

## INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE ARCABOUÇOS POROSOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Tatiana Faria Pereira

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

Orientador(es): Rossana Mara da Silva Moreira Thiré. Marysilvia Ferreira da Costa.

Rio de Janeiro Março de 2009

## INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE ARCABOUÇOS POROSOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Tatiana Faria Pereira

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

Aprovada por:

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

Prof. Marysilvia Ferreira da Costa, D.Sc.

Prof. Glória Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. Cristiano Piacsek Borges, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL MARÇO DE 2009 Pereira, Tatiana Faria

Influência das Técnicas de Preparação nas Propriedades de Arcabouços Porosos de Poli(3hidroxibutirato) para Uso em Engenharia de Tecidos/ Tatiana Faria Pereira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XVIII, 93 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré. Marysilvia Ferreira da Costa.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 85 - 90.

Poli(3-hidroxibutirato).
Biomateriais.
Arcabouços Porosos.
Características Morfológicas I.
Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira et al. II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,
Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III.
Titulo.

Aos meus pais Thomáz e Fátima, aos meus irmãos Thiago e Juninho por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

#### AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter firme e ter me dado a família e os amigos que me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

Às Professoras Rossana Mara da Silva Moreira Thiré e Marysilvia Ferreira da Costa por terem me confiado este trabalho.

À FAPERJ pela bolsa de mestrado e a CAPES e ao PROCAD/CAPES pelo apoio financeiro.

À PHB Industrial S/A por ter fornecido à matéria-prima deste trabalho.

À Professora Dilma Alves Costa pela eterna orientação.

À Professora Glória Dulce de Almeida Soares e ao Professor Cristiano pela colaboração.

Ao Professor Sérgio Camargo por ter cedido espaço no Laboratório de Recobrimentos onde foi conduzida a maior parte dos experimentos.

Aos profissionais desta instituição em especial: Francisco (Secretaria), Carla, Adriana, Hugo, Manuel (MEV), Robson, Laércio e Roberto.

Aos amigos especiais do mestrado, Cris, Taíla, Jeremias, Dani, Geovânio, Maíra, Michelle, Rene, Rodrigo, Fernanda, Gabriel, Yaneth e Yency pelo carinho, apoio e pelos momentos de alegrias.

À todos que compartilham o Laboratório de Recobrimento, em especial Ricardo, Ricardo Nery, Marcopolo, Emanuel e Juliana.

Aos meus pais Thomáz e Fátima pelo amor e a dedicação.

Aos meus irmãos Thiago e Juninho por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus familiares por estarem sempre presentes na minha vida.

Às minhas amigas mais antigas: Claúdia, Roberta, Lívia, Gigi, Cinthya e Ana Paula pela amizade e por estarem comigo nos momentos de alegrias e pelo apoio nas dificuldades.

As amigas Marilia e Elizandra pela convivência, apoio e conselhos.

As minhas amigas Ana Paula (Miau), Carla, Bia, Roberta, Jana.

Aos amigos: Carlos, Vítor, Cristiano, Rod, Miguel, Marcos (Morto), Agustinho, Alan e o Kiko.

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

### INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE ARCABOUÇOS POROSOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Tatiana Faria Pereira

Março/ 2009

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré Marysilvia Ferreira da Costa

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho, foram avaliadas as técnicas de separação de fase induzida termicamente (TIPS), emulsificação e lixiviação de sal (LS) para preparação de arcabouços porosos de poli(3-hidroxibutirato) com aplicação potencial em engenharia de tecido. Em relação à técnica de TIPS, foi avaliada a influência do processo de resfriamento nas propriedades dos arcabouços. Enquanto que para emulsificação, foi estudado o efeito da concentração da solução de PHB e da fração volumétrica de fase aquosa (f) nas características finais dos arcabouços. A produção dos arcabouços por LS (técnica convencional) permitiu comparação entre as técnicas. Os arcabouços porosos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria, calorimetria diferencial de varredura e por ensaios mecânicos de compressão. Os arcabouços porosos apresentaram morfologia, tamanho de poros, porosidade e interconectividade distintas de acordo com a técnica empregada e dos parâmetros envolvidos na confecção dos arcabouços. Os arcabouços produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e f = 0,3 e 0,5 apresentaram maior módulo de compressão com o menor f. Arcabouços preparados por emulsões obtidas pela mistura do polímero em solvente:não solvente apresentou citocompatibilidade em condrócitos humanos. Enquanto, a técnica de LS produziu arcabouços com poros fechados e contendo resíduos de sal, o que tornou o material tóxico aos condrócitos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

### INFLUENCE OF FABRICATION TECHNIQUES ON PROPERTIES OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) SCAFFOLDS TO USE IN TISSUE ENGINEERING

Tatiana Faria Pereira

March/ 2009

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré Marysilvia Ferreira da Costa

Department: Metallurgy and Materials Engineering

In this work, the techniques thermally induced phase separation (TIPS), emulsion freezing/freeze-extraction and casting/particulate-leaching of poly(3hydroxybutyrate) scaffolds with potential application in tissue engineering were evaluated. In relation to TIPS, the influence of cooling process on the properties of scaffolds was investigated. While in relation to emulsion freezing/freeze-extraction, the effects of concentration of PHB solution and the volume fraction of the water phase (f) in the final characteristics of scaffolds were studied. The production of scaffolds by casting/particulate-leaching allowed making comparison among methods. The scaffolds were characterized by scanning electron microcopy, differential scanning calorimetry, termogravimetry and compressive mechanical tests. The scaffolds showed different morphology, size pore, porosity and interconnectivity as a function of the technique fabrication and the experimental parameters employed. The scaffolds produced by emulsion freezing using 10% (w/v) PHB solution presented higher compressive modulus with lower f. The scaffolds prepared by emulsion of PHB in solvent:non-solvent showed cytocompatibility in human chondrocytes. While the technique of LS produced scaffolds with closed pores. These materials presented toxicity to chondrocytes due to salt residues.

# ÍNDICE GERAL

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO & OBJETIVOS

<b>1.1.</b> Introdução1
<b>1.2.</b> Objetivos
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA
<b>2.1.</b> Engenharia de Tecido
<b>2.2.</b> Tipos de Células Utilizadas em Engenharia de Tecidos
2.3. Moléculas Bioativas7
2.4. Arcabouços para o Crescimento Celular
<b>2.4.1.</b> Requerimentos para os Arcabouços Poliméricos10
<b>2.5.</b> Polímeros Utilizados para Arcabouços Porosos15
<b>2.5.1.</b> Poliésteres Sintéticos Bioreabsorvíveis16
<b>2.5.2.</b> Polihidroxialcanoatos
<b>2.5.2.1.</b> Poli(3-hidroxibutirato)
<b>2.6.</b> Técnicas para Fabricação de Arcabouços Porosos
<b>2.7.</b> Lixiviação de Particulados e Evaporação de Solvente
<b>2.8.</b> Separação de Fase Induzida Termicamente (TIPS)

<b>2.8.1.</b> Tipos de Separação de Fase27									
2.8.2. Etapas de Fixação da Estrutura na Separação Líqu	ido-líquido 30								
<b>2.8.3.</b> Parâmetros que Influenciam a Morfologia de	os Poros								
<b>2.9.</b> Emulsificação									
<b>2.9.1.</b> Fatores que Afetam a Estabilidade da	Emulsão 35								
<b>2.9.2.</b> Parâmetros que Influenciam a Morfologia de	os Poros								
CAPÍTULO III – METODOLOGIA									
<b>3.1.</b> Materiais									
<b>3.2.</b> Preparo da solução de PHB	40								
<b>3.2.1.</b> Determinação da concentração da solução	de PHB								
3.3. Preparo da Emulsão pela Mistura do Polímero em Solvente:não-solvente 									
<b>3.4.</b> Preparo da Emulsão pela Adição de Solução Aquosa de Ácido Acético a Solução Polimérica									
3.5. Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Lix Sal	iviação de 42								

3.6. Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Separação de Fase
Induzida Termicamente (TIPS)43
<b>3.6.1.</b> Determinação do Ponto de Névoa ("cloud point")
3.7. Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Emulsificação
3.7.1. Preparo de Arcabouços de Emulsões Obtidas pela Mistura do Polímero em
Solvente:não-solvente45
<b>3.7.2.</b> Preparo dos Arcabouços a partir de Emulsões Obtidas pela Adição de
Solução Aquosa de Acido Acetico a Solução Polimerica
<b>3.8.</b> Caracterização dos Arcabouços Porosos de PHB46
<b>3.8.1.</b> Porosidade dos arcabouços porosos de PHB46
<b>3.8.2</b> . Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
<b>3.8.3</b> . Degradabilidade Térmica por Termogravimetria (TGA)47
<b>3.8.4.</b> Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)
<b>3.8.5.</b> Teste de Compressão48
3.8.6. Estudo da Degradação "in vitro" dos Arcabouços Porosos de PHB
3.8.7. Teste de Adesão de Condrócitos aos Arcabouços Porosos de PHB

### CAPÍTULO IV – RESULTADOS & DISCUSSÃO

<b>4.1.</b> Determinação do Ponto de Névoa50
<b>4.2.</b> Características Gerais dos Arcabouços Porosos de PHB51
<b>4.3.</b> Análise Morfológica por MEV dos Arcabouços Porosos de PHB53
<b>4.3.1.</b> Arcabouços Confeccionados pela Técnica de Emulsificação - Emulsão Preparada pela Adição de Solução Aquosa de Ácido Acético a Solução Polimérica
<b>4.3.2.</b> Arcabouços Confeccionados pela Técnica de Emulsificação - Emulsão Preparada pela Mistura do Polímero em Solvente:não-solvente
<b>4.3.3</b> . Separação de Fase Induzida Termicamente (TIPS)64
<b>4.3.4</b> . Lixiviação de Sal68
<b>4.4.</b> Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)70
<b>4.5.</b> Propriedades Mecânicas74
<b>4.6.</b> Estudo da Degradação " <i>in vitro</i> " de Arcabouços Porosos de PHB77
4.7. Teste de Adesão de Condrócitos aos Arcabouços Porosos de PHB80

### CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

5.1. Conclusões	. 82
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	.84

,	^	,	
CADITIII O VI	DEFEDENCIAS	RIRI IOCRAFICAS	85
CALLULO VI-	· KEFEKEIGCIAS	DIDLIUGKAFICAS	

ANEXO	1
-------	---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema que representa a engenharia de tecido (Adaptado de O'SHEAL &
MIAO, 2008)
Figura 2.2   Estrutura química: (a) poli(caprolactana), (b) poli(ácido lático), (c) poli(ácido glicólico)     poli(ácido glicólico)   e   (d) Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
Figura 2.3. Estrutura química genérica dos polihidroxialcanoato 19
Figura 2.4. Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato)
Figura 2.5. Diagrama de fase binário de um sistema polímero-solvente (Adaptado de YANG <i>et al.</i> , 2004)
<b>Figura 2.6.</b> Diagramas de fases para combinações de transições de fase. (a) separação líquido-líquido e vitrificação, (b) separação líquido-líquido e cristalização do polímero em diagrama de fase fora do equilíbrio. (Adaptado de WITTE <i>et al.</i> , 1996)31
Figura 3.1: Representação do aparato experimental para a determinação do ponto de névoa
Figura 4.1: Imagens das soluções de PHB 10% (p/v): (a) antes do início da turvação (b) visualização da turvação da solução a -25°C

**Figura 4.9.** Imagens de MEV dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal. Seção transversal (a), (b), (c), (d). Superfície superior (em contato com o ar) (e), (f). Superfície inferior (em contato com o molde de vidro) (g), (h)......68

Figura A.1. Curva de DSC do filme de PHB preparado com uma solução 10%......91

Figura A.2: Curva de DSC do arcabouço de PHB confeccionados pela técnica de
lixiviação de sal com uma solução 10%91
Figura A.3. Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão
utilizando solução de PHB 10% e f 0,392
Figura A.4: Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão
utilizando solução de PHB 10% e f 0,592
Figura A.5: Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão
utilizando solução de PHB 135% e f 0,593

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	2.1.	Propriedades	físicas	dos	polímeros	sintéticos	bioreat	osorvíveis
(BARBA	ANTI e	t al., 2005)	•••••					18
<b>Tabela</b> 2006)	2.2.	Propriedade	s do	poli	(3-hidroxibut	tirato) (N	MISRA	<i>et al.,</i> 21
Tabela 4	<b>I.1.</b> Por	osidade de arca	ıbouços p	oroso	s de PHB			52
<b>Tabela</b> aquecime	<b>4.2.</b> 7 ento	Fransições térr	nicas do	os arc	abouços de	PHB ob	tidas no	primeiro 70
<b>Tabela</b> segundo	<b>4.3.</b> Ti aqueci	ransições térmi mento	icas do :	filme	e dos arcat	oouços de	PHB obt	idas com
Tabela 4	<b>1.4</b> . Pro	opriedade mecâ	nica de c	compr	essão dos ar	cabouços c	onfeccion	ados pela
técnica d	le emul	sificação						75

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUÇÃO & OBJETIVOS**

#### 1.1 Introdução

A Engenharia de Tecidos é uma nova área tecnológica que visa reparar e/ ou regenerar tecidos danificados com o emprego de arcabouços de biomateriais combinados com células e fatores de crescimento apropriados (LORCAN *et al.*, 2006).

O seu desenvolvimento é motivado pelas limitações das estratégias tradicionais para a solução de problemas relacionados à perda ou mau funcionamento de um órgão ou tecido. O crescente aumento de pacientes que morrem na fila à espera de um doador compatível aliada aos efeitos colaterais dos remédios imunossupressores são as limitações do transplante de órgãos. É enorme o número de pessoas que necessitam da substituição de um órgão para sobreviver ou melhorar a qualidade de vida com aumento da população idosa, da estatística de acidentes de trânsitos e doenças. A transferência de tecidos de locais saudáveis para sítios doentes no mesmo paciente não substitui todas as funções dos tecidos originais e suportam o risco de complicações no local doador (SHIEH & VACANTI, 2005).

A engenharia de materiais está diretamente relacionada à engenharia de tecido no desenvolvimento de biomateriais para a produção dos arcabouços porosos, que forneçam estabilidade mecânica e uma organização tridimensional para as células aderirem, proliferarem, diferenciarem e secretarem matriz extracelular (ECM), viabilizando a reconstrução do tecido.

As propriedades dos arcabouços dependem principalmente do tipo de biomaterial e do processo de fabricação. Vários estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas, tais como metais, cerâmicos, polímeros e compósitos pela combinação destes materiais. (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005).

O polímero natural ou sintético degradável quando comparados com metais e cerâmicos oferecem a vantagem de serem produzidos sob diversas formas geométricas e

diferentes composições com ampla variedade de estruturas e propriedades (DOREMUS, 1992). A estrutura e propriedades dos arcabouços poliméricos tridimensionais são de importância crítica para a sua aplicação em engenharia de tecido. Os arcabouços precisam ser biocompatíveis, biodegradáveis com uma taxa de degradação ou reabsorção igual à formação de um novo tecido e propriedades mecânicas semelhante ao tecido no local da implantação (HUTMACHER, 2000).

Os polihidroxialcanoatos são poliésteres biodegradáveis e biocompativeis produzidos por vários microorganismos. O poli(3-hidroxibutirato) e os seus copolímeros com unidades 3-hidroxivalerato são os representantes mais estudados por serem produzidos em escala comercial.

As propriedades morfológicas, tais como elevada porosidade e interconectividade, são requeridas para aumentar a área superficial específica para a adesão e crescimento celular facilitando uma distribuição uniforme de células e para adequar o transporte de nutrientes e produtos residuais, sendo o tamanho dos poros específico para cada tipo celular (RANUCCI *et al*, 2000). Entretanto, uma porosidade muito elevada pode comprometer a integridade mecânica do biomaterial. Portanto, a porosidade do material deve ser adequada para promover o crescimento celular, mas levando em conta as propriedades mecânicas exigidas para o tecido que será formado.

Diversas técnicas são empregadas para a produção de arcabouços poliméricos porosos, entre elas estão técnicas de lixiviação de particulados, separação de fase induzida termicamente e emulsificação. A técnica de lixiviação de particulado com evaporação de solvente é comumente empregada para a formação de arcabouços porosos de polidroxialcanoatos (SADER, 2003, MENDONÇA, 2008). A quantidade e o tamanho das partículas de sal são parâmetros que controlam a porosidade e o tamanho dos poros, respectivamente. Porém a deficiência na interconectividade entre os poros, formação de poros irregulares, além da permanência de resíduos de sal nos arcabouços são desvantagens que motivam a escolha de outras metodologias que forneçam arcabouços com características morfológicas apropriadas (CAO *et al.*, 2006).

Na técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS), a determinação das características morfológicas dos arcabouços envolve princípios termodinâmicos. Esta técnica permite a obtenção de uma estrutura com elevada porosidade e poros interconectados quando aplicados parâmetros adequados, de acordo com a termodinâmica da solução polimérica (NAM *et al.*, 1999; CHEN & MA, 2005; YANG *et al.* 2004).

A técnica de emulsificação ("*emulsion freezing*") apresenta a formação de arcabouços com porosidade alta e interconectividade. Esta técnica é afetada pelos processos que promovem a desestabilização da emulsão (WHANG *et al.*, 1995; SULTANA & WANG, 2008). A associação destes processos com as características morfológicas dos poros é pouco relatada na literatura.

Uma grande vantagem da utilização da técnica de separação de fase induzida termicamente e da emulsificação na produção doa arcabouços está relacionada à possibilidade de adição de biomoléculas no procedimento de fabricação. Estas técnicas não expõem as moléculas bioativas a solventes orgânicos tóxicos e à temperatura que promoveriam a sua desnaturação (WHANG *et al*, 2000, CAO *et al.*, 2006). A associação de moléculas bioativas em arcabouços facilita a diferenciação celular e a regeneração do tecido, sendo um campo promissor para a produção de arcabouços porosos de polímeros sintéticos (O'SHEAL & MIAO, 2008).

#### 1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de diferentes técnicas para preparação de arcabouços porosos de poli(3-hidroxibutirato) com aplicação potencial em engenharia de tecido. Os arcabouços porosos de PHB foram produzidos por separação de fase induzida termicamente (TIPS) e emulsificação. A produção de arcabouços aplicando a técnica de lixiviação de sal foi realizada para permitir a comparação entre as técnicas.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar os parâmetros empregados nas técnicas TIPS e emulsificação nas características morfológicas dos arcabouços.
- ✓ Estudar as características morfológicas dos arcabouços confeccionados por emulsificação e lixiviação de sal com a degradação *in vitro*.
- ✓ Avaliar a influência das características finais dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal e emulsificação na adesão de condrócitos humanos *in vitro*.
- Analisar os parâmetros utilizados na técnica de emulsificação nas propriedades mecânicas de compressão dos arcabouços.
- Avaliar as propriedades térmicas dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal e emulsificação.

## **CAPÍTULO II**

## **REVISÃO DA LITERATURA**

#### 2.1 Engenharia de Tecido

A necessidade clínica de regenerar tecidos danificados por doenças degenerativas, traumas por acidentes ou mesmo a perda de órgãos ou de suas funções motivou o avanço no campo da engenharia de tecido, visto que um dos grandes problemas no transplante de órgãos está na deficiência de doadores e nos possíveis efeitos colaterais causados pelos medicamentos permanentes de agentes imunossupressores, que podem causar infecções e desenvolvimento de tumores (TABATA, 2005).

A engenharia de tecido é um campo multidisciplinar que envolve o conhecimento das áreas de saúde, de engenharia e de ciências dos materiais. Consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes do corpo defeituosas ou danificadas. Uma das descrições mais usadas define que a engenharia de tecido envolve a "aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida visando o entendimento fundamental das correlações envolvendo a estrutura e a função em tecidos de mamíferos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido" (ORÉFICE, *et al.* 2006).

Existem três abordagens em engenharia de tecido (MA, 2004)

- O uso de células isoladas para repor aquelas células que não fornecem a função necessária;
- A distribuição de substâncias indutoras de tecido, tais como fatores de crescimento e de diferenciação para alvos localizados;
- Crescimento de células em arcabouços tridimensionais

A vantagem do emprego de células isoladas é evitar complicações cirúrgicas. As desvantagens incluem a morte celular e a perda da função porque muitas células são

substrato-dependentes, crescendo somente quando estão ligados em um substrato. O uso de células isoladas ou substâncias indutoras é considerado quando os defeitos são pequenos e bem contidos (MA, 2004). A distribuição de substâncias indutoras de tecidos é dependente do desenvolvimento do sistema de distribuição para liberação de moléculas bioativas e a produção econômica em larga escala destes agentes. Para tecidos de tamanhos práticos e formas pré-determinadas, estas duas abordagens são severamente limitadas. O crescimento das células em arcabouços porosos tridimensionais é uma abordagem altamente promissora. Os arcabouços são substratos temporários com função de suporte e orientação para o crescimento celular, promovendo a formação do novo tecido (LUO *et al.*, 2007).

