

**Universidade Federal de Itajubá**  
**Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia**  
**Instituto de Física e Química**

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE  
ARCABOUÇOS DE POLIGLICEROL ARBORESCENTE  
ELETROFIADOS**

**Esdras Duarte dos Passos**

Tese submetida à Universidade Federal de Itajubá  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau  
de Doutor em Materiais para Engenharia.

**Área de Concentração:** Polímeros

**Orientação:** Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz

Itajubá-MG

2015

**Universidade Federal de Itajubá**  
**Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia**  
**Instituto de Física e Química**

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE  
ARCABOUÇOS DE POLIGLICEROL ARBORESCENTE  
ELETROFIADOS**

**Esdras Duarte dos Passos**

Tese submetida à Universidade Federal de Itajubá  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau  
de Doutor em Materiais para Engenharia.

**Área de Concentração:** Polímeros

**Orientação:** Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz

Itajubá-MG

2015

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	6
AGRADECIMENTOS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
RESUMO .....	20
ABSTRACT .....	21
CAPÍTULO 1: ASPECTOS GERAIS DA TESE .....	22
1.1 Introdução .....	23
1.2 A Engenharia de Tecidos Biológicos.....	24
1.3 O emprego da eletrofiação para a obtenção de arcabouços moleculares poliméricos	29
1.4 Objetivos .....	32
1.4.1 Objetivo Geral .....	32
1.4.2 Objetivos Específicos .....	32
1.5 Estrutura da Tese .....	32

CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA.....	34
2.1 A utilização de polímeros para a obtenção de arcabouços moleculares .....	35
2.2 Propriedades físico-químicas e biológicas de arcabouços moleculares.....	40
2.3 Aplicação de hidrogéis na engenharia de tecidos biológicos.....	46
2.4 Características físico-químicas do hidrogéis de PGA.....	51
2.5.5 Fluido Supercrítico.....	66
2.5.6 Prototipagem Rápida .....	67
2.5.7 Eletrofiação .....	68
2.5.8 Limitações da utilização dos arcabouços moleculares na ETB.....	72
2.6 Modelagem <i>in silico</i> do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA.....	75
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS .....	82
3.1 Síntese e caracterização do PGA.....	83
3.2 Processo de Eletrofiação do PGA.....	89
3.3 Modelagem <i>in silico</i> do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA.....	92
3.4 Metodologia - Gromacs .....	93
3.5 Avaliação Biológica dos Arcabouços .....	96
3.5.1 Citotoxicidade.....	96
3.5.2 Adesão Celular nos Arcabouços.....	97
3.5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	98
3.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	98
3.7 Espectroscopia de UV-Vis.....	103
3.8 Análise Térmica.....	105
3.8.1 Calorimetria Exploratória Diferencial DSC .....	105

3.8.2	Análise Termogravimétrica - TGA.....	107
3.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....	108
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		110
4.1	Síntese do poliglicerol (PGL) como núcleo oligomérico .....	111
4.2	Análise da síntese do PGL utilizando química quântica computacional .....	115
4.3	Síntese de membranas de PGA por eletrofiação e estudo de suas características físico-químicas .....	126
4.4	Absorção de água .....	138
4.5	Ensaio biológicos .....	147
4.5.1	Citotoxicidade.....	149
4.5.2	Ensaio de Adesão e Proliferação Celular .....	150
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....		159
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		162

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Daniel e Maura, pelo que me ensinaram a amar e respeitar; minha querida esposa, Tatiane e minhas filhas Byanca e Beatriz pelo amor e confiança; aos meus caros mestres a eterna gratidão pela riqueza dos seus ensinamentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial agradeço:

Ao Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz, por sua orientação, amizade, dedicação, paciência e pela formação científica.

A Prof. Dr. Maria Elena Leyva González - por sua amizade, carinho e pela formação científica.

Ao Prof. Dr. Élcio Rogério Barrak (Laboratório de Análise Térmica - UNIFEI) pelas análises DSC e TGA.

A Marinha do Brasil (SP). Divisão de Projetos Especiais.

A Superintendência do IPEN/CNEN – Dr José Carlos Bressiani = acessos a equipamentos.

Ao Dr. Julio San Román CSIC-ICTP/Madri- Espanha (RMN).

Aos demais professores do curso de doutorado, pelo desenvolvimento do meu conhecimento teórico e científico.

Aos colegas do curso de Doutorado em Materiais para Engenharia, em especial ao aluno Aldo da Silva e Amanda de C. Pereira pelo auxílio prestado nos procedimentos experimentais.

Aos funcionários da UNIFEI, em especial àqueles do Laboratório de Biomateriais e Instituto de Física e Química – Instituto de Ciências, pela colaboração necessária para realização deste trabalho.

A todos os que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	tri-dimensionais
AM1	Modelo Austin 1
C	Carbono
CAD	Computer aided Design
DFT	Density functional theory (teoria do funcional de densidade)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)
DTG	Termogravimetria derivada
ETB	Engenharia de tecido Biológico
ETH	Engenharia de Tecido Humano
FDA	Food and Drug Administration
FDM	Fused Deposition Modelling
FTIR	Fourier transform infrared (infravermelho por transformada de Fourier)
Gromacs	Groningen Machine for Chemical Simulation
H	Hidrogênio
$^1\text{H}$ -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
HA	Hidroxiapatita
HOMO	Orbital Molecular de energia mais alto ocupado

LCAO	Orbital atômico linear
LUMO	Orbital Molecular de energia mais baixo desocupado
LCAO-OM	Linear Combination of Atomic Orbitals - Orbital Molecular
MC	Monte Carlo
MO	Orbital molecular
NDO	Neglect of Differential Overlap
Ns	Nanossegundos ( $10^{-9}$ s)
O	Oxigênio
OMF	Orbital Molecular de Froteira
PCL	Poli(policaprolactona)
PDB	Protein Data Bank
PEAD	Polietileno de alta densidade
PGA	Poliglicerol Arborescente
PGL	Poliglicerol Oligomérico
PGLD	Poliglicerol Dendrítico
PLLA	Poli(ácido polilático)
PM3	Método Paramétrico 3
Ps	Picossegundos ( $10^{-12}$ s)
$\epsilon_p$	Potencial eletrostático
QM/MM	Mecânica Quântica/Mecânica Molecular
QSAR	Quantitative structure–activity relationship
QSR	Laser de rubi Qswitched

Rg	Raio de Giro
RM	Ressonância Magnética
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROS	Reactive oxygen species
SAS	Superfície Acessível ao Solvente
SCF	Campo autoconsistente
SFF	Solid Freeform Fabrication
TC	Tomografia Computacional
TG	Termogravimetria
Tg	Transição vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica
UNIFEI	Universidade Federal de Itajubá
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
VR	Vibrational relaxation (relaxamento vibracional - decaimento energético)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tecnologias mais utilizadas para a fabricação de arca-bouços moleculares. Adaptado de [82].....	60
Tabela 2 - Parâmetros utilizados no processo de eletrofição de modo a se obter membranas estáveis.....	91
Tabela 3- Valores dos coeficientes de intumescimento medidos em diferentes temperaturas para as membranas de PGA eletrofiadas. ....	142
Tabela 4- Valores da constante da velocidade de relaxação e do coeficiente de correlação das membranas de PGA eletrofiadas a diferentes temperaturas. ....	144

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Princípios básicos da Engenharia de Tecidos Biológicos. Adaptado de [1]. ..25
- Figura 2- Ilustração de algumas aplicações ETB já em fase clínica. (I) restauração óssea utilizando a biocerâmica de hidroxiapatita. Observa-se na seqüência a falha óssea (a), inserção da biocerâmica (b) e integração da biocerâmica com o tecido ósseo (c). (II) O enxerto cardiovascular macroporoso fabricado a partir do polímero PLLA (A) é embebido em fibrina (B) é implantado na artéria de animal (C). (III) Traquéia produzida integralmente a partir de técnicas da ETB. (IV) Córnea de paciente danificada (esquerda) e regenerada por técnica da ETB (direita). Adaptado de [13-14].....28
- Figura 3- Ilustração da técnica de eletrofiação. O polímero está dissolvido em seu solvente ideal. ....29
- Figura 4- Ilustração da estrutura química (A) e simulação computacional (B) do PGA. Em (B), a cor vermelha indica deficiência de elétrons e a cor azul excesso de elétrons.....31
- Figura 5 - Ilustração de estrutura química com o mapa eletrostático (Software - HyperChem) do PLLA e do biopolímero de amido, dois polímeros amplamente utilizados na obtenção de arcabouços moleculares. ....35
- Figura 6- Ilustração das estruturas químicas e aplicações clínicas de alguns polímeros reabsorvíveis: Dacron®-PET é utilizado na fabricação de vários tipos de stents, PGA é utilizado na fabricação de tubos para a reconstrução de veias e artérias, PLLA é utilizado como enxerto de falhas ósseas e o PCLA é muito utilizado na fabricação de traquéias artificiais. Adaptado de [32-33].....37
- Figura 7- Ilustração do mecanismo de biodegradação de poliésteres alifáticos sintéticos. Adaptado de [37].....38
- Figura 8 - Ilustração das estruturas químicas do PVOH (A), PEG (B) e PGA (C). Adaptado de [42].....39
- Figura 9 - Ilustração do mecanismo de condensação do glicerol para a produção de seus oligômeros. Adaptado de [44].....40
- Figura 10 - Ilustração do processo de adesão e movimento celular na superfície de um arcabouço molecular. O processo de movimento celular se inicia quando a célula

adere na superfície do arcabouço via moléculas de adesão tais como vinculina, talina e integrina. Adaptado de [53].....	43
Figura 11 - Técnicas para o aprisionamento de espécies bioativas em arcabouços moleculares para a ETB. Adaptado de [56].....	46
Figura 12 - Ilustração da microestrutura típica de um hidrogel. Adaptado de [58]. .....	47
Figura 13 - Os químicos tchecos inventores da lente de contato, Otto Wichterle (esquerda) e Drahoslav Lim (direita). Adaptado de [65].....	48
Figura 14 - Relação entre estrutura química e as propriedades biológicas do arcabouço molecular exercem influências significativas que afetam diretamente a interação entre a célula biológica e o material sintético. ....	49
Figura 15 - Ilustração dos principais métodos de reticulação química para a obtenção de hidrogéis: polimerização de monômeros vinílicos (a) e macromonômeros (b), reação através de grupos funcionais (c), utilização de radiação de alta energia (raios- $\gamma$ ) (d), condensação de aminoácidos (e), fotoreticulação com luz UV através de grupos reativos da benzofenona (f). Adaptado de [67]. ....	50
Figura 16 - Ilustração dos métodos de obtenção de hidrogéis via reticulação física: interação iônica (a), interação hidrofóbica (b), automontagem com formação de um complexo estereoquímico (c), interação entre espirais enroladas, interações através de reconhecimento molecular específico. Adaptado de [68]. ....	51
Figura 17 - O químico alemão Hermann Staudinger é considerado o “pai” da química macromolecular. Em 1953 ele ganhou o prêmio Nobel em virtude de seus trabalhos envolvendo a elucidação da arquitetura molecular dos polímeros. Adaptado de [71]. ....	52
Figura 18- Representação de um polímero de cadeia linear formado por N unidades monoméricas e caracterizado pela distância ponta-a-ponta por $\vec{R}$ e seu raio de giro ( $R_g$ ). CM representa o centro de massa da cadeia polimérica. R é o comprimento médio que representa o tamanho do polímero. ....	53
Figura 19 - Novelo aleatório formado por polímeros lineares representando uma partícula microscópica. ....	54
Figura 20- Comparação entre o raio hidrodinâmico e raio de giro de um polímero em solução. Adaptado de [71]. ....	56

Figura 21- Comparação das arquiteturas poliméricas como uma função do grau de ramificação GR: D- dendrítica, G- linear e T- unidades terminais). Adaptado de [77]. .....	57
Figura 22 – Reações específicas de ativação dos grupos 1,2 diol presentes no PGA que poderão favorecer a biofuncionalização do PGA. Adaptado de [80]. .....	59
Figura 23- Diagrama de fases P-T para a água e os respectivos processos correspondentes às transições de fase. Os respectivos equilíbrios entre as fases são: linha DB = equilíbrio líquido-gás, linha DA = equilíbrio sólido-líquido e linha DC = equilíbrio sólido-gás. Adaptado de [83]. .....	61
Figura 24 - Arcabouço molecular tipo esponja fabricado a partir da liofilização do colágeno. Em (A) o arcabouço foi liofilizado após lavagem com solução de ácido acético 0,25 M e em (B) após lavagem com água. Adaptado de [84]. .....	62
Figura 25 - Arcabouço molecular de PLLA produzido pela técnica de gelificação térmica. Adaptado de [85]. .....	63
Figura 26 – Arcabouço de PLLA obtido através da técnica de lixiviação de partículas [86]. .....	64
Figura 27 – Micrografia eletrônica de varredura de arcabouço de PLLA preparado utilizando microesferas de parafina. O tamanho de poros varia de 420-500 µm. Adaptado de [87]. .....	64
Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura de arcabouço molecular de PLLA fabricado através da técnica SFIT. Adaptado de [87]. .....	66
Figura 29 – Diagrama esquemático que mostra o equipamento utilizado para fabricação de arcabouço. Adaptado de [90]. .....	67
Figura 30 - Ilustração de fabricação de arcabouços usando Prototipagem Rápida (RP). .	68
Figura 31- Ilustração do processo de eletrofiação. Adaptado de [95]. .....	69
Figura 32 - Alguns exemplos das configurações que podem ser adquiridas pelo jato de uma solução polimérica durante o processo da eletrofiação [98]. .....	69
Figura 33 - Número de artigos publicados com a palavra-chave eletrofiação no período 1995-2008. Adaptado de [105]. .....	71
Figura 34 - Países que apresentam produção científica e/ou tecnológica na área de eletrofiação. Adaptado de [105]. .....	72
Figura 35 - Diagrama esquemático mostrando as limitações de difusão no arcabouço. Adaptado de [114]. .....	74

