).

Entendendo que a ALP é um importante marcador da produção de colágeno e um indicador do aumento da atividade celular ligada ao processo cicatricial de tecidos cutâneos, foram conduzidos estudos da produção dessa enzima pelas células das linhagens L929 e HEK293 T quando expostas as espumas QU, QU25VB e QU50VB por 7 dias.

Na figura 34, estão apresentados os resultados gráficos da atividade de ALP após sete dias de exposição das células da linhagem L929, observou-se um aumento de $12\pm 6\%$ na atividade da ALP na análise do sobrenadante das células em contato com as amostras contendo 50% de vidro bioativo em relação ao grupo controle, não havendo diferença significativa nos valores obtidos na atividade da ALP em contato com a espuma QU25VB. Houve queda na atividade da ALP na análise do sobrenadante das células em contato com a espuma de quitosana pura que apresentou $80\pm 7\%$ de atividade. Quando comparadas as espumas entre si, essas diferenças se tornam mais significativas tendo em vista que a atividade das espumas QU25VB e QU50VB foram $20\pm 6\%$ e $32\pm 6\%$ respectivamente maiores quando comparadas com a amostra sem vidro bioativo.

Na figura 35, estão apresentados os resultados gráficos da atividade de ALP após sete dias de exposição das células da linhagem HEK293, observou-se um aumento de $14\pm 4\%$, na ALP na análise do sobrenadante das células em contato com as amostras contendo 50% de vidro (QU50VB), não havendo diferença significativa nos valores obtidos para as amostras QU25VB e apresentando queda na atividade da ALP na análise do sobrenadante em contato com a espuma QU, que apresentou $73\pm 6\%$ de atividade da ALP em relação ao grupo controle. Comparando os resultados as espumas entre si, as diferenças passam a ser $24\pm 6\%$ e $41\pm 4\%$ para as espumas QU25VB e QU50VB respectivamente quando comparadas com a amostra sem vidro bioativo.

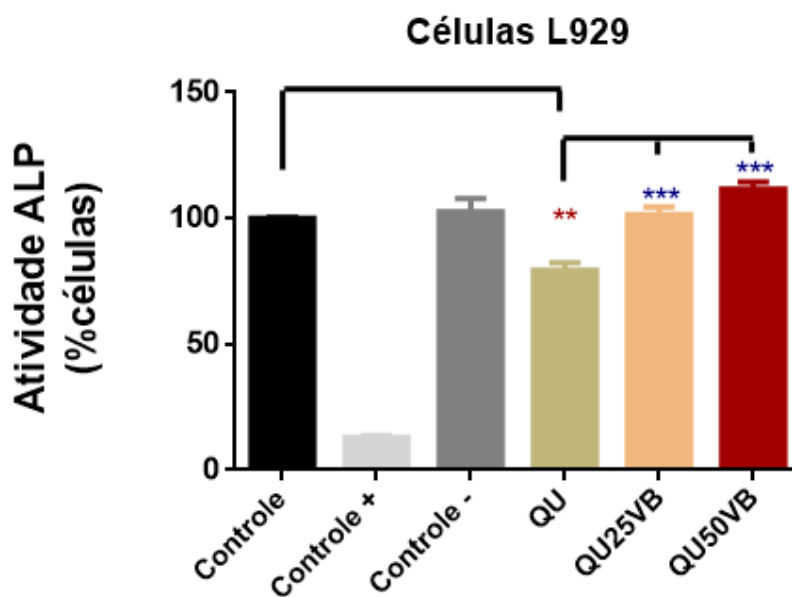


Figura 34: Determinação da Atividade da ALP após sete dias de exposição de culturas de células L929 as espumas QU, QU25VB, QU50VB.

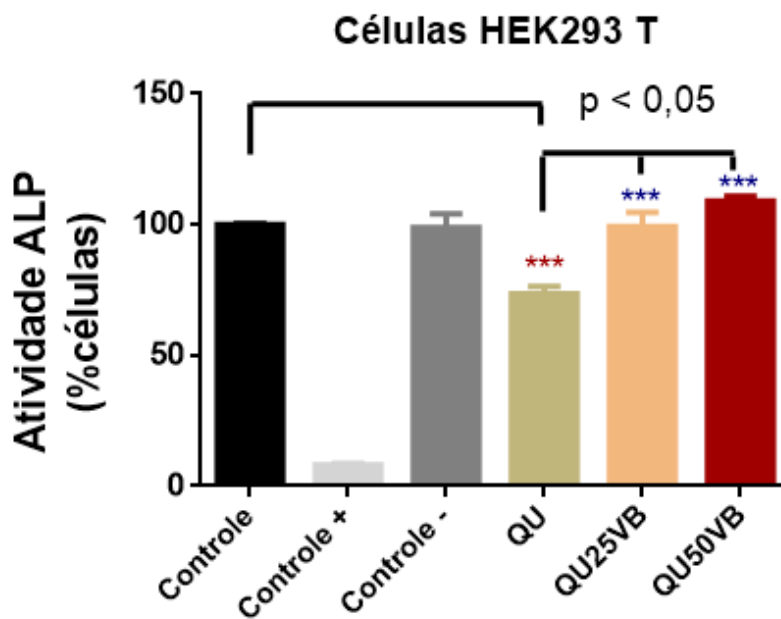


Figura 35: Determinação da Atividade da ALP após sete dias de exposição de culturas de células HEK293 as espumas QU, QU25VB, QU50VB.

5.8 Degradação das espumas 3D

5.8.1 Análise da perda de massa por hidrólise

A degradação *in vitro* de biomateriais é um estudo importante para avaliar sua reabsorbilidade em condições fisiológicas e medir a estabilidade em longo prazo do material. O *scaffold* 3D ideal para aplicações biomédicas deve apresentar um comportamento de degradação o mais controlado quanto possível, que depende da aplicação específica. A Figura 36 apresenta a curva de perda de massa durante o processo de degradação por hidrólise *in vitro* de cada espuma incubada numa solução de SBF a 37°C por um total de 84 dias. Durante os primeiros 7 dias a análise se fez diariamente e posteriormente foi conduzida semanalmente.

Observou-se que a perda de massa de espuma de quitosana pura foi significativamente maior do que as espumas compósitas QU25VB e QU50VB e a perda de massa ocorreu durante todo o período de incubação, porém ela apresentou-se mais intensa até o sétimo dia.