A abordagem da engenharia de tecido utilizando arcabouços porosos envolve a criação do tecido por transplantes de células removidas do próprio paciente, doadores compatíveis ou animais. Estas células são semeadas no arcabouço que serve como substrato e suporte físico para células isoladas. O uso de células do mesmo genótipo minimiza muitos problemas associados com a rejeição imune do tecido estranho. Como estas células são capazes de proliferação, um pequeno número delas pode ser expandido em uma massa celular suficiente para substituir a função de um órgão. Portanto, sem necessitar do sacrifício de um órgão inteiro do doador (ELLISSEF *et al.*, 2005)

A engenharia de tecido é favorecida com a associação de três elementos principais: arcabouços, células e moléculas bioativas (proteínas e fatores de crescimento), sendo combinadas em um meio biológico conveniente para promover a regeneração do tecido *in vitro* e *in vivo* (O'SHEAL & MIAO, 2008).



Figura 2.1: Esquema que representa a engenharia de tecido Adaptado (O'SHEAL & MIAO, 2008).

#### 2.2 Tipos de Células Utilizadas em Engenharia de Tecido

As células exibem um papel importante na regeneração dos tecidos devido a sua capacidade de proliferação e diferenciação, interação celular, produção biomolecular e formação da matriz extracelular. As células usadas em engenharia de tecido podem ser de origem autólogas, alogênicas e xenogênicas. As células autólogas são doadas pelo próprio paciente, as alogênicas são fornecidas por outro indivíduo e as xenogênicas são de origem animal (SHIEH & VACANTI, 2005).

As células doadoras ideais são multipotente capazes de diferenciar e transdiferenciar em uma variedade de células específicas de organismos e tecidos com função especializada e que tenham o mínimo de resposta imunológica. É importante que sejam obtidas facilmente e possam ser expandidas sem alteração da função e fenótipo (SHIEH & VACANTI, 2005).

Recentes avanços na biologia de células troncos tiveram um impacto marcante na engenharia de tecidos. As células tronco são capazes de diferenciar em várias linhagens celulares sendo grande promessa para o tratamento de tecidos cujas fontes celulares para a regeneração são limitadas ou não acessível facilmente. Embora estas células sejam úteis na medicina regenerativa, a ética e as questões legais estão ainda em debate (SHIEH & VACANTI, 2005).

#### 2.3. Moléculas Bioativas Empregadas em Engenharia de Tecidos

As biomoléculas empregadas em engenharia de tecidos são as proteínas, sendo classificadas em adesivas e fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são polipeptídios que transmitem sinais para modular as atividades celulares, atuando no estímulo ou na inibição da proliferação, migração e adesão celular, como também na expressão do gene (BABENSEE *et al.*, 2000).

Muitos tipos celulares podem produzir o mesmo fator de crescimento e o mesmo fator de crescimento pode agir em diversas linhagens celulares, promovendo efeitos iguais ou diferentes. Além de fatores de crescimentos diferentes poderem compartilhar o mesmo efeito biológico. A atuação de um fator de crescimento pode afetar a secreção e ação de outros. A função dos fatores de crescimento é iniciada pela ligação de receptores específicos na superfície de células alvos (BABENSEE *et al.*, 2000).

A integração de arcabouços com métodos de liberação-controlada de biomoléculas tem funções de promover a formação do novo tecido, estimular a angiogenêse, guiar a diferenciação celular e facilitar o processo de regeneração (LUO *et al*, 2007).

A associação de fatores de crescimento em arcabouços pode ocorrer mediante a utilização de dois sistemas potenciais de liberação. Os fatores de crescimento podem ser incorporados diretamente no processamento dos arcabouços ou após a fabricação deles. Em sistemas biodegradáveis, os fatores de crescimentos devem ser liberados à medida que os arcabouços estão sendo degradados, com o propósito de induzir a regeneração do tecido (BABENSEE *et al.*, 2000).

Para cada aplicação em engenharia de tecido, o(s) tipo(s) de fatores de crescimento empregados, a dosagem e a cinética de liberação devem ser avaliadas (BABENSEE *et al* 2000).. Alguns exemplos de fatores de crescimento empregados em engenharia de tecidos são: a BMP (proteína morfogênica do osso) com a função na diferenciação de células formadoras do osso, FGF (fator de crescimento de fibroblasto) promove o processo de cicratização e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) empregados em angiogenese terapêuticas (TESSMAR et al., 2007).

As proteínas adesivas são derivadas da matriz extracelular tal como fibronectina, laminina, vitronectina e colágeno. Estas proteínas são adicionadas com a intenção de promover a adesão celular e aumentar a ligação com a célula via interação liganteaceptor. Este bioreconhecimento ocorre visto que a fibronectina e outras proteínas adesivas possuem a seqüência de aminoácido RGD (Arg-Gly-Asp) que são reconhecidas pelas integrinas presentes na membrana celular (MA *et al.*, 2007).

#### 2.4. Arcabouços para o Crescimento Celular

Os arcabouços para o crescimento celular podem ser confeccionados por metais, cerâmicos, polímeros e pela combinação destes materiais (compósitos). Os materiais metálicos e cerâmicos são principalmente empregados em aplicações ortopédicas. Porém existem duas limitações principais: não são biodegradáveis exceto biocerâmicos e possuem baixa processabilidade (CHEUNG *et al.*, 2007). Os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são geralmente, fáceis de produzir e manusear, além de apresentarem características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos (BARBANTI *et al.*, 2005).

Os arcabouços porosos têm a função de guiar o desenvolvimento de um novo tecido, fornecendo uma estabilidade mecânica e uma organização tridimensional para as células aderirem, proliferarem, diferenciarem e secretarem matriz extracelular (ECM), viabilizando a reconstrução do tecido. A matriz extracelular que circunda as células do corpo não só suporta fisicamente as células como também regula sua proliferação, diferenciação e morfogênese (LANGER *et al.*, 1993).

Os arcabouços porosos podem ser usados com ou sem a semeação de células antes da sua implantação no corpo. Os arcabouços sem células servem para mimetizar a matriz extracelular (ECM) do corpo. Neste caso a regeneração do tecido depende do crescimento interno do tecido vizinho, num processo conhecido como indução (ELLISSEF *et al.* 2005).

A engenharia do tecido usando arcabouços semeados tem sido aplicada no estudo de tecido tal como fígado, vasos sangüíneos, nervos, pele, cartilagem e osso. Os desafios para esta abordagem incluem o projeto e fabricação de arcabouços porosos aptos para promover a adesão celular e suportar o crescimento proliferação e diferenciação destas células e a formação induzida do tecido natural (ELLISSEF *et al.* 2005).

Considerando de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais quanto do tipo de tecido e do reparo necessário, o primeiro passo para reconstrução de um órgão ou tecido visa à seleção do arcabouço para as células. A seleção leva em consideração o tipo, o local e a extensão da lesão, podendo seguir basicamente duas estratégias de aplicação quando preparados com materiais poliméricos degradáveis (BARBANTI *et al.*, 2005).

A primeira estratégia está relacionada com a engenharia de tecido *in vivo*, pelo qual o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o implante no organismo hospedeiro. O implante do conjunto polímero e células ocorre com um tecido prematuro formado e o polímero é remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação de um novo tecido e sua degradação completa (BARBANTI *et al.*, 2005).

A segunda estratégia está relacionada com a engenharia de tecido *in vitro*, em que o implante ocorre com o tecido maduro formado. O arcabouço polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam e secretam matrizes extracelulares durante a cultura do tecido *in vitro*, enquanto o polímero é degradado gradualmente, permitindo espaço para proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Os arcabouços poliméricos para aplicação em engenharia de tecido precisam estar adequados aos seguintes requerimentos:

- Biocompatibilidade;
- Bioatividade
- Propriedades mecânicas apropriadas;
- Controle na taxa de degradação
- Porosidade e tamanho de poros adequados
- Superfície química adequada
- Facilmente processado em geometrias tridimensionais
- Produto que possa ser esterilizado

#### 2.4.1. Requerimentos para os Arcabouços Poliméricos

#### • Biocompatibilidade e Bioatividade

A biocompatibilidade dos materiais exibe um papel importante na engenharia de tecido, a qual assegura que o material seja confiável para o uso no corpo humano e em fluidos endógenos. O material não deve induzir nenhuma resposta inflamatória, de extrema imunogeneticidade ou citotoxidade para células nativas, tecidos ou órgãos vivo. Os produtos resultantes do processo de degradação do implante não devem produzir algum material nocivo. Para projeto e desenvolvimento de arcabouços poliméricos, o requerimento básico é que eles sejam naturalmente degradados com o tempo e gradualmente absorvido pelo corpo humano sem gerar algum efeito lateral (CHEUNG *et al.*, 2007).

A bioatividade está relacionada à capacidade dos materiais de interagir com os tecidos vivos de tal modo a estimular processos físico-químicos inerentes aos sistemas biológicos que favoreçam a integração do biomaterial no ambiente receptor. São materiais que imitam o meio biológico para induzir uma resposta celular desejada, facilitando o cumprimento de sua tarefa (ORÉFICE *et al*, 2006).

A bioatividade do material exibe um papel muito importante na interação tecidobiomaterial e, conseqüentemente, no seu desempenho no organismo. A superfície do material logo após sua implantação sofrerá adsorção de proteína que pode ocorrer de maneira especifica e não-especifica. A adsorção não especifica de proteína está relacionada com a adsorção não controlada levando à quebra das estruturas conformacionais e resultando, assim, na perda de funcionalidade ou de um sítio ativo. As superfícies de biomateriais povoadas com proteínas que perderam a sua biofuncionalidade provocam uma resposta do organismo cuja finalidade está na eliminação do agente estranho ou a sua separação do corpo através da confecção de uma cápsula fibrosa (ORÉFICE *et al.* 2006).

Por outro lado, caso as proteínas que compõem o plasma sejam adsorvidas especificamente nas superfícies do biomaterial, ocorrerá o seu reconhecimento pelo organismo havendo a possibilidade de colonização da superfície por células que poderão proliferar e estimular a regeneração dos tecidos, fixação de implantes e provocar menor grau de inflamação (ORÉFICE *et al.* 2006).

#### Propriedades Mecânicas Apropriadas

Os arcabouços para a engenharia de tecido devem possuir propriedades mecânicas adequadas para suportar o carregamento fisiológico. Estes arcabouços temporários devem resistir às tensões interna e externa até a formação do novo tecido. É necessário que as propriedades mecânicas dos arcabouços sejam similares às propriedades do novo tecido gerado, com a finalidade de promover um suporte estrutural próprio no estágio de regeneração. No estagio posterior, todos os carregamentos devem ser totalmente transferidos para o novo tecido, visto que os arcabouços são degradados gradualmente (CHEUNG *et al.*, 2007).

Na interface tecido-implante com alto módulo, a tensão mecânica será na estrutura da matriz extracelular, resultando na ativação celular. Se tensionado excessivamente poderá ocorrer encapsulamento fibroso e inflamação. Em contrapartida se o material tem um módulo mais baixo que o tecido vizinho, a concentração de tensão será principalmente no implante, deixando o tecido protegido de alguma tensão externa. No entanto, o biomaterial pode exercer uma tensão pequena na vizinhança do tecido, causando atrofia, efeitos análogos aos causados pela baixa gravidade as quais astronautas estão submetidos. O cenário ótimo, portanto, é quando os módulos estão com valores muito próximos, resultando em transferência plana de tensão do implante para o tecido (HILBORN & BJURSYEN, 2007).

#### • Controle da Taxa de Degradação

A principal função dos arcabouços de polímeros biodegradáveis é a sua manutenção no local com as características físicas e propriedades mecânicas, assim como suportar a adesão, proliferação e diferenciação das células até a regeneração do tecido no local lesionado. Idealmente, a taxa de degradação dos arcabouços porosos deve ser igual à taxa de formação do novo tecido de modo a promover uma transição regular da transferência de carregamento do arcabouço para o tecido (CHEUNG *et al.*, 2007).

Alguns fatores que influenciam a taxa de degradação dos arcabouços poliméricos são: localização do implante, composição química e cristalinidade.

Se um arcabouço polimérico é implantado num local de alta vascularização, sua taxa de degradação será mais rápida em relação à região menos vascularizada, de funções passivas. Locais de grandes solicitações mecânicas também têm sido descritos como aceleradores da degradação (BARBANTI *et al.*, 2005).

A influência da composição química pode ser exemplificada pelo caso do poli(ácido lático) que, por ser uma molécula quiral, permite a síntese de compostos enantiômeros, dando origem a uma família de polímeros: poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) e seus copolímeros em diferentes proporções. Segundo Bendix. (1998), devido à distribuição aleatória das unidades D e L na cadeia polimérica, o polímero racêmico não possui domínios cristalinos, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas significativamente menores quando comparados ao semicristalino PLLA (BARBANTI *et al.*, 2005).

Da mesma forma o homopolímero de poli(3-hidroxibutirato) - PHB é cristalino, rígido e relativamente hidrofóbico, e como conseqüência, possui tempo de degradação maior que o copolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), que é mais flexível. Assim, manipulando as proporções e os polímeros utilizados, pode-se adequar o material ao tipo celular e ao tecido que se pretende tratar (ANDRADE, 2006)

#### Porosidade, Interconectividade e Tamanho de Poros Apropriados

Poros são necessários para a formação de tecido porque eles permitem a migração e proliferação das células assim como a vascularização. Por outro lado, uma porosidade elevada e de tamanho de poros muito grandes resultam na redução das propriedades mecânicas comprometendo a integridade estrutural dos arcabouços (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005).

Poros com diâmetros pequenos são preferíveis para produzir área superficial elevada por volume, contanto que o tamanho de poro seja maior que o diâmetro da célula em suspensão (tipicamente 10 µm). Os arcabouços porosos com estrutura porosa aberta são desejáveis nas aplicações em engenharia de tecidos para maximizar a adesão e crescimento celular, produção da matriz extracelular, vascularização e crescimento de tecido. Não existe consenso referente ao tamanho de poro ótimo para o máximo crescimento interno do tecido e/ou o crescimento celular ótimo, mas é geralmente aceito

que isto depende do tecido que é pretendido para restaurar/substituir. No caso da regeneração do osso, alguns autores defendem que o máximo crescimento interno do tecido é alcançado com uma faixa de tamanho de poro de 200 a 400  $\mu$ m, para outros de 100 a 150  $\mu$ m, ou de 100 a 350  $\mu$ m (GOMES, 2004). Poros para crescimento de fibroblasto são requeridos em tamanhos menores, em torno de 20  $\mu$ m e para regeneração de pele de mamífero são de aproximadamente 125  $\mu$ m (WHANG *et al.*, 1995)

O processo de regeneração de tecido e dos tipos de tecidos que serão formados pode ser afetado pelo tamanho dos poros, relacionado com o transporte celular e a vascularização. Arcabouços de hidroxiapatita com diâmetros de 90 - 120 µm associados com proteínas morfogênicas do osso induziram a formação de cartilagem acompanhada pelo desenvolvimento de tecido ósseo, enquanto que os arcabouços com diâmetros maiores (350 µm) induziram a formação diretamente do osso. Estas diferenças foram provavelmente ocasionadas por distinções na vascularização e na diferenciação celular (LUO *et al.*, 2007).

A interconectividade entre os poros é altamente desejável, visto que uma estrutura com poros interconectados aumenta as taxas de difusão no interior dos arcabouços e facilita a vascularização, melhorando o fornecimento de oxigênio e nutrientes, além da remoção do resíduo (GOMES, 2004). Arcabouços com interconectividade elevada podem apresentar deficiência no transporte molecular decorrente da sua baixa permeabilidade. A permeabilidade dos arcabouços está relacionada ao tamanho das aberturas contidas nas paredes dos poros, influenciando na facilidade do transporte molecular através da rede porosa. Além do tamanho das interconexões entre os poros e a porosidade dos arcabouços, a permeabilidade, também é afetada pelas características dos poros, relacionadas ao tamanho, orientação e distribuição (HO & HUTMACHER, 2006).

### • Superfície Química Adequada para Promover a Adesão, Proliferação e Diferenciação Celular

A natureza da superfície pode afetar diretamente a resposta celular e, conseqüentemente, pode influenciar a taxa e a qualidade da formação do novo tecido. A química da superfície, assim como a sua topografia, determina o tipo de proteínas que podem adsorver no biomaterial e como as células irão aderir, proliferar e se diferenciarem (BOYAN *et al.*, 1996).

A importância do processo de biorreconhecimento no comportamento celular levou ao desenvolvimento de duas estratégias principais na engenharia de superfície. Primeiramente, as propriedades superficiais dos materiais tais como composição química, hidrofilicidade/hidrofobicidade, carga e rugosidade entre outros são modulados para uma condição que as proteínas adsorvidas possam manter as suas bioatividades normais. Este método, entretanto, pode não induzir comportamentos celulares específicos devido à adsorção não especifica das proteínas. A segunda estratégia consiste da imobilização de certas biomoléculas na superfície do biomaterial para induzir resposta celular especifica (MA *et al.*, 2007).

A relação de hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície do biomaterial tem uma influência significativa na adsorção de proteínas no mesmo. Valores máximos de adesão de proteínas em biomateriais são encontrados quando a superfície está dotada com níveis intermediários de hidrofobicidade (ou hidrofilicidade). A presença de grupos químicos específicos na superfície de um biomaterial pode orientar e mesmo organizar o processo de adsorção de uma proteína especifica (ORÉFICE *et al.* 2006).

Uma das biomoléculas imobilizadas na superfície de biomateriais são as proteínas, sendo classificadas em adesivas e fatores de crescimento. As proteínas adesivas são derivadas da matriz extracelular tal como fibronectina, laminina, vitronectina e colágeno. Estas proteínas são adicionadas com a intenção de promover a adesão celular e aumentar a ligação com a célula via interação ligante-aceptor. Este bioreconhecimento ocorre visto que a fibronectina e outras proteínas adesivas possuem a seqüência de aminoácido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que são reconhecidas pelas integrinas presentes na membrana celular (MA *et al.*, 2007).

A topografia também faz parte das características da superfície do biomaterial que influencia no comportamento celular, afetando a adesão, a proliferação e o fenótipo. As superfícies mais rugosas facilitam a vascularização e melhoram o fornecimento de oxigênio e nutrientes, assim como a remoção de resíduos (CHEUNG *et al.*, 2007).

O processo para a regeneração do tecido ósseo é um exemplo da influência das características superficiais do biomaterial, tais como composição, energia e rugosidade, na formação do novo tecido. Superfície rugosa promove a formação óssea por favorecer a adesão das células do osteoblasto, enquanto que a superfície microtexturada modula a diferenciação e a função destas células (GREEN *et al*, 2002).

#### 2.5. Polímeros Utilizados para Arcabouços Porosos

Os polímeros empregados na confecção de arcabouços porosos podem ser de origem natural ou sintética, sendo degradáveis ou não degradáveis. Os polímeros degradáveis sintéticos, assim como poli(ácido lático) e policaprolactona, oferecem controle na estrutura química e propriedades físicas e mecânicas, tais como cristalinidade, hidrofobicidade, taxa de degradação. As macromoléculas naturais, tais como componentes da matriz extracelular e polissacarídeos, apresentam a vantagem do reconhecimento celular, porém possuem menor controle sobre as propriedades mecânicas, biodegradabilidade e consistência entre os lotes (MA & LANGER, 1999). Os polímeros naturais muito usados em aplicações na engenharia de tecido, incluem a fibrina, o colágeno, quitosana e alginato. Uma classe de biopolímeros produzida por microorganismos que tem atraído muita atenção para engenharia de tecido são os polihidroxialcanoatos.

Os polímeros são classificados com relação a sua forma de degradação em biodegradáveis, bioreabsorvíveis e bioabsorviveis. Os polímeros biodegradáveis devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Os polímeros bioreabsorvíveis apresentam a degradação através da diminuição de tamanho e são reabsorvidos *in vivo*, sendo eliminados por rotas metabólicas do organismo. A bioreabsorção reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação sem efeitos colaterais residuais (BARBANTI *et al.*, 2005).

Os polímeros bioabsorvíveis podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Estes polímeros podem ser bioreabsorviveis se suas macromoléculas são excretadas (BARBANTI *et al.*, 2005).

