

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

GUILHERME HOFFMAN DE CASTRO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* POROSOS DE
ÁLCOOL POLI VINÍLICO PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS:
UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO E
FORMAÇÃO GASOSA**

BELO HORIZONTE

2018

GUILHERME HOFFMAN DE CASTRO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* POROSOS DE
ÁLCOOL POLI VINÍLICO PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS:
UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO E
FORMAÇÃO GASOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais de Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Viana Ferreira

BELO HORIZONTE

2018

GUILHERME HOFFMAN DE CASTRO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* POROSOS DE ÁLCOOL
POLI VINÍLICO PARA APLICAÇÃO NA ENGEHARIA DE TECIDOS:
UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE FREEZE/THAWING E FORMAÇÃO GASOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais de Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra Roberta Viana Ferreira – **Orientadora DEMAT/CEFET-MG**

Prof.^a Dra. Aline Bruna da Silva **DEMAT/CEFET-MG**

Prof.^a Dra Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo **DEMAT/CEFET-MG**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os agradecimentos enaltecendo à Deus, pela vida que tenho, por me guiar pelos caminhos certos colocando pessoas incríveis ao meu redor.

Agradeço à minha orientadora Dra Roberta Viana, por todo apoio e confiança em meu trabalho, pela liberdade concedida durante o desenvolvimento deste projeto e seu diversos frutos e oportunidades geradas, que com certeza foram de fundamental importância para meu amadurecimento pessoal e acadêmico.

Sou grato a todos os professores do CEFET que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, com conhecimento técnico e com suporte na realização dos experimentos.

Ao CEFET-MG como instituição, pela infraestrutura cedida pra este projeto, e por ser um local onde pude desenvolver diversas competências ao longo dos anos.

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma linha de estudos que aplica conhecimentos físico-químicos e biológicos para a síntese de materiais denominados *scaffolds*, que sejam capazes suportar o desenvolvimento de células para a regeneração de um tecido danificado. No âmbito de desenvolvimento destes substratos, o álcool poli vinílico (PVA), é bastante utilizado por ser um material biocompatível e biodegradável. Entretanto, este material exige em seu processamento o uso de substâncias químicas nocivas ao organismo para promover a melhoria de suas propriedades mecânicas.

De modo a melhorar a biocompatibilidade do material formado, minimizando-se a quantidade de elementos nocivos utilizados na síntese dos *scaffolds*, este trabalho propõe uma rota alternativa de produção destes. A reticulação física das cadeias, aliada aplicação das técnicas de formação gasosa e liofilização, foram utilizadas para formar uma estrutura porosa com tamanho de poro médio entre 140 e 300 μm , compatível com a aplicação deste material na engenharia de tecidos. O material foi caracterizado quimicamente durante as etapas de síntese avaliando-se as bandas de transmitância, via espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier. Além disso, foram realizadas caracterizações térmicas como a calorimetria diferencial exploratória, e análise termogravimétrica.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; *scaffolds*; álcool poli vinílico; reticulação física; liofilização.

ABSTRACT

Tissue engineering a line of studies that applies physico-chemical and biological knowledge to manufacture materials named scaffolds, which are able to support the development of cells for the regeneration of a damaged tissue. In the development of these substrates, poly (vinyl alcohol) (PVA) is widely used as a biocompatible and biodegradable material. However, this material requires in its processing the use of harmful substances to the body to upgrade its mechanical properties.

In order to improve the PVA biocompatibility, minimizing the amount of harmful elements used in the synthesis of the scaffolds, this work proposes an alternative route of production of these. The physical crosslinking of the chains, together with the application of lyophilization techniques, to form a porous structure with a mean pore size between 140 and 300 μm , compatible with the application of this material in tissue engineering. The material was chemically characterized during the synthesis steps by evaluating the transmittance bands via Fourier transform infrared spectroscopy. In addition, thermal characterizations such as differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis were performed.

Key-words:tissue engineering; *scaffolds*; poly (vinyl alcohol); physical crosslinking; lyophilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tríade que compõe a Engenharia de Tecidos.....	15
Figura 2 – Diferentes abordagens para produção de <i>scaffolds</i>	18
Figura 3 – Etapas de obtenção do poli álcool vinílico	22
Figura 4 – Reação de Reticulação do PVA.....	26
Figura 5 - Aproximação das cadeias de PVA pelo processo de congelamento	27
Figura 6 - Separação de fase durante o processo de reticulação física	28
Figura 7 – Fluxograma de processos seguido na obtenção das espumas.....	32
Figura 8 – Gráfico de FITR para as amostras (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.....	36
Figura 9 – Destaque para a região do infravermelho 2000 – 500 cm ⁻¹ (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.	38
Figura 10 – Reação de degradação do PVA induzida pela radiação UV e catalisada por íons de cloro	39
Figura 11 – Reação de desidratação térmica do PVA.....	40
Figura 12 – Calorimetria Diferencial Exploratória da amostra de PVA puro	41
Figura 13 – Gráfico de DSC para as amostras (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.....	42
Figura 14 – Análise Termogravimétrica das amostras nos diferentes ciclos.....	43
Figura 15 – Análise Termogravimétrica a partir de 150 °C.....	45
Figura 16 – Termogravimetria para o carbonato de cálcio utilizado	46
Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Varredura para as amostras de PVA de PVA 1 (A), PVA 3 (B), PVA 6 (C), PVA 9 (D) e PVA 12 (E).	48
Figura 18 – Histograma da dispersão do tamanho de poro obtido em cada ciclo de congelamento e descongelamento.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das propriedades do poli álcool vinílico.....	24
Tabela 2 – Identificação das amostras quanto ao número de ciclos de congelamento e descongelamento submetidos	33
Tabela 3 – Modos Vibracionais dos grupos identificados para as amostras.....	37
Tabela 4 – Comparação das temperaturas de degradação durante a termogravimetria ..	44
Tabela 5 – Comparação das quantidades de material residual presentes ao final do ensaio de termogravimetria	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos gerais	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Engenharia de Tecidos.....	14
3.2	<i>Scaffolds</i>	16
3.3	Técnicas de fabricação dos <i>scaffolds</i> poliméricos	19
3.3.1	<i>Lixiviação salina</i>	19
3.3.2	<i>Formação gasosa</i>	20
3.3.3	<i>Liofilização</i>	21
3.4	Poli(álcool vinílico) – PVA	22
3.4.1	<i>Estrutura molecular</i>	22
3.4.2	<i>Estrutura e propriedades</i>	23
3.4.3	<i>Reticulação</i>	24
3.4.4	<i>Reticulação química</i>	25
3.4.5	<i>Reticulação física</i>	26
3.4.6	<i>Aplicações</i>	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Produção e caracterização da espuma de PVA.....	32
4.1.1	<i>Materiais</i>	32
4.1.2	<i>Procedimento Experimental</i>	32
4.2	Caracterizações	34
4.2.1	<i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	34

4.2.2	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	34
4.2.3	<i>Termogravimetria (TG)</i>	34
4.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Análise Química	36
5.2	Análise Térmica.....	41
5.2.1	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</i>	41
5.2.2	<i>Termogravimetria (TG)</i>	43
5.2.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	48
6	CONCLUSÕES	52
7	SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história o ser humano sempre esteve em busca do aprimoramento tecnológico para a melhoria em sua qualidade de vida. No campo da medicina isto também é válido, com vários exemplos da utilização de materiais, implantes e técnicas reconstrutivas para suprir alguma deficiência, ou reparar os danos causados por uma lesão tecidual. Atualmente a medicina regenerativa conta com tecnologias capazes de restaurar funções, tecidos e órgão por meio de cirurgias e transplante de órgãos. Entretanto há uma desproporção muito grande entre a demanda de material biológico para o tratamento destas pessoas, e a quantidade disponível a ser utilizado (BLITTERSWIJK, C.A., BOER, J., 2015).

A engenharia de tecidos surge então como uma alternativa para se produzir dispositivos vivos e funcionais, para a substituição em partes, ou até mesmo na totalidade órgãos e tecidos que se apresentam danificados. Este novo campo de estudos aplica conceitos da engenharia, e biologia para a construção de substitutos funcionais a partir da combinação de células com um substrato responsável por guiar o desenvolvimento das mesmas até a formação de um tecido maduro (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J. 2014).

A estratégia aplicada pela engenharia de tecidos, para a regeneração tecidual envolve o uso de biomateriais denominados *scaffolds*, células, e moléculas sinalizadoras. De modo geral, coleta-se as células do paciente para serem cultivadas e diferenciadas e por fim implantadas e proliferadas sobre o *scaffold* (SULTANA, N., 2018). A produção destes substratos é atualmente uma das maiores áreas de estudo dentro dos biomateriais, dada a sua importância à engenharia de tecidos. Estes são caracterizados por serem um material tridimensional, sólido e poroso, capaz de desempenhar diversas funções no reparo tecidual. Dentre elas destaca-se a promoção de uma interação entre célula e material, a permeabilidade à passagem de gases e nutrientes, biodegradabilidade e biocompatibilidade (DHANDAYUTHAPANI, B. *et al.*, 2011).

A produção de *scaffolds* deve levar em conta o tipo de tecido que será reconstituído suas exigências mecânicas e morfológicas. A partir destas informações são definidos os materiais mais adequados à dada aplicação e também o processo pelo qual a matéria prima será submetida para a formação de tal estrutura. Existem várias combinações possíveis utilizando-se materiais de origem natural ou sintética, além de processos para a formação de poros que aplicam diferentes princípios físicos e/ou químicos para a formação de uma estrutura porosa (HUTMACHER, D. W., 2001).

Em trabalhos anteriores foi realizada a produção e caracterização de espumas poliméricas de poli álcool vinílico (PVA) para a potencial atuação na engenharia de tecidos de uma válvula cardíaca (ROSA, J.J., FERREIRA, R.V., 2016). Utilizou-se este material por sua versatilidade quanto ao processamento, e principalmente por suas aplicações no campo biomédico. As propriedades físico-químicas, como hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade contribuem para este seja um bom candidato à aplicação com *scaffold* na engenharia de tecidos (PARADOSSI, G., CHIESSI, F., CAVALIERI, E., 2003).

A aplicação do poli álcool vinílico como *scaffold* na engenharia de tecidos é feita de modo geral na forma de filmes, espumas e hidrogéis. Em geral é realizada a reticulação do PVA para atingir as propriedades mecânicas adequadas para a sustentação do desenvolvimento celular (VRANA, N. E. 2009). Uma das formas mais comuns de se promover esta reação no PVA é por meio da reticulação química deste material com o glutaraldeído. Esta substância é capaz de estabelecer ligações cruzadas entre as cadeias do polímero e formar uma rede insolúvel com o material com propriedades mecânicas controladas pelo tempo de reação, e concentração do agente reticulante. (FIGUEIREDO, K.C.S., ALVES, T.L.M., BORGES, C.P., 2008).

A reticulação química do PVA foi abordada em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo pesquisa, e os efeitos sobre as espumas deste material foram descritos (BAI, X. *et al.*, 2010) (ROSA, J.J., FERREIRA, R.V., 2016). Entretanto tal procedimento pode ser tóxico para células que serão posteriormente cultivadas no material, pois os resíduos dos agentes reticulantes possuem um efeito citotóxico para as mesmas (OKAY, O., 2014). Um processo de reticulação alternativo à reticulação química é processo de reticulação física. Tal processo consiste em submeter o material a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento para a formação de interações inter e intramoleculares mais intensas entre as cadeias dos polímeros. Este processo apresenta como vantagens a ausência de resíduos químicos, e o estabelecimento de ligações não são permanentes, fazendo com que este processo seja totalmente reversível (VRANA, N. E. 2009).

O presente projeto consistiu da produção e caracterização de espumas de PVA reticuladas fisicamente. A produção das espumas foi realizada através de uma combinação dos métodos de formação gasosa e liofilização. A espuma foi reticulada por meio de um processo que consistiu de diversos ciclos de congelamento/descongelamento. O material foi caracterizado buscando-se avaliar a influencia dos ciclos de congelamento/descongelamento, na formação dos poros, a composição e propriedades térmicas da espuma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produzir um substrato poroso para potencial aplicação como *scaffold* na engenharia de tecidos constituído de uma espuma de poli álcool vinílico reticulada fisicamente.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir uma espuma polimérica de poli álcool vinílico pela combinação de técnicas de formação gasosa e liofilização;
- Promover a reticulação física do material por meio de ciclos de congelamento e descongelamento;
- Avaliar os impactos do número de ciclos processo nos aspectos físico-químicos, térmicos e morfológicos do material obtido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de Tecidos

As cirurgias reconstrutivas estão presentes no contexto humano desde o início de sua história. A humanidade buscou sempre uma melhoria na qualidade de vida dos indivíduos a partir da reconstrução de algum componente biológico danificado, de modo a substituir a função perdida. Atualmente existem técnicas bastante sofisticadas de transplantes de órgãos e tecidos de um indivíduo a outro. Tais metodologias foram revolucionárias quando empregadas pela primeira vez, e até hoje são responsáveis salvar inúmeras vidas em todo o mundo (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

Nos últimos anos têm se visto uma melhora gradativa dos processos de transplante de órgãos, graças ao desenvolvimento de metodologias mais aprimoradas, e a atuação dos agentes imunossupressores. No entanto, em alguns casos, observa-se uma rejeição crônica por parte do sistema imune do paciente, e há casos em que tais imunossupressores estão relacionados com o posterior surgimento de cânceres, devido ao desequilíbrio imunológico (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014). Além disso, para todos os procedimentos de transplante, a baixa quantidade de tecido disponível para ser utilizado é o principal gargalo encontrado na medicina regenerativa. E ainda, debates éticos e morais como, por exemplo, a respeito da utilização de tecido fetal em terapias, são dilemas ainda não resolvidos nesta área (SALTZMAN, 2004).

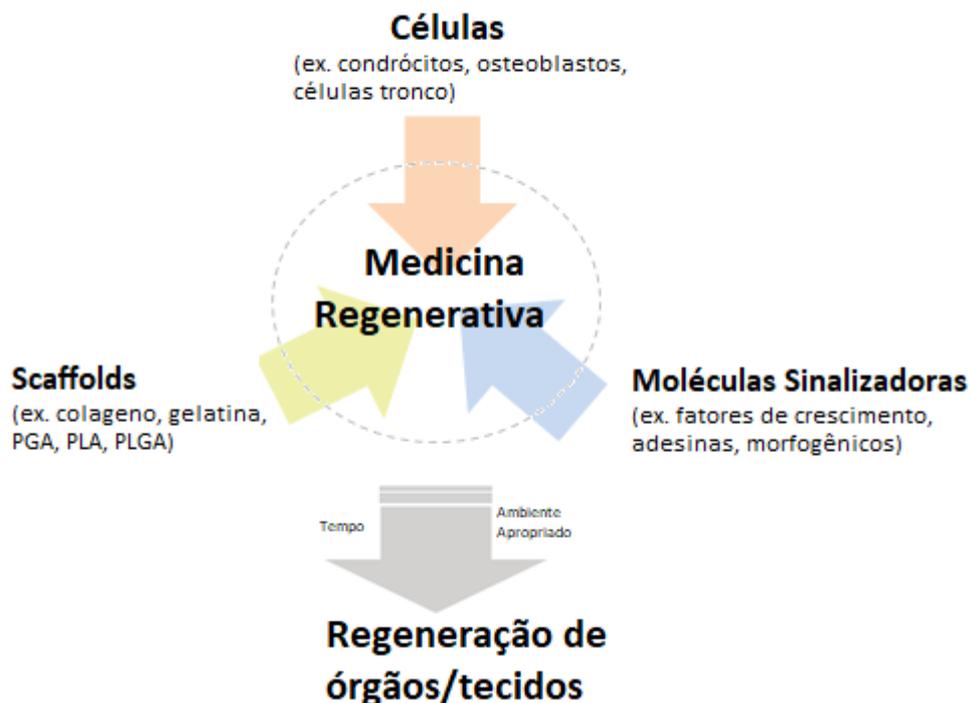
A engenharia de tecidos surge então como uma alternativa para suprir a demanda atual por órgãos e tecidos para a medicina regenerativa, além de oferecer vantagens como uma melhor biocompatibilidade dos tecidos oferecidos e maior acessibilidade à população (KHANG, G., 2017). O seu principal objetivo é o desenvolvimento e a construção de componentes biológicos vivos e funcionais que podem ser utilizados para a regeneração de tecidos defeituosos (BUTTERY, L.D.K., BISHOP, A.E., 2005).