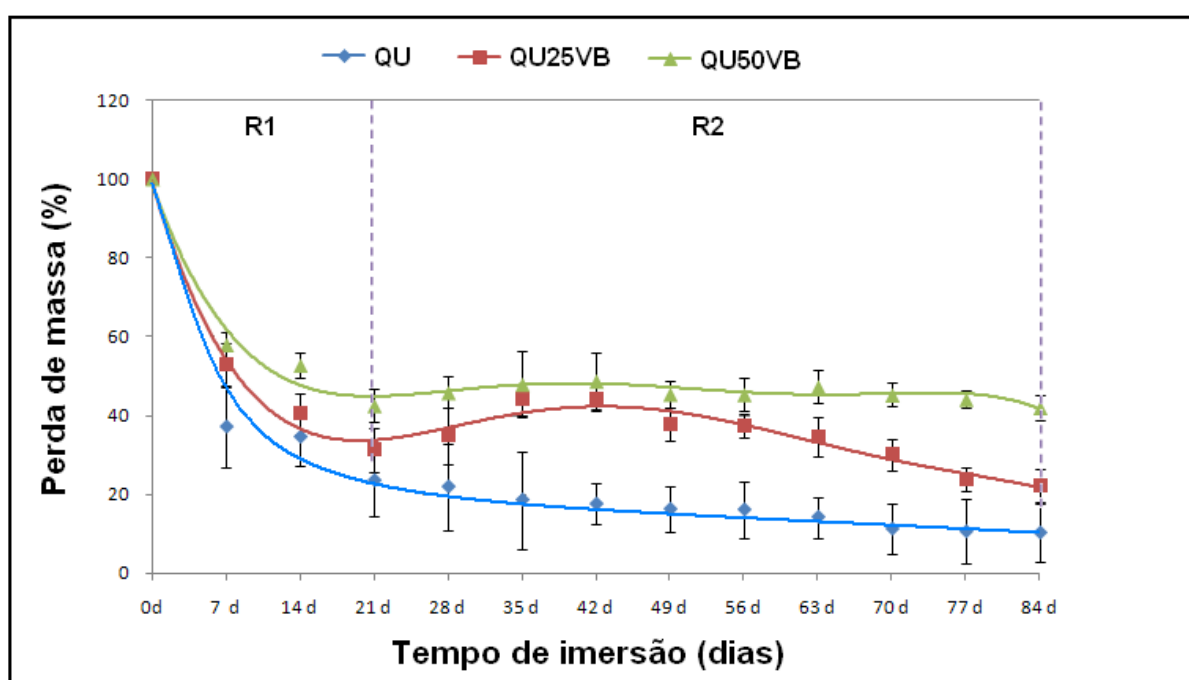


Figura 36: Avaliação da perda de massa por degradação hidrolítica das espumas QU, QU25VB e QU50VB por imersão em solução tampão SBF de pH 7,4 por 84 dias. R1 é o período que compreende taxa inicial de perda de massa e R2 é o período onde as massas dos compósitos.

Devido à grande diferença na perda de massa a partir do vigésimo primeiro dia, especialmente para as espumas compósitas QU25VB e QU50VB, a figura 38 foi dividida em duas regiões distintas indicadas como R1 e R2. Inicialmente ocorre degradação a uma taxa mais elevada (R1), e em seguida observa-se uma segunda região onde a taxa de perda de massa não somente diminui, como também ocorre elevação da massa total para as espumas compósitas QU25VB e QU50VB.

Observando a perda de massa da espuma QU50VB é possível considerar que a estabilização da massa com pouca variação ocorreu até o final da experiência. A espuma QU25VB apresentou um aumento da perda de massa a partir dos quarenta e dois dias do período de incubação.

Considerando a degradação hidrolítica da quitosana no material, essa ocorre a partir da ruptura das ligações éter entre os anéis sacarídeos, resultando na separação de monômeros e erosão de cadeias de polímero com dissolução dos produtos de degradação na solução tampão (LEE; GARDELLA, 2001).

Considerando a degradação do VB: de acordo com o estudado por Cerruti et al (2005) e posteriormente também observado nos estudos de Costa (2010), a degradação do vidro bioativo pode seguir um modelo homogêneo onde o líquido reage com as partículas durante todo o tempo sendo que a reação segue uma cinética de degradação de primeira ordem, e pode também seguir um modelo heterogêneo onde ocorre a extração da sílica e álcalis e a mesma teria sua cinética de degradação variando com a raiz quadrada do tempo de imersão.

Por outro lado, o aumento da massa apresentado pelas amostras compósitas pode ser relacionado ao teor do vidro bioativo presente nas espumas e provavelmente está relacionado à mineralização do VB nas mesmas. A mineralização ocorre devido indução da formação de fosfato de cálcio no VB por imersão em SBF (LUZ et al., 2012; MAJI et al., 2016). Luz et al. (2012) mostraram em seus estudos que após 5 dias de imersão de amostras de compósitos de matriz polimérica com vidro bioativo em SBF foi possível detectar estruturas típicas de apatita formada biomimeticamente e que a mineralização ocorreu apenas nas áreas de amostras onde o VB estava presente. A ocorrência da mineralização nas amostras compósitas, neste trabalho, foi avaliada por FTIR, DRX e EDS e será apresentada nos itens posteriores.

Independente da forma que o vidro e a quitosana sofrem essa degradação ao longo do processo, o que se conclui é que em se tratando de um material compósito, claramente cada fase apresentará um comportamento de degradação/dissolução diferente, no entanto o vidro presente na amostra consegue alterar o padrão de degradação da matriz.

5.8.2 Caracterização por FTIR das espumas após degradação

As espumas foram imersas em SBF durante 84 dias e submetidas a análise FTIR semanalmente. A evolução nos espectros FTIR das amostras imersas em SBF ao longo deste tempo pode ser observada nas figuras 39, 40 e 41. Na figura 37, pode-se observar que as principais alterações nos espectros de QU ocorrem nos grupos amida.

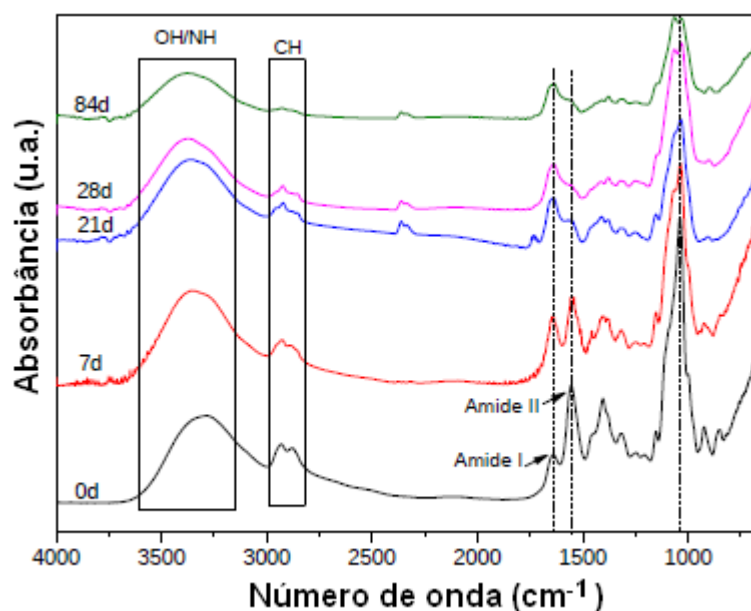


Figura 37: Espectros de FTIR da espuma QU imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.

Uma redução nos principais sinais relacionados com a quitosana: amida I ($1690\text{-}1612\text{cm}^{-1}$); Amida II ($1590\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$); a deformação de tesoura de CH ($1425\text{-}1390\text{cm}^{-1}$) e o alongamento de CO da estrutura do anel (máximo em 1040cm^{-1}) podem ser observados. Estas alterações são consistentes com o processo de degradação hidrolítica do polímero. Não foram observadas alterações mais significativas nos espectros das espumas de quitosana.

Nas espumas compósitas é possível observar o surgimento de novas bandas entre 1200cm^{-1} a 650cm^{-1} (figuras 40 e 41). Desde a primeira semana de imersão em SBF

observou-se um alargamento na banda de 1000cm^{-1} a 1040cm^{-1} , formando um ombro, com máximo em 1030cm^{-1} , que pode ser atribuído ao grupo fosfato (PISHBIN et al., 2014). Além disso, há a ocorrência das bandas em 960cm^{-1} também atribuído ao grupo fosfato e em 875cm^{-1} atribuído ao carbonato, indicando a formação de fosfato de cálcio.