Figura 36 - Ilustração das principais aplicações do pacote de programas Hyperchem (MM = Mecânica Molecular e QM = Mecânica Quântica). .....	76
Figura 37 - Potencial eletrostático calculados no HyperChem 5.1 sobre a superfícies moleculares do glicerol e diglicerol. Faixa de função mapeadas de cores: Vermelho, mais negativo e azul escuro, mais positivo. ....	78
Figura 38 - Representação dos orbitais moleculares HOMO (A) e LUMO (B) para a molécula do Glicerol no Software HyperChem 5.1. ....	81
Figura 39 - Ilustração no da reação de obtenção núcleo oligomérico de PGL-10. O índice n representa o número de moléculas de água removidas durante a reação. Para n = 1,2,3,4,5, 6,7,8 e 9; os oligômeros formados são: diglicerol, triglicerol, tetraglicerol, pentaglicerol, hexaglicerol, heptaglicerol, octaglicerol, nonaglicerol e decaglicerol; respectivamente. ....	84
Figura 40 - Relação entre massa molecular (MM) e o número de desidratações (n) envolvidas no processo de oligomerização do glicerol. ....	86
Figura 41 - Espectro de ESI-MS obtido para o PGL-10. ....	87
Figura 42 - Ilustração do processo de síntese dos PGA G= 1, 2, 3 e 4 utilizando a rota sintética adaptada de Williamson. TBABr = Brometo de tetrabutil amônio, NMO = N-óxido de N-metil morfolina, OsO <sub>4</sub> = tetróxido de ósmio (solução aquosa), PC = purificação cromatográfica [128-129]. ....	88
Figura 43 - Perfil cromatográfico CLAE do PGA (G3) (A) e dependência entre t <sub>R</sub> e o número de geração do PGA (B). ....	89
Figura 44 - Montagem experimental para o processo de eletrofiação: Bomba infusora (Braun), Seringa de vidro (20 mL) (B), fonte de alta tensão (Phywe) (C), detalhe do cone de Taylor formado após aplicação do campo elétrico (D), placa coletora de alumínio (E), deposição das fibras (F), aspecto da membrana formada (G) e microestrutura da membrana formada (H) caracterizada através da microscopia eletrônica de varredura (I). ....	91
Figura 45 - Fluxograma de (DM) - Gromacs 4.0. Adaptado de [148]. ....	95
Figura 46 - Ilustração da distribuição em uma placa de cultura de 96 poços do branco, dos controles e das diluições do extrato de uma amostra em um teste de citotoxicidade. ....	97
Figura 47 - Termográfica (IR) do corpo humano. Adaptado de [148].....	99
Figura 48 - Modos normais de vibração de uma molécula. Adaptado de [149].....	101

Figura 49 - Os tres modos normais de H <sub>2</sub> O $\nu_1 = 3652 \text{ cm}^{-1}$ , $\nu_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$ , $\nu_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$ . Adaptado de [151].	102
Figura 50 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).	103
Figura 51- Níveis de energia eletrônicos e seus estados de transição. Adaptado de [151].	104
Figura 52 - Espectroscopia de UV-Vis.	105
Figura 53 - Ilustra o calorímetro exploratório diferencial do Laboratório de Análise Térmica da UNIFEI.	107
Figura 54 – Equipamento de análise da marca Metler Toledo do laboratório de análise térmica do Laboratório de Biomateriais.	108
Figura 55 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Shimadzu, modelo SS 550.	109
Figura 56- Estrutura mérica de poliéter derivado do poliglicerol. Quando $n=0$ a estrutura resultante é do diglicerol, $n=1$ a estrutura é do triglicerol, $n=2$ a estrutura é do tetraglicerol e assim sucessivamente.	111
Figura 57- Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na síntese do núcleo oligomérico PG: Termopar controlador de temperatura (1), balão tribulado (2), manta de aquecimento (3), sistema Dean-Stark para remoção de água (4), cilindro de nitrogênio (5).	112
Figura 58- Relação entre o porcentual de conversão do glicerol a decaglicerol e o tempo de reação (A) e, dependência da viscosidade dinâmica e a massa molecular dos poligliceróis (B). As medidas de viscosidade dinâmica foram efetuadas em viscosímetro Brookfield a 25 °C utilizando-se spindles LV-3 e LV-4.	113
Figura 59 -Mecanismo de formação de poliéteres do glicerol a partir da catálise ácida. Adaptado de [149].	114
Figura 60- Ilustração da geometria aperfeiçoada dos oligômeros de glicerol no nível PM3: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d), pentaglicerol (e) e hexaglicerol (f).	118
Figura 61- Ilustração da geometria otimizada dos oligômeros de glicerol no nível ZINDO/1: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d), pentaglicerol (e) e hexaglicerol (f).	119
Figura 62- Variação no calor de formação ( $\Delta H_f$ ) para a reação de eterificação do glicerol em função da massa molecular do oligômero sintetizado: (●)PM3 e (○)ZINDO/1.	120

- Figura 63- Densidade eletrônica dos OMF calculados ao nível PM3 para os oligômeros de glicerol estudados nesse trabalho: glicerol (A), diglicerol (B), triglicerol (C), tetraglicerol (D) e hexaglicerol (E). Os átomos em azul claro representam o carbono, em vermelho o oxigênio e em cinza o hidrogênio. .... 123
- Figura 64- Relação entre os orbitais moleculares de fronteira (HOMO-LUMO) e a massa molecular dos oligômeros de glicerol (A) e, relação entre a dureza absoluta e a massa molecular dos oligômeros de poliglicerol (B). .... 124
- Figura 65- Mapas de potencial eletrostático para os oligômeros de poliglicerol construído utilizando PM3: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d) e hexaglicerol (e). .... 125
- Figura 66- Experimento acerca da formação do Cone de Taylor pela ação de um campo elétrico sobre uma gota de 10 mL de água realizado em um ambiente de microgravidade. Fonte [176]. .... 127
- Figura 67- Espectro RMN de próton e carbono do PGL sintetizado nesse trabalho:  $^1\text{H}$ -RMN (A) e  $^{13}\text{C}$ -RMN (B). Os espectros RMN foram obtidos à temperatura ambiente (25°C). .... 128
- Figura 68- Perfil cromatográfico CLAE do PGA (G3) (A) e dependência entre  $t_r$  e o número de geração do PGA (B). .... 129
- Figura 69- Aspecto ótico das membranas de PGA obtidas pela técnica de eletrofição. As membranas estão fixadas em lâminas de vidro para a estabilidade mecânica. .... 130
- Figura 70- Micrografia MEV de membranas do PGA eletrofiado utilizando como núcleo oligomérico o decaglicerol. .... 131
- Figura 71- Micrografia MEV de membranas do PGA eletrofiado utilizando como núcleo oligomérico o tetraglicerol (A) e o hexaglicerol (B). .... 131
- Figura 72- Espectroscopia FTIR de membranas do PGA eletrofiado comparativamente aos oligômeros de glicerol. Em vermelho observa-se o FTIR do PGA após o processo de eletrofição e em azul o FTIR antes da eletrofição. .... 132
- Figura 73 - Curva DSC normalizada da membrana eletrofiada de PGA. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio gasoso. .... 133
- Figura 74- Curva termogravimétrica da membrana eletrofiada de PGA. A análise foi efetuada em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  e velocidade de aquecimento de 10 °C/min, 20 °C/min e 30 °C/min. .... 134

- Figura 75 - Gráfico de Kissinger para a decomposição térmica da membrana de PGA eletrofiada: Primeiro pico referente à primeira etapa de decomposição térmica (■) e, segundo pico correspondente à segunda etapa de decomposição térmica (▲). ..... 137
- Figura 76- Perfil da curva de difusão de solução SBF, pH 7,4 nas membranas de PGA eletrofiadas: 25 °C (○) e a 37 °C (●). ..... 140
- Figura 77-  $\ln(M_t/M_\infty)$  como função de  $\ln(t)$  para a membrana de PGA eletrofiada a 25 °C (○) e 37 °C (●). ..... 141
- Figura 78 - Curva  $\ln(1 - M_t/M_\infty)$  em função de  $t$  para as membranas de PGA eletrofiadas a 25 °C (○) e 37 °C (●). ..... 143
- Figura 79- Valores de módulo de elasticidade,  $E$ , e densidade aparente de reticulação,  $v_e$ , para hidrogéis de PGL. As amostras diferem em quantidades de GMA: 0,25% m/m (1), 0,50% m/m (2), 0,75% m/m (3), 1,0% m/m (4) e 2,0% m/m (5). ..... 145
- Figura 80 - Ilustração da medida de acessibilidade da água à superfície do PGA. A acessibilidade das moléculas de água pode ser medida fazendo "rolar" uma molécula de água "esférica" sobre uma superfície do PGA e somando a área que pode ser acessada por esta molécula em cada unidade métrica do polímero. Adaptado de [197]. ..... 146
- Figura 81- Ilustração da SAS (água) para o PGA, calculado utilizando o GROMACS 4.0. Áreas ( $\text{Å}^2$ ) em vermelho e azul indicam o potencial eletrostático negativo e positivo, respectivamente. ..... 147
- Figura 82 - A medicina do século XXI trabalha com dispositivos complexos oriundos da nanotecnologia a exemplo da pilha de combustível implantável. O nanodispositivo converte a energia mecânica e bioquímica para alimentar outros dispositivos implantados a exemplo dos nanosensores e marca-passos. A biocompatibilidade com o tecido humano é fundamental para o sucesso da aplicação do dispositivo. Adaptado de [199]. ..... 148
- Figura 83- Ensaio de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de PGA (▲) e decaglicerol (●). Os controles positivo e negativo são o fenol a 0,3% (□) e o polietileno de alta densidade (○), respectivamente. ..... 150
- Figura 84- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 aderidas na membrana de PGA eletrofiada após 24 h de cultivo. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas aderidas nas fibras de PGA eletrofiadas. A análise foi efetuada em

- microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro azul com excitação de 450-490 nm. Objetiva: 4X. .... 152
- Figura 85- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 aderidas na membrana de PGA eletrofiada após 24 h de cultivo. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas aderidas nas fibras de PGA eletrofiadas. A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro de excitação FITC-Texas Red. Objetiva: 4X. .... 153
- Figura 86- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 do grupo de controle. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas. A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro de excitação FITC-Texas Red. Objetiva: 4X. .... 154
- Figura 87- Ensaio de proliferação da linhagem de fibroblastos BALB/3T3 na membrana de PGA eletrofiada. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> na presença das membranas e a cada intervalo de tempo de 24h, uma membrana foi retirada para a realização do método de redução de MTT. O crescimento celular apresentou comportamento linear ( $y = 0,00548X - 0,0348/R^2 = 0,9960$ ). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos. .... 155
- Figura 88- Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle referente às células fibroblásticas da linhagem BALB/3T3 utilizadas nesse trabalho. As células foram liofilizadas. .... 157
- Figura 89- Microscopia eletrônica de varredura evidenciando os fibroblastos aderidos nas fibras de PGA eletrofiadas. As membranas de PGA foram liofilizadas. .... 158

## RESUMO

O objetivo geral desta pesquisa foi a produção de arcabouços poliméricos a partir do poliglicerol arborescente, PGA, utilizando a técnica de eletrofição. A membrana de PGA eletrofiada é um produto com grande potencial para utilização na Engenharia de Tecidos Biológicos. O PGA foi sintetizado a partir de um núcleo de decaglicerol através da reação de polieterificação do glicerol na presença de um catalisador básico. A eletrofição do PGA foi realizada a 15 cm de distância da placa coletora, velocidade de fluxo de 0,5 mL/h e uma tensão aplicada de 20 kV. A microscopia de fluorescência e microscopia electrónica de varredura (MEV) revelou que o diâmetro médio e a porosidade das fibras de PGA eletrofiadas foi de aproximadamente  $12,23 \pm 0,91 \mu\text{m}$  e  $73 \pm 5\%$ , respectivamente. As membranas eletrofiadas de PGA exibiram um expoente de difusão com tendências Fickianas para o transporte de fluido corporal simulado. Os dados da análise por DSC indicou que as membranas eletrofiadas de PGA possuem características de polímero amorfo. O arcabouço de PGA eletrofiado foi biocompatível e sustentou a adesão e o crescimento de células de fibroblastos. Estudos *in vitro* de cultura celular de fibroblastos indicaram que os arcabouços de PGA eletrofiado promoveram a adesão celular e o mais importante, promoveram o crescimento celular. As características biológicas e físico-químicas dos arcabouços eletrofiados de PGA indicam sua adequação para utilização na engenharia de tecidos biológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Poliglicerol arborescente, Engenharia de Tecidos, Células de fibroblasto, Arcabouço.

## ABSTRACT

The overall goal of this research was to produce porous polymeric scaffolds with arborescent polyglycerol, PGA, by electrospinning technique. The electrospun PGA membranes have a great potential for applications in Tissue Engineering. The PGA was synthesized from a decaglycerol core through the polyetherification of glycerol in the presence of basic catalyst. The PGA electrospinning was conducted with a fixed plate distance of 15cm, flow rate of 0,5 mL/h and an applied voltage of 20 kV. The optical fluorescence microscopy and scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that the average diameter and porosity of the electrospun PGA membranes were approximately  $12.23 \pm 0.91 \mu\text{m}$  and  $73 \pm 5\%$ , respectively. The electrospun PGA scaffolds showed diffusion exponent with Fickian trends in relationship to their permeability for simulated body fluid transport. DSC data indicate that electrospun PGA membranes have lower crystallinity degree with characteristics of amorphous polymer. The PGA electrospun scaffold exhibits biocompatible property and supports the adhesion and growth of fibroblast cells. The in vitro culture studies of fibroblast cells revealed that electrospun PGA scaffolds promoted cell spreading during the initial stage of cell attachment and, more importantly, promote the cell growth rate. In vitro cell infiltration studies showed that the electrospun PGA effectively support the fibroblast migration into the microfibrinous scaffolds. The physicochemical and biological characteristics of electrospun PGA membranes make it suitable for tissue engineering applications.

**KEYWORDS:** Arborescent polyglycerol, tissue engineering, fibroblast cells, Scaffold.

# 1

## ASPECTOS GERAIS DA TESE

A presente Tese incide sobre a síntese e caracterização de membranas eletrofiadas de poliglicerol arborescente para utilização na Engenharia de Tecidos Biológicos. O capítulo que se segue é dedicado a apresentar os avanços obtidos na Engenharia de Tecidos Biológicos e sua relevância para a medicina regenerativa ambientando o leitor ao contexto do trabalho. O capítulo contém exemplos de algumas aplicações dos materiais sintéticos na Engenharia de Tecidos Biológicos e fornece as motivações contextuais que levaram o autor a conduzir o trabalho. Ao final são apresentados os objetivos e a estrutura da Tese.

Introdução

A Engenharia de Tecidos Biológicos

O emprego da eletrofição para a obtenção de arcabouços moleculares poliméricos

Objetivos

Objetivo Geral

Objetivos Específicos

Estrutura da Tese

## 1.1 Introdução

A Engenharia de Tecidos Biológicos (ETB) é um campo multidisciplinar que aplica os fundamentos das Ciências da natureza (Física, Química e Biologia) e das Engenharias para a obtenção de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um dado tecido biológico enfermo. O fator que rege a eficiência da produção de um tecido biológico sintético biofuncional é o entendimento exato da relação quantitativa entre a estrutura química do material e a influência de suas propriedades biológicas na restauração do tecido biológico e /ou órgão.

Um dos pilares fundamentais da ETB são os arcabouços moleculares que, obtidos a partir de materiais sintéticos, pode ser colonizado por células biológicas e posteriormente implantado na região lesionada para sua reparação. Tais materiais devem propiciar uma melhora significativa do processo de reparação natural que, constantemente produz cicatrizes não funcionais ou pobremente funcionais em lugar de um tecido normal.

Muitos tecidos biológicos se apresentam não somente como uma “coleção” de células distribuídas aleatoriamente, mas também possuem características de organização altamente detalhadas às quais estão relacionadas à sua função biológica. O papel da ETB é reconhecer a arquitetura do tecido biológico e projetar o arcabouço molecular de tal forma que ele proporcione os meios biológicos, químicos e mecânicos adequados para o processo de regeneração celular.