A engenharia de tecidos apoia-se em uma tríade de componentes, como apresentado na figura 1, para garantir o sucesso de seus produtos são estes: as células, o biomaterial e os sinais químicos. Qualquer combinação entre estes três pilares pode ser utilizada a depender sempre do tipo de tecido em que se deseja reparar (KHANG, G., 2017).

As células desempenham um papel fundamental para a reparação e regeneração, uma vez que são responsáveis pela coordenação da estrutura básica dos tecidos e de suas funções. Elas podem ter várias origens sendo células adultas diferenciadas, células tronco fetais ou

embrionárias, e ainda as células tronco pluripotentes induzidas (POLAK, J. *et al.*, 2008). Os biomateriais são denominados *scaffolds*, ou seja, atuam como suportes para as células enquanto estas se proliferam, diferenciam e migram pra a formação do novo tecido. Os materiais aplicados nestes componentes podem ter origem natural, sintética ou uma composição híbrida formada por ambos (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014). E por fim os sinais químicos, os quais são proteínas que influenciam diretamente a proliferação e o crescimento de células, por meio de estímulos para a diferenciação celular. Diferentes tipos de sinais podem ser utilizados, sendo eles sintetizados pelas células presentes no *scaffold*, ou introduzidos artificialmente no biomaterial para sua liberação controlada no meio biológico à medida que o material se degrada. A escolha destes fatores depende do tecido em que se trabalha e a morfologia final esperada para este (BRONZINO, J.D., PETERSON, D. R., 2015).

Figura 1 - Tríade que compõe a Engenharia de Tecidos



Fonte: Figura adaptada de KHANG, G. (2017)

Como visto, a engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que deve contar com a participação de profissionais de diferentes formações para o desenvolvimento de estruturas funcionais que atendam aos requisitos necessários para a sua aplicação biomédica

(BLITTERSWIJK, C.A. BOER, J., 2015). Este campo de estudos tem conseguido nos últimos anos colocar no mercado alguns produtos capazes de promover a reparação tecidual humana, como por exemplo, pele, cartilagem, uretra, bexiga e traqueia. Estas são estruturas relativamente simples, constituídas por uma população de células homogênea. O grande desafio atual é a reprodução de estruturas tridimensionais com uma arquitetura complexa como ossos, coração, fígado, pulmão, rins entre outros, de modo funcional e biomimético (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

3.2 Scaffolds

A engenharia de tecidos visa à reparação dos tecidos biológicos utilizando da combinação entre células, biomateriais e fatores de crescimento. Esta estratégia aplica conhecimentos nas áreas de química, física, ciência dos materiais e biologia, para a construção de substitutos capazes de restaurar e manter funcionalidade de um tecido danificado. Deste modo busca-se a criação de um suporte poroso e tridimensional capaz de fornecer sustento para a adesão celular e permitir o desenvolvimento tecidual, estruturas estas denominadas de *scaffolds* (SCHNEIDER, H.J., SHAHINPOOR, M., 2017).

Os *scaffolds* desempenham um papel fundamental em toda a medicina regenerativa, que é direcionamento do crescimento celular. Grande parte das células dos mamíferos necessita de um substrato para se ancorar caso contrário não serão capazes de se multiplicar, e nem mesmo sobreviver. Por isso, a função de um *scaffold* é fornecer um local de ancoragem propício para as células, e fomentar sua proliferação e diferenciação (KHANG, G., 2017). A tarefa central no desenvolvimento de um *scaffold* é o entendimento das correlações entre as suas propriedades físico-químicas, e as funções biológicas as quais se deseja regenerar. Os tecidos vivos são ambientes dinâmicos com peculiaridades próprias variando em cada região do organismo, e da condição clínica do indivíduo, tornando o desenvolvimento destas estruturas uma tarefa bastante complicada (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

Para a aplicação biomédica os *scaffolds* possuem uma série de pré-requisitos que devem ser atendidos de modo a executar sua função com o mínimo de respostas inflamatórias e a maior eficiência na recuperação da função tecidual perdida. Da perspectiva dos materiais aplicados para o desenvolvimento desta estrutura, uma das propriedades mais importantes é a biocompatibilidade. Esta é a capacidade que um material deve possuir de interagir com o meio biológico e gerar reações imunológicas similares às que um tecido autólogo causaria caso fosse implantado. Algumas características do material devem ser levados em

consideração para se obter respostas inflamatórias brandas e uma boa integração com o tecido. Como exemplo, a hidrofiliabilidade e rugosidade são características superficiais, responsáveis pelas reações biológicas de interface entre material e tecido. Outra propriedade exigida é a biodegradabilidade, esta prevê a degradação do material (via hidrólise, oxidação ou atuação enzimática) em subprodutos solúveis tanto no sangue quanto na linfa, que serão metabolizados e eliminados do organismo (KLEE, D. EASTMOND, G., MCGRATH, J.E., 2003).

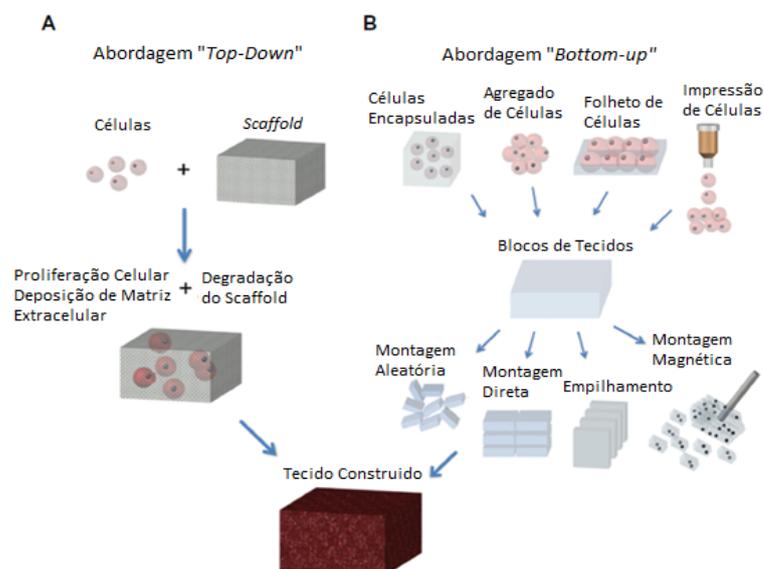
Propriedades físicas como a resistência mecânica e a porosidade dos *scaffolds* estão bastante relacionadas, sendo necessário um controle destes parâmetros para um bom desempenho do *scaffold*. Não é uma exigência para esta estrutura possuir a mesma resistência mecânica do tecido em que se está reconstruindo, devido à grande variabilidade de aplicações e formas possíveis para estes dispositivos. O ideal é que estes sejam capazes de resistir aos esforços aos quais serão submetidos durante a inserção de células, e enquanto fornecem suporte para as células em desenvolvimento para seu bom desempenho junto ao organismo (BLITTERSWIJK, C.A. BOER, J., 2015). Por serem materiais porosos a resistência mecânica dos *scaffolds* muitas vezes é determinada pelo arranjo estrutural de sua matéria prima, isto é, pelo tamanho de poro, orientação do material, cristalinidade entre outros fatores. O tamanho de poro ideal em um *scaffold* dependerá de fatores como o tipo de tecido que será regenerado, e o material escolhido, devendo estes ser maiores que 200 μm para fornecer uma irrigação sanguínea ao tecido que esta sendo regenerado. Uma população de poros variada é positiva para o desenvolvimento tecidual uma vez que a presença de macroporos ($>50 \mu\text{m}$) facilitam o transporte de nutrientes, enquanto que os microporos ($<50 \mu\text{m}$) fornecem uma boa densidade de células cultivadas. Além da presença de poros, deseja-se que estes estejam interconectados dentro da matriz do *scaffold*. Os tamanhos dos canais que ligam um poro a outro devem garantir a migração e proliferação de células implantadas, e a infiltração da matriz extracelular excretada pelas mesmas. Na engenharia de tecidos deseja-se que os poros do *scaffold* estejam interconectados para maximizar o transporte de oxigênio e nutrientes em todas as partes do mesmo (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

Várias técnicas têm sido empregadas na tentativa de desenvolvimento de *scaffolds* tridimensionais capazes de fornecer um ambiente com poros interconectados para a adesão e proliferação das células. Tradicionalmente são empregadas técnicas como a separação de fase, evaporação de solvente, lixiviação salina, eletrofiação, formação gasosa, liofilização, moldagem do fundido, entre outras (SCHNEIDER, H.J., SHAHINPOOR, M., 2017).

Atualmente existem produtos patenteados obtidos em matrizes poliméricas sob forma de fibras, espumas e membranas para a produção de *scaffolds* porosos para aplicação na engenharia de tecidos. A metodologia aplicada na produção destes materiais é capaz de obter estruturas bidimensionais ou tridimensionais com as propriedades adequadas para esta aplicação fazendo o uso técnicas como as já supracitadas. Além disso, a inclusão de biomoléculas à estes substratos é bastante relevante para se amenizar os processos de contaminação e inflamação decorrentes da implantação deste material dentro do organismo humano, e induzir a regeneração e proliferação tecidual FERREIRA, R. *et al.* (2017).

Os métodos citados utilizam o conceito "top-down" para a confecção de *scaffolds*, que consiste na fabricação do material, e seguida cultivo de células sobre estes. Esta metodologia já se mostrou capaz de produzir *scaffolds* para diversos tecidos como a pele, bexiga e cartilagem. Recentemente alguns estudos estão voltados para produção de tecidos mais complexos como os que constituem os rins e o fígado. Eles empregam um conceito denominado de "bottom up" que consiste na produção de *scaffolds* com uma microarquitetura específica a partir de blocos pra o favorecer o desenvolvimento de estruturas complexas através de um controle mais fino do formato e da composição química do material. Deste modo técnicas como o micro encapsulamento celular em hidrogéis, a produção de camadas de células, a impressão utilizando células, tem sido estudadas e se mostram promissoras para o futuro da engenharia de tecidos para estruturas mais complexas (LU, T. LI, Y. CHEN, T, 2013). A figura 2 ilustra as diferenças entre as duas abordagens na produção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos.

Figura 2 – Diferentes abordagens para produção de *scaffolds*



Fonte: Figura adaptada de LU, T. LI, Y. CHEN, T (2013)

3.3 Técnicas de fabricação dos *scaffolds* poliméricos

Ao se realizar uma análise mais aprofundada a respeito das técnicas mais empregadas para a produção de *scaffolds* tridimensionais, observa-se aspectos inerentes ao processo de confecção dos *scaffolds*, que prejudicam sua biocompatibilidade. Um exemplo disto é observado em técnicas como a separação de fase ou evaporação de solvente, que apresentam como grande desvantagem a permanência de solventes orgânicos residuais no material. Outro exemplo pode ser observado na técnica de lixiviação salina que por si só não é capaz de fornecer uma boa interconectividade dos poros ao *scaffold*. Uma alternativa para solucionar tais problemas é a combinação de duas ou mais técnicas de formação de poros de modo a se obter o melhor controle do formato dos mesmos e garantir sua interconectividade (LOH, L. Q. CHOONG, C., 2013). Neste trabalho serão empregadas três formas de produção de *scaffolds*, esperando-se obter estruturas tridimensionais porosas e biodegradáveis.

3.3.1 Lixiviação salina

A lixiviação salina é a técnica mais simples empregada para a formação de um *scaffold* polimérico poroso. Este processo se baseia na dispersão de partículas sólidas em uma matriz polimérica que será enrijecida posteriormente. O endurecimento da matriz pode ser feito a partir de processos como a reticulação, a solidificação do polímero a partir do estado líquido, ou a partir do aumento da viscosidade no caso da ocorrência de uma reação de polimerização de monômeros. Estes fenômenos são responsáveis por aprisionar as partículas salinas no interior da estrutura polimérica, que em uma próxima etapa serão lixiviadas com a atuação de um solvente, geralmente água ou álcool dando origem aos poros no material (LOH, L. Q. CHOONG, C., 2013).

A quantidade de polímero necessária para a produção de *scaffolds* por esta metodologia é menor em relação a outros processamentos, pois a substituição de parte deste pelo agente lixiviador garante uma economia de material, e o barateamento do processo. Outra vantagem desta metodologia é a possibilidade de se controlar o tamanho, o formato e a quantidade dos poros variando-se as características e a quantidade das partículas utilizadas (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

Vários estudos utilizam esta técnica para a produção de poros, LEE S. H. *et al.*, (2005) produziu *scaffolds* de gelatina com a lixiviação de partículas de cloreto de sódio. Seus resultados apontam vantagens deste processo como o controle das propriedades mecânicas, e

taxa de degradação com a variação da quantidade de sal utilizada. Entretanto mostra que há uma baixa quantidade de poros interconectados, o que limita as aplicações deste material para a engenharia de tecidos.

A principal desvantagem deste método para a produção de *scaffolds* é a baixa interconectividade dos poros, pois as partículas salinas são individualizadas, e ao serem lixiviadas deixam apenas a cavidade oca onde se encontravam. Este tipo de *scaffold* possui então apenas um tipo de geometria de poros, o que restringe a penetração e distribuição das células. Além disso, existem casos onde nem todas as partículas são lixiviadas do material devido à falta de penetração do solvente para dentro da matriz, o que pode comprometer sua atuação biomédica (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J., 2014).

REIGIER, J. e HUNEAULT, M. A. (2006) estudaram a produção de scaffolds de poli (ϵ -caprolactama) com cloreto de sódio para lixiviação salina. Neste trabalho foi essencial a utilização de um segundo agente de lixiviação para a melhoria da interconectividade dos poros visto que fora blendado junto à poli (ϵ -caprolactama), o poli óxido de etileno, que também é removido com água da estrutura do *scaffold*. Deste modo, obteve-se um material com porosidade controlável podendo atingir até 88%, e também um bom controle das propriedades mecânicas, interconectividade, e distribuição do tamanho dos poros pelo fato de se lixiviar dois materiais diferentes da matriz polimérica. Portanto reforça a necessidade da aplicação de mais de uma metodologia de produção de poros para se produzir estruturas com uma variedade na população de poros.

3.3.2 Formação gasosa

O processo de obtenção de *scaffolds* por formação gasosa é uma tentativa de se obter um material com diâmetro de poros superior a 100 μm de uma forma simples e de baixo custo. Esta metodologia se divide em duas vertentes diferentes para a introdução de bolhas gasosas em uma matriz polimérica seja ela em solução ou fundida para a formação dos poros.

A primeira abordagem consiste na saturação do polímero com CO_2 gasoso em alta pressão. A solubilidade do gás decai rapidamente com a redução da pressão até a pressão atmosférica, e assim são formadas bolhas com diâmetros entre 100 e 500 μm que ficarão presas na estrutura polimérica graças à elevada viscosidade do material. A vantagem desta técnica é o baixo custo e a grande disponibilidade do CO_2 (TAYEBI, L. MOHARAMZADEH K., 2017).

A segunda abordagem para esta metodologia, que também será a empregada neste trabalho utiliza-se de um agente de expansão para a formação de bolhas no material. Como agente de expansão alguns autores SHIM, et al., 2012, WENCHUAN CHEN, et al., 2011, relatam o uso de carbonatos de amônio e de sódio para a liberação de gás carbônico na matriz do polímero por meio de uma reação com ácido ou degradação térmica. Devido às diferenças de densidades entre a fase líquida (solução polimérica) e a fase gasosa, há uma tendência de uma rápida separação entre elas, formando uma espuma não homogênea. Por isso normalmente são utilizados surfactantes para estabilizar as bolhas e prevenir a separação das fases. Esta desestabilização também pode ser minimizada utilizando-se algumas alternativas como: soluções mais viscosas, materiais que se solidifiquem rapidamente com a redução da temperatura com, por exemplo, a gelatina, ou adicionando-se um agente reticulante para formar ligações cruzadas entre as cadeias e enrijecer o material antes da saída dos gases. Esta metodologia é eficiente para polímeros solúveis em água capazes de formar hidrogéis, criando uma estrutura bastante porosa com poros interconectados (DEHGHANI, F., ANNABI, N., 2011).