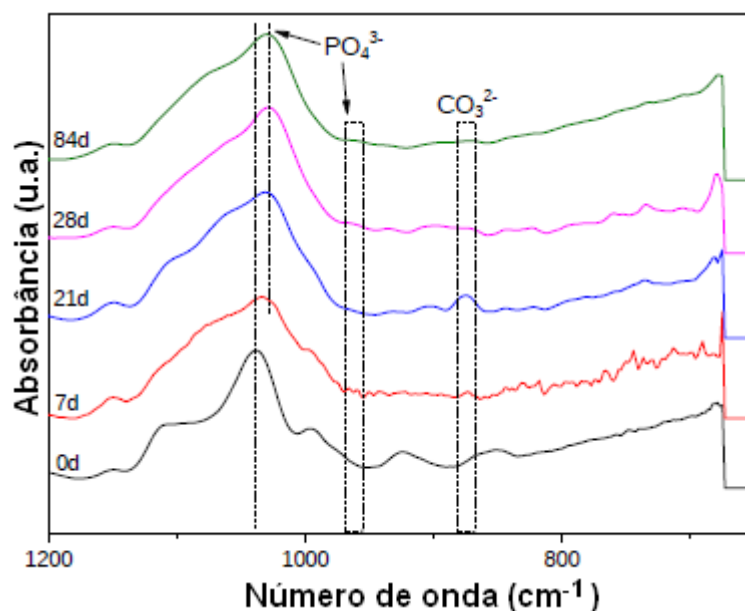


Figura 38: Espectros de FTIR da espuma QU25VB imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.

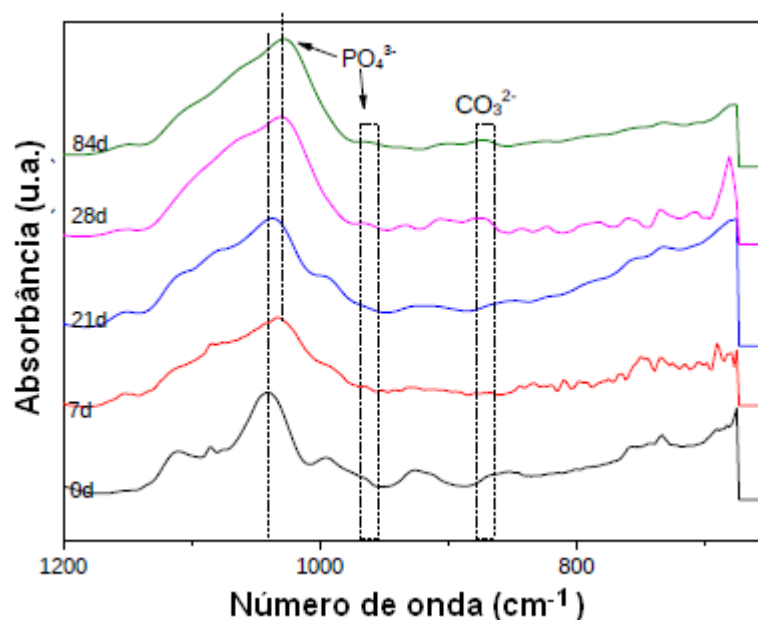


Figura 39: Espectros de FTIR da espuma QU50VB imersa em SBF ao longo de 0, 7, 21, 28 e 84 dias.

Os espectros FTIR das amostras após 84 dias de imersão em SBF (figura 42) confirmam as diferenças no processo de degradação das espumas com e sem vidro bioativo. Somente as

espumas compósitas apresentam as bandas relacionadas aos grupos típicos da camada de fosfato de cálcio formada na superfície das amostras devido à presença das partículas de vidro bioativo.

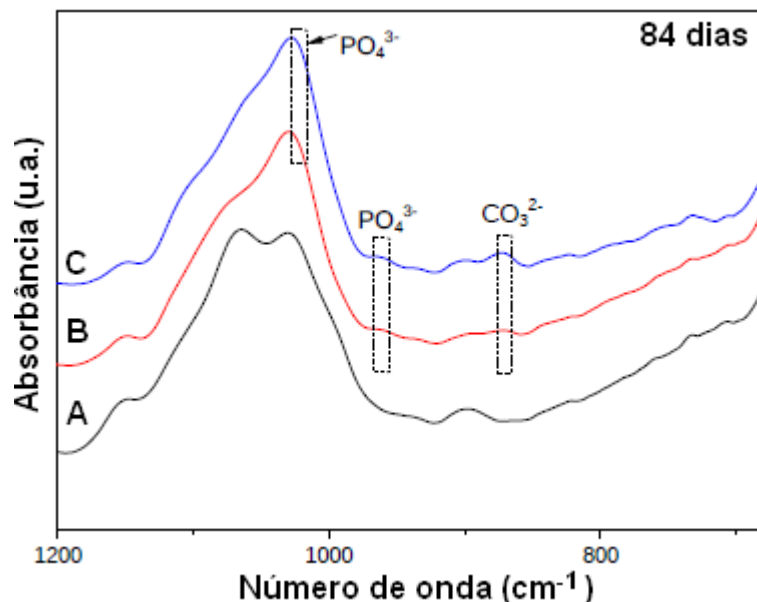


Figura 40: Espectros de FTIR comparativo entre as espumas QU (A), QU25VB (B) e QU50VB (C) imersas em SBF no tempo de 84 dias.

5.8.3 Caracterização por DRX das espumas após degradação

A Figura 41 mostra os espectros de DRX de amostras antes da imersão em SBF e após 21 e 84 dias após incubação. Os padrões de DRX da espuma de quitosana puro mostram que o processo de degradação atua diminuindo a cristalinidade da amostra.

Após 21 dias de imersão, os difratogramas de espuma QU50VB mostram uma fase cristalina com picos principais em 32° , 45° e 56° (2θ), que aparecem também no difratograma da espuma QU25VB, porém após 84 dias de imersão. Esta nova fase é típica de cristais de fosfato e é correspondente ao difratograma padrão de hidroxiapatita (LEE; PAI; CHANG, 2013; PISHBIN et al., 2014). A presença dessa fase é menos evidente na amostra QU25VB devido à menor quantidade de vidro bioativo em comparação com a espuma compósita QU50VB, que possui 50% de vidro em sua constituição.

Pishbin et al. (2014) investigaram o efeito da imersão *in vitro* em SBF de revestimentos de compósitos produzidos por deposição eletroforética de vidro bioativo carregado com gentamicina e quitosana e forneceram evidência de bioatividade das amostras após o aparecimento de picos de hidroxiapatita. Este estudo também relata que os picos tiveram aumento de intensidade após 21 dias de imersão, como ocorreu no presente estudo.