De modo geral os arcabouços moleculares devem ser projetados de acordo com o tecido biológico ou órgão a que se destinam. Assim, arcabouços moleculares porosos permitirão uma colonização celular e crescimento em seu interior. Mudanças no arcabouço molecular a nível microestrutural poderá levar a um aumento de porosidade ou do espaço entre eles o qual levará à uma maior orientação no crescimento celular. Por outro lado, as propriedades de superfície podem ser projetadas para facilitar a adesão e proliferação celular de modo seletivo.

Atualmente uma grande ênfase tem sido dada ao projeto de arcabouços moleculares biodegradáveis. Nesse caso o arcabouço é perfeitamente integrado ao tecido hospedeiro e após um intervalo de tempo apropriado é absorvido pelo organismo do

paciente. A biodegradabilidade permite a substituição gradual e ordenada do arcabouço molecular pelo tecido biológico funcional, prevenindo ao mesmo tempo as respostas adversas ao arcabouço sintético.

Devido à grande variedade de tecidos biológicos no organismo humano, dificilmente um único tipo de material, seja polímero, metal ou cerâmica, poderá satisfazer a todas as exigências da ETB. A seção a seguir expõe os fundamentos básicos da ETB que normalmente auxiliam no projeto de arcabouços moleculares sintéticos adequados para os processos de adesão, crescimento e proliferação celular.

## 1.2 A Engenharia de Tecidos Biológicos

A ETB surgiu há aproximadamente três décadas como uma abordagem alternativa para a reconstrução de tecidos ou órgãos danificados por traumas físicos ou doenças a exemplo do câncer, anomalias congênitas e traumas onde as terapias clínicas convencionais não apresentam eficiência na recuperação de cicatrizes ou queimaduras ou adequada velocidade de regeneração do órgão [1].

Nas últimas quatro décadas, a ETB sofreu um grande avanço causado em grande parte pela multidisciplinaridade atingida entre as ciências da natureza (biologia, química, física) e a tecnologia, particularmente a engenharia de materiais. Aliada às ciências da natureza, a tecnologia tem levado a profundas transformações na medicina do século XXI [2]. Atualmente, arcabouços moleculares que atuam como suporte para o cultivo de células já estão disponíveis no mercado para suas aplicações clínicas [3-4].

O conceito básico da ETB consiste na retirada de células do paciente seguida de sua semeadura em arcabouços sintéticos (poliméricos, cerâmicos) e posterior implantação no próprio paciente [4]. O projeto dos arcabouços sintéticos está fundamentado nos conhecimentos das áreas de ciência e engenharia de materiais, biológica e médica. Após a semeadura celular, deve ocorrer a expansão *in vitro* de células viáveis do paciente doador sobre os suportes sintéticos bioreabsorvíveis. Dessa maneira, o suporte degrada enquanto um novo órgão ou tecido é formado [5]. Portanto, o objetivo específico da ETB é criar novos tecidos/órgãos combinando a tríade arcabouços moleculares, células biológicas e fatores de crescimento. A Figura 1, ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica ETB.

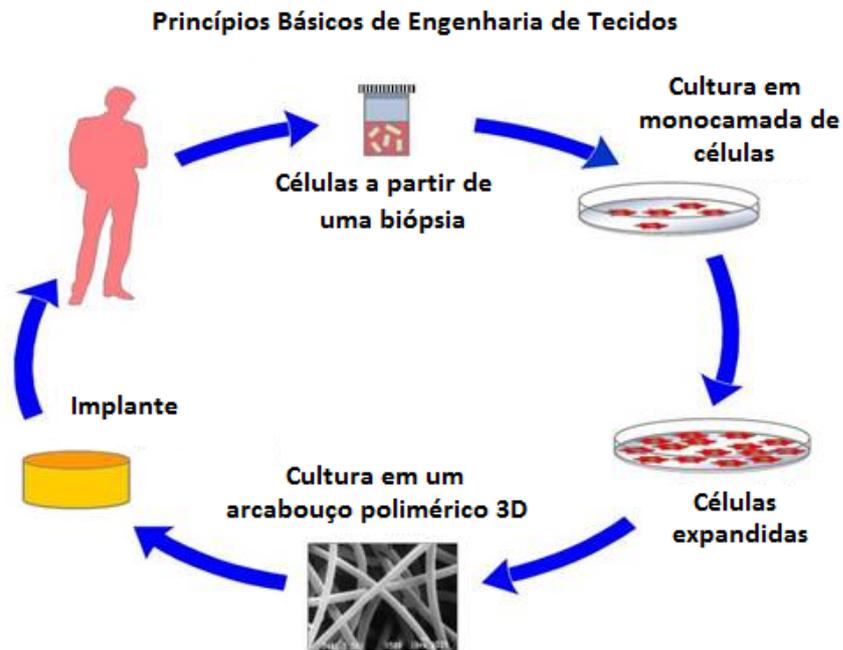


Figura 1 - Princípios básicos da Engenharia de Tecidos Biológicos. Adaptado de [1].

A ETB busca em sua essência superar as limitações dos tratamentos convencionais tais como o transplante de órgãos (enxertos aloplásticos/xenoplásticos) [6-7] havendo uma grande ênfase nas pesquisas objetivando a produção de órgãos ou tecidos sintéticos imunologicamente tolerantes. Esta estratégia forneceria uma solução permanente para órgãos ou tecidos danificados sem a necessidade de terapias adicionais que suprimem a atuação do sistema imunológico frente ao órgão "estranho" [8]. Ao mesmo tempo, a produção de órgãos ou tecidos pela ETB reduziria drasticamente os problemas associados ao transplante do próprio paciente, doador compatível ou mesmo a falta de doadores e os riscos associados à transmissão de doenças.

Atualmente uma das técnicas mais promissoras em desenvolvimento na ETB é a utilização de arcabouços moleculares biodegradáveis obtidos através da técnica de eletrofiação que promovem a adesão celular e suportam o crescimento, proliferação e diferenciação celular com o objetivo específico de regenerar de forma controlada o tecido danificado. Para que esta regeneração aconteça, os arcabouços moleculares têm que cumprir determinados requisitos relacionados ao material sintético utilizado. Desta maneira, a porosidade, as propriedades da superfície e mecânicas tais como a força

compressão, resistência à fadiga, módulo de elasticidade, velocidade adequada de degradação e biocompatibilidade são descritores importantes para a obtenção de arcabouços moleculares adequados para crescimento e proliferação celular [9]. Tais propriedades favorecem a integração do tecido/órgão artificial com o tecido biológico e seu microambiente, vascularização e a baixa ativação do sistema imunológico [7-9].

As técnicas usadas na fabricação de arcabouços moleculares dependem essencialmente das propriedades do material e do tipo de sua aplicação final. Os arcabouços moleculares podem ser fabricados a partir de polímeros, metais, cerâmicas ou compósitos. A utilização de um dado material dependerá essencialmente do tipo de tecido biológico a ser tratado ou a ser substituído. No caso dos tecidos moles como a pele, tendão, ligamentos, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, músculo, cartilagem entre outros os arcabouços moleculares são fabricados principalmente a partir de polímeros sintéticos e biopolímeros.

A função primária de um arcabouço molecular é a de permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular. Ao mesmo tempo deve prover um ambiente no qual as células possam manter seu fenótipo e também a síntese de proteínas e demais biomoléculas necessárias para seu crescimento/diferenciação.

A fabricação de arcabouços para a ETB pode-se dividir basicamente em dois métodos, convencional e prototipagem rápida (PR). Os métodos convencionais incluem as técnicas de formação de espumas, liofilização, lixiviação, separação de fase e eletrofição. De modo geral tais técnicas não permitem um controle rigoroso da arquitetura interna do arcabouço molecular e não é possível se ter um controle preciso de sua porosidade.

Os métodos PR apareceram mais recentemente e ainda estão numa fase inicial de desenvolvimento. Entre as técnicas de prototipagem rápida encontram-se a impressão tridimensional (3D), a estereolitografia, a sinterização laser e a extrusão multimaterial. Estas técnicas são muito promissoras devido à sua versatilidade e rapidez de processo que permitem fabricação de arcabouços moleculares de geometria complexa e com maior controle da arquitetura interna e porosidade do material [10-11]. Entretanto, o custo das técnicas de PR ainda é significativamente elevado, principalmente das matérias primas, equipamentos, modelos e softwares. Adicionalmente, muitas vezes a rugosidade da peça

obtida é muito elevada para os padrões da ETB, podendo ativar eventos biológicos danosos ao paciente a exemplo da trombogenicidade superficial do material [12].

As características básicas de um arcabouço molecular ideal são sua alta porosidade, máxima área superficial, propriedade mecânica adequada, estrutura tridimensional e biodegradabilidade. Ao mesmo tempo deve direcionar o crescimento celular dos tecidos adjacentes e das células semeadas em sua superfície. Para isso o material deve prover uma adequada adesão celular e, em certos casos, deve favorecer também a migração das células.

A estrutura porosa provê ao arcabouço molecular duas funções críticas. Primeiro, os canais dos poros provê a porta de entrada para a migração celular por capilaridade. Em segundo lugar, a existência de poros maximiza a área superficial do material para a interação de numerosas células específicas.

Existem muitos materiais biocompatíveis que podem ser utilizados para a obtenção de arcabouços moleculares. Dentre estes, devido às suas propriedades de processamento e variabilidade molecular, os polímeros ocupam um lugar de destaque. Os polímeros podem ser obtidos em um grande leque de composições químicas e propriedades mecânicas adequadas para a área da ETB. Os polímeros biodegradáveis proporcionam a obtenção de arcabouços moleculares biodegradáveis. Nesse caso, proporcionam uma base de sustentação para as células biológicas semeadas até que essas sejam capazes de secretar sua própria matriz extracelular.

Atualmente a ETB é utilizada com sucesso em muitas áreas da medicina regenerativa destacando-se o tratamento de vítimas de queimaduras, em que é feita a colheita e crescimento de amostras de pele seguida do transplante para o paciente para reparar as áreas danificadas pelas queimaduras. Outras áreas da medicina regenerativa que se encontra em constante desenvolvimento na ETB são (Figura 2) a ortopédica (reparação ou substituição de cartilagens, tecido ósseo e ligamentos), vascular (construção das paredes de vasos sanguíneos), pulmonar (construção de estruturas bronquiais, a exemplo de veias do tórax), oftalmológicas (reconstrução da córnea). Uma meta ambiciosa, mas não impossível com os recursos atuais da ETB e biotecnologia, é a construção de órgãos novos incluindo coração, pâncreas, fígado e bexiga.

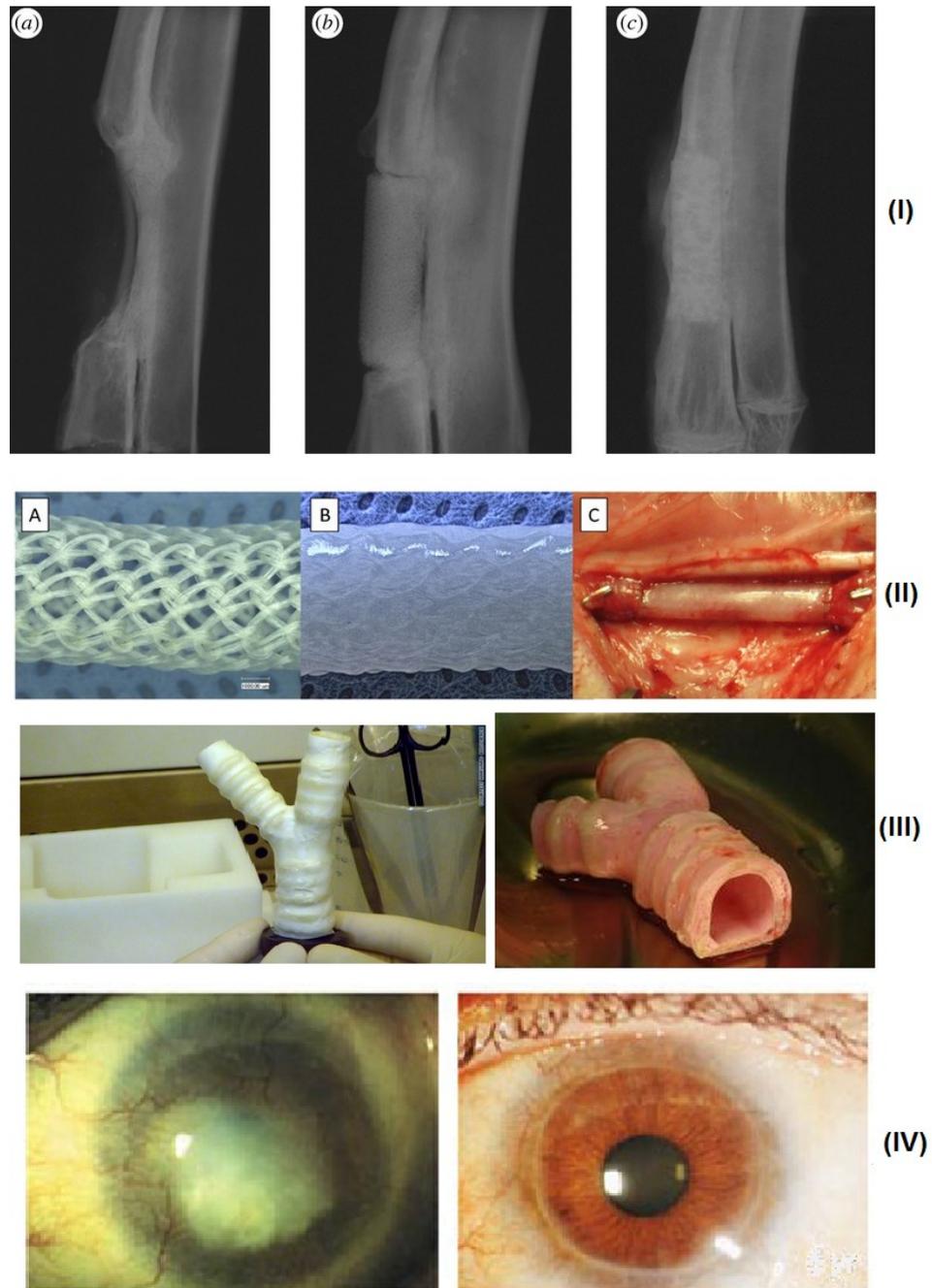


Figura 2- Ilustração de algumas aplicações ETB já em fase clínica. (I) restauração óssea utilizando a biocerâmica de hidroxiapatita. Observa-se na seqüência a falha óssea (a), inserção da biocerâmica (b) e integração da biocerâmica com o tecido ósseo (c). (II) O enxerto cardiovascular macroporoso fabricado a partir do polímero PLLA (A) é embebido em fibrina (B) é implantado na artéria de animal (C). (III) Traquéia produzida integralmente a partir de técnicas da ETB. (IV) Córnea de paciente danificada (esquerda) e regenerada por técnica da ETB (direita). Adaptado de [13-14].