#### 2.5.1. Poliésteres Sintéticos Bioreabsorvíveis

O uso de polímeros sintéticos biodegradáveis como biomateriais é particularmente atrativo porque as suas propriedades físicas e mecânicas podem ser ajustadas variando a técnica de preparação e a estrutura molecular. Os polímeros sintéticos mais usados são: os poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA) e os seus copolímeros, policaprolactona (PCL) e o poli(ácido lático-co-glicólico) (CHEUNG *et al.*, 2007).

O PLA é um alfa poliéster muito usado em aplicações médicas e aprovado pela FDA (*Food and Drug Administrarion*) para aplicações no corpo humano. O ácido lático é uma molécula quiral existindo sob duas formas estereoisomérica que são separados em quatro polímeros distintos conhecidos como D-PLA, L-PLA, D,L-PLA e o meso-PLA. Os produtos formados com a degradação reduzem o pH local, aceleram a taxa de degradação do poliéster e induzem a reação inflamatória. PLA degrada numa taxa mais lenta que o PGA decorrente do seu caráter mais hidrofóbico, limitando a absorção de água e diminuindo a taxa de hidrólise (CHEUNG *et al.*, 2007).

O Poli(ácido glicolico) (PGA) é o poliéster alifático linear mais simples. É um polímero muito cristalino, possuindo um alto ponto de fusão e baixa solubilidade a solventes orgânicos. O PGA degrada rapidamente comparado com o PLA, num período que varia de quatro a doze meses. Os seus produtos de degradação são reabsorvidos naturalmente pelo corpo sendo esta uma propriedade importante para o seu uso como biomateriais. Em comparação com o PLA, o PGA tem elevada resistência à tração e módulo de elasticidade. As propriedades mecânicas do PLA e PGA são relativamente fracas para a confecção de arcabouços de elevada porosidade, limitando o uso deles na regeneração de tecido duro (CHEUNG *et al.*, 2007).

O PLGA é um copolímero formado de ácido lático e ácido glicólico, sendo o primeiro nas formas estereoisoméricas L-ácido láctico e L,D-ácido láctico. A taxa de degradação deste copolímero depende da razão de LA/GA, massa molecular, e a forma e estrutura da matriz. Portanto, o poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) na proporção 50/50 degrada em torno de 1-2 meses, enquanto a razão 75/25 em 4-5 meses e 85/15 em 5-6 meses. Estes copolímeros biocompatíveis são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administrarion*) para uso em humanos, possuindo boa processabilidade, que permite a fabricação de uma variedade de estruturas e formas, taxa de degradação controlável. O

PLGA apresenta boa adesão e proliferação celular, sendo candidatos em potencial para aplicação em engenharia de tecido (NAIR & LAURENCIN, 2007).

A policaprolactona (PCL) é um poliéster semicristalino, solúvel em uma ampla faixa de solventes orgânicos e com baixo ponto de fusão. Possui uma boa processabilidade e capacidade de formar misturas miscíveis com muitos polímeros. A taxa de degradação destes polímeros é lenta permitindo o seu uso na liberação controlada de drogas (NAIR & LAURENCIN, 2007). As suas características de biocompatibilidade, taxa de degradação e resistência mecânica são convenientes e compatíveis para aplicações ortopédicas (CHEUNG *et al* 2007). A **Figura 2.2** apresenta as estruturas químicas destes poliésteres e a **Tabela 2.1** suas propriedades físicas.



**Figura 2.2**: Estrutura química: (a) poli(caprolactana), (b) poli(ácido lático), (c) poli(ácido glicólico) e (d) Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

Polímero	Sigla	$Tg(^{o}C)$	Tm (°C)	Módulo de	Tempo de
				elasticidade	degradação
					(meses)
Poli(ácido	PGA	35-40	225-230	8,4	6-12
glicólico)					
Poli(l-ácido	PLLA	60-65	173-178	2,7	>24
láctico)					
Poli(D,L-	PDLLA	55-60	Amorfo	1,9	12-16
ácido láctico)					
Poli(L-ácido	PLGA	45-50 <sup>a</sup>	Amorfo	2,0	1-2
láctico-co-					
ácido					
glicólico					
Poli(e-	PCL		(-55)-(-60)	0,4	24-36
caprolactona)					

## **Tabela 2.1**: Propriedades físicas dos polímeros sintéticos bioreabsorvíveis(BARBANTI et al., 2005)

<sup>a</sup> valores para o copolímero 50/50, <sup>b</sup> até a completa bioreabsorção, Tg = temperatura de transição vitrea, Tm = temperatura de fusão

#### 2.5.2. Polihidroxialcanoatos

Os Polihidroxialcanoatos (PHAs) constituem uma classe de poliéster natural produzidos por microrganismos sob condições de crescimento fora do equilíbrio, na presença de excesso de fontes de carbono e limitações nas condições de nutrientes (exemplo: nitrogênio e fósforo). São armazenados em grânulos insolúveis em água no citoplasma celular. Os membros da família de PHAs podem ser homopolímeros de ácidos hidroxialcanóicos assim como copolímeros de dois ou mais destes ácidos. A composição dos monômeros dos PHAs é variável e pode ser manipulado através da
fonte de carbono usada e por mudanças nas condições de crescimento (MISRA *et al.*, 2006).

Estes polímeros pertencem a um dos maiores e mais fascinantes grupos de polímeros termoplásticos conhecidos, com mais de 100 diferentes tipos produzidos por uma variedade de monômeros. Os seus representantes mais comuns para aplicações médicas são o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e os copolímeros de PHB com unidades 3-hidroxivalerato (PHB3-V). Descobertas de novos homopolímeros e copolímeros de PHAs, constantemente aumentam os números de polímeros deste grupo, resultando na disponibilidade destes poliésteres com uma ampla faixa de estruturas químicas com diversas propriedades, incluindo materiais que se assemelham com polipropileno e outros que são elastômeros. Tipicamente, PHAs com grupos laterais pequenos são materiais cristalinos, enquanto PHAs com grupos laterais volumosos são elastoméricos. (WILLIAMS *et al.*, 1999)

No caso de copolímeros, alterações sistemáticas das propriedades físicas com a composição dos comonômeros aumentam a faixa de variabilidade pertencente a estes materiais. As diferenças nas propriedades também afetam o modo e a taxa de degradação em meio aquoso ou biológico (WILLIAMS *et al.*, 1999) A **Figura 2.3** representa a estrutura química genérica dos polihidroxialcanoatos.



R1, R2: grupos alquila (C1 –C13) x: 1,2,3,4 n: 100 – 3000

Figura 2.3: Estrutura química genérica dos polihidroxialcanoatos

Uma propriedade importante dos PHAs é a biocompatibilidade, no qual atrai muita atenção para aplicações biomédicas. Devido à variabilidade na composição dos PHAs, implantes feitos deste material apresentam propriedades físico-químicas diferentes e taxa de degradação variável no meio biológico, mantendo resistência mecânica por períodos de tempos curtos ou longos. Diversos relatos têm mostrado a aplicação de PHAs em filmes, suturas e outros produtos para ser usada em cirurgia, engenharia de tecido e farmacologia (MISRA *et al.*, 2006).

A realização de vários testes *in vivo* e *in vitro* mostra que estes polímeros são compatíveis com tecido ósseo e cartilagem, sangue e muitas linhagens celulares. Além disso, resultados de estudos *in vivo* têm demonstrado vários graus de biodegradabilidade e biocompatibilidade em contato com fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos isolados e colágenos (MISRA *et al.* 2006).

#### 2.5.2.1. Poli(3-hidroxibutirato)

O PHB é o membro mais simples e comum da família dos polihidroxialcanoatos, foi descoberto por Lemoigne em 1926. O PHB foi o primeiro polímero dos PHAs a ser usado em aplicações biomédicas. Este poliéster quando isolado do microrganismo apresenta cristalinidade na faixa entre 55 a 80 %. No entanto, as moléculas dentro da bactéria estão no estado amorfo e como inclusões insolúveis em água no citoplasma celular. Vários métodos de extração estão em desenvolvimento para preservar o estado nativo dos polímeros, e com isto, aumentar a aplicabilidade deste polímero em uso biomédico (MISRA *et al.*, 2006). A **Figura 2.4** representa a estrutura química do poli(3hidroxibutirato).



Figura 2.4: Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato).

Os cristais de PHB usualmente apresentam uma morfologia lamelar organizada em cristais finos e alongados ou em forma de esferulitos quando cristalizado a partir de soluções diluídas ou da massa fundida, respectivamente (MISRA *et al.* 2006). A espessura lamelar nos esferulitos é em torno de 50 Å e em cristais crescidos de soluções podem ser menores (BLOEMBERGEN & HOLDE, 1986).

O PHB é um material relativamente inflexível, duro e possui resistência à tração comparável a do polipropileno. Embora seja um poliéster termoplástico natural, o PHB possui tem propriedades mecânicas comparáveis com os poliésteres degradáveis produzidos sinteticamente, tal como o poli(ácido lático) (MISRA *et al.*, 2006). Porém, possui uma baixa taxa de degradação no organismo em comparação com os poliésteres sintéticos, presumidamente devido a sua elevada cristalinidade, que também promove uma maior fragilidade ao material (NAIR & LAURENCIN, 2007).

O PHB apresenta boa permeabilidade ao oxigênio, boa resistência aos raios ultravioleta, mas é pouco resistente a ácidos e bases. É solúvel em clorofórmio e em outros solventes hidrocarbonetos halogenados (ARKIN & BAKI, 2002)

As propriedades mecânicas deste polímero podem ser melhoradas pela adição de plastificantes e misturas com outros polímeros degradáveis com o objetivo de aumentar a flexibilidade e o alongamento na ruptura (MISRA *et al.*, 2006). As propriedades do PHB variam com as amostras devido à diferença na produção de microorganismo, técnicas de extração e métodos de preparação da amostra, por isso, encontra-se na literatura variação das propriedades numa ampla faixa, como apresentado na **Tabela 2.2**. Estas diferenças podem ser atribuídas à variação na massa molecular e na polidispersão dos polímeros extraídos. A massa molecular do PHB encontra-se numa faixa de 0,2 - 0,3 MDa, porém valores maiores que 20 MDa e menores que 0,013 MDa já foram reportados na literatura (MISRA *et al.*, 2006).

Temperatura de fusão (°C)	160 – 177
Temperatura de transição vítrea (°C)	-4 - 15
Resistência à tração (MPa)	15 – 40
Módulo de elasticidade em tração (GPa)	1.1 – 3.5
Cristalinidade (%)	55 - 80
Alongamento na ruptura (%)	1 – 6
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,243
Índice de polidispersão	1,9 – 2,1
Período de degradação	> 52 semanas
Ângulo de contato (°)	66

## **Tabela 2.2**: Propriedades do poli(3-hidroxibutirato)(MISRA et al., 2006)

O PHB tem apresentado excelente biocompatibilidade e ausência de toxicidade para células fibroblástica, condrócitos, osteoblastos, e regiões gastrointestinal de ratos. A decomposição deste polímero em ácido D-3-hidroxibutírico, que é um constituinte normal do sangue humano, evidencia a não toxicidade deste material (MISRA *et al.*, 2006).

A baixa taxa de degradação do PHB pode ser considerada uma vantagem para aplicações em engenharia óssea. Adicionalmente, o potencial piezoelétrico do PHB é considerado uma característica especial, por ser comparável com o osso natural. A recuperação e fortalecimento ósseo podem ocorrer por estimulação elétrica. Portanto, compósito de PHB pode ser empregado na engenharia óssea (FREIER, 2006)

Um estudo da degradação *in vitro* de filmes de PHB em solução tampão a temperatura de 37° C não resultou em perda de massa após 180 dias, mas foi observada diminuição da massa molecular após um período de indução de 80 dias. Este período de indução está relacionado com o tempo necessário para a água penetrar na matriz polimérica. Foi concluído que a hidrólise de poliéster microbial procede em duas etapas. Primeiro ocorre à cisão da cadeia aleatoriamente nas regiões amorfa e cristalina do polímero acompanhada de diminuição da massa molecular. A segunda etapa é caracterizada pela perda de massa, iniciada abaixo de uma massa molecular numérico médio (Mn) de aproximadamente 13000 Da (FREIER, 2006).

Uma aceleração da taxa de degradação de PHB é possível adicionando-se polímeros e plastificantes. Por outro lado, aditivos amorfos ou hidrofílicos levam a uma maior adsorção de água e aceleram a hidrólise. Por exemplo, a adsorção de água foi maior na mistura de PHB/PDLLA do que no PHB/PCL (ZHANG *et al.* 1995)

A degradação *in vivo* (diminuição da massa molecular) ou a reabsorção (perda de massa) de PHB apresentam controvérsias na literatura, referentes ao tempo em que estes eventos ocorrem. As razões para as divergências são provavelmente relacionadas ao uso de amostras feitas por várias tecnologias de processamento em formas diferentes (fibras, filmes, arcabouços porosos) e a incomparabilidade dos diferentes locais de implantação. Porém, inúmeras pesquisas confirmam que o PHB é um polímero completamente reabsorvível, com uma taxa de degradação comparável com poliésteres sintéticos que degradam lentamente, como PLLA de elevada massa molecular. A maior parte das pesquisas relacionadas com o tempo de reabsorção *in vivo* de PHB são estudos conduzidos em ovelhas que demonstram a reabsorção de implantes arteriais (contato com o sangue) após aproximadamente 30 meses (FREIER, 2006).

A perda de massa ou decomposição de PHB ocorre na etapa final da sua degradação, portanto, análises da massa molecular fornecem uma melhor percepção no perfil de degradação do que o simples acompanhamento da perda de massa (FREIER, 2006). Amostras de PHB implantadas subcutaneamente por um ano em ratos apresentaram uma diminuição da massa molecular de aproximadamente 70-85% do valor inicial.

Adicionalmente, um estudo comparativo da degradação *in vivo* do PHB e o seu copolímero PHB-3HV apresentou uma menor degradação do copolímero com o conteúdo de 3HV inferior a 10%. No entanto, a taxa de hidrólise torna-se comparável quando o conteúdo de 3HV atinge aproximadamente 20%. Estes resultados podem ser explicados pela pequena diminuição na cristalinidade do polímero com aumento do conteúdo de 3HV (FREIER, 2006).

A avaliação das propriedades mecânicas das misturas de PHB com PHB atático amorfo resultou na diminuição do módulo de elasticidade e um aumento da deformação na ruptura. A adição de PHB atático acelerou a degradação comparada com o PHB puro a 37 °C e 70°C, verificados através do teste de degradação *in vitro*, o que os autores atribuíram ao aumento da região amorfa e a diminuição da cristalinidade global (FREIER, 2006).

#### 2.6. Técnicas para Fabricação de Arcabouços Porosos

Uma variedade de técnicas é utilizada no processamento de arcabuços porosos tridimensionais de polímeros biodegradáveis. Os métodos convencionais incluem adesão de fibras, moldagem por fusão, lixiviação de particulados com evaporação de solvente, borbulhamento de gás, separação de fase, emulsão/liofilização entre outros. A técnica de eletrofiação é empregada na produção de arcabuços tridimensionais em forma de nanofibras e as tecnologias de prototipagem rápida possibilitam a fabricação de sólido com forma livre diretamente por um projeto auxiliado por computador (CAD) (CHEUNG *et al.*, 2007).

A escolha da técnica de fabricação dos arcabouços acarreta nas suas características morfológicas, relacionadas ao tamanho dos poros, porosidade e interconectividade. Além dos parâmetros empregados em cada técnica, também influenciar nas variações da estrutura porosa. A maioria das técnicas apresenta vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas na escolha do método para a fabricação dos arcabouços.

#### 2.7. Lixiviação de Particulados e Evaporação de Solvente

Esta técnica de preparo de arcabouços foi empregada, primeiramente por Mikos *et al.* (1993), tornando a metodologia mais comumente aplicada para confecção de arcabouços tridimensionais em engenharia de tecido. Este método envolve o uso de agentes porogênicos, podendo ser sais minerais (cloreto de sódio, bicarbonato de amônio) e partículas orgânicas (sacarose, esferas de parafina). Estes agentes porogênicos são adicionados à solução polimérica e a lixiviação destas partículas, após a evaporação do solvente, é responsável para a formação dos poros. É uma técnica simples e permite relativamente bom controle das características morfológicas dos arcabouços, sendo a porosidade controlada pela quantidade de sal adicionado e o tamanho dos poros pelo tamanho dos cristais. Porém, esta técnica possui algumas desvantagens relacionadas à formação de poros com formato irregular, a permanência de resíduos de agentes porogênicos após o processo de lixiviação e a baixa

interconectividade entre os poros, afetando o crescimento celular nestes arcabouços (CAO et al., 2004).

MENDONÇA (2008) aplicou esta técnica no desenvolvimento de arcabouços de PHB usando clorofórmio como solvente e cloreto de sódio como agente porogênico. O tamanho dos poros ficou compreendido dentro de uma faixa de 75 a 135  $\mu$ m, correspondendo à faixa granulométrica das partículas de sal empregadas. Estes arcabouços mostraram-se biocompatíveis com osteoblastos humanos.

Amostras de arcabouços porosos de PHB empregando 90 % de cloreto de sódio com uma faixa granulométrica 38 - 53 µm foram estudas pela análise térmica de termogravimetria (TGA) com o objetivo de detectar e quantificar resíduos do agente porogênico no arcabouço após a etapa de lixiviação em água destilada por 48 h. O resultado mostrou que 1,1% de sal não foram removidos no processo de lixiviação (SADER, 2003).

A associação desta técnica com outros métodos pode ser aplicada para melhorar a morfologia da estrutura porosa e aumentar a interconectividade dos poros.

ZHANG et al. (2005) desenvolveram arcabouços porosos associando a técnica de moldagem por compressão no método de lixiviação de sal, usando como agentes porogênicos cloreto de sódio ou esferas de parafina. As amostras que utilizaram cloreto de sódio foram imersas em água para a lixiviação deste sal. A remoção das esferas de parafina foi feita através do uso do extrator Soxhlet com n-pentano com refluxo por 24 h. Os parâmetros empregados nas técnicas de fabricação influenciaram a morfologia dos arcabouços porosos. O emprego de agentes porogênicos diferentes promoveu a obtenção de poros com formas, tamanhos e porosidades distintos. Os poros se apresentaram na forma dos seus respectivos agentes porogênicos, influenciando na interconectividade da estrutura do arcabuço. Os arcabouços que foram confeccionados empregando esferas de parafina apresentaram uma estrutura porosa bem interconectada com tamanho dos poros em torno de 100 µm. Enquanto, os arcabouços que utilizaram partículas de sal exibiram baixa interconectividade entre os poros (ZHANG et al., 2005). Além disso, os arcabouços apresentaram porosidades diferentes, utilizando o mesmo peso de agente porogênico devido às diferenças nas densidades dos mesmos. A avaliação das propriedades mecânicas de materiais com porosidades semelhantes revelou que os macroporos esféricos apresentaram-se mais forte do que os irregulares e não esféricos (ZHANG et al., 2005).

SUN *et al.* (2005) prepararam arcabouços porosos de PHBV usando a técnica de lixiviação de sal associado à moldagem por compressão e processamento térmico. O cloreto de sódio, usado como o agente porogênico, foi misturado ao polímero, que foi moldado por compressão em discos, empregando uma pressão de 10MPa e temperatura de 180°C por dez minutos e, em seguida, imersos em água deionizada por 72 h a temperatura ambiente, para a lixiviação do sal. Os arcabouços foram secos a vácuo. Esta técnica permitiu a formação de arcabouços com macroporos abertos e interconectados, cujo tamanho ficou na faixa de 30-300µm e porosidade de 80 %.

#### 2.8. Separação de fase induzida termicamente (TIPS)

A técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) de soluções poliméricas foi primeiramente empregada para fabricação de membranas sintéticas. Recentemente o TIPS tornou-se um processo também utilizado para a confecção de arcabouços porosos para aplicação em engenharia de tecido. A preparação de uma estrutura porosa via separação de fase induzida termicamente consiste no resfriamento da solução polimérica numa temperatura que promova a separação de fase que pode ser líquido-líquido ou sólido-líquido, sendo a morfologia dos poros baseada em princípios termodinâmicos. A finalização do processo ocorre com a remoção do solvente dando origem aos poros (HEIJDEN, 2001).

A estrutura porosa é formada no estágio da separação de fase, após a remoção do líquido ou solvente congelado o espaço, primeiramente, ocupado pelo solvente origina a estrutura porosa nos arcabouços. Durante a saída do solvente, o polímero envolto com solvente deve apresentar-se rígido o suficiente para impedir o colapso dos poros e, consequentemente manter a estrutura porosa (HO *et al.*, 2004).

O liofilizador, geralmente é empregado na etapa de remoção do solvente, consiste de um equipamento que funciona com vácuo e temperaturas baixas, permitindo saída do solvente por sublimação, sem ocorrer à desintegração e colapso da estrutura porosa. A temperatura aplicada no liofilizador deve ser baixa o suficiente para que a região rica em polímero não dissolva e possua tensão mecânica adequada para impedir o colapso dos poros durante a secagem (HO *et al.*, 2004).