3.3.3 Liofilização

A liofilização é um processo de secagem dos materiais bastante utilizado para gerar poros no interior dos *scaffolds* pela sublimação do solvente. O primeiro passo deste método consiste no resfriamento do material para promover a solidificação do solvente empregado no preparo da amostra. Em seguida o material é exposto a uma baixa pressão em câmaras herméticas fazendo com que o solvente no estado sólido sublime, e deste modo obtém-se uma estrutura seca e porosa (TERRONI, et al., 2013). Fatores como a taxa de resfriamento e o pH podem alterar o tamanho dos poros formados no material, como por exemplo, taxas mais altas de resfriamento reduzem o tamanho de poro, pois não há tempo para que ocorra a separação das fases entre o solvente solidificado e a matriz. Além disso, há a possibilidade de se empregar esta técnica tanto em *scaffolds* de origem natural, quanto sintéticos.

A aplicação desta técnica de formação de poros para a produção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos é extensa. Trabalhos como o de ZHOU, X. H. *et al.*, (2016) demonstram a aplicabilidade desta metodologia para a produção de uma estrutura a base de PVA com porosidade acima de 80%. Entretanto a concentração do material no solvente é uma variável a ser levada em conta, pois segundo os autores, quanto maior a concentração da

solução polimérica utilizada para se fazer os *scaffold*, menor é a quantidade de poros no interior da estrutura.

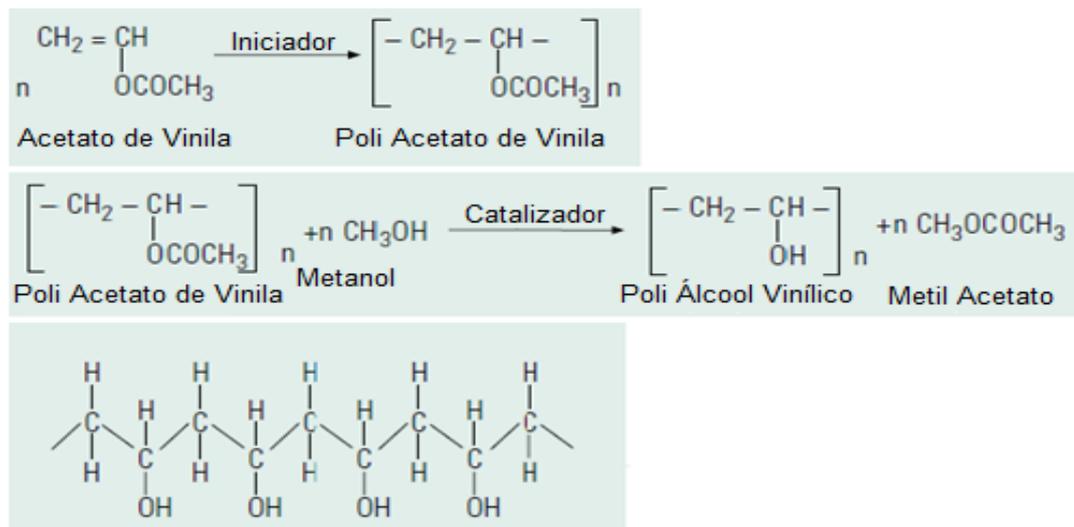
3.4 Poli(álcool vinílico) – PVA

O PVA é um polímero de grande interesse para a área farmacêutica e biomédica na forma de hidrogel. Este polímero possui um conjunto de qualidades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, flexibilidade, estabilidade térmica e relativo baixo custo, que o tornam um material extremamente desejável na área médica (KARIMI, A. et al., 2013).

3.4.1 Estrutura molecular

O monômero do PVA não existe em sua forma estável, sendo rearranjado para seu tautômero, o acetaldeído. Diante disto, este é obtido a partir da polimerização do acetato de vinila em poli acetato de vinila (PVA_c), que posteriormente é convertida em PVA, como pode ser observado na Figura 3. (CLARIANT, 1999).

Figura 3 – Etapas de obtenção do poli álcool vinílico



Fonte: CLARIANT, 1999 (adaptado)

As etapas de obtenção do PVA esquematizadas na figura 3 consistem na síntese do PVA_c a partir da polimerização via radicais livres do acetato de vinila, processo que confere ao material uma larga distribuição de a massa molar. Esta distribuição de peso molecular afeta principalmente propriedades como a cristalinidade, viscosidade, resistência mecânica entre

outras. Para conversão de PVA_c em PVA, o primeiro é solubilizado em metanol, agente responsável por promover uma reação de hidrólise, convertendo assim os grupos laterais acetato presentes na cadeia em grupos álcoois. Ao se variar a concentração do catalizador (hidróxido de sódio), a temperatura de reação e o tempo disponível para tal, é possível se controlar a quantidade de resíduos de acetato que permanecerão presentes na estrutura da molécula. Com isso, os grades de PVA normalmente apresentam um grau de hidrólise, que é a fração de grupos acetato que foram convertidos em grupos álcool, durante a reação de hidrólise. Portanto, em essência, o PVA é sempre um copolímero de poli álcool vinílico e poli acetato de vinila. O grau de hidrólise do PVA é primordial para o polímero, pois afeta diretamente suas propriedades físico-químicas como a cristalinidade e solubilidade (PEPPAS, N.A. HASSAN, C.M., 2000).

As cadeias com um menor percentual de hidrólise tendem a ser mais solúveis em água, uma vez que a presença dos grupos acetato criam zonas de irregularidade na cadeia, o que prejudica a cristalização da molécula, facilitando assim interações mais fortes do polímero com o solvente. Por outro lado as cadeias com elevado grau de hidrólise (>99%) tendem a ser menos solúveis em água, uma vez que suas cadeias formarão interações inter e intramoleculares mais intensas (JUNIOR, E.S.C. e MANSUR, 2008; CLARIANT, 1999).

3.4.2 Estrutura e propriedades

Como relatado acima, os processos de obtenção do PVA, seu histórico térmico e massa molar influenciam diretamente as propriedades deste material, principalmente as características térmicas e físico-químicas. A tabela 1 a seguir resume algumas destas propriedades tomando-se como base materiais com massa molar parecidas.

Tabela 1 – Resumo das propriedades do poli álcool vinílico

Propriedade	PVA 80 % hidrolisado	PVA 99% Hidrolisado
Temperatura de Fusão	180 – 240 °C	180 – 240 °C
Temperatura de Transição Vítrea	85°C	85°C
Temperatura de solubilização em água	20°C	90°C
Solubilidade em água	Até 40%	Até 30%

Fonte: (CLARIANT, 1999)

3.4.3 Reticulação

A grande aplicabilidade do PVA em sistemas farmacológicos e na medicina regenerativa está relacionada com sua flexibilidade e seu elevado teor de água em hidrogéis, capazes de incorporar substâncias biologicamente ativas. Por este motivo a taxa de intumescimento e a hidrofiliabilidade do PVA devem ser controladas para se evitar problemas como uma rápida degradação deste material no corpo, o que poderia levar à rejeição ou a doses exageradas em sistemas de liberação controlada de fármacos. No caso dos *scaffolds* para a engenharia de tecidos esta taxa de degradação deve ser bem controlada e ocorrer na mesma taxa com que o tecido é regenerado (JIANG, S. *et al.* 2011).

Hidrogéis não modificados de PVA possuem pouca estabilidade em sistemas aquosos, os quais podem sofrer severos danos, e comprometer seu desempenho. A formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, também denominadas como reticulação, é capaz de reduzir a hidrofiliabilidade do polímero, aumentar sua resistência mecânica e criar uma estrutura tridimensional para a incorporação de biomoléculas (FIGUEIREDO, K.C.S., ALVES, T.L.M., BORGES, C.P., 2008).

A reticulação pode ser atingida por meio de tratamentos químicos ou físicos. A primeira consiste na reação química dos grupos (-OH) laterais presentes no PVA com outras substâncias, os agentes reticulantes, que serão responsáveis por criar pontos de ligação entre cadeias diferentes. Já a segunda abordagem se baseia no aumento dos pontos de contato molecular “*entanglements*” no polímero por meio de ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. Também existem outras forma de reticulação do PVA como, por exemplo, a reticulação via radiação, porém estas não serão abordadas neste trabalho.

3.4.4 Reticulação química

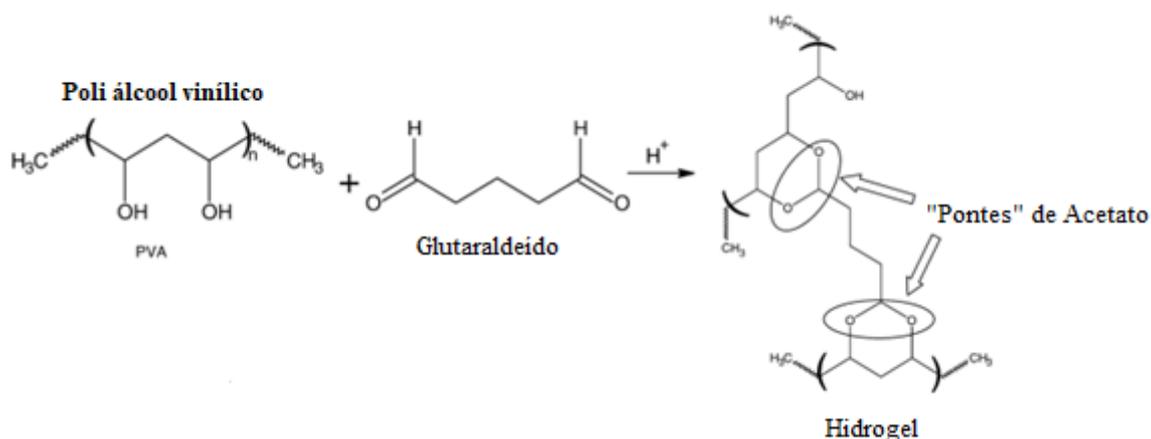
Os agentes reticulantes utilizados para formar as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas normalmente possuem grupos funcionais capazes de reagir com a hidroxila presente nas cadeias de PVA. O formaldeído, o ácido maleico e o glutaraldeído são algumas destas substâncias utilizadas. A partir destas reações podem ser feitas ligações intramoleculares ou intermoleculares, podendo-se controlar estes parâmetros alterando-se o agente reticulante e as condições na qual a reação é feita (FIGUEIREDO, K.C.S., ALVES, T.L.M., BORGES, C.P., 2008).

Dentre os agentes reticulantes destaca-se o glutaraldeído, devido à baixa energia de ativação necessária para a ocorrência da reação, sendo esta feita em temperaturas em torno de 40°C. Além disso, substância tem se destacado no meio biomédico por se ligar de maneira não específica em biomoléculas tais como proteínas, ou seja, esta ligação não promove alterações na conformação proteica, mantendo sua função. Deste modo pode ser utilizado para promover a adesão de proteínas à superfície do PVA, e favorecer o desenvolvimento de estruturas para serem utilizadas como biosensores (FIGUEIREDO, K.C.S., ALVES, T.L.M., BORGES, C.P., 2008).

O procedimento utilizado na reticulação com glutaraldeído está ilustrado na figura 4, e envolve a imersão do PVA em uma solução alcoólica contendo o agente reticulante e um ácido inorgânico como o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico. Dentro deste mecanismo de reação há uma proporção ótima entre o aldeído e o polímero que favoreça a reação. Durante a reação ocorre a liberação de uma molécula de água e a formação de acetato na cadeia (MANSUR et al., 2008).

No caso de haver um excesso de agente reticulante, o processo de formação de ligações cruzadas entre as cadeias será dificultado por causa de um maior impedimento estérico. A grande quantidade do aldeído resulta em uma competição pelos sítios de reação, e como consequência serão formadas ramificações compostas pelo glutaraldeído que foi capaz de se ligar em apenas uma cadeia (MANSUR et al., 2008).

Figura 4 – Reação de Reticulação do PVA



Fonte: MANSUR *et al.*, (2008)

O processo de reticulação química do PVA envolve substâncias que possuem um potencial citotóxico para as células humanas como o próprio glutaraldeído, ácidos inorgânicos e solventes. Além disso, o consumo dos grupos hidroxilas presentes na cadeia diminui a disponibilidade de sítios para as reações de funcionalização do polímero com a incorporação de outras biomoléculas. Com isto pode se obter uma pobre integração do biomaterial com as células acarretando no insucesso do *scaffold* para aplicação na engenharia de tecidos. Por fim a falta de controle sobre a dinâmica da reação de reticulação é responsável pelo aparecimento de heterogeneidades no material. A produção de um *scaffold* com um grau de reticulação não homogêneo implica em propriedades químicas e mecânicas anisotrópicas na mesma, o que poderá influenciar negativamente o crescimento celular dentro do material (FIGUEIREDO, K.C.S., ALVES, T.L.M., BORGES, C.P., 2008).

3.4.5 Reticulação física

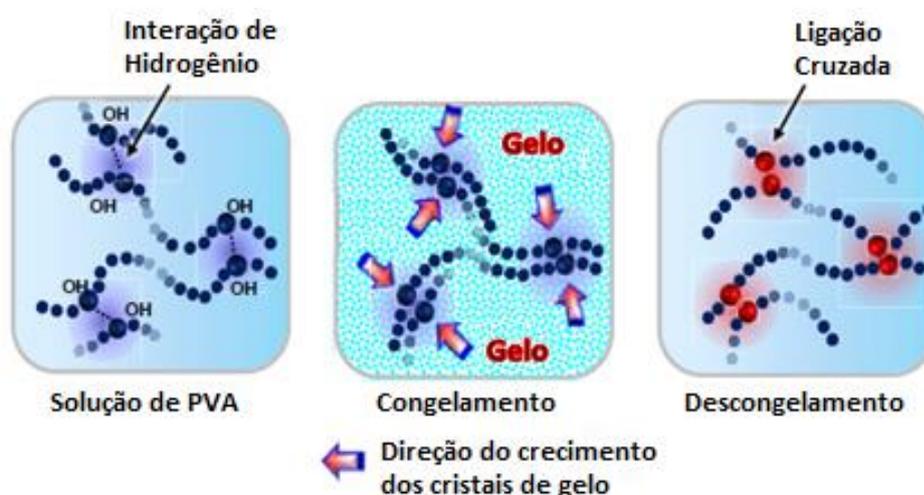
O método de reticulação física desperta grande interesse para aplicações biomédicas do PVA. Esta reticulação é feita sem a utilização de reagentes químicos, o que elimina a presença de resíduo tóxico dos agentes reticulantes. Além disso, oferece um controle mais ajustável sobre as propriedades mecânicas do material (OKAY, O., 2014).

A reticulação física pode ser feita utilizando-se um método com ciclos de congelamento e descongelamento, na qual o polímero solubilizado é congelado e descongelado sucessivas vezes. Por este motivo o produto gerado é denominado criogel. Ao se utilizar esta metodologia, aliada a um controle dos parâmetros de processo é possível à obtenção de um material com propriedades mecânicas e permeabilidade bem definidas. Além

disso, é possível a incorporação de nanopartículas e moléculas biológicas a este material, o torna um bom candidato para diversas aplicações como biomaterial inclusive para a engenharia de tecidos (OKAY, O., 2014).

Os materiais reticulados desta maneira apresentam um aumento na resistência mecânica e a densificação de sua estrutura, que são consequências de fenômenos como: a nucleação e crescimento de cristalitos poliméricos com alta densidade de ligações de hidrogênio, e a separação de fase (STAUFFER, S.R., PEPPAS, N.A., 1992). Durante o primeiro ciclo térmico, o congelamento da água presente no hidrogel, promove a aproximação das cadeias poliméricas, e deste modo induzem a cristalização em regiões amorfas do material, como observado na figura 5.