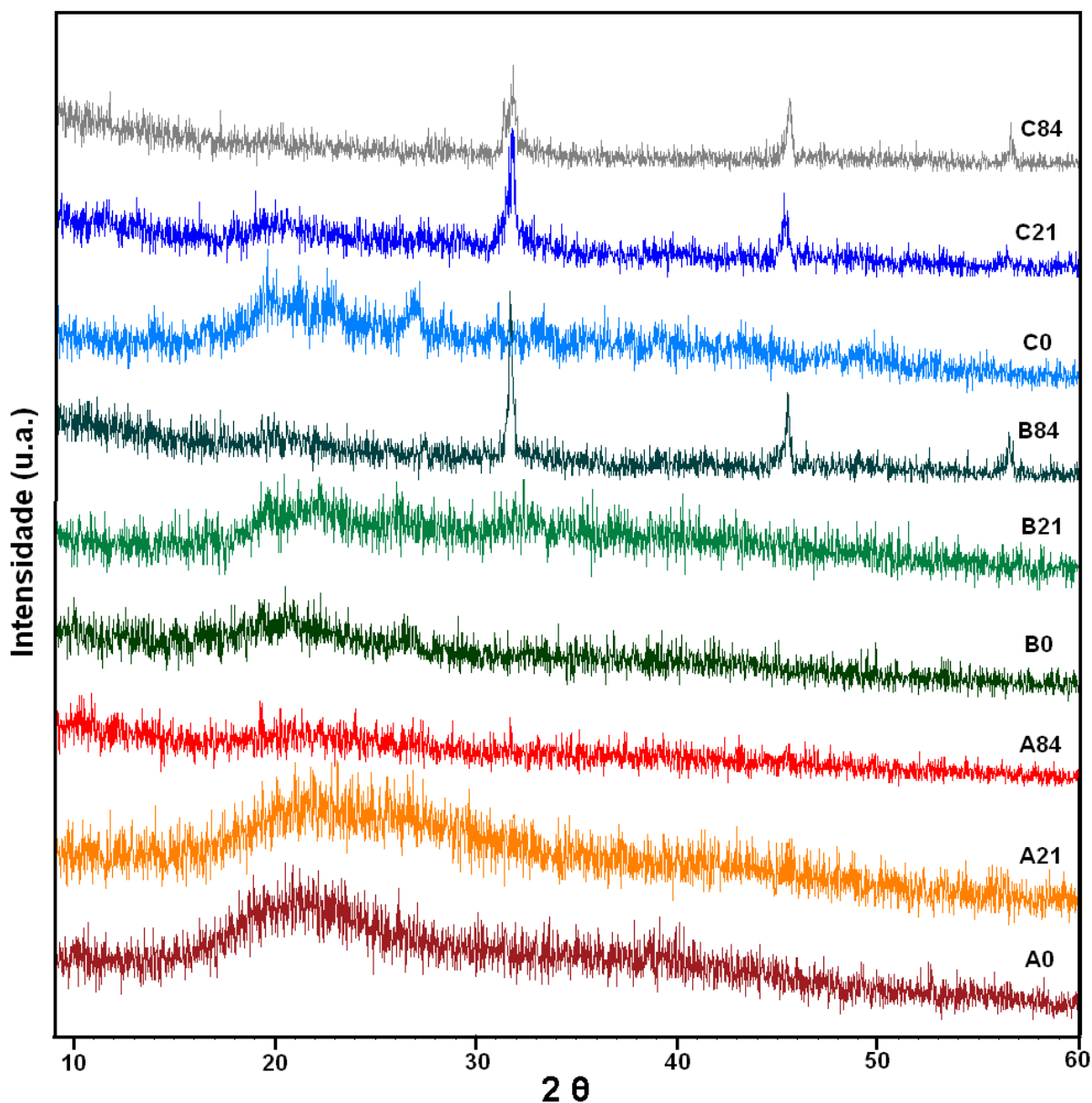


Figura 41: Padrões de DRX de degradação *in vitro* com imersão em SBF durante um período de 84 dias: QU (A0) com 0 dias de imersão (controle), (A21) após 21 dias e (A84) após 84 dias de imersão; QU25VB (B0) com 0 dias, (B21) após 7 dias e (B84) após 84 dias de imersão; QU50VB (C0) com 0 dia, (C21) após 21 dias, (C84) após 84 dias de imersão.

5.8.4 Análise morfológica (MEV) e química elementar (EDS) das espumas após degradação

A Figura 42 mostra as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das espumas antes e depois de 7 e de 84 dias do início do processo de degradação hidrolítica. O MEV foi empregado para avaliar e comparar as alterações na morfologia superficial e porosidade dos *scaffolds*. As imagens das amostras após 7 dias de imersão em

SBF mostram um aumento do tamanho dos poros na estrutura dos materiais. Contudo, a espuma de quitosana pura exibe a maior faixa de tamanho de poros (Tabela 18) em relação às amostras QU25VB e QU50VB.

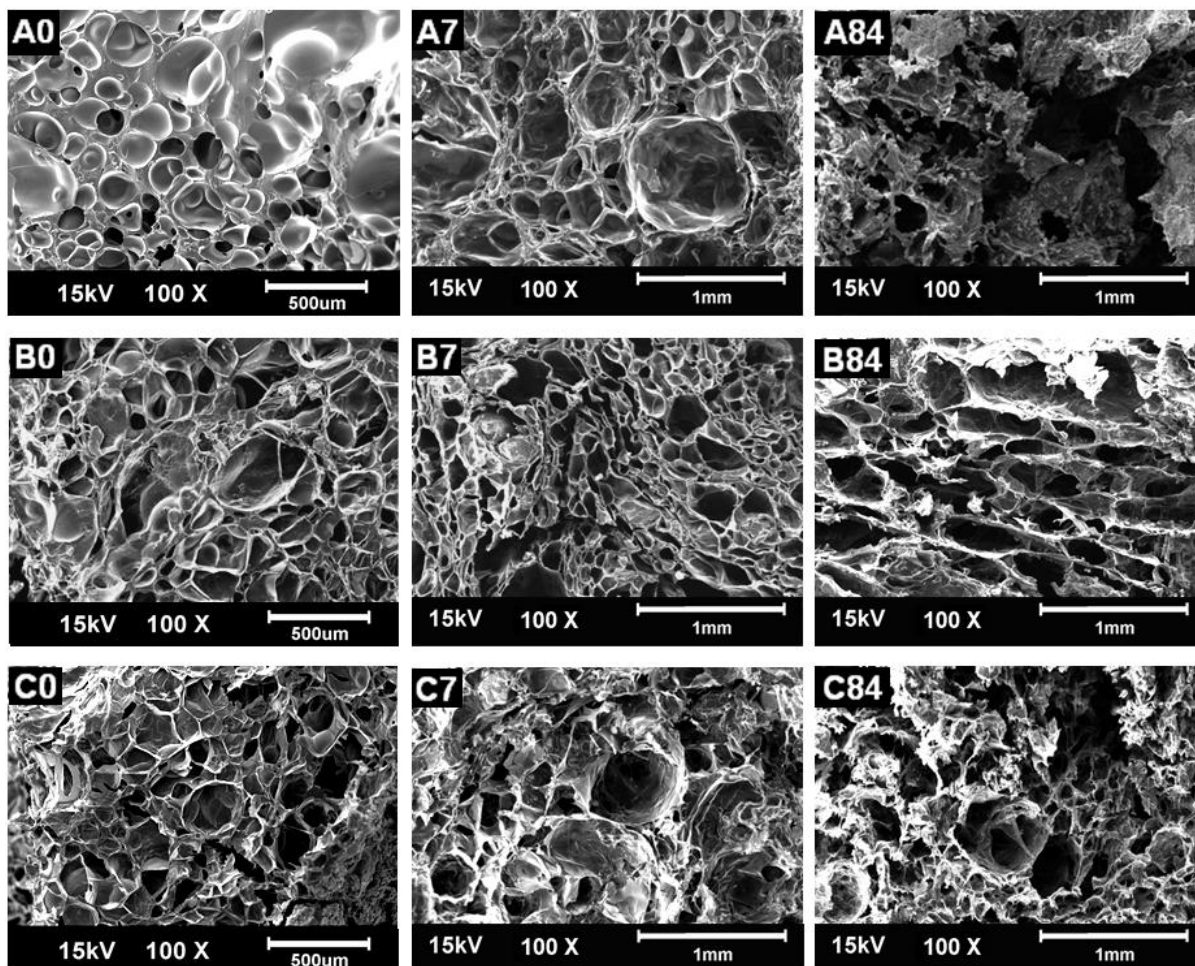


Figura 42: Fotomicrografias por MEV para caracterização das amostras a partir da degradação *in vitro* por imersão em SBF durante um período total de 84 dias: QU (A0) com 0 dias de imersão (controle), (A7) após 7 dias de imersão e (A84) após 84 dias; QU25VB(B0) com 0 dias, (B7) após 7 dias e (B84) após 84 dias de imersão; QU50VB(C0) com 0 dia, (C7) após 7 dias, (C84) após 84 dias de imersão.