Um processo que pode substituir o emprego do liofilizador é o processo de *freeze-extraction* que consiste da troca do solvente por um não solvente ocorrendo em

uma temperatura abaixo do ponto de congelamento da solução polimérica. Neste processo, o espaço primeiramente ocupado pelo solvente será substituído pelo não solvente, consequentemente o polímero não dissolverá quando submetido à secagem a temperatura ambiente para a remoção do não solvente originando os poros (HO *et al.* 2004).

A escolha do não solvente a ser empregado no processo de *freeze-extraction* está relacionada com a sua temperatura de congelamento e a miscibilidade. O não solvente deve possuir temperatura de congelamento menor que a solução polimérica e apresentar miscibilidade com o solvente (HO *et al.*, 2004).

As vantagens desta técnica estão relacionadas à sua capacidade de produzir estrutura com elevada porosidade e poros interconectados empregando parâmetros apropriados. Além de permitir a incorporação de moléculas bioativas no seu processamento sem ocorrer a sua desnaturação (CAO *et al.* 2006). As alterações nos parâmetros possibilitam a formação de arcabuços com tamanhos e formas variadas.

Os parâmetros que influenciam a morfologia dos poros são:

- Processo de resfriamento: temperatura, taxa e intervalo de tempo;
- Concentração do polímero, massa molecular do polímero, composição do solvente;
- Adição de aditivos.

#### 2.8.1. Tipos de Separação de Fase

• Separação Líquido-líquido

Na separação líquido-líquido, a temperatura da solução polimérica é diminuída para dar origem a duas fases, uma fase com concentração elevada de polímero (denominada fase rica em polímero) e a outra com baixa concentração de polímero (denominada fase pobre em polímero). O solvente presente na fase pobre em polímero é removido mais tarde por extração, evaporação ou sublimação (CHEN & MA, 2005).

A **Figura 2.5** apresenta o diagrama de fase binário de um sistema polímerosolvente. A separação de fase líquido-líquido ocorre por dois mecanismos, de acordo com a localização da composição no diagrama da solução polímerica: nucleação e crescimento e decomposição espinodal (CHEN & MA, 2005).



Figura 2.5: Diagrama de fase binário de um sistema polímero-solvente Adaptado (YANG *et al.*, 2004)

O diagrama de fase binário de um sistema polímero-solvente é composto pela curva binodal e espinodal. Os mecanismos de separação líquido-líquido ocorrem em duas regiões caracterizadas termodinamicamente, e separadas pelo envelope espinodal. O mecanismo de nucleação e crescimento ocorre entre as curvas binodal e espinodal, na região termodinamicamente metaestável. Na temperatura abaixo da curva espinodal, região instável, a separação líquido-líquido ocorre através do mecanismo de decomposição espinodal. A linha reta tracejada abaixo das curvas binodal e espinodal é a curva do ponto de congelamento que corresponde à separação sólido-líquido (YANG *et al.*, 2004).

O mecanismo de nucleação e crescimento ocorre de maneiras diferentes, de acordo com a concentração polimérica. Na região metaestável de mais baixa concentração de polímero, gotículas de fase rica em polímero são formadas e dispersas numa matriz de fase pobre de polímeros, enquanto que na região de concentração de polímero elevada, gotículas da fase pobre em polímeros são formadas na matriz da fase rica de polímero (**Figura 2.5**) (CHEN & MA, 2005).

A estrutura do material, após a remoção do solvente, depende do mecanismo e da região, que procederá a separação líquido-líquido. No caso da nucleação e crescimento, o material será em forma de pó quando o mecanismo de nucleação e crescimento ocorrer em concentrações abaixo do ponto crítico (ponto de interseção do envelope binodal e espinodal), e apresentará uma estrutura com poros fechados, em concentrações acima deste ponto. Na região instável do diagrama de fase, relacionada ao mecanismo de decomposição espinodal, ocorre a formação de um arranjo bicontínuo, no qual ambas as fases pobre e rica em polímeros estão completamente interconectadas, dando origem, portanto, a uma estrutura formada por microporos interconectados (CHEN & MA, 2005, MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2006, WITTE et al., 1996)

Para a fabricação de matrizes com estrutura porosa controlada por separação de fase líquido-líquido, é requerida a escolha do solvente com um ponto de congelamento mais baixo que temperatura de separação de fase da solução polimérica. A adição de um não solvente pode ser empregada para induzir a separação líquido-líquido (NAM *et al.*, 1999, HUA *et al.*, 2003, KIM *et al.*, 2004, SHIN *et al.*, 2005).

Arcabouços preparados com solução de PLGA na concentração 9% (p/v) em dioxano/água empregando temperaturas de resfriamentos diferentes apresentaram morfologias distintas relacionadas com o mecanismo de separação líquido-líquido atuante. Quando a solução foi resfriada a uma temperatura ligeiramente abaixo da temperatura do ponto de névoa, caracterizada pelo início da turbidez da solução, foi observada uma estrutura com poros pequenos, com o aumento do tempo de resfriamento uma estrutura não uniforme com poros atingindo tamanhos de 20 µm foi produzida. Esta morfologia, provavelmente, foi decorrente do mecanismo de nucleação e crescimento da fase pobre em polímero. Com a diminuição da temperatura, poros abertos foram obtidos logo no início do estágio de separação de fase, sendo uma característica morfológica referente ao mecanismo de decomposição espinodal (HUA *et al.,* 2003).

#### • Separação Sólido-líquido

Para um sistema onde a temperatura de congelamento do solvente é mais alta que a temperatura de separação de fase liquido-liquido, com a diminuição da temperatura, ocorrerá à separação de fase sólido-líquido (**Figura 2.5**). Neste processo, o solvente é cristalizado e o polímero é expelido da face de cristalização do solvente. Após a remoção do solvente, os poros formados têm morfologia similar à geometria dos cristais de solvente. Dependendo da escolha do solvente e das condições de separação de fase, pode ocorrer a formação de uma estrutura porosa randômica ou orientada (CHEN & MA, 2005).

Para arcabouços com a arquitetura dos poros formadas aleatoriamente, a solução polimérica é resfriada rapidamente na temperatura que ocorra a cristalização do solvente induzindo a separação sólido-líquido. Embora, um gradiente de temperatura não seja intencionalmente aplicado neste sistema de separação de fase, um gradiente local da superfície para o centro das amostras pode promover a formação de uma estrutura porosa com canais que são paralelos ao gradiente de temperatura e possui divisões repetitivas com espaçamento perpendicular uniforme a direção de solidificação (CHEN & MA, 2005).

A formação de arcabouços com a estrutura dos poros orientada é promovida quando a separação de fase é realizada sob gradiente de temperatura uniaxial. A transferência de calor na direção longitudinal pode ser induzida quando o molde, com as paredes isoladas, contendo a solução polimérica é colocado num bloco de metal no processo de resfriamento e a estrutura tipo escada (*ladder-like*) pode ser evitada com o emprego de baixas concentrações de soluções poliméricas (CHEN & MA, 2005).

Arcabouços preparados com uma solução polimérica de PLGA em dioxano foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e após a remoção do solvente apresentaram características morfológicas referentes, provavelmente, ao mecanismo de separação de fase sólido-líquido, no qual a cristalização preferencial do solvente ocorreu dominantemente na direção da transferência de calor. Estruturas distintas foram formadas com o emprego de soluções poliméricas com concentrações diferentes, sendo apresentadas estruturas em forma de contas, do tipo escada e tubulares quando empregadas soluções poliméricas 4, 6 e 9 % p/v, respectivamente (NAM *et al.*, 1999).

#### 2.8.2. Etapas de Fixação da Estrutura na Separação Líquido-líquido

A etapa de fixação pode ser atingida por cristalização, vitrificação ou gelificação da fase rica em polímero.

A vitrificação é um processo de fixação da estrutura da matriz polimérica que ocorre quando a fase rica em polímero atinge a transição vítrea (**Figura 2.6a**). É promovida pela continuidade do resfriamento após a separação de fase líquido-líquido. No ponto de interseção da curva de transição vítrea do polímero na solução e a curva binodal (curva do ponto de névoa para polímeros polidispersivos) ocorre a vitrificação da fase rica em polímero (WITTE *et al.*, 1996).

A transição vítrea de um polímero ocorre na temperatura que cessa a mobilidade segmental das cadeias. A temperatura de transição vítrea é reduzida com a presença de solvente, ocorrendo a vitrificação da solução polimérica a uma determinada composição, característica do sistema.

A fixação da estrutura formada pela separação de fase líquido-líquido pode ocorrer por cristalização do polímero. Quando a solução polimérica envolve um polímero semicristalino, a separação de fase torna-se significativamente mais complicada devido o potencial do polímero cristalizar. A separação de fase líquido-líquido, geralmente é favorecida cineticamente com relação à cristalização do polímero. A fase rica em polímero estará apta a cristalizar, quando a solução é resfriada em temperaturas abaixo do ponto de interseção da curva de cristalização e da separação líquido-líquido, fixando a estrutura (**Figura 2.6b**). As características morfológicas da estrutura podem ser influenciadas por processos de cristalização (CHEN & MA, 2005, WITTE *et al.*, 1996).

Em algumas soluções, a separação de fase liquido-liquido pode ser combinada com a gelificação durante o processo de resfriamento. Neste processo, a solução polimérica inteira solidifica dentro de um gel, uma rede de cadeias poliméricas reticuladas fisicamente com solvente preso dentro da rede. Em uma solução polimérica semicristalina, a conexão de aglomerados de pequenos cristais pode exibir um papel chave para a formação de gel. A estrutura altamente porosa é obtida pela remoção do solvente do gel (CHEN & MA, 2005).



**Figura 2.6:** Diagramas de fases para combinações de transições de fase. (a) separação líquido-líquido e vitrificação, (b) separação líquido-líquido e cristalização do polímero em diagrama de fase fora do equilíbrio. Símbolos: M: curva de equilíbrio da depressão do ponto de fusão, C: curva de cristalização.

Adaptado (WITTE et al., 1996)

#### 2.8.3. Parâmetros que Influenciam a Morfologia dos Poros

#### • Processo de Resfriamento (Temperatura e Tempo)

Os mecanismos de nucleação e crescimento ou decomposição espinodal, ilustrados na **Fig. 2.5**, ocorrem no primeiro estágio da separação de fases. Em um estágio mais avançado ou quando a solução polimérica é mantida a uma temperatura abaixo do ponto de névoa por um intervalo de tempo, observa-se a coalescência contínua das gotículas das fases separadas, minimizando a energia livre interfacial. Este efeito, denominado de *coarsenig* (crescimento), é induzido por um diferencial de tensão interfacial exercida entre os domínios das duas fases separadas (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2006, NAM *et al.*, 1999). O processo *coarsening* promove o aumento do tamanho de poros, porém, concomitantemente tende a gerar poros mais fechados (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2006). É considerado, portanto, um parâmetro cinético para o controle na morfologia dos poros. Uma vez que a obtenção de uma estrutura celular aberta com poros grandes é um parâmetro crítico para a semeadura de células e para a neovascularização in vivo, é importante otimizar os diversos parâmetros envolvidos na técnica de TIPS a fim de controlar o efeito de *coarsenig*.

O efeito do processo de *coarsening* nas características morfológicas do material foi avaliado em membranas preparadas com uma solução 15% (p/v) de poliestireno em ciclohexanol. As membranas foram submetidas ao resfriamento empregando temperaturas de 70 e 81°C por períodos de um minuto e uma hora, antes do seu congelamento rápido com nitrogênio líquido. A utilização da temperatura de 81°C, ligeiramente abaixo do ponto de nevoa (81,5 °C), não apresentou mudanças significativas do tamanho dos poros com os períodos de 1 min e 1 h, sendo de aproximadamente de 2  $\mu$ m e 3  $\mu$ m, respectivamente. Quando a temperatura de resfriamento foi menor houve aumento expressivo no tamanho dos poros com o tempo de *coarsening*. Foi observado que os resfriamentos a 70°C por 1 min e por 1 h levaram a formação de poros com tamanhos em torno de 5  $\mu$ m e 60  $\mu$ m, respectivamente (SONG & TORKELSON, 1995).

Arcabouços porosos confeccionados com uma solução polimérica de PLGA em 1,4-dioxano/água foram submetidos à temperatura de 4°C por períodos de tempos

diferentes antes de serem submetidas ao nitrogênio por uma hora, a fim de avaliar o efeito deste parâmetro na morfologia dos arcabuços porosos. Foram obtidas estruturas com poros na faixa de 1–10  $\mu$ m e o aumento no tempo do resfriamento acarretou aumento no tamanho dos poros e a obtenção de estruturas celulares mais fechadas (NAM *et al.*, 1999).

HUA *et al.* (2003) produziram arcabouços porosos de PLGA também usando o sistema 1,4-dioxano/água. Quando foi empregada uma temperatura de têmpera de 19° C, antes do congelamento com nitrogênio líquido, os tamanhos de poros obtidos foram inferiores a 20 µm, sendo os maiores apresentados no intervalo mais amplo de tempo que foram submetidas a esta temperatura, porém ocorreu o fechamento dos poros e a formação de uma estrutura irregular. Com a diminuição da temperatura de têmpera (3°C) foi possível obter poros maiores de 150 µm empregando os mesmos tempos e solução polimérica.

A morfologia dos arcabouços preparados com uma solução 9% (p/v) de uma mistura polimérica PLGA/PLLA na proporção 1:1, apresentou poros com tamanhos maiores com o emprego de temperatura mais baixa e maior intervalo de tempo de resfriamento antes de serem submetidas ao nitrogênio líquido. Porém os poros apresentaram-se fechados e com pouca interconectividade (SHIN *et al.*, 2205).

O aumento do tempo de resfriamento no preparo dos arcabouços com uma solução 9 % (p/v) PLGA em dioxano/água promoveu o aumento do tamanho dos poros, decorrente do processo *coarsening*, porém acarretou no fechamento dos poros e formação de uma estrutura irregular (HUA *et al.*, 2003).

#### • Concentração Polimérica

A concentração da solução polimérica está diretamente relacionada com o mecanismo envolvido na separação de fase líquido-líquido. A separação ocorre pelo mecanismo de nucleação e crescimento de gotas da fase pobre em polímero quando a composição original da solução esta localizada em concentrações poliméricas acima do ponto crítico (ponto de interseção da curva binodal e espinodal). Enquanto ocorre a separação por nucleação e crescimento de gotas da fase rica em polímero quando a concentração polimérica está abaixo do ponto crítico. Após a formação da gota, o seu crescimento ocorre devido a gradiente de concentração para a gota. Soluções

poliméricas resfriadas abaixo da curva espinodal são instáveis. (**Figura 2.5**). Todas as flutuações na composição resultam na diminuição na energia livre e disparam uma onda de flutuações através da solução polimérica. A amplitude das flutuações aumentará decorrente ao movimento das moléculas de regiões de baixa concentração para regiões de elevada concentração. A decomposição espinodal procede via formação de estruturas bicontinuas, em que a fase rica e pobre em polímero estão completamente interconectadas (WITTE *et al.*, 1996).

NAM *et al.*, (1999) confeccionaram arcabouços de PLLA nas concentrações 10 % p/v e 15% p/v em dioxano/água foram confeccionados empregando no primeiro resfriamento uma temperatura 5° C abaixo do ponto de névoa por 1 minuto antes de serem submetidas à temperatura de gelo seco/etanol. Os resultados apresentaram uma estrutura multimodal composta por tamanhos de poros grandes superior a 100  $\mu$ m e microporos para os arcabuços de PLLA. Os polímeros com concentração de 15 % p/v apresentaram os poros com formas arredondadas mais bem definidas.

#### Adição de Aditivos

KIM *et al.*, (2004), estudaram a influência do emprego do dibloco polietilenoglicolpoliácido láctico (PEG-PLLA) na morfologia dos arcabuços porosos de uma solução polimérica de PLLA numa mistura de 1-4 dioxano/água (87/13). O processo de resfriamento foi realizado empregando uma temperatura de 30°C por 1 h, antes das amostras serem congeladas com nitrogênio líquido. Os arcabouços somente preparados com solução de PLLA apresentaram macroporos irregulares, decorrente do processo de coalescência dos poros menores. Sistemas com aditivos possibilitaram a formação de macroporos regulares, abertos e interconectados com tamanho de poros na faixa de 150 µm-200 µm após o mesmo período de têmpera. De acordo com os autores, o decréscimo da tensão superficial, ocasionado pelos dibloco PEG-PLLA, desacelerou a separação de fase, o que permitiu maior tempo para a estabilização da estrutura porosa.

#### 2.9. Emulsificação

A técnica de emulsificação consiste na solidificação de uma emulsão polimérica, preparada com uma solução polimérica e solução aquosa, sendo a solução polimérica a fase continua e a solução aquosa a fase dispersa. Assim como no caso dos arcabouços produzidos por TIPS, o estágio final para obtenção da estrutura porosa consiste na remoção da fase dispersa e do solvente da fase rica em polímero. Esta remoção pode ser feita por liofilização ou pelo processo de *freeze-extraction*.

O efeito da estabilidade da emulsão na estrutura porosa dos arcabouços também tem que ser considerada, visto que as emulsões não são sistemas termodinamicamente estáveis e processos como sedimentação, floculação e coalescência podem ser introduzidos, ocasionando comprometimento da dispersão dos poros.

#### 2.9.1. Fatores que Afetam a Estabilidade da Emulsão

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e separam-se em duas fases após um período de tempo, que estão relacionados com a formulação da emulsão e as condições de processamento. Os processos de sedimentação, floculação e coalescência são fenômenos cinéticos que estão relacionados com a diminuição do número de gotas de fase dispersa (ADAMSON, 1990).

#### • Processos que Desestabilizam as Emulsões

#### ✓ Sedimentação

O processo de sedimentação promove a separação da emulsão em duas, com a formação de uma emulsão mais rica e mais pobre em fase dispersa com relação à original. A sedimentação é um fenômeno cinético resultante das diferenças de densidades das fases dispersa e continua. Este processo não necessariamente é acompanhado pela coagulação das gotas, porém é favorecido com a ocorrência deste fenômeno (SHAW, 1992).

A taxa de sedimentação esta diretamente relacionada com a diferença de densidades entre as duas fases e inversamente proporcional a viscosidade da emulsão.

#### ✓ Floculação e Coalescência

O processo de floculação é caracterizado pela a adesão reversível das gotas, com manutenção do filme interfacial e da individualidade. As forças de van der Waals somam-se à gravidade para promover a atração entre as gotas, por outro lado, a presença de surfactantes adsorvidos na interface resulta em forças repulsivas de caráter eletrostático ou estérico (SJÖBLOM J. 1992).

As interações entre as forças atrativas de van der Waals e as forças eletrostáticas da dupla camada elétrica (atração e repulsão) são virtualmente aditivas, quando se admite que apenas essas duas forças determinam o grau de estabilidade dos colóides, tem-se a conhecida teoria DLVO generalizada (Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek) (SJÖBLOM J. 1992)

A coalescência ocorre com a fusão das gotas da fase dispersa formando uma gota maior, ocasionando a ruptura do filme superficial que envolve cada gota, é um processo irreversível, que pode resultar em quebra da emulsão (BARBETTA *et al.*, 2008).

#### Fatores que Favorecem a Estabilidade da Emulsão

#### ✓ Baixa Tensão Interfacial

A redução da tensão interfacial entre a fase continua e dispersa aumenta a estabilidade da emulsão. O agente de emulsificante (surfactante) forma um filme adsorvido em torno das gotas da fase dispersa que auxilia no impedimento da coagulação e coalescência, com a redução da energia interfacial (SHAW *et al.*, 1992).

Na emulsão polimérica, o polímero pode atuar como um emulsificador, e a variação da sua porcentagem em peso na emulsão (% p/p) e o seu massa molecular médio ( $M_w$ ) influenciam na estabilidade da emulsão, sendo favorecida pelo aumento do massa molecular médio e a da concentração (WHANG *et al.*, 1995).

#### ✓ Filme Interfacial Mecanicamente Forte e Elástico

A estabilidade das emulsões é favorecida pela proteção mecânica dada pelo filme adsorvido ao redor da gota. A elasticidade do filme também é importante para permitir a recuperação após distúrbios locais (SHAW, 1992).

#### ✓ Repulsão das Duplas Camadas Elétricas

A repulsão entre as partículas diminui os choques evitando a floculação. Quando agentes emulsificantes iônicos são usados, a repulsão da dupla camada elétrica lateral pode prevenir a formação de filmes compactos (SHAW, 1992).