Figura 5 - Aproximação das cadeias de PVA pelo processo de congelamento

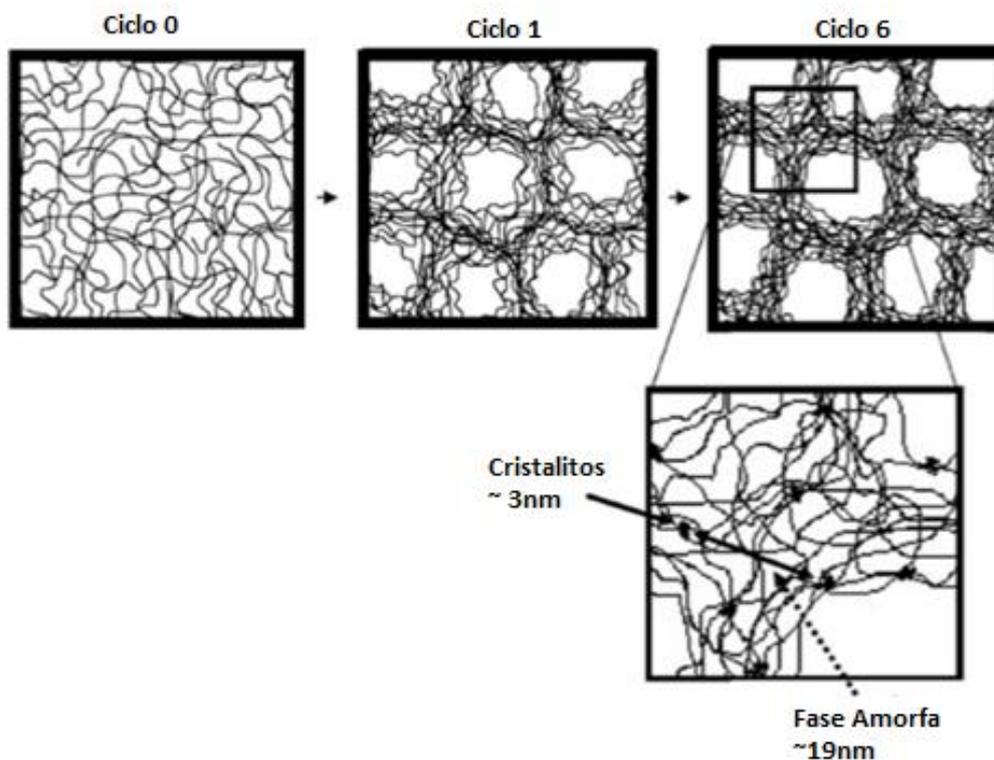


Fonte: Adaptado de (KIM, et al., 2015)

Esse processo cria regiões com concentrações diferentes de polímero, pois como pode-se observar na figura 6, os cristais de gelo segregam da cadeia polimérica, formando zonas com maior concentração do polímero onde os cristalitos são nucleados. Já nas regiões com menor concentração de polímero observa-se uma presença majoritária de gelo, que posteriormente será removido durante o processo de liofilização dando origem a poros na estrutura com tamanhos maiores que 3 μm . O aumento do número de ciclos implica no aumento da fase cristalina, pelo crescimento do tamanho e principalmente da quantidade dos esferulitos. Entretanto, estas porções cristalinas são pequenas se comparadas ao restante da

estrutura chegando a medir cerca de 3 a 4 nm. Em essência, de um ponto de vista macroscópico a reticulação física se trata de uma rede de esferulitos ligados por porções amorfas da cadeia polimérica (OKAY, O., 2014).

Figura 6 - Separação de fase durante o processo de reticulação física



Fonte: Adaptado de OKAY, O., (2014)

Vários parâmetros de processo podem ser modificados para se obter um material com estrutura e propriedades adequadas à aplicação desejada. O peso molecular, o grau de hidrólise do PVA, sua concentração em solução, e o tempo de congelamento são fatores determinantes na estrutura do gel pois modificam a fração cristalina formada, bem como a porosidade e formato dos poros. As condições de congelamento e descongelamento tais como a taxa de variação de temperatura, o número de ciclos, as temperaturas limites atingidas contribuem para a determinação das propriedades da matriz polimérica, como sua resistência mecânica. Esta grande gama de variáveis possibilita uma grande aplicabilidade para este material, sendo que ajustes finos podem ser feitos para obter a reticulação mais adequada de acordo com a aplicação. (OKAY, O., 2014).

Alguns dos parâmetros de processamento dos hidrogéis de PVA reticulados fisicamente foram estudados por Ricciardi, R. *et al.* (2004). Neste trabalho é avaliada a influência do número de ciclos de congelamento e descongelamento na cristalinidade do material. Foram preparadas soluções de PVA 11% m/m, que foram posteriormente submetidas à 10 ciclos. A cristalinidade do material foi avaliada via DSC, e observou-se a presença de picos endotérmicos referentes à fusão dos cristalitos, os quais se tornaram mais estreitos com o aumento do número de ciclos. O autor discute que os ciclos de congelamento e descongelamento promovem uma redução da distribuição de tamanhos dos esferulitos. Com isso obtém-se uma faixa temperatura de fusão mais estreita para o material, ou seja, este fenômeno ocorre em uma temperatura mais específica, visto a maior homogeneidade do material.

Os géis formados a partir de soluções do PVA possuem uma baixa estabilidade dimensional em temperatura ambiente, e se fundem com relativa facilidade em temperaturas entre 30 e 40°C. Isto se deve à grande presença de água em sua estrutura, fazendo com que não sejam capazes de manterem suas propriedades por um longo período de tempo. Por isso, muito tem se estudado a respeito da secagem deste material, que por sua vez aumenta e estabiliza os cristais formados, conferindo a esta estrutura melhor estabilidade térmica e mecânicas (OKAY, O. 2014) (PEPPAS N.A., e HASSAN, C.M., 2000).

3.4.6 Aplicações

O poli (álcool vinílico) é um polímero bastante versátil dado às diferentes propriedades obtidas ao se alterar parâmetros como grau de hidrólise e massa molar. Por isto este é um material com uma ampla aplicação em diversos setores industriais como, por exemplo, no ramo de membranas de pervaporação para solventes orgânicos (MURTHY, Z.V.P., SHAH, M.K. 2012), e para separação de gases (ZOU, J. WINSTON, H.W.S., 2006), em sistemas para tratamento de efluentes (OKAZAKI *et al.*, 1995). Estes sistemas se aproveitam da elevada hidrofiliabilidade do material, e de sua permeabilidade para líquidos e gases para propor tais aplicações.

Seguindo a linha de aplicações industriais para o PVA, LI, X., *et al.* (2012), em seu trabalho estuda o preparo de espumas de um composto de PVA e quitosana, como um material para absorção de íons de cobre e de verde malaquita, um corante utilizado em diversos setores da indústria têxtil, que são compostos despejados indiscriminadamente nos corpos d'água. Para a obtenção desta espuma fora preparada uma solução de PVA e carbonato

de cálcio em água destilada, com a posterior adição de quitosana em diferentes proporções. Em seguida à solução foi adicionado uma solução de ácido clorídrico (5M) para a reação com o carbonato de cálcio e a formação da estrutura da espuma. Por fim o material passou por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Como resultados, os autores descrevem que a adição da quitosana melhora a cinética de absorção das substâncias testadas pela espuma. Além disso, as espumas apresentaram ainda uma boa capacidade de serem reutilizadas, pois mantém suas propriedades de absorção elevadas até o sexto ciclo de trabalho.

Atualmente no setor biomédico muito se tem estudado a respeito do PVA para implementação deste material em diferentes aplicações. Graças a algumas de suas características não tóxicas, não carcinogênicas e e bioadesivas, aliado a um processamento relativamente fácil, este material vem sendo utilizado em hidrogéis para cobertura de feridas KAMOUN et al., (2014), biosensores TSAI, Y. *et al.* (2007), em sistemas de liberação controlada de drogas (LI, WANG, WU, 1998) e em *scaffolds* para a engenharia de tecidos KARIMI, A. *et al.* (2013).

O uso do PVA como um hidrogel para recobrimento de feridas é bem estabelecido, pela propriedades e pela capacidade deste material de ser empregado em sistemas de liberação controlada. TAVAKOLI, J., TANG, Y.,(2017) estudaram a incorporação de mel de Mankuna à hidrogéis de PVA devido não somente pelas reconhecidas propriedades antibacterianas desta substância, mas também por acelerar a cura das feridas, reduzir a inflamação e neutralização do cheiro. Para o preparo dos filmes de PVA com mel, fora preparada uma solução de 6% v/v de PVA em água destilada. Em seguida foram adicionadas 5 gramas do mel na solução de PVA, e por fim a adição de frações de uma solução de bórax em proporções diferentes, para a realização da reticulação. Como conclusões deste trabalho os autores confirmam as propriedades bactericidas do mel, bem como a importância do bórax como agente de reticulação para a manutenção de uma liberação controlada do mel na ferida.

O grupo de pesquisa em que este trabalho foi desenvolvido elaborou um documento de patente no qual descrevem a aplicação de espumas de PVA impregnado com extrato de urucum para a potencial aplicação deste como um *scaffold* na engenharia de tecidos. O extrato é utilizado para promover uma ação bactericida nos *scaffolds* e a obtenção deste foi feita utilizando-se as técnicas de formação gasosa, seguida pela reticulação química e liofilização do material (FERREIRA, R. V. *et al.*,2017).

A aplicação do PVA na engenharia de tecidos é bastante promissora tendo em vista suas propriedades já citadas nos tópicos anteriores, que colocam esse material como um forte candidato para tal aplicação. Atualmente procura-se melhorar o desempenho deste material

quanto à sua viabilidade celular, por meio da incorporação de biomoléculas ao PVA, para promover um efeito biomimético e aproximar ao máximo o comportamento do *scaffold* de um ambiente intracorpóreo. Espera-se que essas substâncias promovam uma ação benéfica na adesão, proliferação e diferenciação das células.

Trabalhos como o de CHOI, S.M. *et al.* (2012) demonstram que a introdução de compostos orgânicos têm efeitos positivos tanto na produção do *scaffold*, quanto na viabilidade celular. Os autores sintetizaram um *scaffold* de PVA com adição de diferentes concentrações de gelatina, um polímero natural com excelentes propriedades de adesão celular. O processamento utilizado foi a liofilização da solução após ter sido mantida em a 80°C por 12 horas. Como resultados os *scaffolds* feitos com maiores concentrações de gelatina apresentaram uma maior interconectividade dos poros, uma taxa de degradação mais elevada, com degradação de 95% do material em seis semanas. Nos testes de viabilidade celular, utilizou-se fibroblastos, e fora observado uma grande adesão das células, e a manutenção de sua bioatividade, visto que estas começaram a produção de matriz extracelular.

O PVA possui, como demonstrado, uma aplicação muito ampla em várias áreas biológicas, principalmente na Engenharia de Tecidos, devido aos diferentes processamentos possíveis de serem empregados para a produção de *scaffolds* utilizando-se este material. FERREIRA, R. *et al.* (2018) do grupo de pesquisa em que este trabalho está inserido, em seu documento de patente se referem à obtenção de um *scaffold* poroso para a Engenharia de Tecidos de uma válvula cardíaca, com a possibilidade de se empregar diversos materiais, dentre eles o PVA. Nesse documento os autores empregam técnicas como a formação gasosa, liofilização e lixiviação salina para a obtenção do substrato poroso. Além disso, descrevem o desenho e a produção de um molde em cavidade para a obtenção de uma estrutura tridimensional no formato de válvula cardíaca. Por fim, relatam ainda a utilização de do processo de congelamento e descongelamento do *scaffold* para promover a reticulação física do PVA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção e caracterização da espuma de PVA

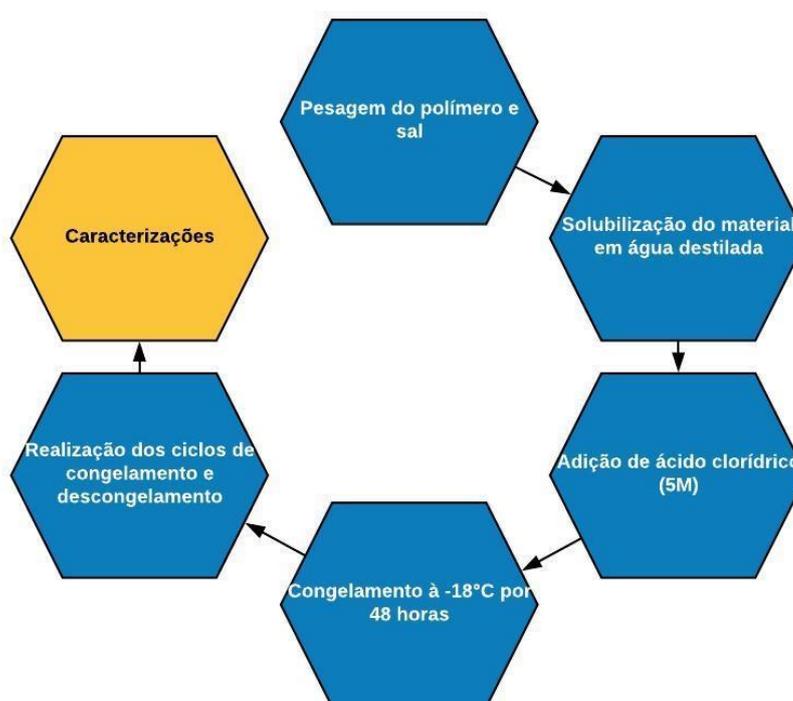
4.1.1 Materiais

Para a produção das espumas poliméricas empregou-se o álcool poli vinílico (PVA) massa molar (M_w) = 145.000 g/mol, com grau de hidrólise de 99.0 – 99.8 mol% da marca Fluka (Sigma Aldrich) como polímero na construção do *scaffold*, o carbonato de cálcio (CaCO_3) utilizado como agente de formador de poros massa molar = 100,9 g/mol da marca VETEC (Sigma Aldrich).

4.1.2 Procedimento Experimental

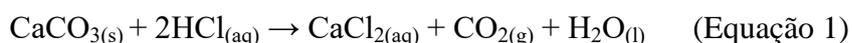
A produção das espumas de PVA foi realizada seguindo os métodos propostos por (BAI, X. *et al.*, 2010) e (PEPPAS, N.A. STAUFFER, S.R., 1991) modificados. A figura 7 apresenta um fluxograma com as etapas seguidas no procedimento experimental deste trabalho.

Figura 7 – Fluxograma de processos seguido na obtenção das espumas



Fonte: Autor

Inicialmente foi preparada a espuma adicionando-se 15g de PVA e 7,5g de CaCO₃ em 100 ml de água destilada. Essa mistura foi colocada em um banho maria para o aquecimento indireto a temperaturas de 85° ±5°C e sob agitação mecânica até a solubilização do polímero e do sal na água. Após a obtenção da solução o material foi resfriado até a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 30 ml de ácido clorídrico (5M) e a solução foi agitada manualmente com o auxílio de um bastão de vidro para promover a reação do carbonato com o ácido conforme a equação 1:



A espuma formada após a reação foi colocada sobre placas de petri, cobertas com filme de PVC e congeladas no freezer à -18°C por 48 horas. As placas de petri foram então retiradas e descongeladas à temperatura ambiente, durante 1 hora. Em seguida foram colocadas novamente no freezer para serem congeladas na mesma temperatura citada. Esse procedimento foi repetido obtendo a amostra de passou pela reticulação com 1 ciclo. Diferentes números de ciclos foram realizados gerando Repetiu-se este procedimento para diferentes amostras que foram submetidas a 3 6 9 e 12 ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras foram secas em uma estufa de circulação de ar CIENLAB modelo 220/100 durante 15 minutos antes de serem caracterizadas. A tabela 2 relaciona o número de ciclos com o código adotado para cada amostra.

Tabela 2 – Identificação das amostras quanto ao número de ciclos de congelamento e descongelamento submetidos

Código	Número de ciclos de congelamento/descongelamento
PVA1	1
PVA 3	3
PVA6	6
PVA9	9
PVA12	12

Fonte: Autor

As amostras foram caracterizadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Termogravimétrica (TGA).

4.2 Caracterizações

4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

As espumas reticuladas fisicamente PVA1, PVA3, PVA6, PVA9, PVA12, e os pellets do PVA puro foram analisados utilizando-se a técnica de transmitância. Os resultados foram obtidos utilizando-se o equipamento *Shimadzu*, modelo *IRPrestige-21* operado em modo ATR, na faixa de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas a grupos químicos.

4.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Utilizou-se o analisador térmico *Shimadzu DSC-60* para se investigar o comportamento térmico das amostras, e ainda observar mudanças no comportamento térmico do material com o decorrer dos ciclos de congelamento e descongelamento. Para este ensaio amostras do material foram submetidas a dois ciclos de aquecimento entre 30 e 250°C . Foi utilizada uma rampa de aquecimento constante de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob um atmosfera de nitrogênio.