Após 84 dias de degradação hidrolítica *in vitro*, as imagens de MEV demonstraram que a espuma QU apresenta destruição extensiva da organização da estrutura de poros e uma faixa de tamanhos de poros bastante heterogênea entre 260µm e 1,5mm ao final do experimento. Por outro lado, as espumas com VB tendem a sofrer menos degradação da sua estrutura fundamental em comparação com a espuma QU. Se compararmos os compósitos entre si, a espuma QU25VB apresentou maior perda em sua estrutura em relação a espuma QU50VB. Isso demonstra que o teor de vidro bioativo nas amostras pode influenciar a estabilização da estrutura da matriz polimérica durante a degradação hidrolítica.

Tabela 18: Análise por MEV da mudança na faixa de tamanho dos poros das espumas 3D antes e após 7 dias e 84 dias de imersão em SBF.

Amostras	Faixa de tamanho de poros (μm)		
	0 dias	7 dias	84 dias
QU	115-450	180-700	260-1500
QU25VB	115-270	130-340	170-400
QU50VB	160-260	140-280	130-290

Após 7 dias de imersão em SBF, nas amostras onde houve a adição de vidro bioativo, observou-se o aparecimento de uma estrutura tipicamente associada a uma camada de apatita biomimeticamente formada, cobrindo as espumas compósitas. A análise de EDS foi realizada para avaliar a alteração na composição química da superfície e comprovar a presença da apatita formada após a imersão em SBF. A Figura 43 mostra a imagem MEV de estrutura biomimética associada à apatita juntamente com o espectro EDS de amostras compósitas após 84 dias de imersão. Em comparação com as amostras controle, as concentrações de Ca/P nas superfícies das amostras aumentam após a imersão em SBF enquanto a concentração de silício (Si) diminui. Os resultados de DRX e FTIR obtidos reforçam essa informação. É importante salientar que não houve alterações significativas na composição química da amostra QU no decurso do experimento.

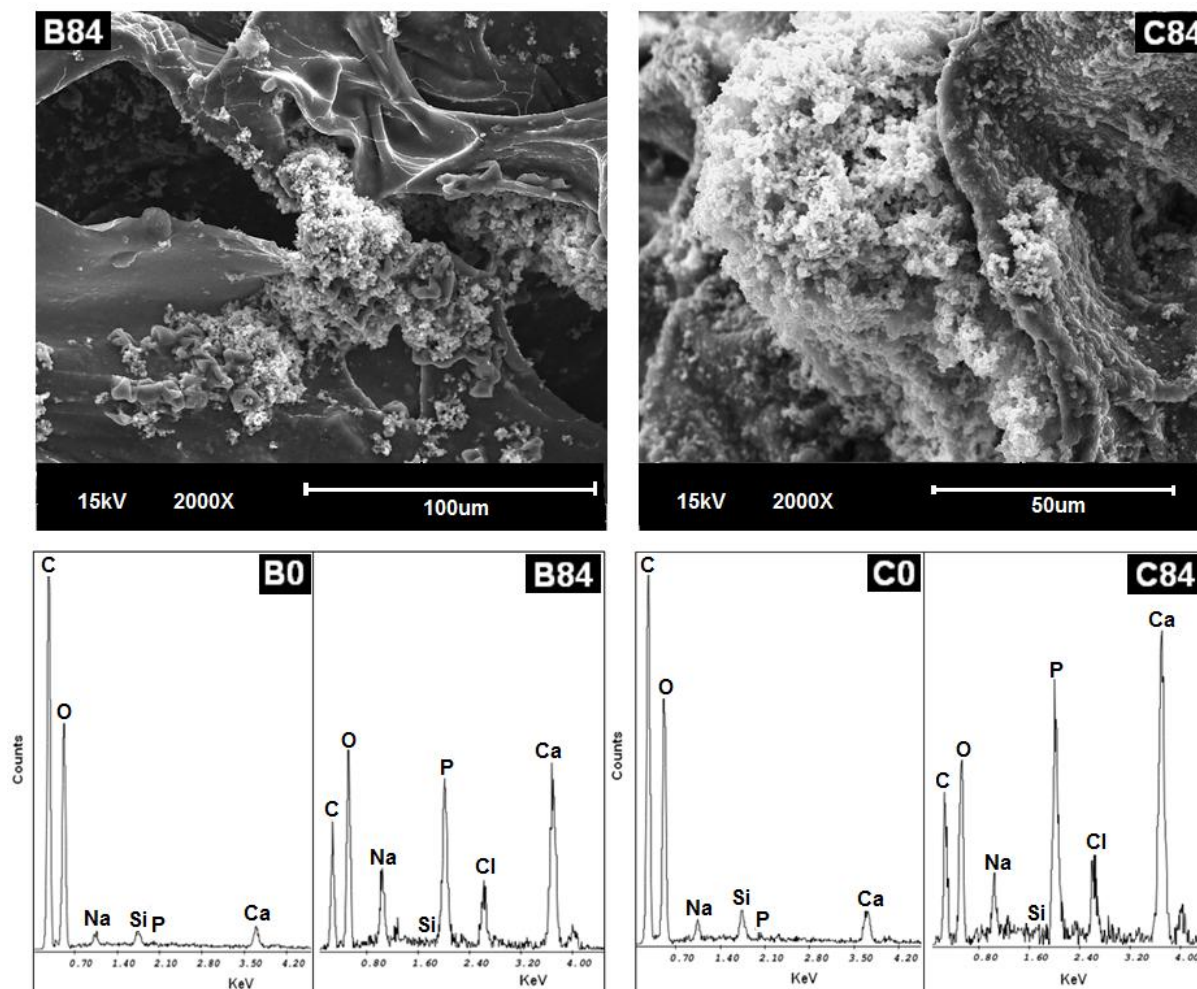


Figura 43: Imagens do MEV das formações de apatita a partir da superfície de espumas compósitas QU25VB (B84) e QU50VB (C84) após imersão em solução de SBF durante 84 dias. Espectros da caracterização dos elementos químicos por EDS para as espumas compósitas QU25VB (B0) e QU50VB (C0) embebidas em solução de SBF no tempo 0 dias (controle) e QU25VB (B84) e QU50VB (C84) após 84 dias de imersão.

As alterações observadas por MEV após degradação das espumas correlacionou-se bem com os dados de perda de massa, que indica que com o aumento de teor de vidro bioativo nas amostras o processo de perda de massa das espumas tende a diminuir comparativamente. Além disso, a formação da camada de apatita é um fator importante que provoca aumento da massa dos materiais compósitos durante o experimento, influenciando o resultado da perda de massa final.