A utilização de arcabouços moleculares porosos na ETB parece ter evoluído inicialmente a partir das idéias de Voorhees [15] e Wesolewski [16], que comprovaram a

eficiência de próteses cardiovasculares porosas na reconstrução ventricular relativamente às próteses cardiovasculares com ausência ou baixa distribuição de poros.

Devido ao seu baixo custo e relativa simplicidade a técnica de processamento de polímeros através da eletrofiação é muito promissora para a obtenção de arcabouços moleculares para a ETB devido ao seu baixo custo além de permitir a obtenção de arcabouços moleculares de elevado cociente área/volume de porosidade e de superfície similares morfológicamente à matriz extracelular biológica [17].

### 1.3 O emprego da eletrofiação para a obtenção de arcabouços moleculares poliméricos

A utilização da técnica de eletrofiação de polímeros (EFP) para a obtenção de arcabouços moleculares é uma técnica bem difundida na ETB. A técnica EFP é uma extrusão exercida por forças eletrostáticas de um polímero em solução ou no seu estado de fusão, resultando em fios poliméricos eletricamente carregados que após serem depositados em uma placa coletora formam uma rede ou malha porosa de micro ou nanofibras [18]. A Figura 3 ilustra a técnica de eletrofiação.

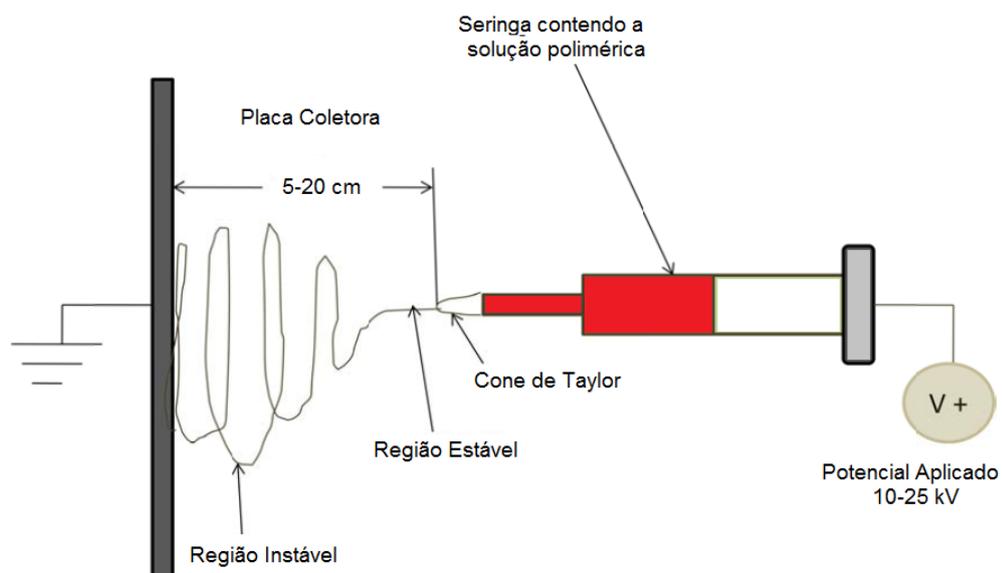


Figura 3- Ilustração da técnica de eletrofiação. O polímero está dissolvido em seu solvente ideal.

O equipamento de eletrofiação consiste basicamente de quatro partes: uma bomba infusora constituída por uma seringa com a finalidade de controlar o fluxo da solução polimérica, uma agulha de aço que atua como eletrodo, uma fonte de tensão para gerar o campo elétrico e uma placa coletora, normalmente de alumínio, que atua como contra-eletrodo para o depósito das fibras poliméricas. Sob a ação de um campo elétrico de baixa intensidade, a gota pendente da solução polimérica é estabilizada pela tensão superficial da solução. A medida que a diferença de potencial aumenta, as cargas eletrostática distribuídas na solução do polímero levam a uma distorção na geometria da gota e esta adquire uma forma cônica, conhecida como cone de Taylor. A formação do cone se deve às forças opostas, tensão superficial e força eletrostática, distribuídas na gota da solução polimérica. À uma tensão crítica, as forças eletrostáticas vencem a tensão superficial e um fio da solução polimérica emerge do cone e se deposita na placa coletora, conforme é ilustrado na Figura 3.

A técnica de eletrofiação possui como variáveis dependentes os parâmetros da solução polimérica (concentração, constante dielétrica do solvente), parâmetros de processo (velocidade de fluxo, tensão aplicada, distância entre a agulha e a placa coletora) e também da temperatura e umidade relativa da câmara onde se realiza o processo [19-20].

O objetivo desta Tese envolve a obtenção de arcabouços moleculares porosos baseados no polímero poliglicerol arborescente (PGA) utilizando a técnica de eletrofiação, buscando desenvolver um campo de aplicação na área de tecidos moles da ETB. A estrutura do PGA é ilustrada na Figura 4.

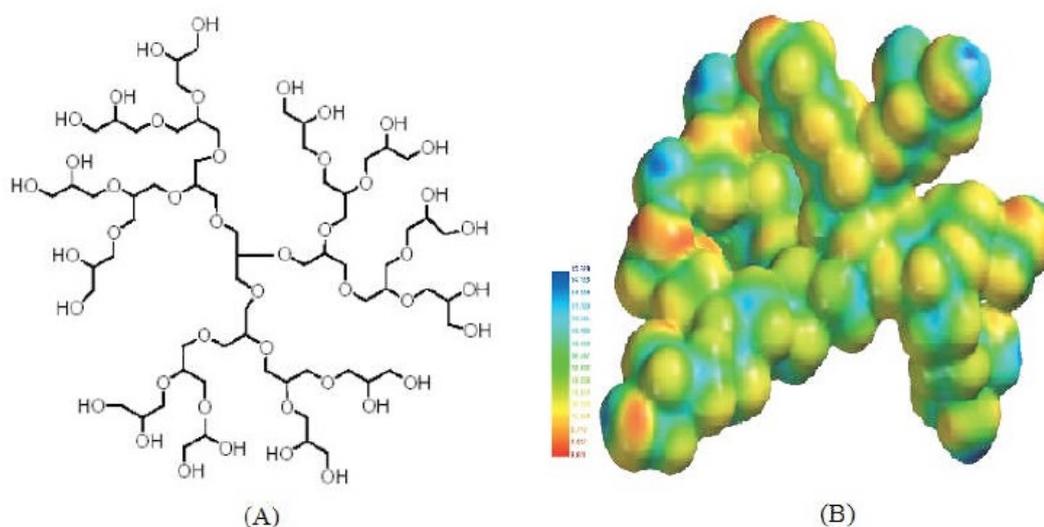


Figura 4- Ilustração da estrutura química (A) e simulação computacional (B) do PGA. Em (B), a cor vermelha indica deficiência de elétrons e a cor azul excesso de elétrons.

O PGA é um polímero solúvel em água, o que dispensa a utilização de solventes tornando possível, assim, se desenvolverem rotas de síntese de arcabouços moleculares porosos através da técnica de eletrofiação utilizando a química verde (*green chemistry*). Ao mesmo tempo, a eliminação de solventes orgânicos contribui para que o arcabouço molecular obtido mantenha as características biocompatíveis do PGA.

O PGA tem sido intensamente estudado em nossos laboratórios na UNIFEI há cerca de uma década, devido às suas promissoras aplicações como sistemas transportadores de princípios bioativos, podendo ser obtidos a partir da rota de síntese química do glicerol, particularmente interessante para o Brasil, o maior produtor de glicerina como subproduto da síntese do biodiesel do mundo [21-22].

A aplicação do PGA na obtenção de arcabouços moleculares porosos para a ETB utilizando a técnica de eletrofiação não tem sido abordado pela literatura até o presente momento. Observa-se portanto, uma lacuna de conhecimentos sobre a utilização de arcabouços moleculares baseados no PGA para a ETB, particularmente voltada para a regeneração de tecidos moles a exemplo do tecido cardíaco infartado.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo principal investigar a aplicabilidade de um políglicerol arborescente (PGA) na obtenção de um arcabouço molecular macroporoso com potencial aplicação na Engenharia de Tecidos Biológicos. As características físico-químicas do PGA levaram à escolha da técnica de eletrofição para a obtenção do arcabouço molecular. O arcabouço de PGA eletrofiado foi investigado quanto à sua capacidade de interação com fibroblastos.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Aperfeiçoar o processo de eletrofição para a obtenção de arcabouços moleculares baseados no PGA.
- Caracterizar o arcabouço de PGA através das técnicas de intumescimento e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar as propriedades biocompatíveis do arcabouço de PGA através do ensaio de citotoxicidade.
- Avaliar o processo de adesão e proliferação de fibroblastos no arcabouço de PGA utilizando as técnicas MEV e microscopia de fluorescência (MF).

## **1.5 Estrutura da Tese**

Esta Tese está dividida em cinco capítulos, sendo que, neste capítulo foi apresentado a pesquisa resgatando as motivações para a realização desse estudo. Em seguida, são apresentadas algumas considerações sobre a temática escolhida, bem como são apresentados os objetivos e as questões norteadoras da presente pesquisa.

No segundo capítulo, é apresentada a revisão da literatura a respeito dos principais polímeros utilizados na fabricação de arcabouços moleculares para a ETB. Conceitos importantes como bioreabsorção e biodegradabilidade. As principais técnicas utilizadas na obtenção de arcabouços moleculares porosos, as possibilidades de aplicação e limitações de cada técnica também são discutidas neste capítulo.

No terceiro capítulo, apresenta-se a metodologia da pesquisa. É apresentada a rota de síntese do PGA e o processo de eletrofição para a obtenção de arcabouços moleculares para a ETB. Também são apresentadas as técnicas de caracterização físico-química e biológica do arcabouço de PGA eletrofiado.

O quarto capítulo, é dedicado à apresentação dos resultados obtidos e sua análise quanto ao processo de síntese do PGA e sua eletrofição. São examinados os resultados das caracterizações físico-químicas e biológicas e o processo de adesão e proliferação de células fibroblásticas nas membranas eletrofiadas obtidas utilizando-se as técnicas de microscopia fluorescente e eletrônica de varredura.

Por fim, no quinto capítulo, como considerações finais, são apresentadas as principais conclusões deste estudo e as implicações para futuras pesquisas.

# 2

## REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo a literatura relacionada com o tema desta Tese é revista, procurando analisar os diversos estudos empíricos, os diferentes tipos de metodologia empregados para a obtenção de arcabouços poliméricos e os resultados alcançados. É igualmente propósito deste capítulo efetuar uma retrospectiva dos fatos mais relevantes do passado que contribuíram para a Engenharia de Tecidos Biológicos contemporânea, destacando-se o processo de eletrofiação. A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de arcabouços moleculares baseados no poliglicerol arborescente e que utilizam a rota de síntese a partir do glicerol também é apresentado.

A utilização de polímeros para a obtenção de arcabouços moleculares

Propriedades físico-químicas e biológicas de arcabouços moleculares

Aplicação de hidrogéis na engenharia de tecidos biológicos

Características físico-químicas do hidrogéis de PGA

Fluído Supercrítico

Prototipagem Rápida

Eletrofiação

Limitações da utilização dos arcabouços moleculares na ETB

Modelagem *in silico* do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA

## 2.1 A utilização de polímeros para a obtenção de arcabouços moleculares

Atualmente, existe uma ampla variedade de família de polímeros utilizados na fabricação de arcabouços para a semeadura de células biológicas. A característica principal desses materiais é sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de bioreabsorção [23].

Considerando a estrutura da matriz polimérica, uma série de abordagens podem ser utilizadas na ETB, envolvendo desde a utilização de um polímero biodegradável, a exemplo de poli(L-ácido láctico) (PLLA) ou mesmo de polissacarídeos a exemplo do amido [24-25]. A Figura 5 ilustra as estruturas do PLLA e do amido, utilizados na ETB.

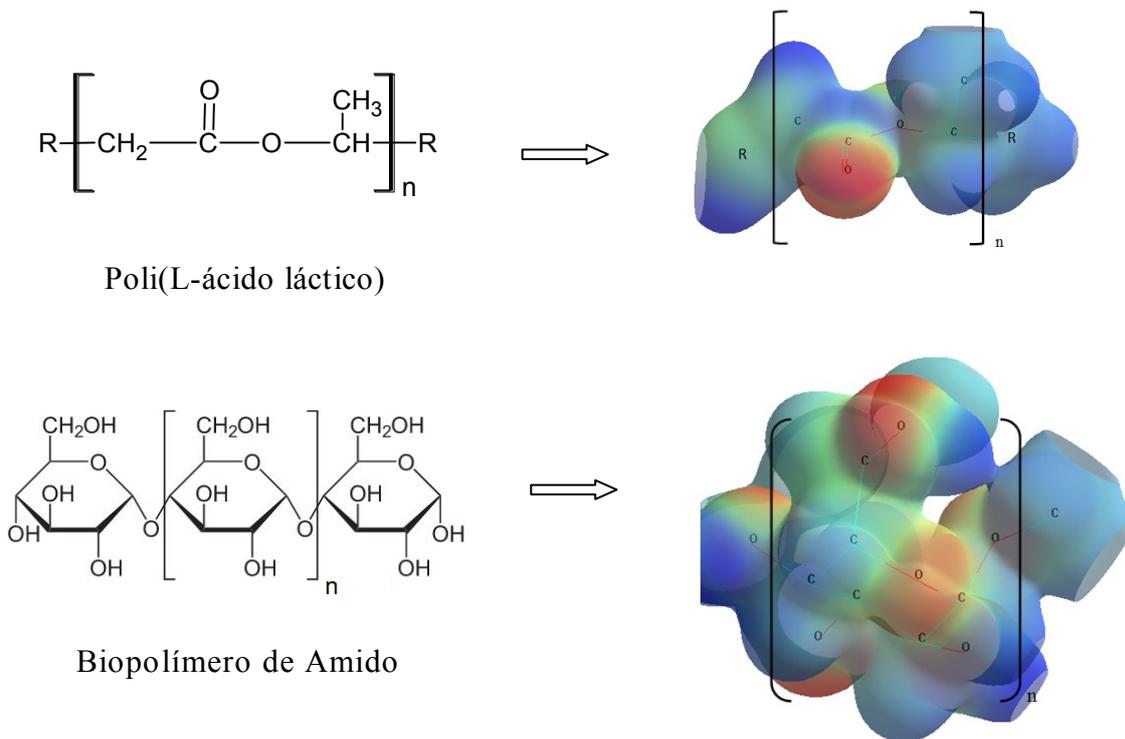


Figura 5 - Ilustração de estrutura química com o mapa eletrostático (Software -HyperChem) do PLLA e do biopolímero de amido, dois polímeros amplamente utilizados na obtenção de arcabouços moleculares.

Os polímeros podem ser classificados como naturais (biopolímeros) e sintéticos. Com relação a seu comportamento no fluido fisiológico podem ser classificados em absorvíveis ou não absorvíveis [26].