4.2.3 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria foi utilizada para se avaliar a perda de massa em percentual das amostras com o aumento da temperatura. Os resultados deste ensaio fornecem informações relevantes para a comparação da estabilidade térmica das amostras analisadas. O experimento consiste no aquecimento das amostras do material que se encontram sobre uma balança de precisão. A taxa de aquecimento escolhida fora de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em temperaturas que variaram dos 30° aos 900°C . O valor da massa das amostras é acompanhado em tempo real e armazenado em um banco de dados do equipamento. Por fim, realiza-se a conversão dos valores obtidos para porcentagens da massa inicial, e plota-se os gráficos de perda de massa em função da temperatura.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para se avaliar e comparar as estruturas morfológicas das amostras, ou seja, verificar a presença de porosidade no material e a interconectividade destes. O equipamento utilizado para esta análise foi o *Shimadzu* modelo SSX-500, com a utilização de uma tensão de 15 kV em ampliação no tamanho da imagem entre 25 e 60 vezes. Durante o preparo amostras liofilizadas foram fraturadas em pedaços pequenos após serem mergulhadas em nitrogênio líquido. Depois foram recobertas com uma fina camada de ouro, por meio do processo de deposição de vapor, de modo a melhorar a condutividade elétrica das mesmas e conseqüentemente a nitidez da imagem formada.

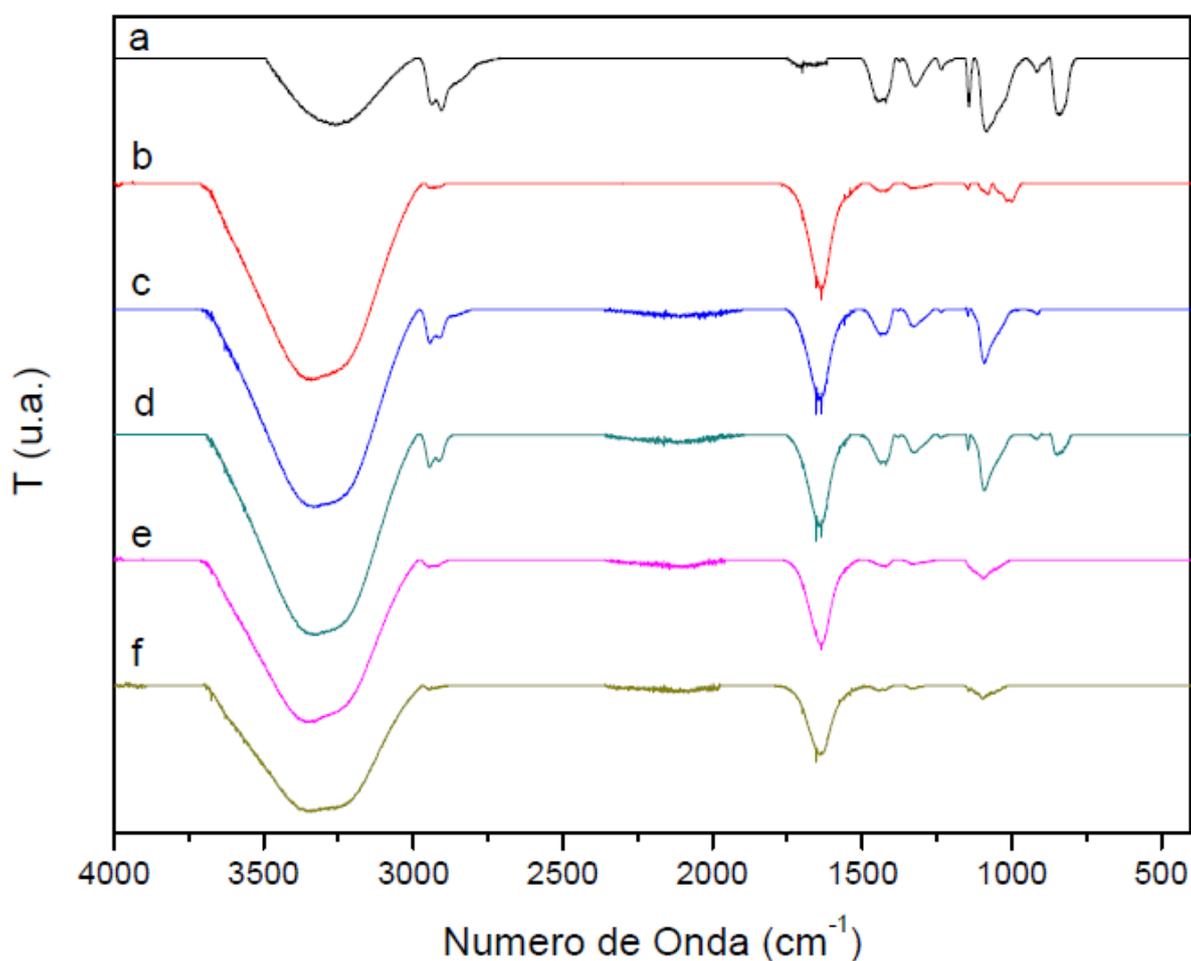
Para se comparar os efeitos dos ciclos sobre a porosidade e tamanho de poro das amostras, utilizou-se o software *ImageJ* para se fazer a medição do tamanho dos poros presentes em diferentes regiões de cada uma. Utilizou-se a medição da mesma quantidade de poros para todas as amostras para se montar histogramas com a distribuição normal do tamanho de poros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise Química

A espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) para as amostras após diferentes ciclos de congelamento e descongelamento são mostradas na figura 8.

Figura 8 – Gráfico de FTIR para as amostras (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.



Fonte: Autor

Foram identificadas em todas as amostras as bandas características do poli álcool vinílico que podem ser associadas às vibrações das ligações -OH, C=O, C-H, C-OH, C-O.

A tabela 3 sumariza os modos vibracionais identificados com os respectivos picos em número de onda para as amostras de PVA. Como não foram feitas reações para modificação da composição química do material assume-se que em todos espectros os modos vibracionais

serão referentes aos mesmos grupos químicos, variando-se apenas a sua intensidade como efeito dos ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela 3 – Modos Vibracionais dos grupos identificados para as amostras

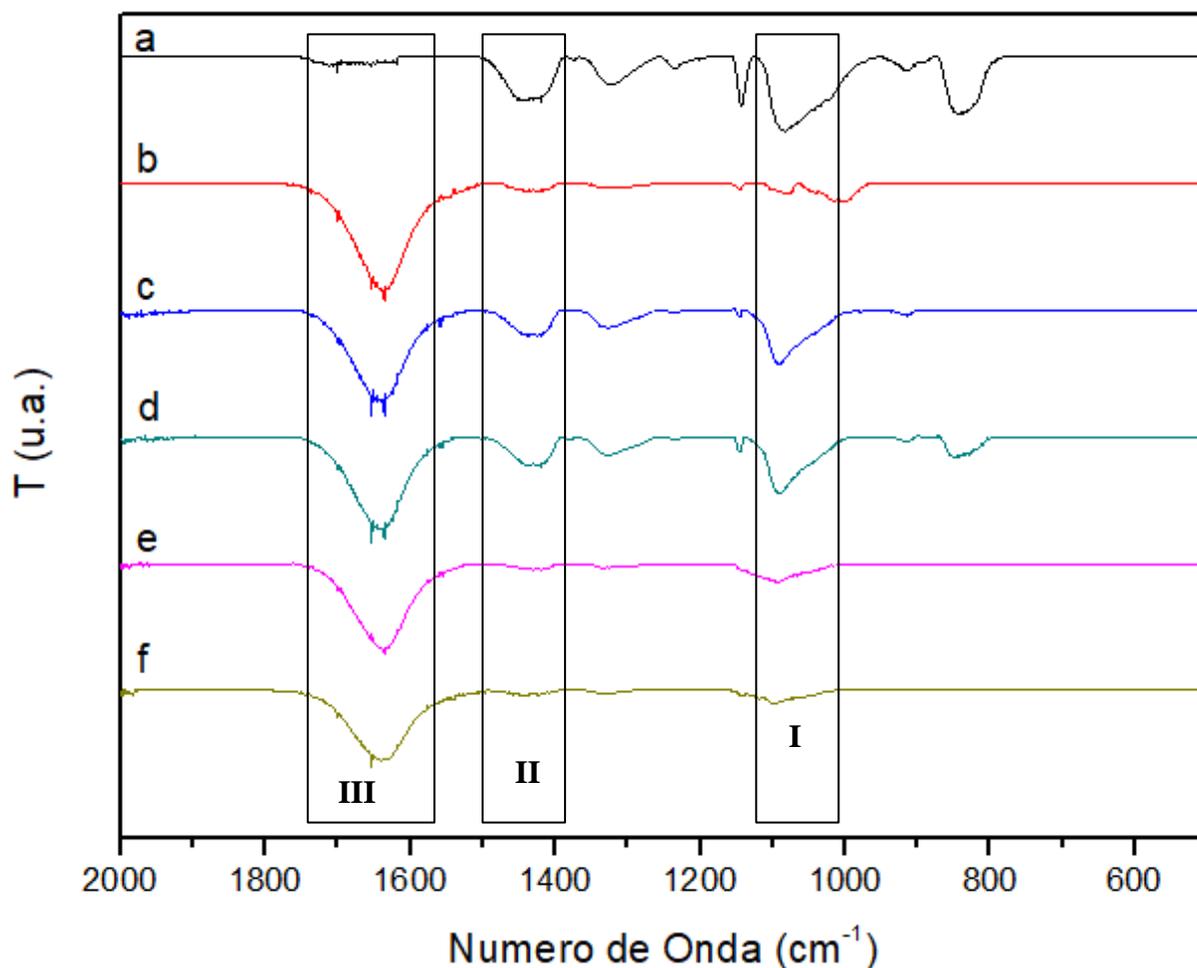
Identificação	Grupo Característico	Número de Onda cm^{-1}	Referência
I	-OH Ligação de hidrogênio intra/intermolecular	3700-2970	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)
II	C-H de grupos alcanos	2950	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)
III	Vibrações combinadas de C=O e C=C	1630	(HERNANDEZ, J.C., <i>et al.</i> , 2018)
IV	Estiramento de C-O	1430	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)
IV	CH ₃ -OH, combinada com vibrações C-C e C-H	1500-1360	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)
V	Ligação C-OH	1100	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)
VI	C-C e C-H	870	(CHATURVEDI, A. BAJPAI, A.K. <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: Autor

Uma característica marcante deste polímero é a forte intensidade com que a banda referente à ligação -OH é apresentada, em todas as amostras ela ocorreu na faixa de 3700-2970 cm^{-1} . O protocolo adotado para a produção deste material contribuiu para a formação de bandas largas pela presença residual de grupos -OH provenientes da água utilizada na solubilização do polímero, como observado para as amostras de 1, 3, 6, 9 e 12 ciclos. Foi também observado a presença de picos em 2950 cm^{-1} que são associados à presença da ligação de C-H, o que confirma a cadeia hidrocarbônica do material. (CHATURVEDI, A. *et al.*, 2014).

O gráfico da Figura 9, exibe a região de 2000 – 500 cm^{-1} .

Figura 9 – Destaque para a região do infravermelho 2000 – 500 cm^{-1} (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.



Fonte: Autor

O efeito dos ciclos de congelamento e descongelamento é evidenciado na Figura 9, que exibe a redução da intensidade até o completo desaparecimento das bandas referentes à ligação C-OH entre 1000 e 1100 cm^{-1} (I) e a ligação C-O entre 1360 e 1500 cm^{-1} (II). A justificativa para a redução dos picos pode estar relacionada gradual com o a aproximação das cadeias poliméricas a cada ciclo de congelamento e descongelamento, quando são formadas interações intra e intermoleculares mais intensas entre estas e reduzindo a mobilidade da cadeia (HERNANDÉZ, J.C., 2018).

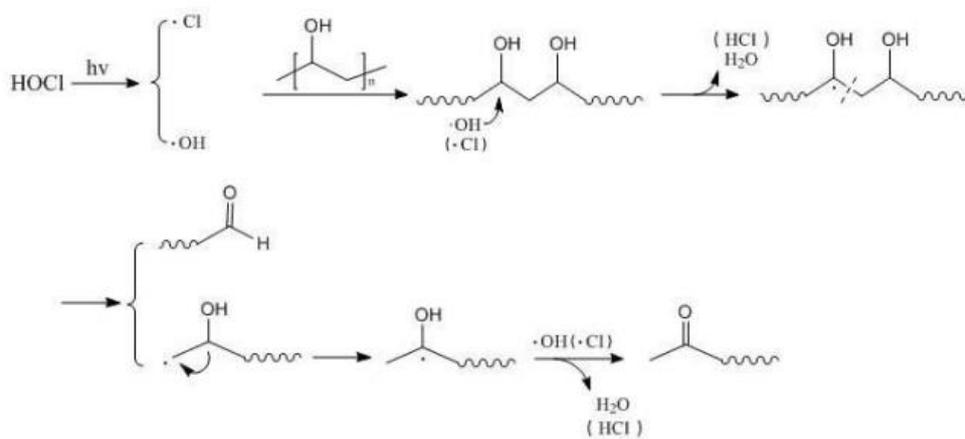
Três mecanismos atuam de maneira concomitante para reduzir a mobilidade das cadeias, são eles: o congelamento da água, a separação de fases, e a cristalização do PVA. A formação de gelo pelo congelamento da água força a aproximação das cadeias poliméricas e com isso a aumento do número de interações de hidrogênio entre as cadeias e a presença de mais *entanglements*, que são pontos de enrosco molecular. Em temperaturas abaixo de zero a

solubilidade do PVA na concentração utilizada neste trabalho (15% m/v) em água é bastante reduzida, com isso há a separação de fases em regiões com maior concentração de PVA e regiões com menor concentração. Por fim, a formação de cristalitos de PVA também promove um maior travamento das cadeias do polímero pois esta estrutura apresenta pouca mobilidade para suas moléculas (OKAY, O., 2014).

Na figura 9 também se destaca a presença de uma banda larga em 1630 cm^{-1} , referentes à ligação C=O combinada com C=C (III) como descritos na tabela 3, para todas as amostras excetuando-se a amostra de PVA puro. Não era esperado o aparecimento desta banda, visto que o poli álcool vinílico utilizado apresenta um grau de hidrólise superior à 99%, e com isso a maior parte dos domínios acetato, que possuem a ligação C=O, presentes na estrutura do material foram substituídos por grupos álcoois durante a obtenção do PVA.

No trabalho de BEI, Y. *et al.* (2017), foram feitas análises avaliando-se o efeito sinérgico da degradação do polímero por radiação ultravioleta (UV) com a presença de íons de cloro no PVA. Como resultados, o autor propõe uma rota de reação na qual está descrita na figura 10. Nela observa-se a reação de oxidação dos grupos álcool presentes na cadeia polimérica e a quebra das ligações carbono-carbono pela atuação da radiação, e catalisada pela presença de íons de cloro no meio de reação e um pH ácido. Com a quebra da cadeia ocorre a formação de radicais livres na estrutura do polímero, que estarão livres para poderem reagir com outras hidroxilas e dar sequência ao processo de degradação. Como consequência da reação de oxidação fotolítica observa-se a formação de domínios C=O e C=C, resultantes da reorganização eletrônica da cadeia em isômeros.

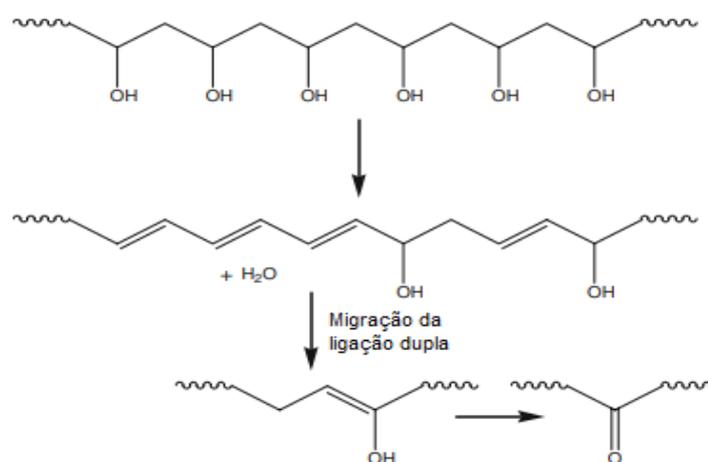
Figura 10 – Reação de degradação do PVA induzida pela radiação UV e catalisada por íons de cloro



Fonte: BEI, Y. *et al.* 2017

Outros trabalhos também demonstram a influência da temperatura no processo de degradação do PVA. ILČIN, M. *et al.* (2009) relata em seu trabalho que o principal produto de degradação térmica do PVA em temperaturas inferiores à 200°C é a água. A eliminação desta substância provoca a formação de ligações duplas nas cadeias conforme exibido na figura 11. Trabalhos como os de HOLLAND, B.J., HAY, J.N., (2001) e THOMAS, P. S., *et al.*, (2001) também discutem a degradação térmica do PVA, afirmando que a formação da banda presente entre 1715 e 1595 cm^{-1} são referentes à conjugação das vibrações das ligações C=C e C=O decorrentes da reação de desidratação do material.