5.8.5 Caracterização por micro-CT das espumas após degradação

A tabela 19 apresenta os resultados da análise quantitativa 3D dos *scaffolds* antes e após imersão em SBF durante 84 dias, obtidos por micro-CT.

Tabela 19: Análise quantitativa por micro-ct das espumas 3D antes e após 84 dias de imersão em SBF.

Amostras		Porosidade total (%)	Poros abertos (%)	Tamanho médio de poros (μm)
QU	0d	45,2 \pm 2,8	98,8 \pm 1,9	249,6 \pm 7,9
	84d	50,0 \pm 1,8	99,4 \pm 0,7	344,2 \pm 7,2
QU25VB	0d	59,7 \pm 5,7	99,3 \pm 1,0	269,4 \pm 8,1
	84d	76,2 \pm 0,8	99,2 \pm 0,2	432,2 \pm 6,8
QU50VB	0d	51,9 \pm 0,7	98,5 \pm 1,2	149,8 \pm 1,6
	84d	56,6 \pm 2,5	99,9 \pm 0,1	174,7 \pm 8,5

A Figura 44 apresenta o histograma de distribuição do tamanho de poros e um modelo de reconstrução 3D dos *scaffolds* antes e depois da imersão em SBF durante 84 dias. Após a imersão de SBF ocorreu a degradação dos *scaffolds* e, conseqüentemente, observou-se um aumento na porosidade total e no tamanho médio dos poros para todas as amostras, mantendo a sua porosidade aberta e interligada.

Observou-se comportamento semelhante na análise por MEV, com algumas diferenças quantitativas que podem estar relacionadas às limitações da técnica, uma vez que a micro-CT calcula o tamanho de poro na estrutura 3D completa e o MEV observa apenas uma pequena região das amostras e de forma superficial. Uma redução drástica na porosidade devido ao encolhimento do material ou sua degradação poderia reduzir a mobilidade celular através do *scaffold*. Por fim, o comportamento observado das amostras após o contato com fluido corporal simulado é favorável à engenharia de tecidos, uma vez que a arquitetura 3D não foi prejudicada, mantendo a capacidade de penetração celular, interconectividade para acesso a nutrientes e melhor disseminação celular.

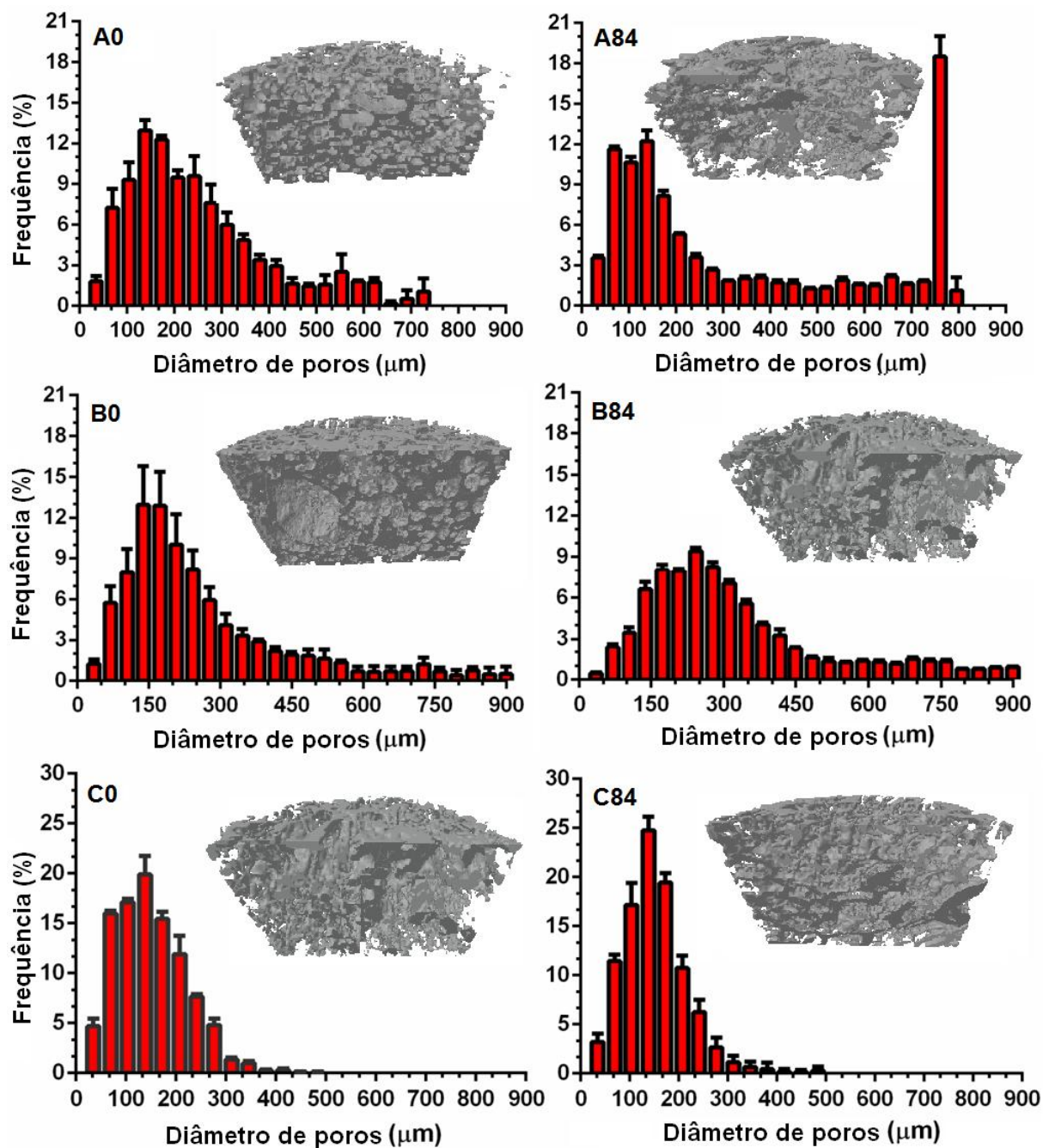


Figura 44: Distribuição do diâmetro do tamanho de poros obtida por micro-CT das espumas QU (A0); QU25VB (B0); QU50VB (C0) antes da imersão em SBF e QU (A84); QU25VB (B84); QU50VB (C84) após 84 dias de imersão em SBF.

6 CONCLUSÕES

A análise por MEV e a análise de micro-TC revelaram que ambos os materiais apresentaram alta porosidade.

A caracterização dos scaffolds demonstrou que o uso de vidro bioativo na espuma modificou a cristalinidade e promoveu uma reticulação física das espumas compósitas, refletindo no aumento da resistência à compressão.

A distribuição do tamanho dos poros foi outro fator que também influenciou as propriedades mecânicas.

A maior recuperação de forma das espumas compósitas, quando comparada com a espuma de quitosana pura, mostrou que as interações intermoleculares observadas no FTIR podem ser consideradas uma reticulação física.

O aumento da proporção de vidro bioativo na estrutura das matrizes modulou o comportamento de absorção, permeabilidade e transmissão de vapor d'água.

Os resultados confirmam que os biomateriais à base de quitosana e vidro bioativo permitem uma viabilidade celular aumentada, e uma maior atividade da fosfatase alcalina

Através de ensaio de degradação *in vitro* foi verificado que a presença do vidro bioativo na estrutura das espumas compósitas diminuiu os valores de perda de massa em meio aquoso.