Os polímeros naturais, a exemplo do colágeno (Figura 6) são possuidores de propriedades biológicas específicas como matriz de sustentação de nanocristais de hidroxiapatita, contudo apresentam as desvantagens inerentes dos materiais alógenos e exógenos (disponibilidade, segurança e variações físico-químicas entre os lotes produzidos) [27].

Para sua aplicação na ETB, os polímeros sintéticos devem ser necessariamente biocompatíveis, biodegradáveis ou bioreabsorvíveis [28].

A utilização de materiais bioreabsorvíveis ou biodegradáveis possuem como principal vantagem a eliminação de cirurgias para sua remoção posteriormente ao processo de cicatrização e formação do novo tecido biológico [29-30].

Os polímeros sintéticos a exemplo dos poliésteres alifáticos poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(ácido glicólico) (PAG), poli(1-ácido láctico) (PLLA) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) são os polímeros biodegradáveis mais comumente usados para a fabricação de arcabouços moleculares. Esses materiais já são utilizados para aplicações clínicas, aprovados pelo FDA (“Food and Drug Administration” – EUA) e estão disponíveis no mercado nacional para diversas aplicações na regeneração do tecido ósseo [31]. A Figura 6 ilustra as estruturas químicas de alguns dos polímeros biodegradáveis/bioreabsorvíveis mais utilizados na ETB.

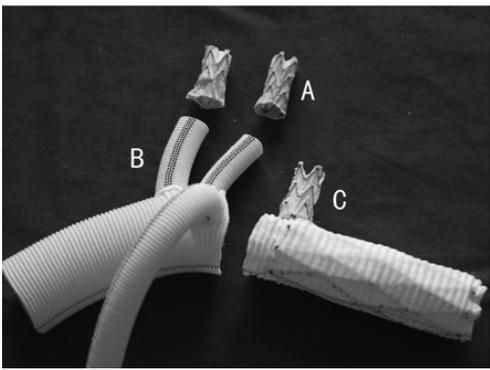
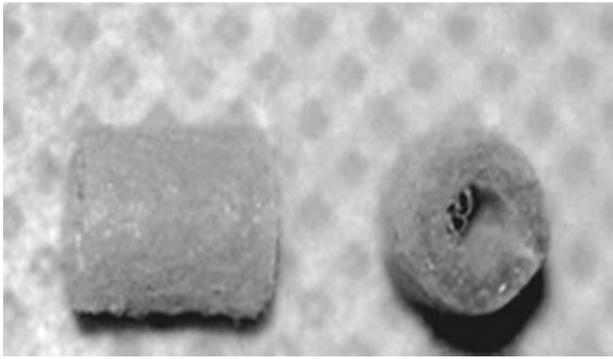
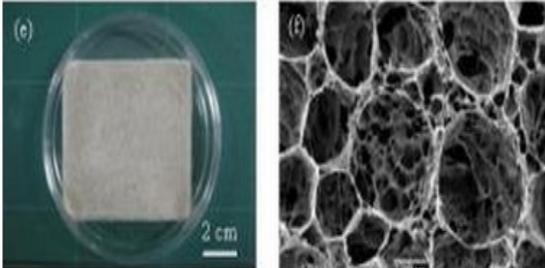
	
$\left[ \text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-O-C(=O)-C}_6\text{H}_4\text{-C(=O)-} \right]_n$ <p style="text-align: center;">Dacron-PET</p>	$\left[ \text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-} \right]_n$ <p style="text-align: center;">PAG</p>
	
$\left[ \text{-O-CH(CH}_3\text{)-C(=O)-} \right]_n$ <p style="text-align: center;">PLLA</p>	$\left[ \text{-C(=O)-O-(CH}_2\text{)}_6\text{-} \right]_n$ <p style="text-align: center;">PCL</p>

Figura 6- Ilustração das estruturas químicas e aplicações clínicas de alguns polímeros reabsorvíveis: Dacron®-PET é utilizado na fabricação de vários tipos de stents, PGA é utilizado na fabricação de tubos para a reconstrução de veias e artérias, PLLA é utilizado como enxerto de falhas ósseas e o PCL a é muito utilizado na fabricação de traquéias artificiais. Adaptado de [32-33].

Os polímeros PLLA, PET e PCL são polímeros de condensação pertencentes à família dos poliésteres alifáticos biodegradáveis, por possuírem carbonilas que atuam como nucleofílico que sofrem hidrólise no meio fisiológico catalisado pela água, um agente eletrofílico.

No caso da hidrólise da ligação éster ser catalisada por meio da ação de enzimas, a cadeia polimérica deve se ajustar aos sítios ativos das enzimas. Tal fato é favorecido pela flexibilidade das cadeias poliméricas alifáticas, o que não ocorre com os poliésteres aromáticos que proporcionam elevado impedimento estérico que inviabilizam a reação hidrolítica do material [34].

Os polímeros PLLA, PGA e PCL são os poliésteres mais utilizados na fabricação de suturas absorvíveis e possuem como grande vantagem a sua biodegradabilidade por hidrólise simples da cadeia do éster em meio aquoso, ou seja, na presença dos fluidos corporais. O polímero PCL tem sido atualmente um dos polímeros mais utilizados na fabricação de matriz para a liberação controlada de fármacos. Sua biodegradação ocorre particularmente através da hidrólise da ligação éster pelas enzimas presentes nos fluidos biológicos [35]. A Figura 7 ilustra a degradação dos poliésteres alifáticos sintéticos em meio aquoso [36].

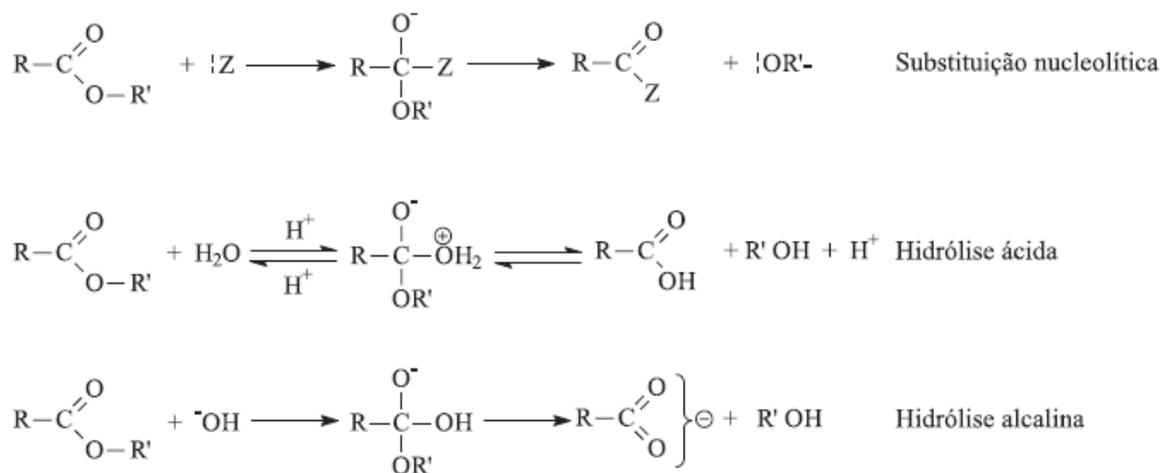


Figura 7- Ilustração de degradação de poliésteres alifáticos sintéticos. Adaptado de [37].

Outros polímeros de origem natural a exemplo da seda também tem sido utilizados como suportes para o crescimento de vários tipos de tecidos biológicos [38]. O biopolímero seda é sintetizado pelo bicho-da-seda da espécie *Bombyxmori* sendo constituído pelas proteínas sericina e fibroína. A fibroína é uma proteína estrutural das fibras de seda composta principalmente pelos aminoácidos glicina, alanina, tirosina e serina. A fibroína de seda é um polímero natural que apresenta grande potencial para

aplicação como biomaterial devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, mínima reação inflamatória e propriedades mecânicas adequadas, além de alta permeabilidade para oxigênio e vapor d'água.

Recentemente nossa atenção tem se voltado para a aplicação de PGA para a obtenção de arcabouços para a ETB [39-40]. Os PGA(s) tem sua origem na reação de polieterificação da glicerina, um monômero de origem natural, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis [41]. O PGA pertence à família dos poliéteres com elevada densidade de grupos hidroxila em sua periferia (Figura 8). Sua estrutura química primária é muito similar aos polímeros poli(álcool vinílico) (PVOH) e poli(etileno glicol) (PEG), tradicionalmente utilizados na indústria farmacêutica para a fabricação de sistemas transportadores de fármacos ou curativos para o tratamento de feridas. A Figura 8 ilustra comparativamente as estruturas químicas do PVOH, PEG e PGA.

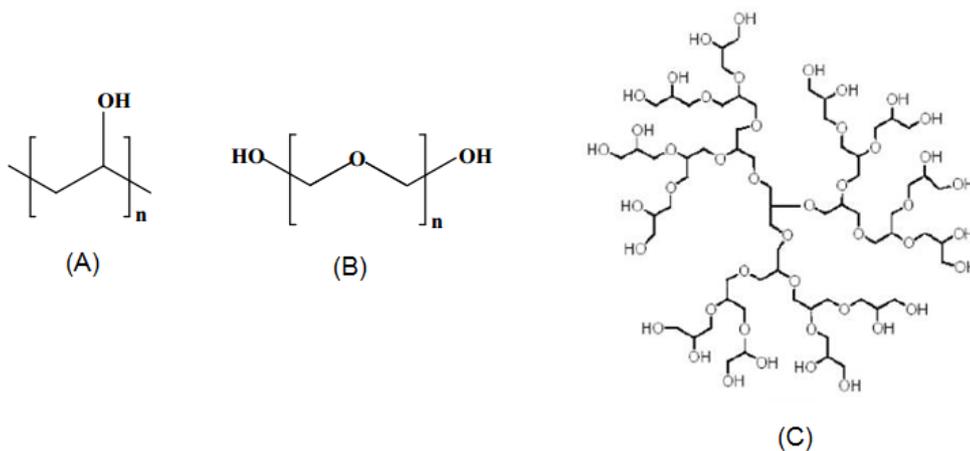


Figura 8 - Ilustração das estruturas químicas do PVOH (A), PEG (B) e PGA (C). Adaptado de [42].

Com o objetivo de se produzir PGA capazes de atuarem como arcabouços moleculares para a engenharia de tecidos biológicos, este trabalho apresenta os resultados teóricos e experimentais sobre a síntese de hidrogéis de PGA, utilizando-se um núcleo oligomérico de glicerol como precursor da rede polimérica.

Na reação de polimerização, as unidades de glicerol sofrem condensação através dos grupos hidroxilas, formando éteres, que podem ter cadeias carbônicas de massa molecular variada, dependendo das condições reacionais [42]. A Figura 9 ilustra as possibilidades de

condensação do glicerol para a obtenção de seus núcleos oligoméricos lineares (diglicerol, triglicerol, tetraglicerol, pentaglicerol e hexaglicerol) [43].

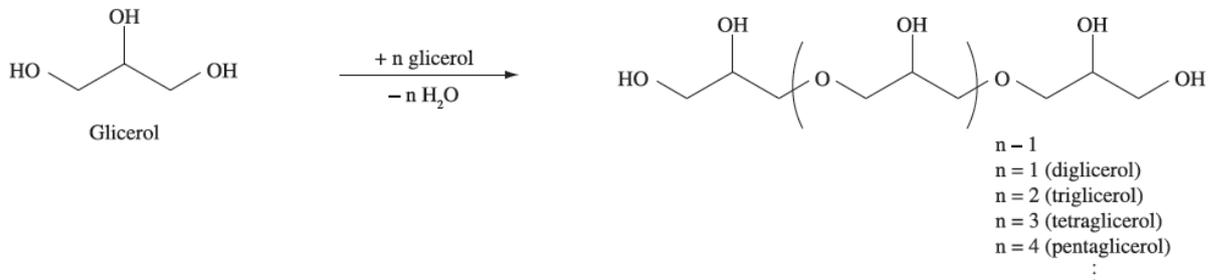


Figura 9 - Ilustração do mecanismo de condensação do glicerol para a produção de seus oligômeros. Adaptado de [44].

## 2.2 Propriedades físico-químicas e biológicas de arcabouços moleculares

A principal função de um arcabouço molecular é atuar temporariamente como suporte, facilitando e guiando o crescimento celular até a completa regeneração do tecido biológico. Para alcançar esse objetivo é necessário que o arcabouço mantenha a morfologia e as propriedades mecânicas adequadas ao longo de todo o processo regenerativo [45].

Um arcabouço molecular adequado para ETB deve atuar como um modelo tridimensional para o crescimento *in vitro* e *in vivo* da célula biológica. Para alcançar esse objetivo o arcabouço deve consistir de uma rede de poros interconectados em escala micrométrica e/ou macrométrica de forma a permitir o transporte de nutrientes através dos poros, migração celular, adequada vascularização e conseqüentemente o crescimento tecidual no local [46].

A biocompatibilidade de um dado arcabouço polimérico é uma característica fundamental, pois garante que o material é seguro para uso *in vivo*, não induzindo respostas inflamatórias. Como o material implantado no corpo humano deve permanecer ali por um determinado tempo, os subprodutos originados de sua interação com o meio celular não devem produzir qualquer efeito nocivo ao corpo. Para tanto, um requisito básico é que seja degradado naturalmente ao longo do tempo e absorvido pelo corpo sem gerar efeitos

colaterais. Esse processo permite que o organismo recupere sua funcionalidade gradualmente evitando sequelas.

Com relação aos fenômenos degradação e absorção, entende-se que o material deve se decompor naturalmente, mas seus subprodutos devem ser excretados por intermédio de alguma via metabólica normal ao organismo, sem que haja o acúmulo ou biodistribuição em algum órgão do corpo humano [47]. A biodegradabilidade dos arcabouços é necessária para que se permita que a matriz extracelular ocupe o espaço vazio enquanto o material é degradado. A hidrólise e a degradação enzimática mediada principalmente pelas enzimas circulantes no organismo biológico são as duas formas básicas de degradação de um arcabouço polimérico biodegradável implantável [48].

Também deve ser considerado que as dimensões dos poros exercem uma influência importante nas propriedades biológicas do arcabouço molecular. O arcabouço deve não somente possuir uma estrutura porosa para que possa difundir nutrientes e permitir a eliminação de resíduos, mas também devem apresentar interconectividade para favorecer a difusão celular bem como viabilizar as atividades metabólicas da célula [49]. Para a regeneração óssea os tamanhos de poros variam entre 100 e 440 $\mu\text{m}$  [50]. No caso de arcabouços com finalidade de liberação de fármacos, as dimensões dos poros variam entre 150 e 200  $\mu\text{m}$  [45].

Uma vez que ao final do processo de regeneração celular, toda a carga suportada pelo arcabouço será transferida para o tecido regenerado, as propriedades mecânicas do arcabouço devem ser similares ao tecido neoformado. Nesse caso, a velocidade de degradação do arcabouço deve ser compatível com a formação do novo tecido, que ocupará o local do arcabouço após sua biodegradação [49].