Figura 11 – Reação de desidratação térmica do PVA



Fonte: Adaptado de (ILČIN, M. *et al.* 2009)

No presente trabalho não há a utilização de raios UV, entretanto as temperaturas em que o polímero foi submetido para sua solubilização ($85 \pm 5^\circ\text{C}$), aliado à constante agitação mecânica durante esta etapa podem ter contribuído para a quebra de algumas cadeias, com a consequente formação de radicais e início do processo de degradação. Além disso, é possível que o ácido clorídrico, utilizado para a produção das espumas, tenha promovido a catalise das reações de degradação. Pode se também observar o impacto do efeito degradativo nas amostras ao se comparar a redução gradual da intensidade das bandas referentes às ligações C-OH (I) e C-O (II), nos espectros do infravermelho. Tal fenômeno tem como causa principal o consumo destas ligações durante as reações de degradação relatadas acima.

Portanto os resultados observados para o análise no infravermelho por transformada de Fourier apontam para a ocorrência de dois fenômenos distintos sobre a estrutura das cadeias poliméricas. O primeiro sendo a formação de uma rede mais interconectada e com

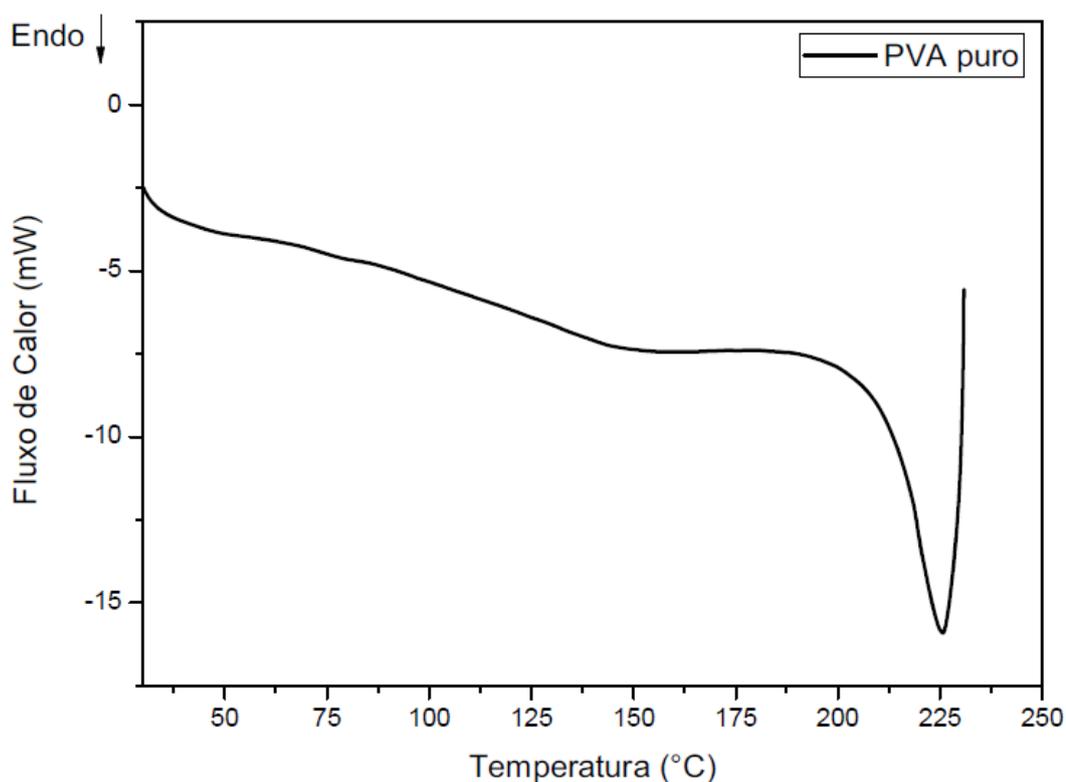
mobilidade dos grupos químicos reduzida pelo efeito da reticulação física. E o segundo observado pela degradação do polímero catalisada pelo ácido clorídrico.

5.2 Análise Térmica

5.2.1 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Os resultados obtidos por meio da análise com o DSC para as diferentes amostras estão mostrados abaixo na figura 12 e 13. No primeiro gráfico está plotado a curva referente ao PVA puro, e no segundo estão curvas comparando as curvas obtidas para as amostras de PVA puro e as amostra reticuladas fisicamente.

Figura 12 – Calorimetria Diferencial Exploratória da amostra de PVA puro

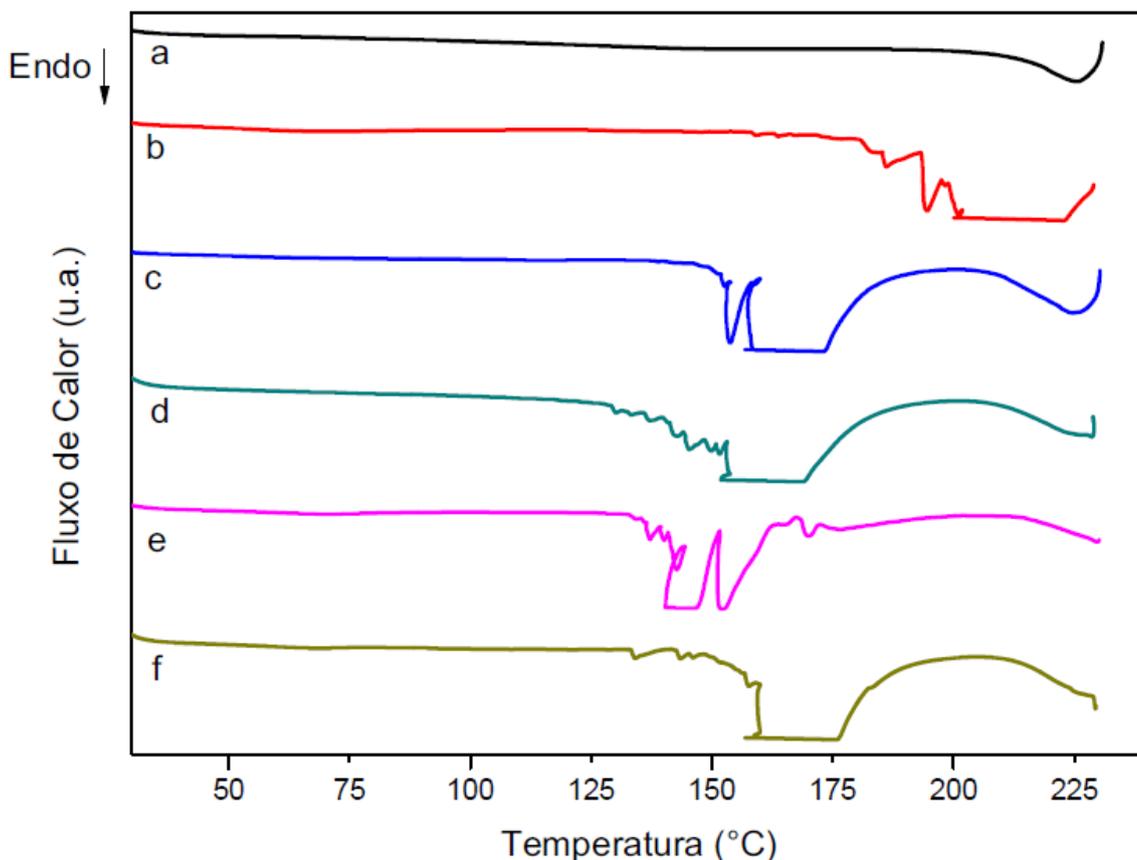


Fonte: Autor

Para a amostra dos pellets de PVA, a temperatura de fusão do material foi identificada na temperatura entre 190 e 230°C, como se pode observar no gráfico da figura 11, em que há um pico endotérmico à 225°C indicando a ocorrência de tal transformação. Este resultado condiz com o valor esperado e informado pela empresa fabricante deste material em sua ficha de dados, na qual relata o início da decomposição do material acima dos 200°C e sua fusão

ocorrendo entre 180 e 240°C (SIGMA ALDRICH, 2016). A figura 12 apresenta os resultados de calorimetria diferencial exploratória para as demais amostras de PVA em diferentes ciclos de congelamento e descongelamento.

Figura 13 – Gráfico de DSC para as amostras (a) PVA puro, (b) PVA1, (c) PVA3, (d) PVA6, (e) PVA9, (f) PVA12.



Fonte: Autor

Observa-se que para todas as amostras as quais foram submetidas ao processamento de formação gasosa com a adição do ácido e posteriormente o tratamento com os ciclos de congelamento e descongelamento há a presença de picos e bandas endotérmicas em temperaturas inferiores a 200°C. Tais resultados corroboram para o indicado nas análises químicas em que se percebeu a presença de material degradado.

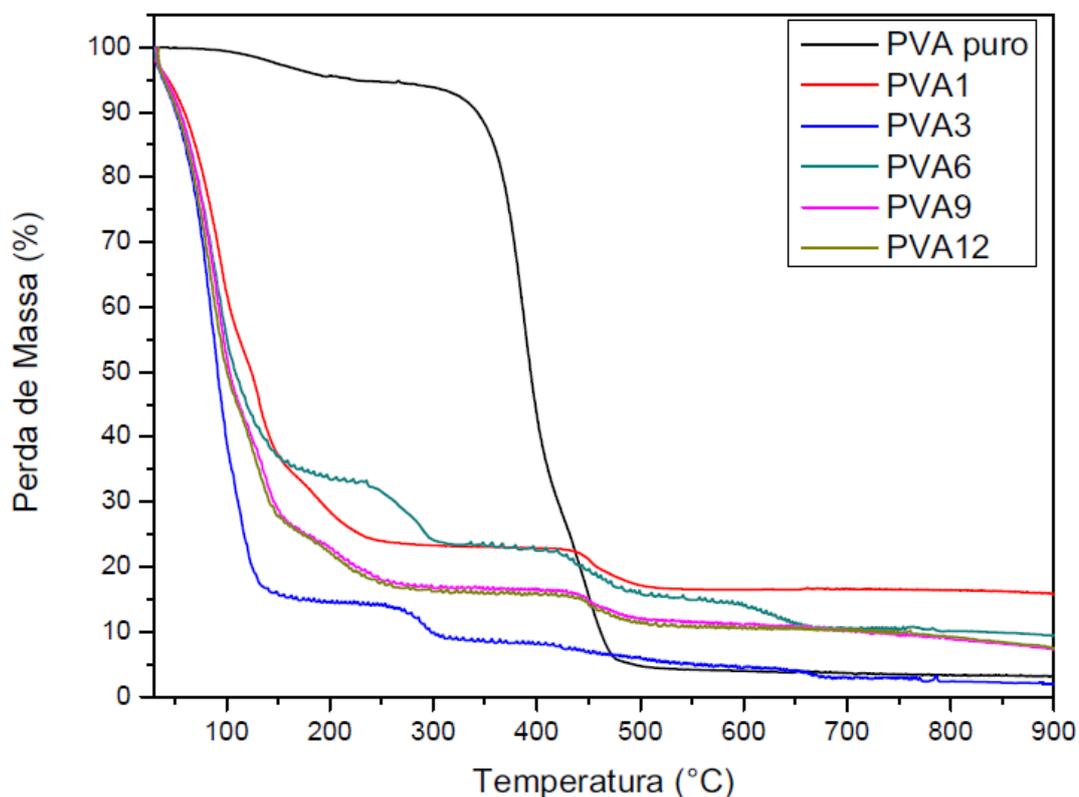
Os resultados observados podem estar relacionados com o limite de detecção do equipamento o qual não se mostrou com a sensibilidade de acompanhar as transformações sofridas pelo material durante o ensaio. As temperaturas máximas as quais o material fora submetido estiveram próximas a 230°C, sendo insuficientes para registrar a fusão do PVA.

Para as análises de DSC esperava-se que para a amostra de PVA puro o pico relativo à fusão da parte cristalina deste material em temperaturas próximas a 230°C, fosse maior comparativamente às demais amostras. Isto se deve ao processamento em as segundas foram submetidas tendo sua estrutura cristalina desfeita durante a solubilização em água. Em seguida, esperava-se um incremento gradual do pico endotérmico à mesma temperatura, relativo à fusão da fase cristalina do PVA, com o decorrer dos ciclos de congelamento e descongelamento. Sendo este um claro indicativo do aumento da cristalinidade do material com o processo (PEPPAS, N.A. e HASSAN, C. M., 2000) (KIM, AN, *et al.*, 2015).

5.2.2 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica das amostras com diferentes ciclos de congelamento e descongelamento está plotada no gráfico da imagem 14 abaixo. A partir das curvas de perda de massa para cada amostra, pode-se determinar quais os fenômenos de degradação térmica atuantes e comparar a resistência térmica das amostras. A tabela 4 resume estes resultados indicando a temperatura de início da degradação.

Figura 14 – Análise Termogravimétrica das amostras nos diferentes ciclos



Fonte: Autor

Tabela 4 – Comparação das temperaturas de degradação durante a termogravimetria

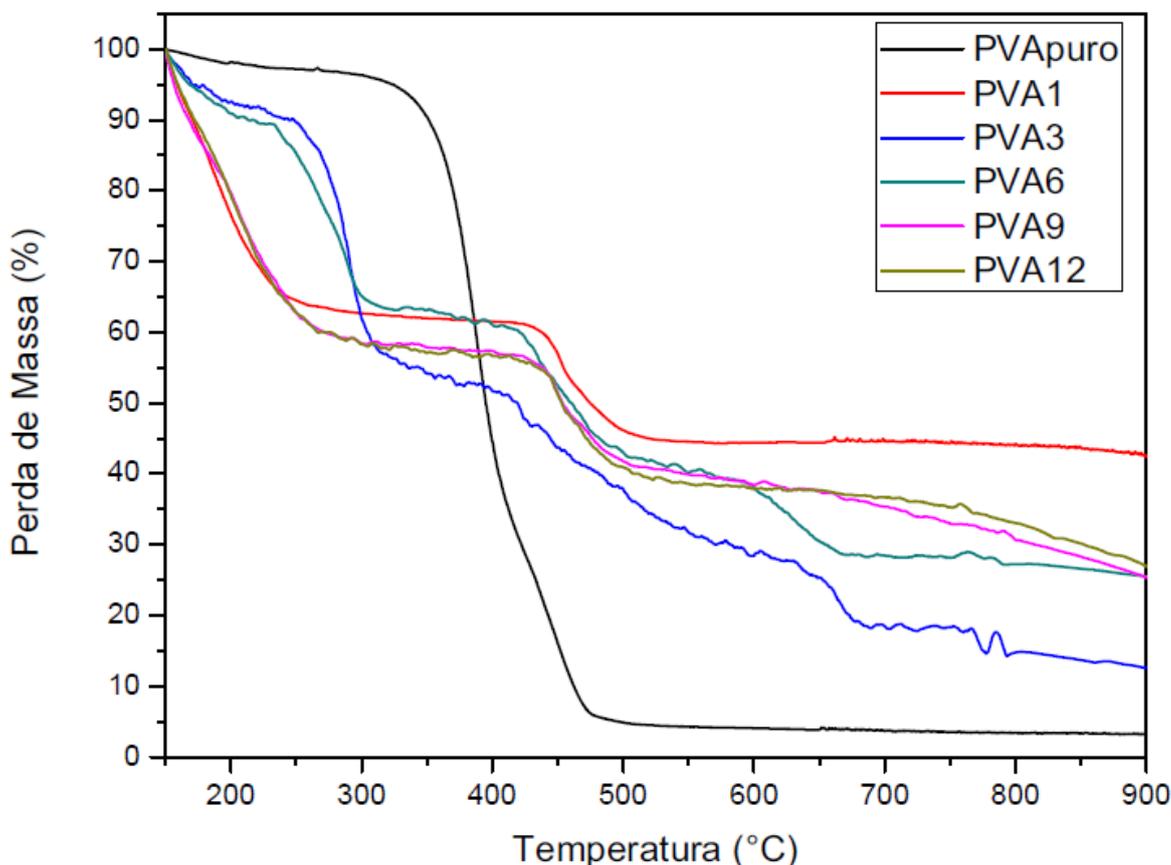
Amostra	Faixas de Temperatura em que ocorreram os eventos (% de Perda de Massa)			
	1º Evento	2º Evento	3º Evento	4º Evento
PVA puro	30 - 150°C (5%)	280 - 415°C (63%)	415 - 520°C (28%)	
PVA1	30 - 150°C (64%)	150 - 250°C (13%)	433 - 515°C (7%)	
PVA3	30 - 150°C (85%)	240 - 320°C (7%)	410 - 520°C (2%)	650 - 690°C (4%)
PVA6	30 - 150°C (67%)	230 - 300°C (11%)	418 - 525°C (7%)	600 - 700°C (5%)
PVA9	30 - 150°C (73%)	150 - 265°C (10%)	430 - 520°C (6%)	
PVA12	30 - 150°C (74%)	150 - 265°C (10%)	430 - 540°C (4%)	

Fonte: Autor

Ao se analisar os resultados obtidos, observa-se em todas as amostras uma primeira perda de massa, ocorrida entre 30 e 150 °C, referente à saída de substâncias voláteis principalmente água. O PVA é um material com caráter hidrofílico, sendo assim mesmo após a secagem há a ocorrência adsorção de moléculas de água. (GUIRGUIS, O.W., MOSELHEY, M.T.H., 2011). Para as amostras que foram submetidas ao procedimento experimental, observa-se que há uma perda significativa de massa nesta região com percentuais que variam de aproximadamente 64 a 85%. Tal resultado está relacionado com o fato de que o material se comporta como um hidrogel, ou seja, uma rede polimérica entumecida por água (JIANG, S. LIU, S. e FENG, W., 2011).