#### ✓ Volume Pequeno de Fase Dispersa e Viscosidade Elevada da Emulsão

A adição de um volume pequeno de fase dispersa favorece a formação de gotículas pequenas que são mais estáveis que gotas grandes. As gotas grandes são menos estáveis que gotas menores decorrente da sua menor razão área/volume, que aumentam a possibilidade de coalescêcia da gota.

O aumento da viscosidade da emulsão reduz as taxas de sedimentação e coalescência. (SHAW, 1992).

#### 2.9.2. Parâmetros que Influenciam a Morfologia dos Poros

Os parâmetros que influenciam as características morfológicas dos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsificação são a concentração da solução polimérica, a fração volumétrica de fase aquosa (f), a massa molecular do polímero, que afetam a viscosidade da emulsão. Estes parâmetros estão relacionados à espessura da parede dos poros, tamanho de poros e porosidade. Além de serem parâmetros que influenciam na cinética dos processos que desestabilizam a emulsão (sedimentação, floculação e coalescência).

O conhecimento da cinética de coalescência pode fornecer o perfil do crescimento das gotas da fase dispersa com o tempo. Estes resultados podem correlacionar os parâmetros empregados na confecção dos arcabouços e as características morfológicas resultante. A desestabilização parcial emulsão pode permitir o aumento dos poros com o fenômeno de coalescência, porém em contrapartida pode comprometer a dispersão dos poros com a falta de controle destes processos.

#### Fração Volumétrica de Fase Aquosa

A influência da fração volumétrica de fase aquosa na morfologia dos poros confeccionados pela técnica de emulsificação está relacionada diretamente com tamanho médio dos poros e indiretamente com a porosidade (WHANG *et al.*, 1995).

WHANG *et al.*, (1995) confeccionaram arcabouços porosos do copolímero PLGA empregando a técnica de emulsificação. As amostras foram preparadas utilizando soluções de PLGA em cloreto de metileno (10% p/v e 7,5% p/v) e frações volumétricas de fase aquosa (0,4 e 0,5), sendo que arcabouços preparados com soluções 10% (p/v) empregaram somente o f de 0,4. As amostras foram submetidas ao congelamento rápido com nitrogênio líquido (-196 °C) e seguido do processo de remoção do solvente e da fase aquosa empregando um liofilizador, nas condições de pressão 30 mTorr e temperatura de -55°C. Os resultados mostraram que um decréscimo do f de 0.5 para 0.4 promoveu a diminuição do tamanho médio dos poros de 22 para 15 µm, mas a porosidade manteve-se constante na faixa de 93-95 % (WHANG *et al.*, 1995). A adição de um volume menor de fase dispersa favorece a formação de gotículas menores, por consequencia gerando poros menores após remoção da fase aquosa, considerando uma emulsão água em óleo. Além de gotas grandes de fase dispersa apresentarem-se menos estáveis decorrentes a sua menor razão de área/volume, promovendo a coalescência das gotas (SHAW, 1992).

SULTANA & WANG (2008), também empregaram a técnica de emulsificação para a produção de arcabouços porosos de PHBV. A emulsão foi preparada pela adição de solução aquosa de ácido acético à solução de PHBV em clorofórmio. Os arcabouços porosos foram confeccionados em duas etapas: solidificação da emulsão e liofilização. A solidificação da emulsão (a -35 °C por 12 h) e a liofilização (a -35 °C por 72 h). Os resultados relataram que os arcabouços preparados com uma mesma concentração de solução polimérica, 10% (p/v) apresentaram um aumento na porosidade em função do aumento da fração volumétrica da fase aquosa empregada. Os arcabouços PHBV produzidos com f de 0,5 apresentaram poros bem distribuídos, sugerindo que não ocorreram processos que diminuíssem a estabilidade da emulsão (sedimentação, floculação e/ou coalescência) e consequentemente afetam as características morfológicas do material.

#### Concentração da Solução Polimérica e Massa Molecular do Polímero

O tamanho médio dos poros também sofre influência da viscosidade da solução polimérica. Os resultados do trabalho de WHANG *et al.*, (1995), referentes aos arcabouços de PLGA confeccionados com a solução polimérica mais viscosa, decorrentes dos maiores valores de viscosidade da solução e de concentração apresentaram maiores tamanhos de poros. A viscosidade da solução está relacionada com a massa molecular médio dos polímeros (M<sub>w</sub>). De acordo com os autores, valores mais elevados deste parâmetro promovem mais estabilidade à emulsão, aumentando o intervalo de tempo para a ocorrência da quebra da emulsão, permitindo a formação de uma estrutura com poros maiores. O aumento do M<sub>w</sub> do polímero ocasiona diminuição na taxa de sedimentação e na taxa de floculação (WHANG *et al.*, 1995).

SULTANA & WANG, (2008) estudaram a influência da concentração da solução polimérica na porosidade arcabouços porosos de PHBV confeccionados pela técnica de emulsificação. Os resultados relataram que as emulsões preparadas com concentrações de soluções poliméricas de 5,0 % (p/v) e 12,5 % (p/v), e empregando a mesma fração volumétrica de fase aquosa (0,5) resultaram em arcabouços com porosidades diferentes. A porosidade diminuiu de 88 % para 80 % com o aumento da concentração polimérica (SULTANA & WANG, 2008).

A espessura da parede dos poros foi alterada com a concentração da solução polimérica. O aumento da concentração polimérica permitiu a formação de uma estrutura porosa com paredes mais espessas e definidas (SULTANA & WANG, 2008).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGIA**

Este capítulo é referente às metodologias, os materiais, os reagentes, os equipamentos e as técnicas de caracterização utilizadas na confecção deste trabalho.

#### 3.1. Materiais

Os arcabouços porosos foram confeccionados com o poliéster natural Polihidroxibutirato de massa molecular (Mw) de 524.000 Da com uma polidispersão igual a 8,6. Fornecido pela PHB Industrial S/A. Os reagentes utilizados foram produzidos pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza P.A.

#### 3.2. Preparo da Solução de PHB

A solução de PHB foi preparada pela solubilização de PHB em clorofórmio utilizando um balão de fundo chato com capacidade de 250 mL. Este procedimento foi baseado em MENDONÇA, 2008. Foram preparadas soluções com duas concentrações diferentes: 10 % (p/v) e 13,5 % (p/v)

O preparo da solução se dividiu em duas etapas:

- (i) inchamento do polímero sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2 h;
- (ii) solubilização do PHB por aquecimento do sistema sob agitação e refluxo a 65°C por um período de 3 horas.

A solução resultante, depois de atingir a temperatura ambiente foi filtrada a vácuo.

#### 3.2.1. Determinação da Concentração da Solução de PHB

A determinação das concentrações das soluções de PHB foi realizada através da medida de peso seco. Para determinação desta medida foi colocado 1 mL de solução de PHB em três recipientes metálicos previamente tarados. Estes recipientes foram submetidos a uma temperatura de 105 °C em uma estufa para a remoção do solvente, sendo pesados a cada duas horas. O encerramento deste processo ocorria quando a massa do conjunto, recipiente mais amostra, fosse constante obtendo-se assim a concentração da solução em g/mL. A concentração em %(p/v) da solução de PHB foi obtida pela Equação (3.1).

$$C_{(\% p/v)} = (\underline{M_{\underline{f}} - M_{\underline{0}}}) \times 100$$
V

 $C_{(\% p/v)} = concentração$ 

 $M_f = massa$  do recipiente mais a amostra

 $M_0 = massa do recipiente$ 

V= volume de amostra

#### 3.3. Preparo da Emulsão pela Mistura do Polímero em Solvente: não-solvente

A emulsão foi preparada pela mistura de 7g de PHB em 80 ml de clorofórmio:água na proporção 86:14 (v/v). Conforme, o preparo da solução de PHB, a emulsão também foi realizada em duas etapas. Após o processo de inchamento do polímero por duas horas sob agitação e refluxo, a emulsão foi aquecida a 65°C por 3 horas. Não foi realizado o processo de filtração.

### 3.4. Preparo da Emulsão pela Adição de Solução Aquosa de Ácido Acético a Solução Polimérica

As emulsões foram preparadas pela adição de solução aquosa de ácido acético (0,1M) em soluções de PHB sob agitação magnética vigorosa por 30 minutos. As

soluções de PHB com concentrações diferentes (10 %p/v e 13,5 %p/v) foram utilizadas para o preparo das emulsões de PHB com e duas frações volumétricas de fase aquosa de 0,50 e 0,30. As soluções de PHB com concentração de 13,5% foram utilizadas no preparo da emulsão somente com a fração volumétrica de fase aquosa de 0,5

Após a agitação magnética, as emulsões foram submetidas ao processo de homogeneização fazendo o emprego de um dispersor Ultra-turrax (Ika, T25- ferramenta tipo S25 – 256) por 3 minutos sob a velocidade de 16000 rpm.

#### 3.5. Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Lixiviação de Sal

Os arcabouços porosos de PHB confeccionados pela técnica de lixiviação de sal utilizaram uma solução de PHB 10% (p/v) e cloreto de sódio como agente porogênico. A faixa granulométrica e a quantidade de sal empregada na produção dos arcabouços determinam o tamanho de poros e a porosidade, respectivamente, sendo empregado cloreto de sódio na faixa granulométrica de 75 a 150 µm e na proporção 60% (p/p).

Ao molde de vidro foram adicionados 0,3 g de cloreto de sódio, devidamente secos e, em seguida 2 mL de solução de PHB. A mistura heterogênea sal / solução de PHB foi agitada até não mais ser observado depósito de sal no fundo do molde de vidro. A evaporação do solvente ocorreu em dessecador por 48 h e o início do processo de lixiviação (para a remoção do sal) ocorreu, em seguida, com a imersão do material em água destilada por 48 h. A última etapa do procedimento é a secagem dos arcabouços por 72 h à temperatura ambiente (MENDONÇA, 2008).

Para as análises de calorimetria diferencial de varredura a solução de PHB foi vertida nos moldes sem a presença do sal, e em seguida secos conforme o procedimento adotado pelos arcabouços.

#### Classificação Granulométrica e Secagem do Cloreto de Sódio

Os arcabouços porosos confeccionados pela técnica de lixiviação de sal empregaram cloreto de sódio na faixa granulométrica de 75 a 150 µm. A obtenção da granulometria do sal foi conseguida fazendo o uso de um peneirador Gilson Perfomer III, modelo SS3 por 30 minutos. O processo foi realizado utilizando peneiras com abertura de 150  $\mu$ m e de 75  $\mu$ m, sendo a peneira com abertura maior colocada em cima O cloreto de sódio (NaCl) macerado com gral foi adicionado na peneira superior e retirado da peneira de abertura de 75  $\mu$ m. O sal recolhido foi secado a 105° C em estufa por 12 horas.

### **3.6.** Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Separação de Fase Induzida Termicamente (TIPS)

A confecção dos arcabouços porosos de PHB ocorreu em moldes de vidro (diâmetro: 20 mm e altura de 25 mm). Foram utilizados 2 ml de solução de PHB (10 % p/v) em cada molde. O processo de resfriamento ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, foram aplicadas temperaturas de 2°C (geladeira) e -30°C (freezer) por 70 minutos e, na segunda etapa a solução foi congelada em nitrogênio líquido por 90 min.

A etapa de remoção de solvente foi realizada empregando o processo de *freeze*extraction. O processo de *freeze-extraction* foi realizado por um período de 48 h a uma temperatura de -70°C, empregando o etanol como não solvente. A escolha do etanol foi devido à sua miscibilidade com clorofórmio, à sua temperatura de fusão (-114,3°C, abaixo da temperatura de congelamento da solução) e por não ser solvente para o PHB, atendendo requisitos necessários para a realização deste processo. Imediatamente, após o término do período de resfriamento, três moldes contendo a solução congelada foram imersos em cada beckers contendo 80 mL de etanol, previamente resfriados a -70°C. O intervalo de tempo para a retirada do material dos moldes e o transporte para o freezer (-70°C) durava aproximadamente 30 min. Nesta etapa inicial, a temperatura na faixa entre (-90°C) e (-80°C) foi obtida com os beckers contendo o líquido de extração dentro de um banho com a mistura de gelo seco e etanol. A temperatura menor que - 70°C empregada na etapa inicial deste processo foi requerida para garantir que a temperatura não atinja uma temperatura superior ao ponto de congelamento da solução.

A temperatura compreendida entre (-90°C) e (-80°C) foi obtida com a mistura de 80 mL de etanol comercial a 300 g de gelo seco, e em seguida, adicionando aproximadamente 400 ml de nitrogênio líquido.

Após a retirada dos arcabouços do processo de *freeze-extraction*, foi feita a secagem dos materiais em dessecador contendo sílica gel, a temperatura ambiente por 3 dias. Na etapa de secagem, ocorria surgimento dos poros devido à saída do etanol.

A utilização da etapa de troca de solvente, com tensão superficial mais baixa que o etanol, foi realizado com a imersão do material em hexano a temperatura ambiente por um período de 3h. Este procedimento foi realizado como uma etapa adicional à metodologia descrita acima, sendo introduzida após o processo de *freeze-extraction*.

#### 3.6.1 Determinação do Ponto de Névoa ("cloud point")

O ponto de névoa pode ser detectado a partir da temperatura em que ocorre o início da turvação da solução polimérica. Neste trabalho, a determinação desta temperatura ocorreu por turbidimetria visual, baseado no procedimento descrito por HUA *et al.* 2003. Os experimentos foram conduzidos com o auxílio de um aparato mostrado na **Figura 3.1**.



Figura 3.1. Representação do aparato experimental para a determinação do ponto de névoa

Em linhas gerais, 2 tubos de ensaio contendo a solução a ser analisada foram colocados em becker com etanol com a adição de gelo seco lentamente. A solução foi resfriada em etapas de 1°C, equilibrando o sistema a cada nova temperatura. Outro tubo de ensaio contendo a solução foi mantido fora do banho para o controle.

#### 3.7. Confecção dos Arcabouços Porosos de PHB pela Técnica de Emulsificação

## **3.7.1.** Preparo de Arcabouços de Emulsões Obtidas pela Mistura do Polímero em Solvente:não-solvente

O arcabouço foi confeccionado utilizando emulsão de PHB 7,6% (p/v) em clorofórmio:água na proporção 86:14 (v/v) preparada conforme o item 3.3.1. A um molde de vidro foi adicionado 2 ml da emulsão para o início do procedimento que consiste na realização de três etapas: processo de resfriamento da emulsão, *freeze*-*extraction* e secagem.

- O processo de resfriamento ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, a emulsão polimérica foi submetida à temperatura de (-30°C) por 70 minutos. Em seguida foi congelada com nitrogênio líquido (-196 °C) por um período de 60 minutos.
- O processo de *freeze-extraction* foi realizado empregando o etanol como não solvente por um período de tempo de 48 h e temperatura de -70°C.

Após a retirada do material do banho ocorreu o processo de secagem do material em dessecador. Foi utilizado o mesmo procedimento experimental para o processo de *freeze-extraction* e de secagem do material descrito no item 3.6.

# **3.7.2.** Preparo dos Arcabouços a partir de Emulsões Obtidas pela Adição de Solução Aquosa de Ácido Acético a Solução Polimérica

Os arcabouços porosos de PHB foram confeccionados utilizando emulsões preparadas com soluções poliméricas de concentrações de 10 e 13,5 % p/v e frações volumétricas de fase aquosa (f) de 0,5 e 0,3, sendo a emulsão preparada com solução 13,5 % p/v, somente utilizou o f de 0,5 (item 3.4). Rapidamente após a homogeneização com o ultra-turráx, as emulsões foram colocadas em moldes de silicone (diâmetro: 15 mm e altura: 5 mm), fazendo o uso de uma seringa. Em seguida, os moldes foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido (-196 °C ) por um período de 25 min antes de serem colocados em uma temperatura de -30°C por 20 horas.

O processo de *freeze-extraction* foi realizado por um período de 5 dias a uma temperatura de -70°C, também empregando o etanol como não solvente. Após a retirada do material do banho no processo de *freeze-extraction* ocorreu à secagem do material em dessecador. Foi utilizado o mesmo procedimento experimental para o processo de *freeze-extraction* e de secagem do material descrito no item 3.6.

#### 3.8. Caracterização dos Arcabouços Porosos de PHB

#### 3.8.1. Porosidade dos Arcabouços Porosos de PHB

A porosidade dos arcabouços porosos de PHB foi determinada pela equação 3.2, seguindo o procedimento adotado por HO *et al.*, (2004).

$$P = \frac{(V - V_P)100}{V} (\%) \qquad \qquad \text{Equação 3.2}$$

P = porosidade (%) V = volume do arcabouço (cm<sup>3</sup>) Vp = volume de polímero (cm<sup>3</sup>)

O volume do arcabouço (V) de PHB foi obtido por medições das suas dimensões fazendo uso de um paquímetro.

O volume de polímero (Vp) foi obtido pela equação 3.3

$$V_p = \frac{M}{\rho_p}$$
 Equação 3.3

 $V_p$  = volume do polímero (cm<sup>3</sup>)

M = massa do polímero no arcabouço (g)

$$\rho_p$$
 = densidade do polímero (g/cm<sup>3</sup>)

A densidade do PHB é 1,23 g/cm<sup>-3</sup> (fornecida pela ficha técnica fornecida pela PHB Industrial S/A).

#### 3.8.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução, valores da ordem de 10 nm são geralmente apresentados por instrumentos comerciais. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (DEVADID *et al.*, 2007).

As imagens de MEV foram utilizadas para a determinação das características morfológicas dos poros e da superfície dos arcabouços de PHB, empregando microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM (modelo 6460 LV). Os sinais utilizados para a obtenção da imagem foram emitidos pelos elétrons secundários. Para a análise da seção transversal, os arcabouços porosos foram fraturados em nitrogênio líquido. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos) e observadas a 10 kV, 15 kV e 20 kV, sendo as regiões de interesse documentados por micrografias.

#### 3.8.3. Degradabilidade Térmica por Termogravimetria (TGA)

Esta técnica foi utilizada para detectar e quantificar a presença de resíduos de sal empregados na preparação de arcabouços porosos de PHB através da técnica de lixiviação de sal.

A análise de TGA foi realizada em um analisador termogravimétrico (TGA) Perkin-Elmer (modelo Pyris 1 TGA), aplicando uma taxa de aquecimento de 10° C/min até a temperatura de 750 ° C em atmosfera de nitrogênio, utilizando-se 6,6 mg de amostra.

#### **3.8.4.** Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura foi empregada na caracterização dos arcabouços porosos de PHB para a quantificação das propriedades térmicas dos materiais e na determinação da cristalinidade do material. A porcentagem de cristalinidade de um polímero pode ser determinada por DSC, a partir do pico endotérmico relativo à fusão cristalina amostra. A área sob o pico está diretamente relacionada à quantidade de calor absorvida na fusão. Se um maior teor da amostra apresenta-se na forma de arranjo organizado (mais regiões cristalinas ou maior grau de cristalinidade), então uma maior quantidade de calor será absorvida na fusão. O oposto é observado para amostras com pequena porcentagem de regiões cristalinas (LUCAS *et al.*, 2001).

O grau de cristalinidade, Xc, das amostras foi calculado utilizando a equação 3.4.

$$X_{c} = \left(\frac{\Delta H_{f}}{\Delta H_{f100\%}}\right) x100 \quad \text{Equação 3.4}$$

Onde  $\Delta H_f$  é a variação de entalpia de fusão da amostra de porcentagem de cristalinidade desconhecida e  $\Delta H_{f100\%}$  é a variação de entalpia de fusão para a amostra 100 % cristalina. O valor de  $\Delta H_{f100\%}$  para o PHB é 146 J/g (INOUE *et al.*, 1992).

As transições térmicas que ocorreram durante o aquecimento e resfriamento da amostra foram obtidas através das curvas de DSC. No primeiro ciclo de aquecimento a amostra foi aquecida de – 10 °C a 200 °C na taxa de 10 °C/min, seguido de resfriamento a 200 °C/min. O segundo ciclo de aquecimento e resfriamento foi realizado nas mesmas condições. Utilizou-se um calorímetro diferencial de varredura Perkin-Elmer, modelo Pyris Diamond.

#### 3.8.5. Teste de Compressão

Os arcabouços de PHB produzidos pela técnica de emulsificação empregando soluções com concentração 10% (p/v) e frações volumétricas de fase aquosa (f) de 0,5 e 0,3 (item 3.7.2) foram submetidos a ensaios mecânicos de compressão.

As amostras foram preparadas nas dimensões cúbicas de 5 mm x 5 mm x 5 mm, sendo o ensaio realizado em triplicata. As análises foram realizadas em uma máquina de ensaios mecânicos, modelo EMIC DL 10000, empregando uma célula de carga 200 Kg e velocidade de 0,5 mm/min. O módulo compressivo foi obtido da inclinação da região linear inicial da curva tensão x deformação construída com os dados obtidos na análise (SULTANA & WANG, 2008).