A interação entre o tecido biológico e o arcabouço molecular sintético está intrinsecamente ligado à energia livre da adesão celular e exercerá influencia significativa nas respostas subséquentes na capacidade das células em se proliferarem e diferenciarem após contato com o implante [45].

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos distintos. Em um primeiro fenômeno a fase de adesão ocorre rapidamente, envolvendo eventos como interações coulombiana e de van der Waals entre as células e o arcabouço. Posteriormente poderá haver a adsorção de moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de

membrana celular e do citoesqueleto que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal celular promovendo assim a ação de fatores de transcrição e regulação da expressão gênica da célula em crescimento na matriz sintética [45].

A adesão celular é mediada por diferentes tipos de proteínas receptoras trans-membrana conectada ao citoesqueleto celular [46]. Os aspectos da dinâmica da adesão celular necessitam de regulação destes receptores de adesão celular, que se encontram na superfície da célula. Este fenômeno é crucial para a união de células individuais em tecidos tridimensionais de mamíferos. As células não se juntam simplesmente e formam tecidos, na verdade elas estão organizadas em padrões diversos e altamente distintos.

A capacidade adesiva dos conjuntos de receptores de adesão ou dos processos associados ao citoesqueleto tais como o espalhamento celular, é crucial para uma boa adesão celular, controle do crescimento e mobilidade celulares. A morfogênese tecidual requer a cooperação entre o processo físico de adesão celular e os processos de sinalização mediados por proteínas que controlam a transferência da informação entre as células. Portanto, os sistemas de adesão celular podem ser reconhecidos como mecanismos que ajudam na tradução da informação genética básica nos complexos padrões tridimensionais das células nos tecidos biológicos.

As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos arcabouços são muito importantes entre as interações entre as células biológicas e a matriz sintética uma vez que, geralmente; as células biológicas aderem mais fortemente a superfícies de materiais mais hidrofílicos [51].

A migração celular está envolvida em diversos fenômenos biológicos, sendo parte fundamental na formação dos órgãos e tecidos. Sua importância permanece mesmo em organismo adulto, tanto na fisiologia, quanto em sua patologia. Por exemplo, a migração dos fibroblastos e células endoteliais vasculares é essencial para a cura de feridas. Para que a célula se movimente, primeiramente ela deve aderir ao suporte para que sejam desencadeados os eventos que provocarão seu movimento, incluindo a contração dos filamentos de actina que conectam os complexos de adesão célula-suporte como estruturas intracelulares [52]. A Figura 10 ilustra o processo de adesão celular ao arcabouço molecular.

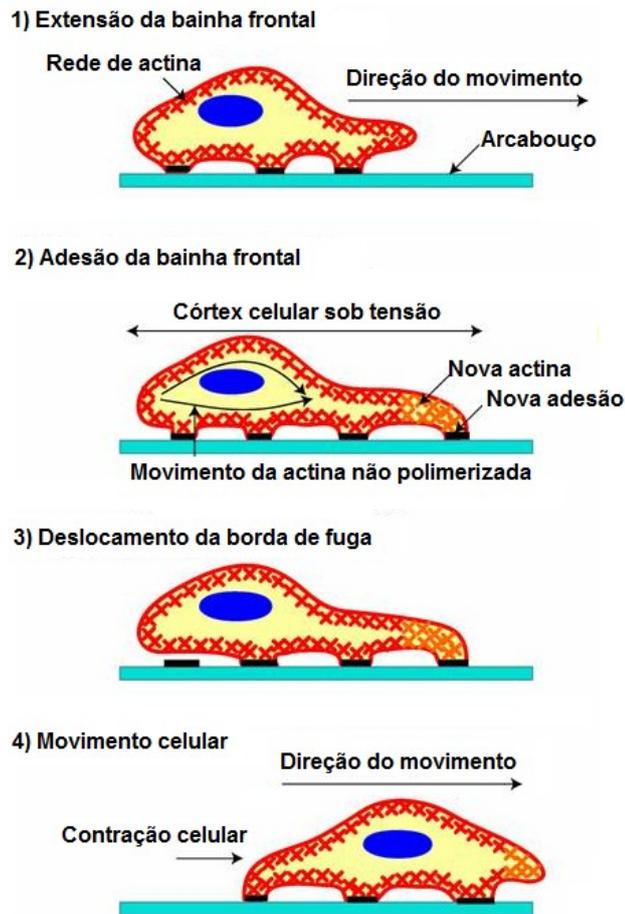


Figura 10 - Ilustração do processo de adesão e movimento celular na superfície de um arcabouço molecular. O processo de movimento celular se inicia quando a célula adere na superfície do arcabouço via moléculas de adesão tais como vinculina, talina e integrina. Adaptado de [52].

As mudanças nas formas dos tecidos biológicos frequentemente envolvem migrações celulares em um processo coordenado tanto espacialmente quanto temporalmente. Nesse caso, as células podem migrar individualmente ou como uma parte aderente do tecido biológico, acompanhando suas mudanças morfológicas [47].

Os desafios atuais no projeto de arcabouços moleculares para a ETB estão associados ao entendimento quantitativo das relações entre a composição química das macromoléculas e os fenômenos físico-químicos e bioquímicos envolvidos na interface arcabouço/tecido biológico que favorecem o processo de proliferação, crescimento e diferenciação celular.

Pesquisas recentes apontam a biomimetização como sendo um passo importante no aperfeiçoamento do processo de adesão celular em arcabouços moleculares sintéticos. O

processo de biomimetização se baseia na imobilização de biomoléculas na superfície do material a fim de reproduzir a função biológica da matriz extracelular [53]. Diversas pesquisas apontam as proteínas da matriz extracelular atuando como locais específicos para o processo de adesão das células e de pois nas etapas posteriores de migração, crescimento e diferenciação celular.

Alguns processos que propiciam a obtenção de arcabouços moleculares biomimetizantes são: a modificação química de grupos funcionais, adição de carga eletrostática à superfície e alterações da molhabilidade hidrofiliicidade /hidrofobicidade [54-55].

As proteínas de cadeia longa da matriz extracelular tais como a fibronectina, vitronectina e laminina, com seqüências de peptídeos, como RGD (Arg-Gly-Asp), podem ser utilizadas de forma eficiente na modificação da superfície de um arcabouço sintético. A ligação dessas proteínas ou peptídeos à matriz polimérica pode ocorrer de forma covalente ou adsorção física [47].

Para a confecção de um material biomimetizado, devem ser consideradas características como a afinidade da ligação entre o ligante presente no biomaterial e o receptor a ser inserido, a densidade de ligações presentes no ligante e a sua distribuição espacial [48]. Dependendo da natureza das forças envolvidas na interação macromolécula-substrato e da aplicação projetada para o arcabouço, o processo de imobilização das biomoléculas no arcabouço pode ser permanente ou temporário. De maneira geral, existem três possíveis técnicas para a imobilização de biomolécula sem um arcabouço molecular destinado à ETB: adsorção física, imobilização por aprisionamento ou ligação covalente [46].

A adsorção física é uma técnica que retém a biomolécula de interesse na superfície do arcabouço molecular através de forças de ligação de hidrogênio, forças de van der Waals ou a formação de complexos de transferência de carga. As vantagens desta técnica envolvem o baixo custo e a ausência da necessidade de modificar-se quimicamente o arcabouço. Entretanto, as forças de ligação no processo de adsorção são suscetíveis à lixiviação por gradientes de pH, temperatura, concentração ou força iônica do meio.

Outro processo de imobilização de biomoléculas na superfície do arcabouço molecular de forma a promover a adesão e o crescimento celular é a técnica do aprisionamento físico da biomolécula diretamente na matriz polimérica. A imobilização por aprisionamento envolve a

utilização de uma barreira física para a retenção da biomolécula na matriz polimérica que compõe o arcabouço. A imobilização por aprisionamento pode ser de caráter permanente ou temporário, dependendo de cada sistema. O inconveniente dessa técnica de imobilização está no fato de que as biomoléculas imobilizadas não permanecem na superfície, o que leva a uma redução significativa no processo de indução da adesão e proliferação celular. Como desvantagem da técnica de aprisionamento físico pode-se apresentar a elevada barreira de difusão de nutrientes para o crescimento celular ou mesmo a eliminação de subprodutos resultantes da biodegração/bioreabsorção do arcabouço sintético.

No processo de imobilização via ligação covalente os grupos funcionais do arcabouço molecular são ativados de forma a se acoplar quimicamente à molécula biológica de interesse. A ligação química entre o arcabouço sintético e a biomolécula pode ser efetuada em meio tamponado similar ao do meio celular, utilizando-se simultaneamente aditivos e estabilizadores que preservam a atividade de reconhecimento das biomoléculas. Esta técnica apresenta como vantagem a baixa resistência difusional ao passo que a principal desvantagem reside no fato de que o arcabouço molecular não poderia ser biodegradável.

A Figura 11 resume as principais técnicas de imobilização de compostos bioativos em arcabouços moleculares de forma a promover a adesão, crescimento, proliferação e diferenciação celular.

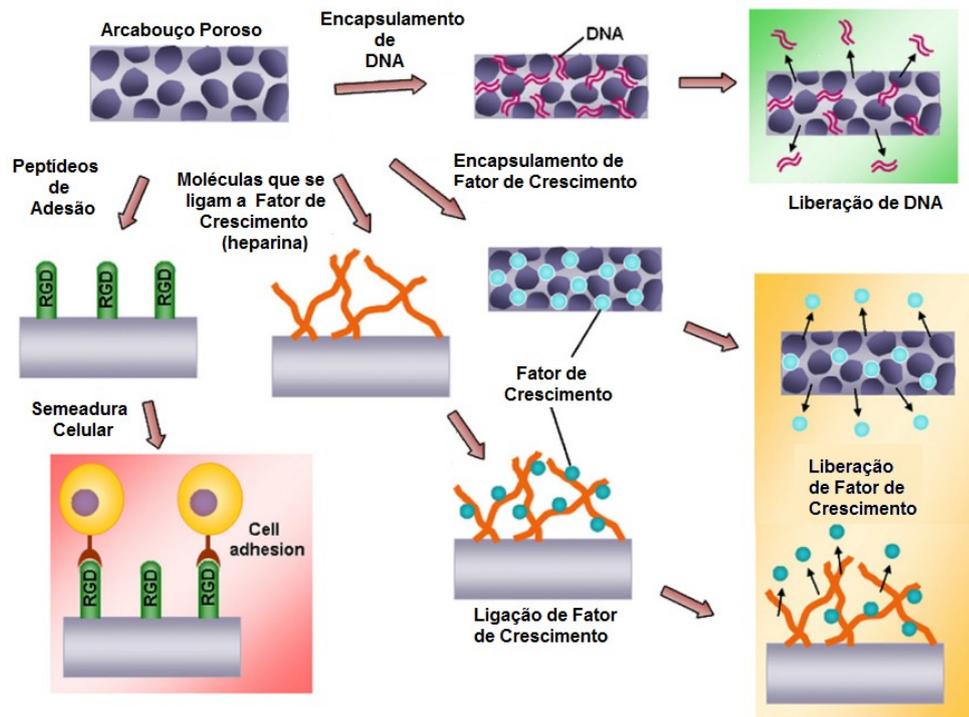


Figura 11 - Técnicas para o aprisionamento de espécies bioativas em arcabouços moleculares para a ETB. Adaptado de [56].

### 2.3 Aplicação de hidrogéis na engenharia de tecidos biológicos

Uma classe de polímero comumente utilizada na obtenção de arcabouços moleculares devido à sua constituição similar ao do tecido biológico quanto ao seu conteúdo de água são denominados de hidrogéis. Um hidrogel representa uma rede macromolecular tridimensional com elevado conteúdo de água [57].

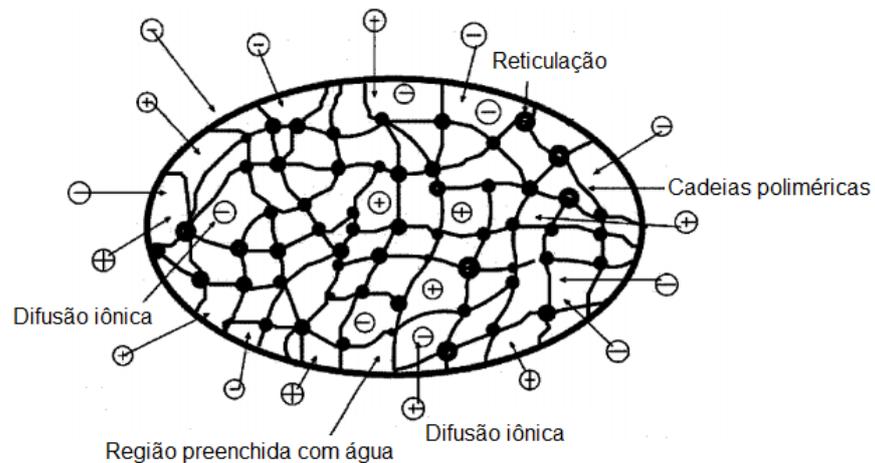


Figura 12 - Ilustração da microestrutura típica de um hidrogel. Adaptado de [58].

Uma importante característica do hidrogel é que, em escala macroscópica, se comportam como sólidos enquanto que, ao nível molecular, apresentam propriedades similares às soluções verdadeiras [59]. Esta propriedade é particularmente importante para a medicina uma vez que é possível se imobilizar componentes biológicos como células e proteínas no arcabouço macromolecular, obtendo assim um microambiente que mimetiza a fisiologia de tecidos e órgãos biológicos dos mamíferos [60].

Um gel pode ser definido como uma rede tridimensional de cadeias flexíveis constituídas por segmentos conectados através de interações físicas ou, ligadas covalentemente e, solvatadas por um determinado líquido (Figura 12). Se o líquido que solvata as cadeias poliméricas é de natureza orgânica, o sistema recebe o nome de organogel. Por outro lado, se a solvatação é feita pela água o material se denomina de hidrogel [61-62].

A atenção sobre a aplicação dos hidrogéis na medicina iniciou-se a partir dos trabalhos de Wichterle e Lim (Figura 13) sobre a fabricação de lentes de contato a partir do polímero hidrofílico poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA) [63-64].



Figura 13 - Os químicos tchecos inventores da lente de contato, Otto Wichterle (esquerda) e Drahoslav Lim (direita). Adaptado de [65].

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos, insolúveis em água, apresentando módulo de elasticidade muito próximo ao dos tecidos moles (cartilagens) que incham na presença de água até alcançarem o equilíbrio termodinâmico. No estado desidratado os hidrogéis são denominados de xerogéis e exibem cristalinidade.

O foco das pesquisas atuais a respeito da aplicação dos hidrogéis para a fabricação de arcabouços moleculares está dirigido principalmente para a compreensão da relação entre a estrutura química e sua atividade biológica (Figura 14).