Com o objetivo de se comparar melhor os efeitos dos ciclos sobre a estabilidade térmica do polímero com o decorrer dos ciclos de congelamento e descongelamento, montou-se um gráfico (figura 15) destacando-se a região acima de 150 °C, na qual a maior parte da água não estrutural presente no material já tenha evaporado, restando apenas aquela que se encontra ligada às cadeias poliméricas.

Figura 15 – Análise Termogravimétrica a partir de 150 °C



Fonte: Autor

Com este novo gráfico a comparação da resistência térmica das amostras é mais evidente. Comparando-se o segundo evento de perda de massa entre as amostras presente entre 240 a 320°C para o PVA3 e PVA6, com o mesmo evento observado para o PVA puro, que ocorre entre 280 e 415°C, há uma perda de estabilidade térmica nas amostras processadas. Isto se deve à atuação dos processos de degradação já mencionados nos itens anteriores. Nesta faixa de temperaturas ocorre o início da degradação térmica das cadeias do PVA, com a saída de água das cadeias e formação de cetonas e aldeídos a partir dos grupos álcoois presentes no polímero HOLLAND, B.J., HAY, J.N., (2001) e THOMAS, P. S., *et al.*, (2001).

O procedimento experimental adotado neste trabalho pode ter contribuído para a observação de tais resultados, uma vez que agitação mecânica vigorosa em temperaturas próximas a 100°C e a presença do ácido clorídrico podem ter sido responsáveis por respectivamente, iniciar e catalisar uma reação de degradação da cadeia polimérica. Portanto observa-se uma menor resistência ao calor para as amostras de PVA3 e PVA6, quando comparado ao PVA puro. Para as amostras de PVA9 e PVA12 o impacto foi ainda mais

severo, sendo observadas perda de massa em temperaturas ainda menores, na faixa entre de 150 a 300°C.

Outro evento de degradação térmica ocorre em temperaturas que variam entre 410 e 540°C para as amostras processadas, e está relacionado com a pirólise das cadeias de PVA, que tem com produtos voláteis orgânicos resultando nesta perda de massa. Para a amostra de PVA puro a temperatura em que este evento ocorre é de aproximadamente 490°C.(THOMAS, P. S., *et al.*, 2001).

Por fim observa-se um último evento presente apenas para as amostras de PVA3 e PVA6, em temperaturas entre 600 a 700°C. Tal fenômeno está relacionado com a decomposição térmica do carbonato de cálcio utilizado com agente formador de poros. A equação 2 descreve a reação de decomposição do carbonato de cálcio ocorrida durante a termogravimetria. A partir dela pode-se notar que a perda de massa observada está relacionada com a saída de gás carbônico do material. E na figura 16 está plotado o gráfico da termogravimetria referente ao carbonato de cálcio utilizado neste experimento.

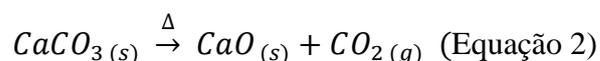
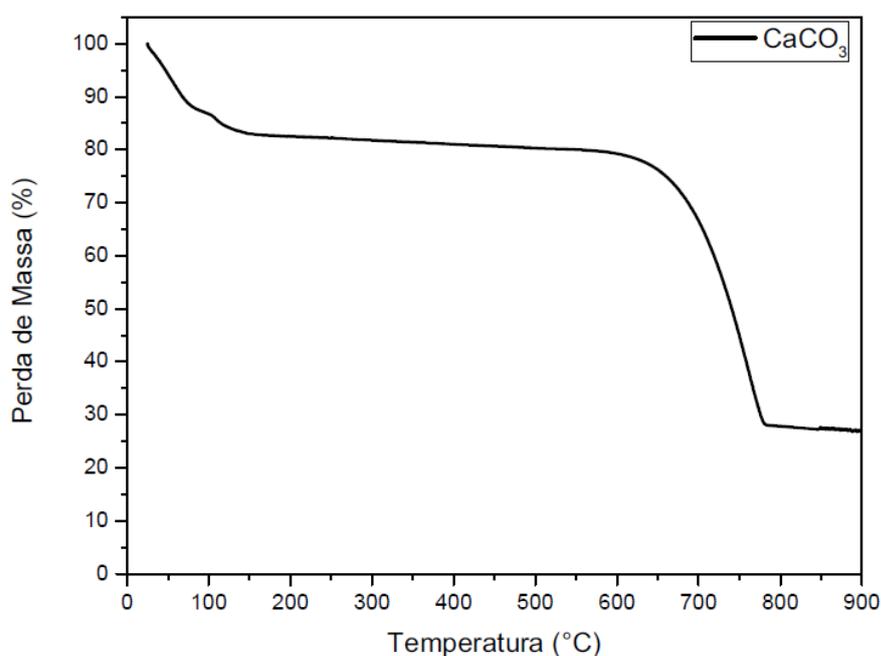


Figura 16 – Termogravimetria para o carbonato de cálcio utilizado



Fonte: Autor

A reação para a produção da espuma ocorre de maneira heterogênea sobre o material, com isso pode haver porções onde a reação ocorreu de maneira completa e em outras se percebe a presença de carbonato residual. Devido à heterogeneidade descrita, observa-se que para as amostras PVA9 e PVA12 não há o evento de degradação na faixa compreendida entre 600 e 700°C. Para estas amostras a quantidade de carbonato presente não é detectada no gráfico de perda de massa. Deste modo a massa residual final presente nestas amostras se refere ao cloreto de cálcio (CaCl_2) formado da reação do ácido clorídrico com o carbonato de cálcio representado na equação (1).

Para as amostras que passaram pelo processo de congelamento e descongelamento bem com a amostra de PVA puro houve a presença de material remanescente após a pirólise das cadeias poliméricas. Isto se deve à presença de resíduos carbonizados do material no equipamento, e também pela presença de sal não reagido durante o processamento. Nesse trabalho não foram adotadas medidas para a lavagem das amostras antes de serem enviadas para a caracterização, com isso a presença de sal residual era esperada nas amostras.

A tabela 5 apresenta as frações finais de material resultante do ensaio de termogravimetria. Nela é possível observar a diferença causada pela presença do sal no material processado e o PVA puro.

Tabela 5 – Comparação das quantidades de material residual presentes ao final do ensaio de termogravimetria

Amostra	% Remanescente
PVA puro	3%
PVA1	16%
PVA3	2%
PVA6	10%
PVA9	11%
PVA12	12%

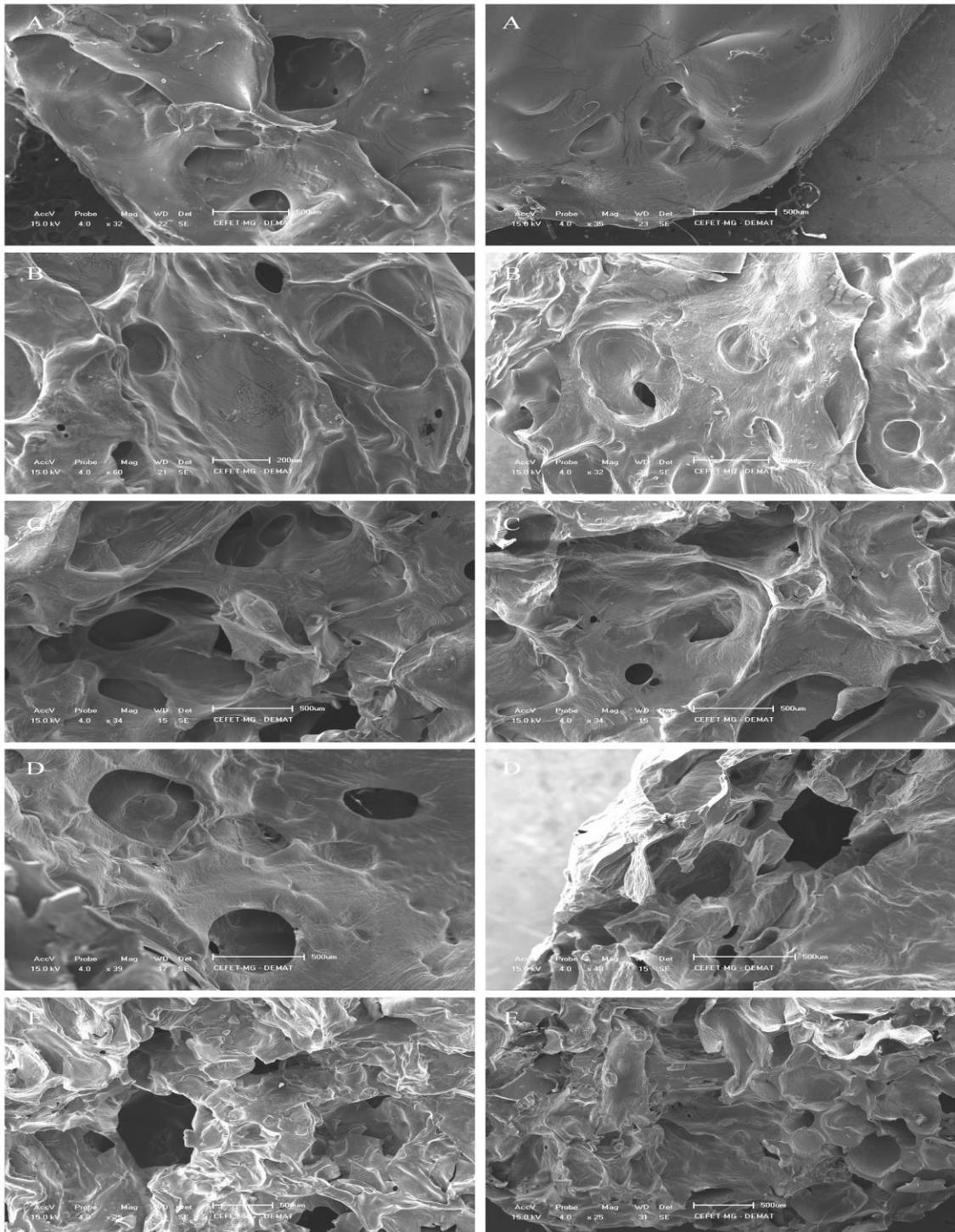
Fonte: Autor

Ao se comparar os resultados presentes na tabela observa-se novamente a heterogeneidade da distribuição do sal pela cadeia do polímero, com quantidades distintas de material remanescente em cada amostra.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens da superfície das amostras estão apresentadas na figura 17.

Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Varredura para as amostras de PVA de PVA 1 (A), PVA 3 (B), PVA 6 (C), PVA 9 (D) e PVA 12 (E).



Fonte: Autor

A partir da análise das imagens é possível observar a presença de poros interconectados em todas as amostras. Além disso, há uma aparente mudança na morfologia com o decorrer dos ciclos de congelamento e descongelamento em que o material foi submetido. WHETSELL, J., (2015) estuda em seu trabalho a influência dos ciclos de congelamento e descongelamento em espumas poliméricas. O autor atribui às mudanças na morfologia das paredes dos poros, a penetração da água presente no interior da espuma. O congelamento da água durante um ciclo promove sua dilatação para a formação de gelo, tal expansão por sua vez promove a ruptura das paredes que formam um poro. Com isso, libera-se espaço para mais água escoar para o interior do material e continuar este mecanismo. Ainda segundo o autor, a água não necessariamente destrói as paredes dos poros, mas é capaz de enfraquecer estas estruturas e formar novos canais de conexão entre aqueles presentes.

Dos processos de formação de poros empregados neste trabalho, as imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que o mais efetivo para a formação de uma estrutura porosa fora a formação gasosa, tendo em vista o formato arredondado dos poros obtidos. No estudo de LI, X., *et al.* (2012), os autores empregam a mesma técnica de formação gasosa, e reagentes similares aos adotados no presente trabalho. Relatam a formação de uma estrutura heterogênea, com a presença de poros abertos e fechados na espuma formada, devido ao processo de formação gasosa promovida pela reação do Carbonato de Cálcio (CaCO_3) com o Ácido Clorídrico (HCl). Os autores relatam um aumento no tamanho de poro e em sua interconectividade, devido a atuação do gelo como um agente formador de poros com o decorrer dos ciclos.

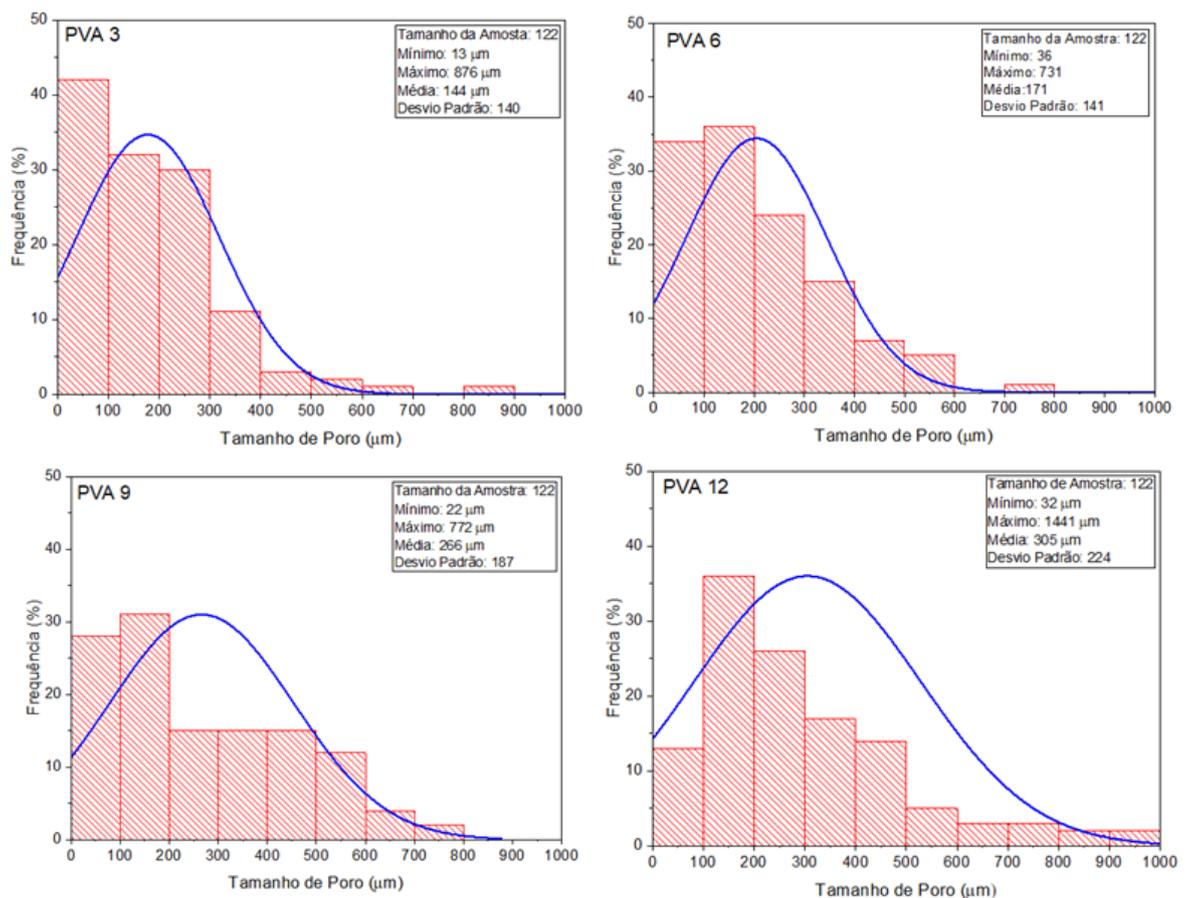
Por fim, os efeitos da liofilização foram bastante evidentes neste processo, visto que para as amostras de PVA1 e PVA3 se mostrou um processo agressivo ao material, que por estarem nos primeiros estágios de sua reticulação física ainda não possuem uma resistência mecânica capaz de lhe conferir estabilidade dimensional, logo observa-se para estas amostras a presença de diversos poros fechados e até a ausência de poros em algumas regiões como nota-se na figura 12 -A e 12 -B.