As matrizes obtidas apresentaram características que as habilitam a estudos adicionais visando sua utilização em fins biomédicos, como curativos ou como um componente em sistema de cultivo celular.

7 TRABALHO FUTUROS

- Realizar ensaio de atividade antimicrobiana das espumas.
- Realizar ensaio com implantação das espumas *in vivo*, avaliando indução angiogênica, modulação da resposta inflamatória, crescimento e diferenciação celular e velocidade de cicatrização.
- Modificar a granulometria do vidro bioativo adicionado a amostra, testando materiais em escala nanométrica.
- Utilizar um vidro bioativo com incorporação de íons terapêuticos.
- Realizar ensaio mecânico em amostra dentro de meio fisiológico para simular a comportamento em situação mais próxima da real.
- Avaliar a degradação em meio enzimático, aproximando aos parâmetros dos processos que ocorrem *in vivo*.
- Avaliar a capacidade de incorporação e liberação de fármacos voltados para estimulação da cicatrização de lesões cutâneas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 491–495, 2011.
- AGRAWAL, S. L.; AWADHIA, A. DSC and conductivity studies on PVA based proton conducting gel electrolytes. **Bulletin of Materials Science**, v. 27, n. 6, p. 523–527, 2004.
- ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 401–414, 2008.
- ANDERSEN, S. R. et al. Ethylene oxide toxicity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 77, n. 2, p. 346–356, 1949.
- ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas - Estado da arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100–104, 2006.
- APARECIDA, A. H.; GUASTALDI, A. C.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento e caracterização de suportes porosos de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) para utilização como biomaterial para reposição e regeneração óssea. **Polímeros**, v. 18, n. 4, p. 277–280, 2008.
- BAINO, F. et al. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 15–30, 2016.
- BARRIONI, B. R. et al. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 22–30, 2015.
- BASKAR, D.; BALU, R.; KUMAR, T. S. S. Mineralization of pristine chitosan film through biomimetic process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 385–389, 2011.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35–52, 2004.
- BICHO, R. S. L. Desenvolvimento de estruturas porosas tridimensionais por moldação por congelamento (Freeze-Casting). 2012.
- BOMBARO, K. M. et al. What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns? **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 29, n. 4, p. 299–302, jun. 2003.
- BOTTINO, M. C. M. Estudo da osteointegração da liga ti-13nb-13zr obtida por metalurgia do pó com diferentes graus de porosidade. p. 150, 2005.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 12S–34S, jun. 2006.
- CAVALCANTI, O. A.; CÍCERI, L. Material De Acondicionamento E Embalagem Primário: Avaliação Da Permeabilidade Ao Vapor D'água. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 6, n. 1, 2002.

CERRUTI, M.; GREENSPAN, D.; POWERS, K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1665–1674, 2005.

CHEN, R. Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical, and release characteristics of the prepared capsule. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, n. 3, p. 141–148, nov. 1996.

CHOW, I.; LEMOS, E. V.; EINARSON, T. R. Management and prevention of diabetic foot ulcers and infections: a health economic review. **PharmacoEconomics**, v. 26, n. 12, p. 1019–35, 2008.

CORREIA, C. O.; LEITE, A. J.; MANO, J. F. Chitosan/bioactive glass nanoparticles scaffolds with shape memory properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 39–45, 2015.

COSTA, H. DE S. **Síntese, caracterização e avaliação do comportamento degradativo de híbridos poli (álcool vinílico)/vidro bioativo imersos em meio aquoso**. [s.l.] UFMG, 2010.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

COSTA-JÚNIOR, E. S. et al. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 472–481, 2009.

COSTA-JÚNIOR, 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**, v. 20, n. 2, p. 553–561, 2009.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings - a review. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, p. 22, dez. 2015.

DUTTA, P. K.; DUTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 1, p. 20–31, 2004.

DUTTA, P. K.; JOYDEEP, D.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, p. 20–31, 2004.

EL-HADI, A. et al. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. **Polymer Testing**, v. 21, n. 6, p. 665–674, 2002a.

EL-HADI, A. et al. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. **Polymer Testing**, v. 21, n. 6, p. 665–674, 2002b.

ETHRENBURG, L. et al. Evaluation of genetic risks of alkylating agents: Tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 24, n. 2, p. 83–103, 1974.

BEZERRA, A. M. Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. 2011.

FUCHS, J. R.; NASSERI, B. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. **The Annals of thoracic surgery**, v. 72, n. 2, p. 577–91, ago. 2001.

FUJISAWA, M. Perfil epidemiológico de crianças e adolescentes vítimas de queimaduras admitidos em centro de tratamento de queimados. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 15, n. 2, p. 74–79, 2016.

GABRIEL, V. Hypertrophic Scar. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 301–310, 2011.

GERHARDT, L.-C.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Materials**, v. 3, n. 7, p. 3867–3910, 6 jul. 2010.

GIBSON, L. J. Biomechanics of cellular solids. **Journal of Biomechanics**, v. 38, n. 3, p. 377–399, 2005.

GIBSON, L. J.; ASHBY, M. F.; HARLEY, B. A. **Cellular materials in nature and medicine**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

GILLETTE, R. L. et al. Effects of a bioactive glass on healing of closed skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1149–1153, jul. 2001.

GORUSTOVICH, A. A.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 2, p. 199–207, abr. 2010.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128–133, 2006.

HARLEY, B. A. et al. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 4, p. 463–474, 2007.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v. 4, n. July, p. 518–24, 2005.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. D. G. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. **Polímeros**, v. 20, p. 201–204, 2010.

HUNT, T. K.; HOPF, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. **Advances in skin & wound care**, v. 13, n. 2 Suppl, p. 6–11, 1988.

ISHIZAWA HIGUCHI, C. I.; UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE. **Hydrogel à base de chitosane-xanthane: une matrice pour l'inclusion et le relargage de médicaments = Chitosan-xanthan hydrogel: a matrix for the inclusion and the delivery of drugs**. [s.l.] Université de Sherbrooke, 2002.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322–337, 2011.

JONES, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 23, n. S, p. S53–S82, 2015.

- COSTA-JÚNIOR, E. S. Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. p. 133, 2008.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?** **Biomaterials**, 2006.
- KONTOU, E. et al. Physical and chemical cross-linking effects in polyurethane elastomers. **Colloid & Polymer Science**, v. 268, n. 7, p. 636–644, jul. 1990.
- KUMAR V, ABBAS AK, F. N. **Robbins & Cotran: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier: [s.n.].
- KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203–226, 2006.
- LAMKE, L.-O.; NILSSON, G. E.; REITHNER, H. L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. **Burns**, v. 3, n. 3, p. 159–165, 1977.
- LAMPMAN, P. et al. **INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY**. 4th. ed. Washington: Cengage Learning, 2009.
- LARRY, R.; HENCH, L. The story of Bioglass. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, p. 967–978, 2006.
- LEE, D. S. H.; PAI, Y.; CHANG, S. Effect of Thermal Treatment of the Hydroxyapatite Powders on the Micropore and Microstructure of Porous Biphasic Calcium Phosphate Composite Granules. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 04, n. 02, p. 114–118, 2013.
- LEE, J. W.; GARDELLA, J. A. **In vitro hydrolytic surface degradation of poly(glycolic acid): Role of the surface segregated amorphous region in the induction period of bulk erosion** **Macromolecules**, 2001.
- LULEVICH, V. et al. Single cell mechanics of keratinocyte cells. **Ultramicroscopy**, v. 110, n. 12, p. 1435–1442, 2010.
- LUZ, G. M. et al. Micropatterning of bioactive glass nanoparticles on chitosan membranes for spatial controlled biomineralization. **Langmuir**, v. 28, n. 17, p. 6970–6977, 2012.
- MAJI, K. et al. Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. v. 2016, 2016.
- MANSUR, H. S. et al. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1574–1583, 2009.
- 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**, v. 137, n. 1, p. 72–83, 2008.
- MAQUET, V. et al. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 66, n. 2, p. 335–46, 1 ago. 2003.