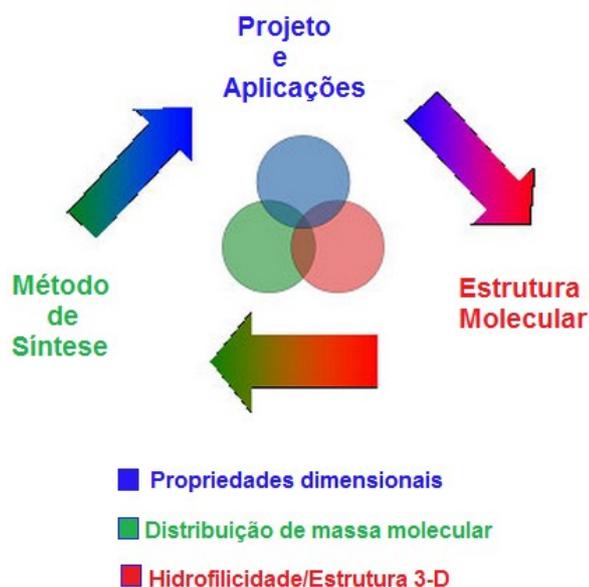


Figura 14 - Relação entre estrutura química e as propriedades biológicas do arcabouço molecular exercem influências significativas que afetam diretamente a interação entre a célula biológica e o material sintético.

Dessa maneira, observa-se que a estrutura química resultante de um arcabouço molecular tipo hidrogel são resultantes de um conjunto de condições de processamento que influi decisivamente nas suas aplicações como arcabouço molecular para a ETB.

A estabilidade dimensional do arcabouço molecular dependerá diretamente do conteúdo de água absorvida pelo hidrogel e depende diretamente da estrutura química primária do material e da distribuição de massa molecular no material. A distribuição de massa molecular, ou seja, a polidispersão (PD) é influenciada por vários parâmetros, destacando-se as condições reacionais empregadas na reação de polimerização para a obtenção do hidrogel.

De modo geral, os hidrogéis podem ser obtidos a partir da reticulação química e reticulação física [66]. O método de reticulação química (Figura 15) envolve a formação de reticulações através do uso de agentes reticulantes. Entretanto, os métodos de reticulação química tendem a apresentar sérias limitações na fabricação de arcabouços moleculares para a ETB uma vez que a remoção do excesso de agentes reticulantes geralmente é incompleta tendo-se como resíduos a presença de compostos tóxicos resultantes de seu processo de síntese.

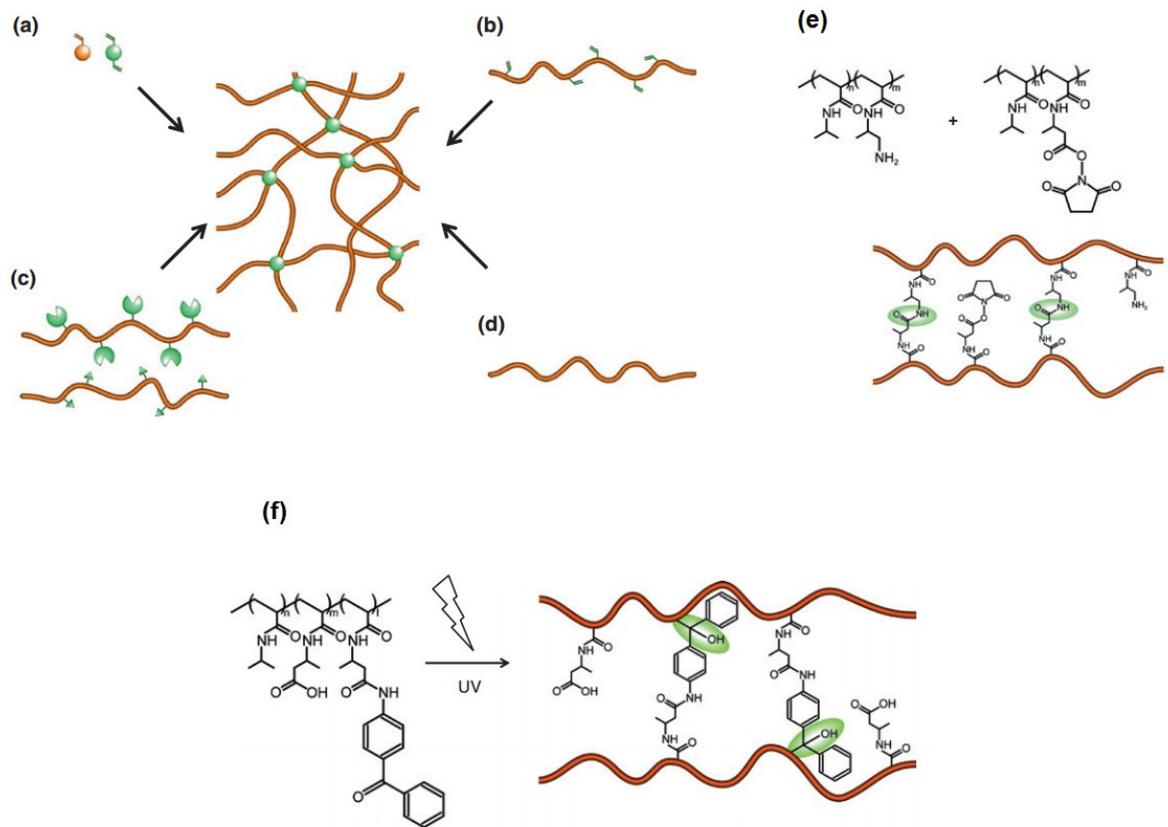


Figura 15 - Ilustração dos principais métodos de reticulação química para a obtenção de hidrogéis: polimerização de monômeros vinílicos (a) e macromonômeros (b), reação através de grupos funcionais (c), utilização de radiação de alta energia (raios- $\gamma$ ) (d), condensação de aminoácidos (e), fotoreticulação com luz UV através de grupos reativos da benzofenona (f). Adaptado de [67].

Os hidrogéis físicos (Figura 16) também chamados de reversíveis, possuem as redes poliméricas mantidas juntas por emaranhados moleculares ou forças secundárias incluindo a coulombiana, ligação de hidrogênio ou forças hidrofóbicas. Caso o polímero seja semicristalino, a formação de cristalitos poderá levar ao ancoramento das cadeias da parte amorfa da macromolécula e servir como pontos de reticulação. Nesse caso, partindo do resfriamento de uma solução polimérica, formam-se cristalitos, que são características dos géis físicos, também denominados de criogéis [67].

Formados por domínios hidrofóbicos e agrupamentos de emaranhados moleculares dão aos hidrogéis físicos uma inhomogeneidade característica. As terminações de cadeia podem gerar defeitos nesses géis, como por exemplo, a diminuição do grau de cristalinidade, necessário para o ancoramento das cadeias poliméricas.

A combinação de um íon multivalente com um polieletrólito gera um hidrogel físico denominado de ionotrópico (a exemplo o alginato de cálcio, Fig. 16(a)). Quando se mistura polieletrólitos de cargas opostas eles precipitam ou gelificam, dependendo da concentração e pH da solução, o resultado dessa "reticulação iônica" são os chamados complexos coacervados (Fig. 16(b)). Hidrogéis de complexos coacervados têm se tornado atraente para o preparo de arcabouços moleculares para a ETB devido à simplicidade de seu preparo. Entretanto, deve ser observado que as interações físicas são reversíveis e podem ser desestabilizadas por gradientes de força iônica, pH, temperatura e aplicação de tensão (campos elétricos).

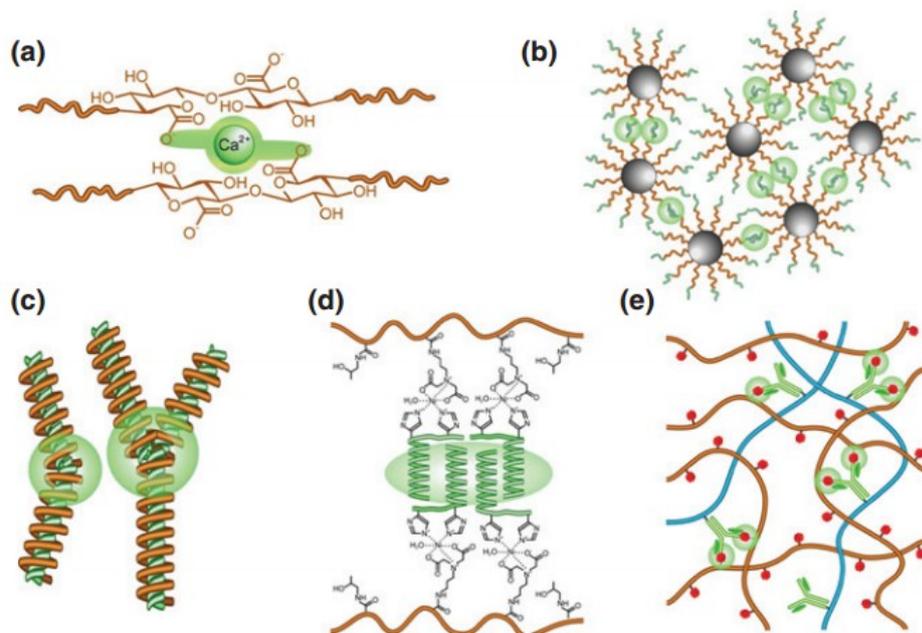


Figura 16 - Ilustração dos métodos de obtenção de hidrogéis via reticulação física: interação iônica (a), interação hidrofóbica (b), automontagem com formação de um complexo estereoquímico (c), interação entre espirais enroladas, interações através de reconhecimento molecular específico. Adaptado de [68].

## 2.4 Características físico-químicas do hidrogéis de PGA

A grande maioria dos arcabouços moleculares desenvolvidos atualmente para a ETB é constituída por polímeros. Os polímeros sintéticos bioabsorvíveis com a capacidade de degradar-se sob a ação de reações hidrolíticas nas condições fisiológicas e eliminar-se completamente através das vias metabólicas têm sido os materiais mais

atrativos para a ETB. Os arcabouços moleculares elaborados a partir desse tipo de polímero oferecem a possibilidade de se criar tecidos biológicos completamente naturais eliminando os problemas associados a respostas inflamatórias e formação de tecido fibroso associado normalmente aos implantes permanentes.

Recentemente, estudos têm demonstrado que oligômeros do glicerol e poligliceróis arborescentes (PGA) exibem boas propriedades de biocompatibilidade tornando-os sistemas atraentes para a obtenção de arcabouços moleculares para a ETB [69-70].

É importante observar que além da distribuição da massa molecular, a arquitetura molecular (Figura 17) do polímero também poderá exercer uma influência marcante nas propriedades do arcabouço molecular pretendido.

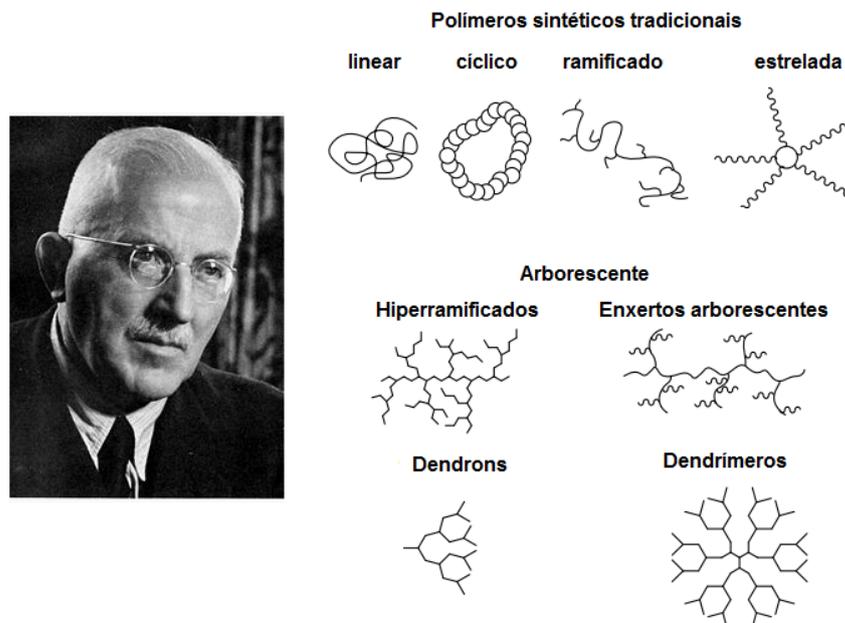


Figura 17 - O químico alemão Hermann Staudinger é considerado o “pai” da química macromolecular. Em 1953 ele ganhou o prêmio Nobel em virtude de seus trabalhos envolvendo a elucidação da arquitetura molecular dos polímeros. Adaptado de [71].

São os trabalhos de Hermann Staudinger que evidenciam a grande variedade das propriedades físico-químicas dos polímeros em função de sua diversidade de estruturas. Devido à rotação da ligação C-C, uma macromolécula ideal possui muitos graus de liberdade e pode assumir muitas configurações diferentes. Dessa maneira, é a liberdade rotacional sobre

cada ligação C-C que faz a molécula de um polímero linear parecer um longo pedaço flexível de uma corda (Fig. 18). Entretanto, deve ser observado que, para cadeias reais de polímeros existem impedimentos que restringem cada ligação a um pequeno número de estados rotacionais distintos e a faixa de valores acessível para o ângulo  $\varphi$  é severamente restrita por interferências estéricas entre as sucessivas unidades da cadeia.

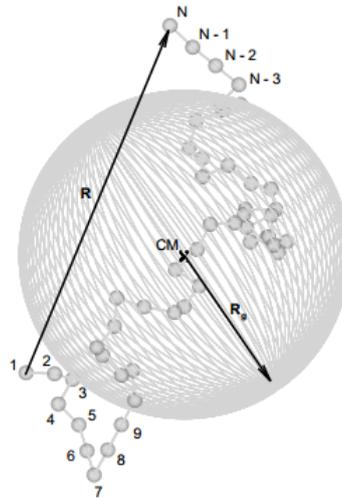


Figura 18- Representação de um polímero de cadeia linear formado por N unidades monoméricas e caracterizado pela distância ponta-a-ponta por  $\vec{R}$  e seu raio de giro ( $R_g$ ). CM representa o centro de massa da cadeia polimérica. R é o comprimento médio que representa o tamanho do polímero.

Devido às inúmeras conformações que a cadeia polimérica pode assumir, a melhor representação da morfologia de uma partícula polimérica é a de um “novelo aleatório” de baixa energia (Figura 19). Polímeros com grupos laterais grandes impõem dificuldades ao empacotamento destas cadeias em arranjos cristalinos por impedimento estérico o que resulta em polímeros amorfos.