MILLON, L.E. e WAN, W. K., (2005) estudam em seu artigo a influência do número de ciclos de congelamento e descongelamento nas propriedades mecânicas do PVA. Os resultados obtidos para os ensaios mecânicos com o material, os autores relatam que o aumento do número de ciclos aumenta significativamente a resistência mecânica à tração de suas amostras. MILLON, L. E., *et al.* (2007) justifica tal incremento nas propriedades mecânicas devido à separação de fases ocorrida durante os ciclos de congelamento e descongelamento. Com o passar dos ciclos as cadeias do polímero tendem a se segregar cada

vez mais do solvente que neste caso é a água. Deste modo são formadas estruturas com uma densidade mais elevada de pontos de contato intermolecular, e com maior cristalinidade, que limitam a movimentação relativa entre as cadeias do polímero. Portanto os ciclos contribuem para o travamento das cadeias e conseqüentemente elevam o módulo de elasticidade do material.

Quanto às medições dos tamanhos de poros foram plotados os seguintes histogramas da figura 18, para se avaliar os efeitos do processo, na dispersão da população de poros presentes na estrutura. Observa-se com maior clareza o impacto dos fenômenos já descritos com relação ao efeito que os ciclos de congelamento e descongelamento sobre a estrutura porosa do material.

Figura 18 – Histograma da dispersão do tamanho de poro obtido em cada ciclo de congelamento e descongelamento.



Fonte: Autor

Pelas curvas de distribuição normal do tamanho de poros obtidos, os ciclos de congelamento e descongelamento aumentam a distribuição, e também o tamanho dos poros. Nos primeiros ciclos (PVA3 e PVA6) nota-se uma predominância de poros com tamanhos

inferiores à 300 μm . A curva de distribuição normal para estas amostra é estreita indicando que não uma variedade na população dos poros. Já para as amostras que passaram por mais ciclos de congelamento e descongelamento (PVA 9 e PVA 12) observa-se um tamanho médio de poro maior, e um aumento na frequência de poros com tamanhos entre 200 a 500 μm .

6 CONCLUSÕES

A produção de *scaffolds* é uma parte fundamental dentro da engenharia de tecidos, e engloba diversos aspectos que devem ser levados em consideração, como a biocompatibilidade do material, suas propriedades físico-químicas e sua morfologia. Neste trabalho foi abordada uma rota para a produção de *scaffolds* poliméricos de poli álcool vinílico, a partir das técnicas de formação gasosa e liofilização, aliadas à reticulação física do material. O procedimento descrito se mostrou adequado à produção de uma estrutura com a possibilidade de controle no tamanho e interconectividade dos poros. Os efeitos dos tratamentos térmicos com ciclos congelamento e descongelamento foram descritos, e a partir deste nota-se que com o decorrer do processo a estrutura se apresentou mais adequada à aplicação proposta. As amostras com 12 ciclos de congelamento e descongelamento formaram uma estrutura com uma maior dispersão de tamanho de poros. Quanto à abordagem físico-química destaca-se os efeitos do tratamento térmico sobre material, conferindo ao polímero uma estrutura com menor mobilidade para a movimentação das cadeias. Neste caso, novamente a amostra com mais ciclos se destaca pela perda de mobilidade atingida pelas cadeias. Também destaca-se a perda de propriedades térmicas induzidas por processos degradativos catalizados pelo forte ácido inorgânico utilizado na síntese deste material.

7 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Para a continuidade deste trabalho recomenda-se um aprofundamento a respeito dos seguintes temas:

- Influência do pH ácido sobre as espumas poliméricas de PVA;
- Realizar testes utilizando-se ácidos orgânicos, mais fracos que o ácido clorídrico para a reação com o carbonato de cálcio;
- O comportamento dinâmico mecânico do material formado após a conclusão de cada um dos ciclos de congelamento e descongelamento;
- Ensaio de degradação em solução tampão fosfato para se avaliar a vida útil deste material;
- Medição da porosidade e densidade dos *scaffolds*;
- Resistência mecânica das amostras;
- Ensaio *in vitro* para averiguar a viabilidade celular do material;
- Avaliação do intumescimento do material;
- Viabilidade de incorporação de biomoléculas ao *scaffold*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAI, X. et al. **Preparation of crosslinked macroporous PVA foam carrier for immobilization of microorganisms.** Process Biochemistry, 10 Agosto 2010. 60-66.

BEI, Y. **Degradation of polyvinyl alcohol (PVA) by UV/chlorine oxidation: Radical roles, influencing factors, and degradation pathway.** Water Research, Shenzhen, Maio 28 2017.

BLITTERSWIJK, C. A.; BOER, J. (Eds.). **Tissue Engineering.** 2ª. ed. San Diego: Elsevier, 2015.

BRONZINO, J. D.; PETERSON, D. R. (Eds.). **Molecular, Cellular and Tissue Engineering.** 4ª. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

BUTTERY, L. D. K.; BISHOP, A. E. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering.** Cambridge: Woodhead Publishing, 2005.

CHATURVEDI, A.; BAJPAI, A. K. **Preparation and Characterization of Poly(vinyl alcohol) Cryogel-Silver Nanocomposites and Evaluation of Blood Compatibility, Cytotoxicity, and Antimicrobial Behaviors.** Polymer Composites, 2014.

CHOI, S. M. **Porous Three-Dimensional PVA/Gelatin Sponge for Skin Tissue Engineering.** International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, Gyeongsan, Coréia do Sul, 7 Julho 2012. 384 - 389.

CLARIANT. **Mowiol Polyvinyl Alcohol.** Frankfurt am Main. 1999.

COSTA JÚNIOR, D. S.; MANSUR, H. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 133. 2008.

DEGHANI, F.; ANNABI, N. **Engineering porous scaffolds using gas-based techniques.** Current Opinion in Biotechnology, 3 Maio 2011. 661-666.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. **Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review.** International Journal of Polymer Science, Toquio, 9 Julho 2011. 1 - 9.

FERREIRA, R. **Matrizes para a engenharia de tecidos na forma de espumas, fibras e/ou membranas constituídas por polímeros, cerâmicas, compósitos poliméricos e/ou compósitos cerâmicos contendo extrato de bixa orellana l. E o método de obtenção.** BR 10 2017 018080 8, 23 Agosto 2017.

FERREIRA, R. **Dispositivo e método de obtenção de matrizes para engenharia de tecidos do tecido cardiovascular.** BR 10 2018 001781 0, 26 Janeiro 2018.

FIGUEIREDO, K. C. S.; ALVES, T. L. M.; BORGES, C. P. **Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked Under Mild Conditions**. Journal of Applied Science, p. 3074-3080, 2008.

GUIRGUIS, O. W.; MOSELHEY, M. T. H. **Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends**. Natural Science, Cairo, 10 Setembro 2011. 57 - 67.

HERNANDÉZ, J. C. **Thermal, Structural, and Rheological Characterization of Waxy Starch as a Cryogel for Its Application in Food Processing**. Polymers, Cuautitlan Izcalli, 23 Março 2018. 359 - 372.

HOLLAND, B. J.; HAY, J. N. **Thermal degradaton of poly(vinyl alcohol)**. Polymer, Birmingham, 19 Fevereiro 2001. 6775 - 6783.

HSIEH, W. C. et al. **Biocompatible testing and physical properties of curdlan-grafted poly(vinyl alcohol) scaffold for bone tissue engineering**. Carbohydrate Polymers, Kaohsiung, 3 Novembro 2016.

HUTMACHER, D. W. **Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives**. Journal of Biomaterials Science , 16 Outubro 2001. 107 - 124.

ILČIN , M.; HOLÁ, O.; BAKAJOVÁ, B. **FT-IR study of gamma-radiation induced degradation of polyvinyl alcohol (PVA) and PVA/humic acids blends**. J. Radioanal Nuclear Chemistry, Budapeste, 28 Agosto 2009. 9 - 13.

JIANG, S.; LIU, S.; FENG, W. **PVA hydrogel properties for biomedical application**. Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials , 19 Abril 2011. 1228 - 1233.

KAMOUN, E. A. et al. **Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers**. Arabian Journal of Chemistry, 2014.

KARIMI, A.; NAVIDBAKSH, M.; FAGHIHI, S. **Fabrication and mechanical characterization of polyvinyl alcohol sponge for tissue engineering applications**. Perfusion, p. 231-237, 2013.

KHANG, G. (Ed.). **Intelligen Scaffolds fof Tissue Engineering and Regenerative Medice**. 2ª. ed. Singapura: Pan Stanford Publishing, 2017.

KIM, T. H. et al. **Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezingethawing method to investigate stem cell differentiation behaviors**. Biomaterials, p. 51-60, 2015.

KLEE, D. .; EASTMOND, G. C.; MCGRATH, J. E. **Biomedical Applications Polymer Blends**. [S.l.]: Springer, 2003.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4^a. ed. Londres: Elsevier, 2014.

LEE, S. B. et al. **Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method**. *Biomaterials*, 29 Julho 2005. 1961 - 1968.

LI, J. K.; WANG, N.; WU, X. S. **Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing–thawing process fo protein/peptide drug delivery**. *Journal of Controlled Release*, p. 177-126, 1998.

LI, X. et al. **Preparation and characterization of new foam adsorbents of poly(vinyl alcohol)/chitosan composites and their removal for dye and heavy metal from aqueous solution**. *Chemical Engineering Journal*, Lanzhou, 7 Dezembro 2012. 88 - 97.

LOH, L. Q.; CHOONG, C. **Three Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size**. *Tissue Engineering: Part B*, v. 19, p. 485-502, 6 Nov 2013.

LU, T.; LI, Y.; CHEN, T. **Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering**. *International Journal of Nanomedicine*, p. 337-350, 2013.

MANSUR, H. S. et al. **FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde**. *Materials Science and Engineering C*, p. 539-548, 2008.

MILLON, F. E.; WAN, W. K. **The Polyvinyl Alcohol–Bacterial Cellulose System As A New Nanocomposite for Biomedical Applications**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Materials*, Ontario, 28 Novembro 2005. 245 - 253.

MILLON, L. E. et al. **SANS Characterization of an Anisotropic Poly(vinyl alcohol) Hydrogel with Vascular Applications**. *Macromolecules*, Ontario, 28 Fevereiro 2007. 3655 - 3662.

MURTHY, Z. V. P.; SHAH, K. **Separation of isopropyl alcohol–toluene mixtures by pervaporation using poly (alcohol vinyl) membranes**. *Arabian Journal of Chemistry*, p. 1-6, 2012.

NKHWANA, S. et al. **Poly(vinyl alcohol): Physical Approaches to Designing Biomaterials for Biomedical Applications**. *Conference Papers in Science*, 20 Março 2014.

OKAY, O. (Ed.). **Polymeric Criogels Macroporous Gels with Remarkable Properties**. Londres: Springer, 2014.

OKAZAKI, M. et al. **Development of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel for Waste Water Cleaning. II. Treatment of N,N-Dimethylformamide in Waste Water with**

Poly(vinyl alcohol) Gel with Immobilized Microorganisms. Journal of Applied Polymer, p. 2243-2249, 1995.

PARADOSSI, G.; CHIESSI, E.; CAVALIERI, F. **Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2003. 687 - 691.

PARK, Y.-I.; LEE, K.-H. **Preparation of Water-Swollen Hydrogel Membranes for Gas Separation.** Journal of Applied Polymer Science, Taejon, v. 80, p. 1785-1791, 15 Outubro 2001.

PEPPAS, N. A.; HASSAN, C. M. **Structure and Applications of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freeze Thawing Methods.** Berlin. 2000.

PEPPAS, N. A.; STAUFFER, S. R. **Reinforced uncrosslinked poly (vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review.** Journal of Controlled Release, 1991. 305-310.

POLAK, J.; MONTALARIS, S.; HARDING, S. E. (Eds.). **Advances in Tissue Engineering.** Londres: Imperial College Press, 2008.

REIGIER, J.; HUNEAULT, M. A. **Preparation of interconnected poly(3-caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching.** Polymer, 16 Maio 2006. 4703 - 4717.

RICCIARDI, R. et al. **Investigation of the Crystallinity of Freeze/Thaw Poly(vinyl alcohol) Hydrogels by Different Techniques.** Macromolecules, 30 Julho 2004. 9510 - 9516.

ROSA, J. J.; FERREIRA, R. V. **Desenvolvimento e caracterização de espumas de poli álcool vinílico para potencial uso na engenharia de tecidos.** Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 51. 2016.

SALTZMAN, M. W. **Tissue Engineering: Principles for the Design of Replacement organs and Tissues.** Nova Iorque: Oxford, 2004.

SCHNEIDER, H. J.; SHAHINPOOR, M. **Smart Materials for Tissue Engineering Fundamental Principles.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017.

SHIM, Y. B. et al. US 2012/0108689 A1, 2012.

SIGMA ALDRICH. **SAFETY DATA SHEET.** Cotia, p. 7. 2016.

STAUFFER, S. R.; PEPPAS, N. A. **Poly (vinyl alcohol) hidrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing.** Polymer, p. 3932-3936, 1992.

SULTANA, N. **Mechanical and biological properties of scaffold materials**. In: DENG, Y. . K. J. **Funcional 3D Tissue Engineering Scaffolds**. Duxford: Elsevier, 2018. p. 1 - 16.

TAVAKOLI, J.; TANG, Y. **Honey/PVA hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structural, physico-mechanical and in-vitro biomedical studies**. Materials Science and Engineering C, Adelaide, Austrália, 29 Março 2017. 318 – 325.

TAYEBI, L.; MOHARAMZADEH, K. (Eds.). **Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering**. Duxford: Woodhead Publishing, 2017.

TERRONI, H. C. et al. **Liofilização**. Revista Científica, p. 271-284, 2013.

THOMAS, P. S. et al. **FTIR study of the thermal degradation of poly(vinyl alcohol)**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Sydney, 2001. 501 - 508.

TSAI, Y. C.; HUANG, J.-D.; CHIU, C.-C. **Amperometric ethanol biosensor based on poly(vinyl alcohol)–multiwalled carbon nanotube–alcohol dehydrogenase biocomposite**. Biosensors and Bioelectronics , p. 3051-3056, 2007.

VRANA, N. E. **Cryogelation for Tissue Engineering: Composites, Scaffold Formation and Cell Encapsulation**. Dublin City University. Dublin, p. 277. 2009.

WENCHUAN CHEN, D. D. S. et al. **Gas-Foaming Calcium Phosphate Cement Scaffold. Tissue Enginnering: Part A**, Baltimore, 6 Dezembro 2011. 12.

ZHOU, X. H.; WEI, D. X.; YE, H. M. **Development of Poly(vinyl alcohol) Porous Scaffold with High Strength and Well Ciprofloxacin Release Efficiency**. Materials Science & Engineering: C, 1 Outubro 2016. 326-335.

ZOU, J.; WINSTON HO, W. S. **CO₂-selective polymeric membranes containing amines in crosslinked poly (vinyl alcohol)**. Journal of Membrane Science, p. 310-321, 2006.