#### 3.8.6. Estudo da Degradação "in vitro" dos Arcabouços Porosos de PHB

Para o ensaio de degradação "*in vitro*", os arcabouços porosos de PHB foram colocados em tubos de falcon fechados, contendo 20 mL de solução tampão fosfato salino pH 7,4. Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C por 30 dias, após este período, os arcabouços porosos retirados do banho foram lavados com água milli-Q e com etanol PA, e secos em estufa a 60°C por 8 horas (VANIN & SANTANA, 2004). As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura analisando a superfície e a seção transversal dos materiais.

#### 3.8.7. Teste de Adesão de Condrócitos aos Arcabouços Porosos de PHB

A biocompatibilidade "in vitro" foi testada, utilizando condrócitos humanos. Aproximadamente  $10^5$  células foram semeadas na superfície dos arcabouços de PHB e incubadas a 37°C por 5 dias. As amostras foram fixadas por 2 h em solução a 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, os arcabouços foram pós-fixados em OsO<sub>4</sub> 1% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 40 min e secos ao ponto crítico (CPD020, Balzers Union). Subseqüentemente, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura. Os testes biológicos foram realizados no laboratório de Biomineralização, do Departamento de Histologia e Embriologia do CCS/UFRJ.

## **CAPÍTULO IV**

## **RESULTADOS & DISCUSSÃO**

#### 4.1. Determinação do Ponto de Névoa

O ponto de névoa das soluções de PHB a 10% (p/v) foi determinado por turbidimetria visual, seguindo o procedimento descrito no item 3.6.1. Este parâmetro foi importante para estabelecer a temperatura aplicada na primeira etapa de resfriamento para confecção de arcabouços pela técnica de separação de fases induzida termicamente (TIPS). A **Figura 4.1** apresenta as imagens da solução na realização do ponto de névoa.





**Figura 4.1.** Imagens das soluções de PHB 10% (p/v): (a) antes do início da turvação (b) visualização da turvação da solução a -25°C.

O resfriamento lento da solução de PHB (**Figura 4.1a**) permitiu a identificação do início do ponto de névoa, caracterizado pela formação de um filete branco, na temperatura de -17°C. Na temperatura de -25°C, este fenômeno foi mais facilmente visualizado (Figura 4.1b). Desta forma, foram produzidos arcabouços utilizando uma temperatura acima do ponto de névoa (2°C) e outra ligeiramente abaixo (-30°C).

#### 4.2. Características Gerais dos Arcabouços Porosos de PHB

Os arcabouços porosos de PHB foram confeccionados empregando as técnicas de emulsão, separação de fase induzida termicamente e lixiviação de sal.

Os arcabouços produzidos por lixiviação de sal e separação de fase induzida termicamente apresentaram o mesmo diâmetro  $(20 \pm 0,2)$  mm, referentes à utilização de moldes de vidro, no entanto, as espessuras foram diferentes,  $(0,90 \pm 0,3)$  mm e  $(2,3 \pm 0,8)$  mm, respectivamente. As dimensões dos arcabouços confeccionados por emulsão apresentaram diâmetros de  $(11,6 \pm 0,46)$  mm e espessuras de  $(5,02 \pm 0,98)$ , sendo utilizados moldes de borracha de silicone.

A **Tabela 4.1** apresenta os valores de porosidade obtidos para os diversos arcabouços produzidos. É recomendado que os arcabouços a serem utilizados na engenharia de tecidos possuam porosidade com valores maiores que 80% (HUA *et al.*, 2003). Desta forma, apenas os arcabouços produzidos por emulsão seriam recomendados para testes práticos.

Os maiores valores de porosidade foram obtidos pela técnica de emulsificação, indicando que, possivelmente, esta técnica seria a mais adequada para preparação de arcabouços com elevada interconectividade de poros. Estes resultados estão em conformidade aos relatados na literatura (WHANG *et al.*, 1995; SULTANA & WANG , 2008).

	Volume do	Volume do polímero	Porosidade
	arcabouço (cm <sup>3</sup> )	(Vp) (cm <sup>3</sup> )	
Emulsão – solução de	0,557	0,0515	90,7%
PHB 13,5 % f: 0,5			
Emulsão – solução de	0,5252	0.06186	88%
PHB 10% f: 0,3			
Emulsão – solução de	0,4967	0,0412	92%
PHB 10% f: 0,5			
Emulsão – solução	0,1149	0,0133	88%
PHB 7,6% (86:14			
clorofórmio:água)			
TIPS (2 °C)	0,0346	0,01154	66%
TIPS (-30 °C)	0,0444	0,0133	70%
LS	0,098	0,026	73%

Tabela 4.1 - Porosidade de arcabouços porosos de PHB.

A análise dos resultados de porosidade permite a avaliação dos efeitos da variação dos parâmetros empregados na confecção de arcabouços pela técnica de emulsificação de emulsões preparadas com soluções aquosas de ácido acético e soluções poliméricas de PHB. Os arcabouços confeccionados com a mesma fração volumétrica de fase aquosa (f = 0,5) e utilizando concentrações de soluções poliméricas diferentes, apresentaram porosidades de 92% e 90,7% com concentrações de solução de PHB 10% (p/v) e 13,5% (p/v), respectivamente. Enquanto que para os arcabouços confeccionados com a mesma concentração de solução polimérica 10% (p/v) e empregando frações volumétricas de fase aquosa de 0,3 e 0,5, exibiram porosidades de 88% e 92%, respectivamente. O aumento da porosidade dos arcabouços foi observado quando empregou o maior valor de fração volumétrica de fase aquosa ou com a

utilização da solução de PHB com menor concentração, corroborando com os resultados obtidos na literatura (WHANG *et al.*, 1995; SULTANA & WANG , 2008).

Os arcabouços produzidos pela técnica de lixiviação de sal apresentaram valores de porosidade superiores aos descritos na Literatura (na faixa de 20-50%) (HUTMACHER, 2000, MENDONÇA, 2008). Possivelmente, esta diferença nos valores encontrados esteja relacionada com o procedimento empregado para determinação deste parâmetro.

Os arcabouços produzidos pela técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) apresentaram valores baixos de porosidade, comparados com os encontrados na literatura (NAM *et al.*, 1999; HUA *et al.*, 2003). Estes resultados podem estar relacionados com os parâmetros empregados na metodologia (processo de resfriamento e concentração), no processo de *freeze-extraction* e na etapa de secagem do material.

#### 4.3. Análise Morfológica por MEV dos Arcabouços Porosos de PHB

A morfologia da superfície e da estrutura de poros dos arcabouços foi analisada por microscopia eletrônica de varredura.

### 4.3.1 Arcabouços Confeccionados pela Técnica de Emulsificação - Emulsão Preparada pela Adição de Solução Aquosa de Ácido Acético a Solução Polimérica

A **Figura 4.2** apresenta imagens de MEV que caracterizam a estrutura morfológica dos arcabouços confeccionados com uma emulsão preparada com uma solução de PHB 10 % (p/v) e uma fração volumétrica de fase aquosa de 0,3.




**Figura 4.2.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e f de 0,3. Seção transversal (a), (b), (c), (d), (e),(f). Superfície Superior (em contato com o ar) (g), (h) Superfície inferior (em contato com o molde) (i), (j).

A estrutura porosa obtida com os arcabouços confeccionados por emulsão de uma solução de PHB 10% (p/v) e f de 0,3 apresentou poros com formato arredondado. Porém, também se observou poros com formatos não definidos. O tamanho médio dos poros ficou em torno de  $(54 \pm 22) \mu m$  (Figura 4.2 a-c). A comparação entre as imagens (a), (b), (c) com as (d), (e), (f) da Figura 4.2 mostram que esta técnica não apresentou reprodutibilidade nas características morfológicas. Estes resultados podem estar relacionados à instabilidade das emulsões, destacando a necessidade do conhecimento da cinética dos processos que desestabilizam a emulsão.

A **Figura 4.3** apresenta imagens de MEV que caracterizam a estrutura morfológica dos arcabouços confeccionados com uma emulsão preparada com uma solução de PHB 10 % (p/v) e uma fração volumétrica de fase aquosa de 0,5.





**Figura 4.3.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e f de 0,5. (a), (b), (c), (d), (e),(f) são imagens da seção transversal, (g) imagem da superfície superior (em contato com o ar), (h) imagem da superfície inferior (em contato com o molde).

Os arcabouços confeccionados por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e f de 0,5 apresentaram regiões porosas (parte superior da **Figura 4.3a**) e regiões deficientes em poros próximas à superfície em contato com o molde (parte inferior da **Figura 4.3a**). No caso das regiões porosas, observa-se uma estrutura com poros em formato irregular (**Figuras 4.3 b-e**). O tamanho dos poros ficou compreendido em uma

ampla faixa abrangendo poros de 50 a 260  $\mu$ m, com tamanho médio de (152 ± 70)  $\mu$ m. A região deficiente em poros é destacada na **Figura 4.3f.** Estes arcabouços apresentaram fragilidade das paredes na estrutura porosa (**Figura 4.3e**).

A formação de uma estrutura com deficiência na dispersão dos poros sugere a ocorrência do processo de sedimentação nos arcabouços. No processo de sedimentação ocorre a separação da emulsão com distinções na composição de fase aquosa. Uma emulsão pobre em fase dispersa pode resultar na formação de um arcabouço contendo regiões com deficiência em poros.

Arcabouços confeccionados pela técnica de emulsão a partir de uma solução de PHBV 10% (p/v) e f = 0,5 e empregado um liofilizador para a remoção do solvente apresentaram uma estrutura de poros com morfologia diferente da visualizada no presente trabalho. Os autores observaram poros tubulares (SULTANA & WANG, 2008). Este resultado pode ser um indício de que além da estabilidade da emulsão, o processo de secagem também deve influenciar fortemente a morfologia do material final.

Os arcabouços confeccionados com a mesma concentração de solução polimérica, porém aplicando frações volumétricas diferentes apresentaram características morfológicas distintas (**Figuras 4.2 e 4.3**). O aumento da fração volumétrica da fase aquosa resultou em arcabouços com maiores tamanhos de poros, corroborando com os resultados encontrados na literatura (WHANG *et al.*, 1995). Possivelmente, o tamanho de poros pode estar relacionado com o processo de coalêscencia. A taxa de coalescência da fase dispersa (solução aquosa) está diretamente relacionada com a sua concentração na emulsão (WHANG *et al.*, 1995). Desta forma, pode-se supor que nas emulsões com f = 0,5, houve maior coalescência da fase dispersa dando origem a arcabouços com poros maiores e com maior porosidade (Tabela 4.1).

A **Figura 4.4** apresenta imagens de MEV que caracterizam a estrutura morfológica dos arcabouços confeccionados com uma emulsão preparada com uma solução de PHB 13,5% (p/v) e uma fração volumétrica de fase aquosa de 0,5.





**Figura 4.4.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 13,5% (p/v) e f de 0,5. Seção transversal (a), (b), (c), (d), (e), (f). Superfície superior (em contato com o ar) (g), (h). Superfície inferior (em contato com o molde) (i) (j)

As características morfológicas dos arcabouços porosos confeccionados pela técnica de emulsão aplicando uma solução de PHB 13,5 % e f = 0,5 apresentam a maioria dos poros com formato arredondado e com uma ampla faixa de tamanho, desde macroporos de aproximadamente 1 mm a poros menores de 120  $\mu$ m, além da existência de microporos no interior dos poros (**Figuras 4.4a, b**). A **Figura 4.4 (e)** evidencia a existência de poro com formato irregular.

Os resultados indicaram que a concentração da solução polimérica influenciou as características morfológicas do material, principalmente, o tamanho e a espessura da parede dos poros. Os arcabouços confeccionados com a mesma fração volumétrica da fase aquosa, mas empregando uma solução polimérica mais concentrada apresentaram uma estrutura com uma maior espessura da parede dos poros promovendo a formação de uma estrutura porosa mais definida (**Figuras 4.3 a-e e 4.4 a-f**).

As características morfológicas dos arcabouços preparados com uma solução polimérica 13,5% (p/v) sugerem que não ocorreu o processo de sedimentação, devido à ocorrência de poros em toda região. Os arcabouços confeccionados com o mesmo f (0,5), mas empregando uma solução polimérica 10% (p/v) apresentaram indicativos da ocorrência do fenômeno de sedimentação. Estes resultados indicam a influência da concentração da solução polimérica na estabilização da emulsão. O aumento da concentração da solução polimérica diminui a taxa de sedimentação, devido ao aumento da viscosidade da emulsão, sendo uma variável inversamente proporcional a velocidade de sedimentação (WHANG *et al.*, 1995).

A existência dos macroporos e a extensa heterogeneidade no tamanho dos poros, possivelmente estão relacionadas com floculação e coalescência das gotículas da fase dispersa, indicando dois dos processos de desestabilização da emulsão. Pode-se supor que o tamanho dos microporos seja referente às gotículas de fase dispersa (fase aquosa) que não sofreram o processo de coalescência. O fenômeno de coalescência dos poros permite a formação de poros maiores. No entanto, caso a taxa de coalescência seja muito elevada, pode ocorrer à quebra da emulsão, impedindo a formação dos poros. A **Figura 4.4 (d)** apresenta o indicativo da ocorrência do fenômeno de coalescência dos poros.

O preparo de uma emulsão com concentração de solução de PHB mais concentrada favorece a estabilidade da emulsão relacionada à ação emulsificante do polímero, que reduz a força motriz para a coalescência com a diminuição da energia livre interfacial. A taxa de floculação e coalescência também são influenciadas pela viscosidade da fase contínua, o aumento da concentração da solução polimérica promove diminuição destas taxas (WHANG *et al.* 1995).

Os arcabouços confeccionados com uma solução de PHB 10% (p/v) e f = 0,5, possivelmente, apresentaram os fenômenos de floculação e coalescência mais acentuados promovendo o aumento da velocidade de sedimentação. A sedimentação não necessariamente é acompanhada pela floculação das gotas, porém é favorecido com a ocorrência deste fenômeno (SHAW, 1992).

A interconectividade entre os poros influencia no transporte molecular, juntamente com a porosidade e a permeabilidade dos arcabouços, sendo uma das características morfológicas necessária para a obtenção de um material com aplicações em engenharia de tecido. A técnica de emulsão tem permitido a formação de arcabouços com poros interconectados (SULTANA & WANG, 2008).

As imagens de MEV da seção transversal dos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsão apresentam uma estrutura com poros abertos, sugerindo a formação de uma rede porosa interconectada (Figuras 4.2 c,d,f, 4.3 c-e, 4.4 a-f).

As imagens de MEV da superfície dos arcabouços confeccionados por emulsificação permitem observar que não ocorreu uma distinção entre as características da superfície em contato com o molde e a superfície oposta, decorrente a formação de superfícies com características morfológicas lisas, porosas ou rugosas independentes da sua localização e dos parâmetros empregados na técnica (**Figuras 4.2 g-j, 4.3 g,h, 4.4 g-j**).

A formação da camada densa nas superfícies dos arcabouços pode estar relacionada com a etapa de secagem, durante a remoção do etanol. Possivelmente, a matriz polimérica não estaria suficientemente rígida para resistir à tensão superficial causada pela evaporação do não solvente (etanol).

### 4.3.2. Arcabouços Confeccionados pela Técnica de Emulsificação - Emulsão Preparada pela Mistura do Polímero em Solvente:não-solvente

A **Figura 4.5** apresenta imagens de MEV dos arcabouços porosos produzidos a partir de uma emulsão de PHB 7,6% (p/v) em clorofórmio/água na proporção 86:14. Neste caso, o controle de temperatura da etapa do processo de *freeze-extraction* não foi eficiente. A temperatura não foi mantida -70°C durante todo tempo do processo.



**Figura 4.5.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação a partir de uma emulsão 7,6% (p/v) em clorofórmio/água na proporção 86/14. Seção transversal (a), (b) Syperfície superior (em contato com o ar) (c), Superfície inferior (em contato com o molde de vidro) (d).

A estrutura morfológica dos arcabouços confeccionados por esta técnica de emulsificação apresentou poros com formato arredondado e com tamanhos variando de 19 a 98 µm (**Figuras 4.5 a, b**). A maioria dos poros apresentou-se fechados e com baixa interconectividade.

As imagens de MEV exibem uma estrutura porosa seriamente comprometida, com regiões apresentando deficiência na dispersão dos poros, possivelmente associados ao colapso dos poros durante o processo de *freeze-extraction*. Como não houve controle de temperatura durante o processo, a temperatura atingiu um valor acima da temperatura de congelamento da emulsão, dissolvendo a região rica em polímero, enfraquecendo, consequentemente, as paredes dos poros. Para estes arcabouços, foi verificado que a porosidade foi de 71%, valor menor do que o apresentado na **Tabela 4.1** para arcabouços produzidos por esta técnica de emulsificação (88%).

Na **Figura 4.6**, são apresentadas imagens de MEV dos arcabouços porosos produzidos por emulsificação a partir de uma emulsão de PHB 7,6% (p/v) em clorofórmio/água na proporção 86:14 e com controle adequado da temperatura no processo de *freeze-extraction*.





**Figura 4.6.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma emulsão 7,6 % (p/v) em clorofórmio/água na proporção 86/14. Seção transversal de regiões próxima a superfície em contato com o molde (a), (b). Seção transversal de regiões localizadas próximas a superfície oposta (em contato com o ar) (c), (d). Superfície superior (em contato com o ar) (e). Superfície inferior (em contato com o molde de vidro) (f).

As imagens de MEV apresentaram características morfológicas diferentes em função das regiões que foram obtidas às imagens, ressaltando a grande heterogeneidade observada nestes materiais. A estrutura porosa na região próxima ao molde apresentou poros alongados com tamanhos na faixa de 3 a 30  $\mu$ m (**Figuras 4.6 a, b**). Enquanto que, os poros na região oposta apresentaram formato arredondado e tamanhos em torno de  $(10,5 \pm 4,4) \mu$ m (**Figura 4.6 c, d**).

As características morfológicas destes arcabouços não se assemelham aos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsificação a partir da adição de solução aquosa de ácido acético à solução polimérica (**item 4.3.1**). Como os parâmetros experimentais utilizados foram bem diferentes, não foi possível estabelecer uma suposição sobre qual etapa de fabricação poderia ter influenciado de forma mais significativa a característica final dos arcabouços. Mas, pode-se supor que o fenômeno de coalescência tenha sido favorecido na técnica de emulsificação empregando uma solução aquosa de ácido acético, sugerindo que a tensão interfacial entre a solução aquosa de ácido acético e a solução polimérica seja maior que à tensão interfacial formada numa emulsão preparada com a mistura do polímero em clorofórmio:água.

### 4.3.3. Separação de Fase Induzida Termicamente (TIPS)

Os arcabouços confeccionados pela técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) foram confeccionados empregado duas metodologias com distinções no processo de resfriamento. A temperatura utilizada na etapa de resfriamento que precede o congelamento da solução com nitrogênio líquido foi o parâmetro variado no procedimento. Os arcabouços foram produzidos utilizando temperaturas de 2°C e -30°C por um período de 70 min na primeira etapa de resfriamento, sendo que a temperatura mais elevada está acima do ponto de névoa (-17 °C) e a outra, abaixo desta temperatura.

A **Figura 4.7** apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços porosos produzidos pela técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) com primeiro resfriamento na temperatura de 2° C ou -30 ° C por 70 min e seguido de congelamento com nitrogênio líquido.





**Figura 4.7.** Imagens de MEV dos arcabouços porosos produzidos por separação de fase induzida termicamente. Seção transversal dos arcabouços com o 1° resfriamento: 2 °C (a) e (c). Seção transversal dos arcabouços com o 1° resfriamento -30°C.(b) e (d). Superfície 1° resfriamento: 2 °C (e) superior (em contato com ar) (g) inferior (em contato com o molde). Superfície 1° resfriamento: -30 °C (f) superior (em contato com ar) (h) inferior (em contato com o molde)

A estrutura porosa obtida com os arcabouços confeccionados empregando a temperatura de primeiro resfriamento maior que o ponto de turvação, 2°C, apresentaram

poros com tamanhos ligeiramente maiores, em uma faixa de 44  $\mu$ m a 11  $\mu$ m (média = 23,12 ± 8,5)  $\mu$ m. As características morfológicas dos arcabouços porosos confeccionados pela técnica de separação de fase induzida termicamente é baseada em princípios termodinâmicos, uma ligeira variação na concentração polimérica pode acarretar mudanças no mecanismo de separação de fase (NAM *et al.*, 1999). A taxa de resfriamento também pode ter influenciado nas características morfológicas do material.