MATSUMURA, H. et al. Cones of skin occur where hypertrophic scar occurs. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 9, n. 4, p. 269–77, 2011.

MAYHALL, C. G. The epidemiology of burn wound infections: then and now. **Clinical infectious diseases** : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 37, p. 543–550, 2003.

MEHDIPOUR, M.; AFSHAR, A. A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass-chitosan composite coating. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 471–476, 2012.

MESEGUER-OLMO, L. et al. Biocompatibility and *in vivo* gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 3, p. 458–465, 5 set. 2002.

MIGUEZ-PACHECO, V.; HENCH, L. L.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 1–15, 2015.

MOREIRA, C. D. F. et al. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1207–1216, 2016.

MORI, N.; MORIMOTO, Y.; TAKEUCHI, S. Biomaterials Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip. **Biomaterials**, v. 116, p. 48–56, 2017.

MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 461–6, jan. 2010.

MURPHY, C. M.; O'BRIEN, F. J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. **Cell Adhesion & Migration**, v. 4, n. 3, p. 377–381, 28 jul. 2010.

MUTSAERS, S. E. et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 29, n. 1, p. 5–17, jan. 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995–1012, 2012.

NAKAZATO, H. et al. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level. **European journal of pharmacology**, v. 446, n. 1-3, p. 177–85, 20 jun. 2002.

NETO, C. G. T. et al. **Thermal analysis of chitosan based networks** **Carbohydrate Polymers**, 2005.

NISOLA, G. M. et al. Macroporous flexible polyvinyl alcohol lithium adsorbent foam composite prepared via surfactant blending and cryo-desiccation. **Chemical Engineering Journal**, v. 280, p. 536–548, 2015.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OGAWA, K. Effect of Heating an Aqueous Suspension of Chitosan on the Crystallinity

and Polymorphs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2375–2379, 1991.

OGAWA, K.; INUKAI, S. X-Ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 160, n. C, p. 425–433, 1987.

OKUYAMA, K. et al. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 3, p. 237–248, 2000.

OLIVEIRA, A. A. et al. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, 2013.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. DE M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais** : fundamentos e aplicações. [s.l.] Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2000.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 18, n. 1, p. 18–23, 2004.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 4th. ed. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2009.

PEI, A.; ZHOU, Q.; BERGLUND, L. A. Functionalized cellulose nanocrystals as biobased nucleation agents in poly(L-lactide) (PLLA) – Crystallization and mechanical property effects. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 5, p. 815–821, 2010.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. **Journal of biomedical materials research**, v. 28, p. 693–698, 1994.

PISHBIN, F. et al. Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Bioactive Glass/Chitosan Composite Coatings for Orthopaedic Implants. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 11, p. 8796–8806, 11 jun. 2014.

PRICE, G. H. et al. Alkaline Phosphatase in the Healing Burn Wound of the Rat1a2. v. 317, p. 312–317, 1979.

QUEEN, D. et al. The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. **Biomaterials**, v. 8, n. 5, p. 367–71, 1987.

RAVI KUMAR, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

REHMAN, I. et al. Analysis of surface layers on bioactive glasses. **Biomaterials**, v. 15, n. 10, p. 865–870, 1994.

REMPEL, L. C. T.; TIZZOT, M. R. P. A; VASCO, J. F. M. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Revista Bras. Queimaduras**, v. 10, n. 1, p. 3–9, 2011.

REZABEIGI, E.; WOOD-ADAMS, P. M.; DREW, R. A. L. Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 248–252, jul. 2014.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029–7032, 1999.

RUBIN, J. R. et al. Unna's boot vs polyurethane foam dressings for the treatment of venous ulceration. A randomized prospective study. **Archives of surgery (Chicago, Ill. :** **1960)** v. 125, n. 4, p. 489–90, abr. 1990.

SABREE, I.; GOUGH, J. E.; DERBY, B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions. **Ceramics International**, v. 41, n. 7, p. 8425–8432, 2015.

SADAHIRA, C. M. Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis de álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos. p. 76, 2007.

SANTOS, J. E. DOS. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. 2004.

SARABAH, S. Recent advances in topical wound care. **Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India**, v. 45, n. 2, p. 379–87, maio 2012.

SCHOUTEN, H. J.; NIEUWENHUIS, M. K.; VAN ZUIJLEN, P. P. M. A review on static splinting therapy to prevent burn scar contracture: Do clinical and experimental data warrant its clinical application? **Burns**, v. 38, n. 1, p. 19–25, fev. 2012.

SERNA, J.; VITALES, M. Dermatología. **Dermatologia Clinica**, v. 1, n. 1, p. 453, 2013.

SERRA, A. N. B. M. C. DO V. F. Atualização no tratamento local das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 2, p. 38–44, 2010.

SHAH, J. B. The history of wound care. **The journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 3, n. 3, p. 65–6, set. 2011.

SHALUMON, K. T. et al. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 571–576, 2011.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, p. 63–68, 1998.

SILVA, A. L. Nova abordagem no tratamento de lesões complexas: uso de matriz de regeneração dérmica. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 10, n. 2, p. 66–70, 2011.

SOUZA, V. M. **Ativos Dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação, para médicos e farmacêuticos**. São Paulo: Tecnopress: [s.n.].

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1135–1138, 18 nov. 2005.

SUN, H. et al. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1735–1740, 2006.

TANIGAWA, J.; MIYOSHI, N.; SAKURAI, K. Characterization of chitosan/citrate and chitosan/acetate films and applications for wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, n. 1, p. 608–615, 5 out. 2008.

THOMAS, S.; LOVELESS, P. A comparative study of the properties of twelve hydrocolloid dressings. v. 1997, 1997.

THOMAS, S.; YOUNG, S. Exudate-handling mechanisms of two foam-film dressings. **Journal of Wound Care**, v. 17, n. 7, p. 309–315, jul. 2008.

TILOCCA, A. Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, n. 33, p. 6848–6858, 2010.

TORRES, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 306–312, 2005.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911–918, 2004.

WATERS, M. D. et al. Alkaline in human activation and collagen in culture synthesis skin fibroblasts. v. 80, p. 170–174, 1973.

WU, P. et al. Water vapour transmission rates in burns and chronic leg ulcers: Influence of wound dressings and comparison with in vitro evaluation. **Biomaterials**, v. 17, n. 14, p. 1373–1377, 1996.

ZHANG, F. et al. Microwave synthesis and actuation of shape memory polycaprolactone foams with high speed. **Scientific reports**, v. 5, p. 11152, 2015.

ZHANG, R.; MA, P. X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. **Journal of biomedical materials research**, v. 45, n. 4, p. 285–93, 15 jun. 1999.

ZHITOMIRSKY, D. et al. **Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coatings with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications** **Journal of Materials Processing Technology**, 2009.

ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 510–525, set. 2010.