Estes arcabouços foram confeccionados empregando o clorofórmio como solvente, que possui a temperatura de congelamento (-63,5°C) mais baixa que a temperatura que ocorre a separação de fase líquido-líquido (-17°C). Nestas condições, a técnica TIPS para produção dos arcabouços foi regida através da separação de fase líquido-líquido. Mas os mecanismos (nucleação e crescimento ou decomposição espinodal) envolvidos na separação de fase líquido-líquido estão relacionados com diagrama de fase binário polímero-solvente (**Figura 2.5**). É necessário o conhecimento deste diagrama para determinar o mecanismo atuante na formação da estrutura, de acordo com a combinação da concentração da solução polimérica e a temperatura que foi aplicada a separação de fase.

De acordo com as características morfológicas, é possível relacionar com o mecanismo envolvido. O material obtido, neste trabalho, com a técnica TIPS de uma solução de PHB não se apresentou em forma de pó, permitindo sugerir que a separação de fase líquido-líquido não ocorreu via o mecanismo de nucleação e crescimento na região de concentração da solução polimérica mais baixa. Na região de concentração polimérica mais elevada, o mecanismo de decomposição espinodal promove a formação de uma estrutura de poros interconectados, enquanto que o de nucleação e crescimento origina poros fechados. As imagens de MEV permitiram observar a formação de uma estrutura com poros fechados, sugerindo que a separação líquido-líquido ocorreu via mecanismo de nucleação e crescimento na região de nucleação e crescimento na região de nucleação e crescimento na porte fechados, sugerindo que a separação líquido-líquido ocorreu via mecanismo de nucleação e crescimento na região de nucleação e crescimento na região de nucleação e crescimento na região de nucleação e crescimento na porte fechados, sugerindo que a separação líquido-líquido ocorreu via mecanismo de nucleação e crescimento na região de maior concentração de solução polimérica.

O PHB é um polímero semicristalino, portanto a etapa de fixação da estrutura pode ter ocorrido via a cristalização do polímero. A vitrificação da fase rica em polímero também pode estar envolvida nesta fase. A determinação da forma que ocorreu esta etapa exige o conhecimento das curvas de separação líquido-líquido, de cristalização e a curva de transição vítrea.

A Figura 4.8 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos arcabouços porosos produzidos pela técnica de separação de fase

induzida termicamente com primeiro resfriamento na temperatura –30°C por 70 min e segundo resfriamento com nitrogênio líquido. Neste procedimento houve a realização de uma etapa de extração com hexano, após o processo de *freeze-extraction*.



**Figura 4.8.** Imagens de MEV da seção transversal dos arcabouços porosos produzidos por separação de fase induzida termicamente com o 1º resfriamento a -30°C (a) sem a extração com hexano (b) com a extração com hexano

A adição da etapa de imersão do material em hexano, após o processo de *freeze-extraction*, para permitir a troca de solventes (etanol – hexano) foi empregada com o objetivo de evitar o colapso dos poros no processo de secagem do material. O hexano possui uma tensão superficial menor que o etanol, ocasionando menor possibilidade do colapso dos poros durante a secagem do material.

As imagens de MEV mostraram características morfológicas distintas da estrutura porosa nos arcabouços com o procedimento sem e com hexano. As imagens também apresentaram que a incorporação da etapa de hexano não evitou o colapso dos poros. Este resultado provavelmente está associado à etapa anterior, processo de *freeze*-*extraction*, decorrente da permanência de clorofórmio no material, ocasionando o colapso dos poros. Quando o processo de *freeze-extraction* não ocorre de forma eficiente, as regiões no material que contém clorofórmio possivelmente levam à dissolução do polímero no processo de extração com hexano a temperatura ambiente.

### 4.3.4. Lixiviação de Sal

A **Figura 4.9** apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços porosos produzidos por lixiviação de sal.





**Figura 4.9.** Imagens de MEV dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal. Seção transversal (a), (b), (c), (d). Superfície superior (em contato com o ar) (e), (f). Superfície inferior (em contato com o molde de vidro) (g), (h).

Os arcabouços porosos confeccionados por lixiviação de sal apresentaram uma capa densa, localizada na região próxima a superfície superior (em contato com o ar) e uma porção porosa referente à região inferior (mais próxima ao molde), como relatado na literatura (MENDONÇA, 2008; SADER, 2003). A formação da camada densa, provavelmente, é referente à deposição de cloreto de sódio no fundo do molde, decorrente da maior densidade do cloreto de sódio com relação à densidade da solução PHB 10 % (p/v) (MENDONÇA, 2008).

Os poros obtidos pela técnica de lixiviação de sal apresentaram formato poligonal com diâmetro médio de  $(138 \pm 65) \mu m$  (Figura 4.9 a-d). O tamanho da maior parte dos poros encontrou-se dentro da faixa granulométrica do agente porogênico empregado no preparo dos arcabouços. Porém, foram identificados poros menores e maiores que 75 µm e 150 µm, respectivamente. Os poros com diâmetros menores estão possivelmente associados à desagregação de partículas de sal com agitação manual realizada na metodologia de preparo e os maiores decorrentes da junção das partículas (SADER, 2003).

A estrutura porosa dos arcabouços apresentou poros com baixa interconectividade, sendo uma desvantagem da técnica (**Figura 4.9 d**). A baixa interconectividade dos poros dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal foi relatado na literatura (CAO *et al.*, 2004; CAO *et al.* 2006).

Esta técnica permitiu a reprodutibilidade dos arcabouços, relacionadas à estrutura porosa e as características das superfícies.

### **4.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A análise térmica dos arcabouços, empregando a técnica de calorimetria diferencial (DSC), permitiu avaliar efeito das técnicas de produção nas temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e de cristalização ( $T_c$ ), nas entalpias de fusão ( $\Delta H_f$ ) e de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e no grau de cristalinidade ( $X_c$ ) dos arcabouços (**Tabelas 4.2 e 4.3**). Os dados fornecidos nas tabelas foram retirados da análise das curvas de calorimetria diferencial de varredura apresentadas no Anexo 1. O grau de cristalinidade foi calculado de acordo com a Equação 3.4 (item 3.8.3).

Amostra	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_{f}\left(J/g ight)$	X <sub>c</sub> (%)
Filme de PHB	178	64,3	44
(10 % p/v)			
LS	176,58	56,73	39
Emulsão –	174,68	37	25
solução PHB			
10 % e f = 0,3			
Emulsão –	173,59	49,5	34
solução 10% e			
f = 0,5			
Emulsão –	173,48	47,5	32,5
solução 13,5%			
e f = 0,5			

**Tabela 4.2:** Transições térmicas dos arcabouços de PHB obtidas no primeiro aquecimento

Amostra	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{\rm f} \left( J/g \right)$	$T_{c}$ (°C)	$\Delta H_{c} (J/g)$	$X_{c}(\%)$
Filme de PHB	175	65	40,59	-35	44,5
(10 %p/v)					
LS	174,3	58	37,7	-12,3	40
Emulsão –	173,48	35	48	-18,7	24
solução PHB					
10 % e f = 0,3					
Emulsão –	172,85	47	41	-21,06	32
solução 10% e					
f = 0,5					
Emulsão –	172,3	43	39	-23,33	29
solução 13,5%					
e f = 0,5					

 Tabela 4.3: Transições térmicas do filme e dos arcabouços de PHB obtidas com segundo aquecimento.

Dentre as técnicas avaliadas, a lixiviação de sal produziu arcabouços com parâmetros térmicos mais próximos do filme denso.

Para todas as técnicas empregadas, a temperatura de fusão dos arcabouços foi menor do que a do filme denso. As temperaturas de fusão dos arcabouços de PHB apresentaram ligeiras variações em função da técnica empregada para confecção dos arcabouços. A maior variação na temperatura de fusão foi de 2°C apresentada entre as técnicas de emulsificação (solução 13,5% e f = 0,5) e de lixiviação de sal, podendo estar associada com as diferenças de processamento entre estas técnicas de confecção dos arcabouços.

A cristalização de um polímero ocorre pelo mecanismo de nucleação e crescimento. A taxa de cristalização é o produto da nucleabilidade (ou probabilidade de nucleação, também denominado "fator de nucleação") e a transportabilidade (ou

difusividade das cadeias ou fragmentos delas, também denominado "fator de transporte") (KREVELEN, 1997).

A temperatura de cristalização está associada à temperatura que ocorre a maior parte da cristalização do polímero, sendo encontrados valores diferentes com a variação da técnica de preparo dos arcabouços. A análise da curva de DSC no segundo aquecimento informou que os arcabouços de PHB confeccionados por lixiviação de sal apresentaram uma diminuição de aproximadamente 3°C na Tc com relação ao filme de PHB produzidos com a mesma concentração de solução polimérica. Este resultado sugere que na técnica de lixiviação de sal, resíduos salinos não removidos após o processo de lixiviação, provavelmente atuaram como agente nucleante facilitando a cristalização do PHB.

Na técnica de emulsificação, o arcabouço confeccionado com f = 0,3 e concentração de solução polimérica de 10% (p/v) apresentou temperatura de cristalização maior do que a do filme denso de PHB 10% (p/v). Para as emulsões preparadas com f = 0,5 e concentrações de soluções poliméricas de 10 ou 13,5 % (p/v) foram relatados valores muito próximos à temperatura de cristalização do filme de PHB.

A técnica de emulsificação apresentou a formação de arcabouços de PHB com grau de cristalinidade menor que do filme denso. Os arcabouços preparados com uma concentração de solução de PHB 10% apresentaram grau de cristalinidade de 24% e 32% com f de 0,3 e 0,5, respectivamente. Para os arcabouços produzidos com uma concentração de solução polimérica de 13,5% e f = 0.5 foi determinado o grau de cristalinidade de 29%, analisando a curva de DSC no segundo aquecimento. Os arcabouços produzidos com a mesma concentração da solução polimérica, mas com frações volumétricas de fase dispersa distintas apresentaram uma diferença de 8% no grau de cristalinidade, sendo que o maior grau de cristalinidade foi observado nos arcabouços preparados com maior f. O acréscimo da cristalinidade com o aumento na fração volumétrica de fase aquosa pode estar relacionado com os processos de desestabilização da emulsão. A presença de regiões deficientes em poros nos arcabouços confeccionados com concentração da solução polimérica 10 % e f de 0,5, provavelmente está relacionada ao fenômeno de sedimentação (Figura 4.3 f). O fenômeno de sedimentação ocorre com a separação da emulsão em regiões com distinções de solução aquosa. A emulsão com maior percentagem de fase aquosa provavelmente permitiu maior possibilidade de formação de ligações intermoleculares entre os segmentos das cadeias poliméricas, promovendo a formação de regiões

cristalinas. Portanto este fenômeno pode estar relacionado com o aumento da cristalinidade com o aumento de f, comparando os arcabouços confeccionados com a mesma concentração de solução polimérica.

Os arcabouços confeccionados com emulsões com mesma fração volumétrica de fase aquosa, mas empregando concentrações das soluções poliméricas diferentes apresentaram uma diminuição pequena na cristalinidade com o aumento da concentração de solução polimérica. Este comportamento pode, também está relacionado com os fenômenos de desestabilização da emulsão. Nos arcabouços confeccionados com a concentração de solução de PHB 13,5 % não foi observada a ocorrência do processo de sedimentação, apresentando uma boa distribuição de poros nos arcabouços (**Figura 4.4 a-f**), o que, conseqüentemente, pode ter dificultado a agregação das cadeias de PHB, diminuindo, assim a cristalinidade. Outro fator a ser considerado é a viscosidade da solução. Com maior concentração, ocorreu o aumento da viscosidade da solução de PHB, dificultando a cristalização.

A comparação entre os dados fornecidos pelas curvas do primeiro aquecimento e segundo aquecimento na análise de DSC relatou uma diferença de 3°C na temperatura de fusão do filme denso de PHB 10 % (p/v) (**Tabelas 4.2 e 4.3**). A temperatura de fusão do filme denso de PHB 10% (p/v) apresentou a temperatura de 178°C no primeiro aquecimento, enquanto no segundo aquecimento esta temperatura foi de 175°C. Este resultado sugere a ocorrência de quebra das cadeias de PHB durante o aquecimento do fundido no segundo aquecimento. As cadeias com menor massa molar cristalizam-se mais facilmente, formando cristais que podem ser fundidos a temperaturas menores. No caso dos arcabouços produzidos pela técnica de emulsão, esta diferença entre a T<sub>m</sub> no 1° e no 2° aquecimento foi significativamente menor. Pode-se sugerir que, possivelmente, ocorreu a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da água e os grupos carbonila do PHB, tornando as cadeias de PHB mais estáveis, isto é, menos susceptíveis à degradação térmica. Diversos autores identificaram ligações de hidrogênio entre o PHB e outros polímeros (CHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005).

73

### 4.5. Propriedades Mecânicas

Os arcabouços utilizados no ensaio de compressão foram preparados com a mesma concentração polimérica e variando a fração volumétrica de fase aquosa (f = 0,5 e f = 0,3). A descrição da metodologia para a realização do ensaio mecânico de compressão encontra-se no item **3.8.5**.

A **Figura 4.10** apresenta as curvas tensão x deformação de arcabouços confeccionados por emulsificação submetidos ao teste mecânico de compressão.



**Figura 4.10.** Curva tensão x deformação de arcabouços de emulsificação submetidos ao teste mecânico de compressão (a) e (b) solução PHB 10%, f = 0,3 (c) e (d) solução PHB 10%, f = 0,5.

Amostra	Porosidade (%)	Módulo de compressão
		(MPa)
Emulsão – solução PHB	88	0,011 ± 1,75E-5
10%, f = 0,3		
Emulsão – solução PHB	92	0,0018 ± 1,41E-5
10%, f = 0,5		

 Tabela 4.4: Propriedade mecânica de compressão dos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsificação

As curvas tensão x deformação obtidas com o teste de compressão dos arcabouços confeccionados por emulsificação de uma solução de PHB 10% empregando f diferentes (0,3 e 0,5) exibiram três regiões, comumente observada em estruturas porosas (SULTANA & WANG, 2008). A primeira região é denominada elasticidade linear, a inclinação desta curva fornece o módulo de compressão. A análise das curvas permite observar que a região de elasticidade ocorreu em valores baixos de tensões, acompanhada por um longo platô, caracterizando a segunda região. A região de elasticidade linear é controlada pela estrutura da parede dos poros e o platô é associado ao colapso dos poros. Quando a maioria dos poros apresentarem colapsados, inicia-se a terceira região, denominada densificação, caracterizada pela elevação acentuada na tensão (SULTANA & WANG, 2008)

Nos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsificação, o aumento do módulo de compressão é associado com o emprego de soluções poliméricas mais concentradas e com a obtenção de arcabouços com menor porosidade (SULTANA & WANG, 2008)

O módulo compressivo dos arcabouços com porosidade de 88%, preparados com uma solução polimérica de 10 % e f de 0,3 apresentou o valor de 0,011 MPa. Enquanto que os arcabouços confeccionados com a mesma concentração da solução polimérica, porém empregando f de 0,5, exibiram o módulo de compressão em uma ordem de grandeza menor, 0,0018 MPa, com uma porosidade de 92%. Foi observado, portanto, uma relação inversa entre a porosidade e a resistência mecânica de compressão do material.

As características morfológicas dos arcabouços referentes à estrutura e a espessura da parede dos poros também podem influenciar nas propriedades mecânicas

do material. As imagens de MEV apresentadas nas **Figuras 4.2 (a-f) e 4.3 (a-f)** destacam as diferenças morfológicas dos arcabouços preparados com frações volumétricas de fase aquosas diferentes. A característica da estrutura porosa apresentadas na morfologia dos arcabouços produzidos com o maior f indica uma maior fragilidade na sua parede porosa, podendo também ser um fator responsável pelo baixo valor de módulo compressivo observado.

A fragilidade do material pode ser influenciada pela sua cristalinidade. Como os arcabouços produzidos com maior fração volumétrica de fase aquosa apresentaram maior grau de cristalinidade (**Tabela 4.3**), seria realmente esperado que estes materiais apresentassem maior fragilidade.

O módulo de elasticidade obtido pelo ensaio de compressão dos arcabouços preparados com f = 0,5 (92 % de porosidade) apresentou um valor muito baixo (0,0018 MPa), sendo duas ordem de grandeza menor dos arcabouços de PHBV com porosidades muito próximas, 94% (SULTANA & WANG, 2008). Esta diferença significativa nos valores dos módulos, ressaltando a utilização da mesma metodologia de ensaio mecânico, possivelmente foi influenciada pelas distinções nas características morfológicas dos arcabouços, além do PHBV apresentar menor grau de cristalinidade em relação ao PHB.

O conhecimento das propriedades mecânicas do material é necessário para avaliar a sua possível aplicação em engenharia de tecido. Os arcabouços devem possuir resistências mecânicas muito próximas com as do tecido natural que é pretendido regenerar. O módulo de elasticidade para o tecido ósseo está na faixa entre 15-30 GPa, enquanto que de tecidos macios, está na ordem de 20 KPa, aproximadamente HILBORN *et al.*, 2007). Desta forma, trabalhos futuros devem ser conduzidos a fim de aprimorar as propriedades mecânicas dos arcabouços confeccionados para que estes materiais possam ter aplicação na regeneração de tecidos.

### 4.6. Estudo da Degradação "in vitro" de Arcabouços Porosos de PHB

O conhecimento da taxa de degradação do material para aplicação em engenharia de tecido é necessário decorrente de uma das funções dos arcabouços porosos é possuir integridade mecânica até a formação do novo tecido. A degradação do polímero *in vitro* não é a mesma da sua degradação *in vivo*. Porém, o seu estudo é válido para fornecer um indicativo deste valor. Na degradação *in vivo*, o arcabouço está submetido a esforços mecânicos, além das respostas do hospedeiro ao material implantado (VANIN & SANTANA, 2004).

O teste de degradação foi realizado com uma solução tampão PBS em pH 7,4 e temperatura de 37 °C por um período de 30 dias.

A **Figura 4.11** apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície superior e inferior de arcabouço confeccionado pela técnica de lixiviação de sal antes e depois do teste de degradação.





**Figura 4.11.** Imagens de MEV dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal. Superfície superior (em contato com o ar): (a) antes e (b) após a degradação. Superfície inferior (em contato com o molde): (c) antes e (d) após a degradação. Seção transversal: (e) antes e (f) após a degradação.

A **Figura 4.12** apresenta imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 13,5% e f de 0,5.





**Figura 4.12.** Imagens de MEV de arcabouços porosos produzidos por emulsificação de uma solução de PHB 13,5% e f de 0,5. Superfície superior (em contato com o ar) (a) antes e (b) após a degradação. Seção transversal: (c), (e) antes e (d), (f) após a degradação.

As imagens de MEV não mostraram alterações significativas nas características morfológicas da superfície e da estrutura porosa dos arcabouços confeccionados por lixiviação de sal e emulsificação (**Figura 4.11 e 4.12**). Resultados na literatura apresentaram diminuição da massa molecular, evidenciando a primeira etapa da degradação, somente após 80 dias. A perda de massa, resultados da segunda fase da hidrólise, foi observada após 180 dias (FREIER *et al.*, 2002).

O PHB possui uma taxa de degradação mais lenta quando comparados a outros poliésteres biodegradáveis. Resultados encontrados na literatura relataram que o período de degradação do PHB é superior a 52 semanas. Enquanto que para o poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) na proporção 75/25, PLGA, este período está na faixa entre 16-20 semanas (NAIR & LAURENCIN, 2007). Arcabouços de PLGA confeccionados pela técnica de lixiviação de sal apresentaram colapsos dos poros após o mesmo período de degradação (CAO *et al.*, 2006).

Os resultados do teste de degradação *in vitro* de arcabouços porosos de PHB realizados por um período de 30 dias não foram conclusivos, requerendo um tempo maior de análise para permitir a ocorrência das mudanças morfológicas com a degradação.

#### 4.7. Teste de Adesão de Condrócitos aos Arcabouços Porosos de PHB

O teste de adesão de condrócitos foi realizado nos arcabouços confeccionados pela técnica de emulsificação (emulsão de PHB 7,6 % (p/v) em clorofórmio/água na proporção 86:14) e por lixiviação de sal. A morfologia dos arcabouços utilizados foi mostrada nas **Figuras 4.5 (a-b), 4.9 (a-d),** respectivamente.

A **Figura 4.13** apresenta imagem de MEV da seção transversal de um arcabouço de PHB confeccionados por emulsificação após cultivo de condrócitos humanos por 5 dias. As células aderidas na superfície migraram para o interior do arcabouço. Nesta figura, encontra-se em destaque um condrócito, com formato esférico, aderido à parede de um poro interno do arcabouço. A manutenção da morfologia arredonada, natural do condrócitos humanos na cartilagem hialina, sugerem que o fenótipo celular deve ter sido preservado nesta cultura *"in vitro"*. O resultado positivo do teste biológico é um indício de que o arcabouço produzido não apresentou efeito tóxico às células e que, possivelmente, todo solvente foi removido do material.



**Figura 4.13:** Imagem de MEV da seção transversal de arcabouço de PHB confeccionados por emulsificação após cultivo de condrócitos humanos por 5 dias.

Os arcabouços avaliados apresentaram uma faixa de tamanho de poros de 19 a 98 µm. De acordo com a Literatura, poros na faixa de 38-150 µm são adequados para cultivo de condrócitos *in vitro* (DICK *et al.*, 2008). No entanto, o número de células aderidas no material foi abaixo do esperado. Possivelmente, devido à baixa dispersão de poros na estrutura do biomaterial.

Os arcabouços preparados pela técnica de lixiviação de sal não apresentaram adesão de condrócitos após a realização do teste *in vitro*. Provavelmente, este resultado foi ocasionado pelos resíduos salinos que permaneceram nos arcabouços porosos de PHB. Análises termogravimétricas do material indicaram a presença de 1,66% de massa residual, sugerindo que uma parte do cloreto de sódio utilizado não foi retirada pelo processo de lixívia (**Figura 4.14**). A presença de resíduos salinos ilustra uma das desvantagens do uso da técnica lixiviação de sal para fabricação de arcabouços porosos.



Figura 4.14. Análise termogravimétrica de arcabouço de PHB produzido por lixiviação de sal.

# **CAPÍTULO V**

## CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusões

- Este trabalho objetivou a confecção de arcabouços de PHB empregando três técnicas distintas: emulsificação, separação de fase induzida termicamente (TIPS) e lixiviação de sal. Foi avaliada a influência da técnica e dos parâmetros experimentais empregados nas características finais dos arcabouços.
- A técnica de emulsificação a partir da adição de solução aquosa a solução de PHB permitiu a produção de arcabouços com melhores propriedades morfológicas, relacionadas à porosidade e interconectividade dos poros. Os arcabouços apresentaram porosidades na faixa de 88% - 92%. Nas imagens de MEV, foram observados poros abertos, sugerindo que o material possua elevada interconectividade.
- Na técnica de emulsificação, a estabilidade da emulsão influenciou na estrutura morfológica dos arcabouços. Observou-se o aumento do tamanho dos poros dos arcabouços produzidos por emulsificação com o aumento da concentração da solução de PHB e com o aumento da fração volumétrica empregada. E o aumento de porosidade foi relatado nos arcabouços confeccionados com o maior valor de fração volumétrica e menor concentração de solução de PHB. Nos arcabouços confeccionados por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e um f = 0,5 apresentaram região com deficiência de poros. Este resultado possivelmente está associado a fenômenos de desestabilizam a emulsão, como a sedimentação.
- A técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) apresentou valores baixos de porosidade com relação a resultados relatados na literatura e, aparentemente, poros com pouca interconectividade. Os resultados indicaram a influência dos parâmetros nas características morfológicas do material, relacionado com a termodinâmica da solução polimérica. Os arcabouços foram produzidos com o primeiro resfriamento acima (2°C) e abaixo (-30°C) do ponto

de névoa. Os resultados apresentaram poros maiores nos arcabouços confeccionados com o primeiro resfriamento a 2°C, ao contrário do esperado. O processo *coarsening* não foi observado nos arcabouços preparados com o 1° resfriamento abaixo do ponto de névoa.

- No TIPS, a formação dos poros ocorreu pela termodinâmica de separação de fase líquido-líquido e, provavelmente, pelo mecanismo de nucleação e crescimento na região de maior concentração de solução de PHB.
- Além da influência termodinâmica envolvida na formação das características morfológicas dos arcabouços, as etapas de remoção do solvente (*freezeextraction*) e de secagem do material, possivelmente, influenciaram as características finais dos arcabouços. A obtenção de materiais com regiões densas provavelmente foram ocasionadas pela dissolução do polímero durante a secagem devido à permanência de resíduo de solvente ou acarretadas pela tensão superficial do etanol no processo de secagem.
- A técnica de lixiviação de sal produziu arcabouços com poros fechados e contendo resíduos de sal, o que tornou o material tóxico aos condrócitos, sendo desvantagens associadas a esta técnica.
- O teste de adesão de condrócitos humanos *in vitro* mostrou a citocompatibilidade dos arcabouços confeccionados por emulsificação a partir de emulsões obtidas pela mistura do polímero em solvente:não-solvente. A adesão de condrócitos abaixo do valor esperado esta associada às características morfológicas apresentadas por estes arcabouços.
- Os resultados do teste de degradação *in vitro* dos arcabouços de PHB produzidos com as técnicas de lixiviação de sal e emulsificação não foram conclusivos devido ao tempo destinado para a análise.
- Os resultados obtidos por DSC relataram, principalmente a influência da solução aquosa empregadas na confecção dos arcabouços por emulsificação na cristalinidade do material. Houve uma redução significativa nos valores de cristalinidade com relação aos filmes densos de PHB, principalmente para os arcabouços confeccionados com a mesma solução polimérica do filme denso 10% (p/v) e f = 0,3.
- Os arcabouços confeccionados por emulsificação de uma solução de PHB 10% (p/v) e f =0,5 ou 0,3 exibiram maior módulo de compressão, quando foi

empregado f = 0,3. Estes resultados podem estar relacionados à menor porosidade e cristalinidade apresentadas por estes arcabouços, além da maior fragilidade da estrutura porosa, evidenciada pela espessura da parede dos poros nos arcabouços preparados com maior f.

#### 5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

• Estudos relacionados à termodinâmica de soluções de PHB devem ser realizados para a obtenção do ajustes dos parâmetros do processo. A influência da concentração da solução polimérica e da adição de aditivos são parâmetros que também podem ser avaliados. A utilização de outros métodos para a determinação do ponto de névoa, como a técnica de calorimetria diferencial de varredura modulada e de espalhamento de luz podem permitir a determinação mais precisa do ponto de névoa.

• Na técnica de emulsificação, o conhecimento da cinética dos processos envolvidos na desestabilização da emulsão é necessário para a identificação mais específica da influência destes fenômenos nas características morfológicas dos arcabouços. Além de possibilitar o controle dos parâmetros. O espectrofotômetro Marvern pode ser empregado para a determinação da distribuição das gotas da fase dispersa na emulsão.

• A análise de imagens tridimensionais dos arcabouços obtidas pela técnica de tomografia pode ser realizada para comprovar a interconectividade dos poros dos arcabouços. Estudos de permeabilidade dos arcabouços devem ser realizados para a determinação quantitativa da interconectividade do material.

• Estudos mais avançados do ensaio da degradação *in vitro* dos arcabouços de PHB devem ser realizados, empregando um maior tempo de análise. Além das imagens de microscopia eletrônica de varredura, a técnica de calorimetria diferencial de varredura deve ser usada para a determinação da variação da cristalinidade com o tempo de degradação, visto que a variação na cristalinidade caracteriza a primeira etapa da degradação de poliéster natural. As medidas da propriedade mecânica e a pesagem do material também podem ser empregadas para avaliar as alterações na resistência e na perda de massa, respectivamente, com a degradação.

# **CAPÍTULO VI**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMSON, A. W, 1990, *Physical Chemistry of Surfaces* 5 ed., Los Angeles, John Wiley & Sons.
- ANDRADE, R. L., 2006 "Biomateriais Utilizados em Bioengenharia Ortopédica" Estud. Biol., v. 28, n.63, p.17-23;
- ARKIN, A. H. & BAKI, H., 2002. "Chemical Modification of Chlorinated Microbial Polyesters" *Biomacromolecules*, v.3, pp. 1327-1335.
- BABENSEE, J. E, MCINTIRE, L. V, MIKOS, A. G., 2000 "Growth Factor Delivery for Tissue Engineering" *Pharmaceutical Research* v 17, pp 497-504.
- BARBANTI, S. H, ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, R. A. E., 2005, "Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos" *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 15, pp. 13-21.
- BARBETTA, A., MASSIMI, M., ROSARI, B., et al., 2008, "Emulsion Templated Scaffolds that Include Gelatin and Glycosaminoglycans" *Biomacromolecules*, v. 9, pp. 2844-2856.
- BLOEMBERGEN, S., HOLDEN, D. A, 1986, "Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly (β-hidroxybutirate-co- β-hidroxyvalerate)", *Macromolecules*, pp, 2865-2871.
- BOYAN, B. D., HUMMERT, T. W., DEAN, D. D., et al., 1996. "Role of Material Surfaces in Regulating Bone and Cartilage Cell Response", *Biomaterials*, v. 17, pp.137–146.
- CAO, Y., MITCHELL, G., MESSINA, A., PRICE, L., et al., 2006, "The Influence of Architecture on Degradation and Tissue Ingrowth into Three-Dimensional Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Scaffolds in Vitro and in Vivo", *Biomaterials*, v. 27, pp. 2854–2864.
- CAO, Y., TRISTAN, C. I., COOPER-WHITE, J. J., et al., 2004, "Production and Surface Modification of Polylactide-Based Polymeric Scaffolds for Soft-Tissue Engineering" In: HOLLANDER, P. A., HATTON, V. P., *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*, capítulo:8, Totowa, USA, Humana Press Inc.

- CHEN, C.; ZHOU, X.; ZHUANG, Y.; DONG, L, 2005 "Thermal Behavior and Intermolecular Interactions in Blends of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Maleated Poly(3-Hydroxybutyrate) with Chitosan" *Journal Of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v. 43, pp 35-47.
- CHEN, J. V; MA, P. X., 2005, "Polymer Phase Separation" In: MA, P. X., ELISSEF, J. (eds), *Scaffolding in Tissue Engineering*, capítulo 9, Boca Raton, USA, CRCPress.
- CHEUNG, H., LAU, K., LU, T., HUI, D., 2007. "A Critical Review on Polymer-Based Bio-Engineered Materials for Scaffold Development", *Composites: Part B*, v.38, pp 291–300.
- DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G., 2007, "Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e Preparação de Amostras", Porto Alegre, Edipucrs.
- DICK, S., ROCHA, A. G., MATIAS, F., et al., 2008, In: 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam.
- DOREMUS, R. H., 1992. "Review Bioceramics", *Journal of Material Science*, v. 27, pp. 285-297.
- ELLISSEFF, J. & MA P., 2005 "Scaffolding in Tissue Engineering", Editora Taylor & Francis .
- FREIER, T., 2006. "Biopolyesters in Tissue Engineering Applications" Advanced Polymer Science, v. 203, pp 1–61.
- GOMES, E. M. M., 2004, A Bone Tissue Engineering Strategy Based on Starch Scaffolds and Bone Marrow Cells Cultured in a Flow Perfusion Bioreactor. Tese de D.Sc., Universidade do Minho, Lisboa, Portugal.
- GREEN, D., WALSH, D., MANN, S., OREFFO, C. O. R, 2002, "The Potential of Biomimesis in Bone Tissue Engineering: Lessons From the Design and Synthesis of Invertebrate Skeletons", *Bone*, v.30, pp:810–815.
- HEIJDEN, P. C. V., 2001 "The Formation of Porous Structures by Thermally-Induced Phase-Separation" In: A Dsc-Study on the Demixing of Binary Polymer Solutions, Print Partners Ipskamp, pp. 1-8.
- HILBORN, J., BJURSYEN, M. L., 2007. "A New and Envolving Paradigm for Biocompatibility", Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine v.1, pp 110 – 119.

- HO, M., KUO, P., HSIEH, H., et al., 2004, "Preparation of Porous Scaffolds by Using Freeze-Extraction and Freeze-Gelation Methods", *Biomaterials*, v. 25, pp. 129-138.
- HO, T. H & HUTMACHER, 2006, "A Comparison of Micro CT with Other Techniques Used in the Characterization of Scaffolds", *Biomaterials*, v. 27, pp 1362–1376.
- HUA, F., PARK, G. T, LEE, S. D., 2003, "A Facile Preparation of Highly Interconnected Macroporous Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) Scaffolds by Liquid–Liquid Phase Separation of a PLGA–Dioxane–Water Ternary System", *Polymer*, v. 44, pp. 1911–1920.
- HUTMACHER, D. W, 2000, "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage", *Biomaterials*, v. 21, pp. 2529–43.
- INOUE, Y., YOSHI, N., 1992, "Structure and Physical Properties of Bacterially Synthesized Polyesters, *Progress in Polymer Science*, v. 17, pp. 571-610.
- KARAGEORGIOU, V., KAPLAN, D., 2005. "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis" *Biomaterials* v. 26, pp 5474–5491.
- KIM, H. D., BAE, E. H, KWON I. C., et al., 2004 "Effect of PEG–PLLA Diblock Copolymer on Macroporous PLLA Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation", *Biomaterials*, v. 25, pp. 2319 – 2329.
- KREVELEN VAN, D. W., 1997, Properties of Polymers. 3 ed Amsterdam, Elsevier.
- LANGER, R., VACANTI, J. P, 1993, "Tissue Engineering", Science, v. 260 pp. 920 926.
- LI, J.C.; FUKUOKA, T.; HE, Y.; et al, 2005, "Thermal And Crystallization Behavior of Hydrogen-Bonded Miscible Blend of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Enzymatically Polymerized Polyphenol" *Journal of Applied Polymer Science*"v. 97, pp. 2439-2449.
- LORCAN, A. T., TOSETTO, M., MILLER S. I., et al., 2006, "Surface-Induced Changes in Protein Adsorption and Implications for Cellular Phenotypic Responses to Surface Interactions", *Biomaterials* v. 27, n. 16, pp.3096–3108.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E., 2001, "Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica", Rio de Janeiro, Epapers serviços editoriais.
- LUO, Y., ENGELMAYR, G., AUGUSTE, T. D. et al., 2007 "Three-dimensional Scaffolds", In: LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. (eds)., Principles of Tissue Engineering, capítulo 25, U.S.A., Elsevier.

- MA, P. 2004, "Scaffolding for Tissue Engineering", Materials Today, pp. 30 40.
- MA, Z., MAO, Z., GAO, C., 2007, "Surface Modification and Property Analysis of Biomedical Polymers Used for Tissue Engineering". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces article in press*; pp1-21.
- MA P. X, LANGER R., 1999, "Fabrication of Biodegradable Polymer Foams for Cell Transplantation and Tissue Engineering, In: MORGAN, R. J, YARMUSH, L. M. (eds)., *Tissue engineering methods and protocols*, capítulo 4, Totowa, USA, Humana Press Inc.
- MARTINEZ-PEREZ, C. A., GARCIA-CASILLAS, P.E., 2006, "Porous Biodegradable Polyurethane Scaffolds Prepred by Thermally Induced Phase Separation" *Journal Of Advanced Materials*, n. 1, pp. 5-10.
- MENDONÇA, R. H, 2008, "Imobilização de Fibronectina na Superfície de Suportes Porosos de PHB para Aplicação em Engenharia Óssea" Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MISRA, K. S., VALAPPIL, P. S., ROY, I. E., et al., 2006, "Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications", *Biomacromolecules*, v. 7, pp 2249-2258.
- NAIR, S., LAURENCIN, T. C, 2007. "Biodegradable Polymers as Biomaterials", *Progress Polymer Science*, v. 32, pp 762–798.
- NAM, S. Y., PARK, G. T., 1999, "Biodegradable Polymeric Microcellular Foams by Modified Thermally Induced Phase Separation Method", *Biomaterials*, v. 20, pp. 1783 – 1790.
- ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M., MANSUR, H. S., 2005, *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*, 1 ed, Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica.
- O'SHEA, T. M., MIAO, X., 2008, "Bilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering" *Tissue Engineering: Part B*, v. 14, pp. 447 – 464.
- RANUCCI, C. S, KUMAR, A., BATRA, S. P., et al., 2000, "Control of Hepatocyte Function on Collagen Foams: Sizing Matrix Pores Toward Selective Induction of 2-D and 3-D Cellular Morphogenesis", *Biomaterials*, v. 21, pp. 783–793.
- SADER, M. S., 2003, Preparação e Caracterização de Estruturas Porosas do Poliéster Biodegradável Poli(3-hidroxibutirato) para Aplicações em Engenharia de Tecidos. Dissertação de mestrado, Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano (IMA/UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- SHAW, D. J., 1992, Introduction to Colloid & Surface Chemistry, 4 ed., Liverpool, An imprint of Elsevier Science.
- SHIEH, S., VACANTI, J. P., 2005, "State-of-the-Art Tissue Engineering: from Tissue Engineering to Organ Building", Surgery, v. 137, pp 1-7.
- SHIN, K. C, KIM, B. S., KIM, J. H., et al., 2005, "A Facile Preparation of Highly Interconnected Macroporous PLGA Scaffolds by Liquid–Liquid Phase Separation II", *Polymer*, v. 46, pp. 3801–3808.
- SJÖBLOM, J., 1992, *Emulsions--a Fundamental and Practical Approach*, Bergen, Norway, Johan.
- SONG, S., TORKELSON, J. M., 1995, "Coarsening Effects on the Formation of Microporous Membranes Produced via Thermally Induced Phase Separation of Polystyrene-Cyclohexanol Solutions ",*Journal of Membrane Science*, v. 98, pp. 209-222.
- SULTANA, N., WANG M., 2008, "Fabrication of HA/PHBV Composite Scaffolds through the Emulsion Freezing/Freeze-Drying Process and Characterization Of the Scaffolds" J Mater Sci: Mater Med, v. 19, pp. 2555–2561.
- SUN, J., WU, J., LI, W., et al., 2005, "Macroporous Poly(3-hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) Matrices for Cartilage Tissue Engineering", *European Polymer Journal*, v. 41, pp. 2443–2449.
- TABATA, 2005, "Role of Gelatin in the Release Carrier of Growth Factor for Tissue Engineering", In: MA, P. X., ELISSEF, J. (eds), *Scaffolding in Tissue Engineering*, capítulo 4, Boca Raton, USA, CRCPress.
- TESSMAR, K. J, GÖPFERICH, M. A., 2007, "Matrices and Scaffolds for Protein Delivery in Tissue Engineering" *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, pp 274–291.
- VANIN, M., SANTANA ,C. C., 2004, "Estudo da Degradação "In Vitro" de Blendas de Poli(α-Hidroxibutirato) (PHB) / Poli(L-Ácido Latico) (PLLA) na Forma de Filmes" Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 14, pp. 187-193.
- WHANG, K, THOMAS, G. K, HEALY, K. E., 2000, "A Biodegradable Polymer Scaffold for Delivery of Osteotropic Factors" *Biomaterials*, v.21, n. 24, pp 2545-2551.
- WHANG, K., THOMAS, C. H, HEALY, K. E., 1995, "A Novel Method to Fabricate Bioabsorbable Scaffolds" *Polymer*, v. 36, pp. 837-842.

- WILLIAMS, F. S, MARTIN, P.D, HOROWITZ, M. D., et al., 1999, "PHA Applications: Addressing the Price Performance Issue I. Tissue Engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, v 25, pp 111–121.
- WITTE, P. DIJKSTRA, J. P, BERG, J. W. A, et al., 1996, "Phase Separation Processes in Polymer Solutions in Relation to Membrane Formation" *Journal Of Membrane Science*, v. 117, pp 1-31.
- YANG, F., MURUGAN, R., RAMAKRISHNA S., et al., 2004, "Fabrication of Nano-Structured Porous PLLA Scaffold Intended for Nerve Tissue Engineering" *Biomaterials*, v. 25, pp. 1891–1900.
- ZHANG, J., WU, L., JING, D., et al., 2005. "A Comparative Study of Porous Scaffolds with Cubic and Spherical Macropores" *Polymer*, v. 46, pp. 4979–4985.
- ZHANG, L., XIONG, C., DENG, X., 1995. "Biodegradable Polyester Blends for Biomedical Application". J Appl Polym Sci, vol. 56, p.p 103–12.
## ANEXO



Figura A.1: Curva de DSC do filme de PHB preparado com uma solução 10%.



Figura A.2: Curva de DSC do arcabouço de PHB confeccionados pela técnica de lixiviação de sal com uma solução 10%.



**Figura A.3.** Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão utilizando solução de PHB 10% e f 0,3.



Figura A.4: Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão utilizando solução de PHB 10% e f 0,5



Figura A.5: Curva de DSC do arcabouço poroso confeccionados pela técnica emulsão utilizando solução de PHB 135% e f 0,5.

This document was created with Win2PDF available at <a href="http://www.win2pdf.com">http://www.win2pdf.com</a>. The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only. This page will not be added after purchasing Win2PDF.