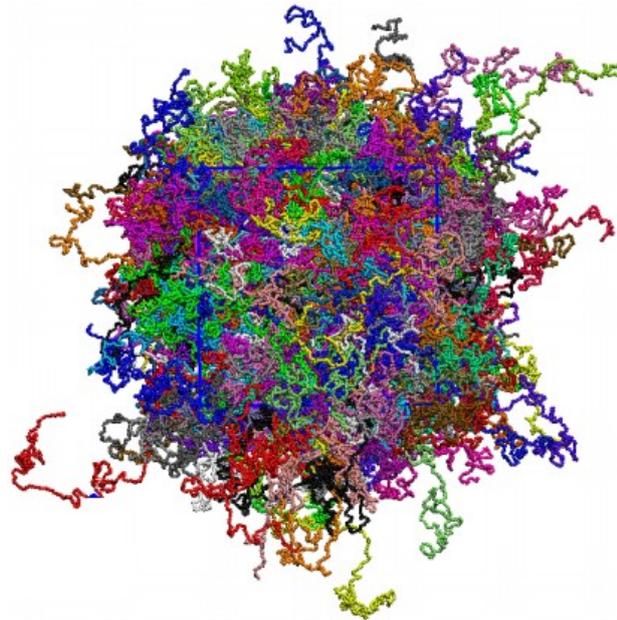


Figura 19 - Novelo aleatório formado por polímeros lineares representando uma partícula microscópica [72].

É fato que cadeias poliméricas ocupam um volume no espaço e suas dimensões são influenciadas por ângulos de ligação e por interações entre os elementos da cadeia. Estas interações podem ser classificadas interações de curto alcance e interações de longo alcance. A interação de curto alcance ocorre entre átomos vizinhos ou grupos de átomos e são usualmente forças de repulsão estérica causadas pela sobreposição de núvens eletrônicas. As interações de longo alcance são compostas de forças atrativas e repulsivas, (interações van der Waals) entre segmentos separados em uma cadeia que ocasionalmente se aproximam devido a flexibilidade molecular.

A energia das macromoléculas depende também das interações entre átomos ou grupos de átomos não ligados intra- e intermolecularmente. Assim, das muitas conformações possíveis teoricamente, apenas algumas são energeticamente favoráveis. As distribuições destas conformações são governadas pelas leis da termodinâmica e da mecânica estatística. As conformações de mais baixa energia são preferidas pelo fator de Boltzmann,  $(e^{-\frac{E}{kT}})$ , onde E é a energia da molécula numa conformação particular, T é a temperatura absoluta e k é a constante de Boltzmann [73].

Se um polímero é feito de  $N$  ligações, com  $\vec{r}_n$  representando a  $n$ -ésima ligação, o vetor ponta-a-ponta  $\vec{R}$  é dado por:

$$\vec{R} = \sum_{n=1}^N \vec{r}_n \quad (2.1)$$

O tamanho médio da cadeia macromolecular pode ser calculado considerando-se a média do quadrado de  $\langle \vec{R}^2 \rangle$ :

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \langle \vec{r}_n \vec{r}_m \rangle \quad (2.2)$$

Desde que não existe correlação entre as direções de diferentes vetores de ligação, se  $n \neq m$ ,  $\langle \vec{r}_n \vec{r}_m \rangle = \langle \vec{r}_n \rangle \cdot \langle \vec{r}_m \rangle = 0$ . Logo, o tamanho da cadeia polimérica é dado por  $\langle \vec{R}^2 \rangle$ :

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \sum_{n=1}^N \langle \vec{r}_n^2 \rangle = Nb^2 \quad (2.3)$$

Sendo:  $b$  o comprimento de cada ligação e  $N$  o número de meros presentes na cadeia polimérica.  $Nb$  representa, no caso, o limite termodinâmico do comprimento da cadeia polimérica (linear).

Caso não exista a presença de interações entre as unidades méricas na cadeia polimérica, a energia do polímero é independente de sua geometria o que significa fisicamente que o sistema está em equilíbrio termodinâmico. Nesse caso, todas as configurações possíveis são prováveis de ocorrer flutuando no tempo de acordo com a unção de distribuição de Maxwell-Boltzmann,  $P(\vec{R}, N)$ :

$$P(\vec{R}, N) = \left( \frac{3}{2\pi Nb^2} \right)^{3/2} e^{-\frac{3\vec{R}^2}{2Nb^2}} \quad (2.4)$$

Por razões termodinâmicas, o polímero tende a se enovelar à medida que o produto  $Nb$  aumenta uma vez que, quanto maior a distância entre as pontas da cadeia maior a energia da conformação. A estrutura de um gel corresponde à ligação covalente das cadeias de polímeros lineares entre si que, numa primeira aproximação, podem ser ditas como ramificadas.

O raio de giro,  $R_g$  é uma grandeza que permite a diferenciação entre as arquiteturas de diferentes polímeros e corresponde à distância de rotação em torno de um eixo fixo no espaço. Dessa forma, qualquer objeto tem um número ilimitado de raios de giro, pois há um número ilimitado de eixos correspondentes. No exemplo de uma molécula esférica, o eixo passa pelo seu centro de gravidade e o raio de giro estabelece o tamanho da cadeia polimérica [74].

A Figura 20 demonstra uma correlação da distância calculada para o raio de giro ( $R_g$ ) e o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), que é calculado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, a partir do centro de gravidade de um polímero em solução.

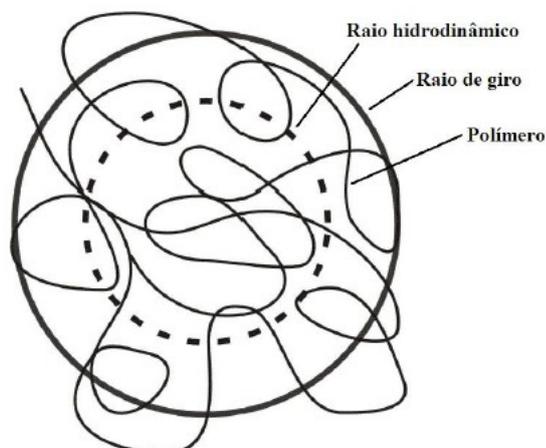


Figura 20- Comparação entre raio hidrodinâmico e raio de giro de um polímero em solução. Adaptado de [75].

O raio de giro é um dado importante na avaliação do comportamento da estrutura ao longo do tempo. Esta análise é responsável pela verificação da compactação da molécula. O crescimento deste parâmetro,  $R_g$  significa que a molécula aumentou seu

volume, o que pode influenciar na utilização do material, principalmente para materiais biocompatíveis.

O raio de giro pode ser obtido através do programa `g_gyrate`, pacote pertencente ao software Gromacs, que utiliza a equação 2.5:

$$R_g = \left( \frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{1/2} \quad (2.5)$$

sendo  $r_i$  a posição do átomo  $i$  em relação ao centro de massa e  $m_i$  sua respectiva massa.

Contrariamente aos seus isômeros lineares, políglicéricóis, o PGA possui uma arquitetura globular possuindo uma baixa polidispersão quanto à distribuição de sua massa molar, ocupando ao mesmo tempo um volume hidrodinâmico menor [76].

O grau de ramificação (GR) desempenha também um importante papel no controle da massa molecular e polidispersão (PD) dos polímeros arborescentes. Os dendrímeros possuem um GR ideal igual a 1, enquanto que nos polímeros lineares  $GR = 0$  [77]. Conseqüentemente polímeros hiperramificados se situam no intervalo  $0 < GR < 1$ , conforme demonstrado na Figura 21.

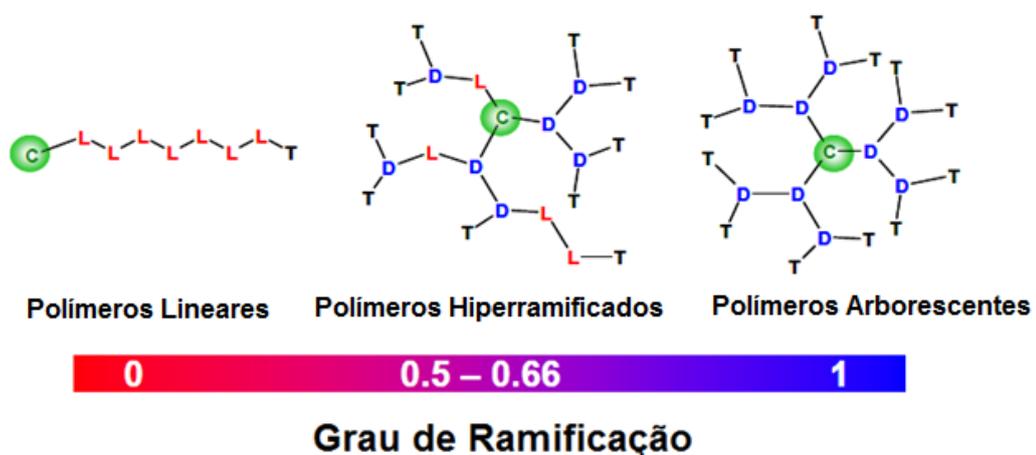


Figura 21- Comparação das arquiteturas poliméricas como uma função do grau de ramificação GR: D-dendrítica, L- linear e T- unidades terminais). Adaptado de [77].

Apresentando uma elevada densidade de grupos hidroxilas em sua superfície o PGA é um polímero não-iônico, amorfo, termoplástico e muito solúvel em água. O PGA apresenta uma estrutura mimetizante do poli(etileno glicol) (PEG) e poli(óxido de etileno), dois polímeros hidrofílicos extensamente utilizados na produção de sistemas para aplicações clínicas [78].

A elevada densidade dos grupos 1,2 diol na periferia do PGA poderá também permitir a biofuncionalização seletiva do arcabouço sintético com moléculas promotoras de adesão celular. A biofuncionalização do arcabouço baseado no PGA poderá permitir o desenvolvimento de arcabouços moleculares capazes de mimetizarem a complexidade e dinamismo da matriz extracelular nativa dos tecidos biológicos de tal forma que os mesmos estimulem, inicialmente, as interações biológicas na interface arcabouço/tecidos receptores, ocasionando uma resposta biológica reparatória e funcional do tecido solicitante a curto e longo prazo, após implante do arcabouço no organismo biológico [79]. A Figura 22 ilustra uma série de reações de ativação a que podem ser submetidas as unidades méricas do glicerol presentes no PGA para uma posterior biofuncionalização específica do arcabouço.

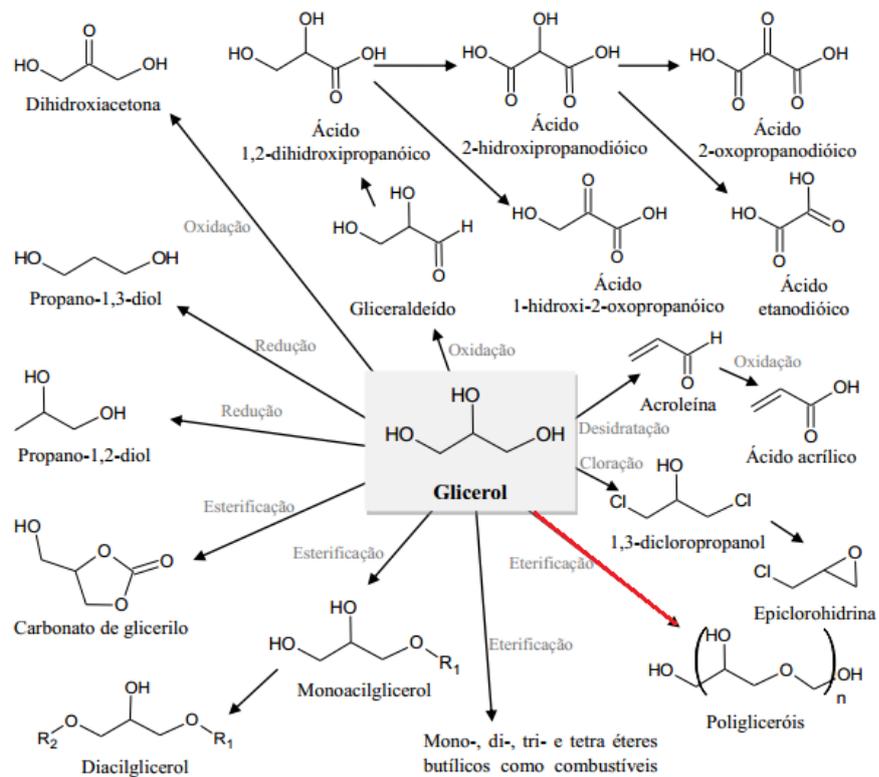


Figura 22 – Reações específicas de ativação dos grupos 1,2 diol presentes no PGA que poderão favorecer a biofuncionalização do PGA. Adaptado de [80].

Adicionalmente, a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PGA situa-se em torno de  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , comportando-se como um líquido viscoso à temperatura ambiente o que pode favorecer a obtenção do arcabouço. Sua alta solubilidade em água permite, ao mesmo tempo a obtenção de arcabouços moleculares liofilizados [81].

O PGA é sintetizado a partir de um núcleo oligomérico de glicerol. Oligômeros de glicerol são produtos biodegradáveis que são conhecidos desde o início do século 20. No entanto, somente na última década é que foram desenvolvidas rotas de síntese de reações de esterificação para a obtenção de produtos de elevada pureza [77]. Oligoéteres de glicerol são estruturas moleculares não iônicas, que têm sido usados por muitos anos como emulsificantes em alimentos e emolientes na área cosmética.

## 2.5 Tecnologias para a produção de arcabouços moleculares

Um grande número de tecnologias foram desenvolvidas nas últimas décadas para a produção de arcabouços moleculares poliméricos para a ETB. Cada processo apresenta suas vantagens e desvantagens que cada técnica de elaboração confere ao arcabouço molecular características estruturais diferentes, de forma que é importante selecionar a técnica mais adequada de acordo com sua aplicação na ETB.

As técnicas mais importantes para a produção de arcabouços moleculares para a ETB estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1- Tecnologias mais utilizadas para a fabricação de arcabouços moleculares. Adaptado de [82].

<b>Tecnologia</b>	<b>Propriedades do polímero base</b>	<b>Tamanho de poros obtidos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Porosidade do arcabouço (%)</b>	<b>Morfologia observada</b>
Liofilização	Solúvel	<300	<97	Microporos interconectados
Separação de fases induzida termicamente	Solúvel	<200	<97	Microporos interconectados
Laminação por membranas	Solúvel	30-300	<85	Porosidade irregular
Lixiviação	Solúvel	30-300	20-50	Poros esféricos
Tecnologia de fluido supercrítico	Amorfo	<100	10-30	Estrutura microporosa com poros não interconectados

### 2.5.1 Liofilização

A liofilização é um processo de secagem no qual a água é cristalizada a baixas temperaturas e então sublimada. No entanto, para que o processo de sublimação ocorra é necessário que a zona de operação esteja abaixo do ponto triplo (ponto onde há coexistência das fases sólida, líquida e vapor), conforme apresentado na Figura 23 [83]. O diagrama de fases da água (Figura 23) é uma representação gráfica das propriedades da água em termos de pressão e temperatura, e ilustra as regiões onde a fase sólida, líquida e vapor coexistem em equilíbrio.

O ponto triplo, que ocorre a uma temperatura de  $0,0098^{\circ}\text{C}$  e uma pressão de  $4,58\text{ mmHg}$ , é onde ocorre a intercessão das três linhas correspondentes aos estados da água. Ao fornecer calor a um material em condições abaixo do ponto triplo, a água contida neste produto passará diretamente do estado sólido ao de vapor, sendo esse processo chamado de sublimação.

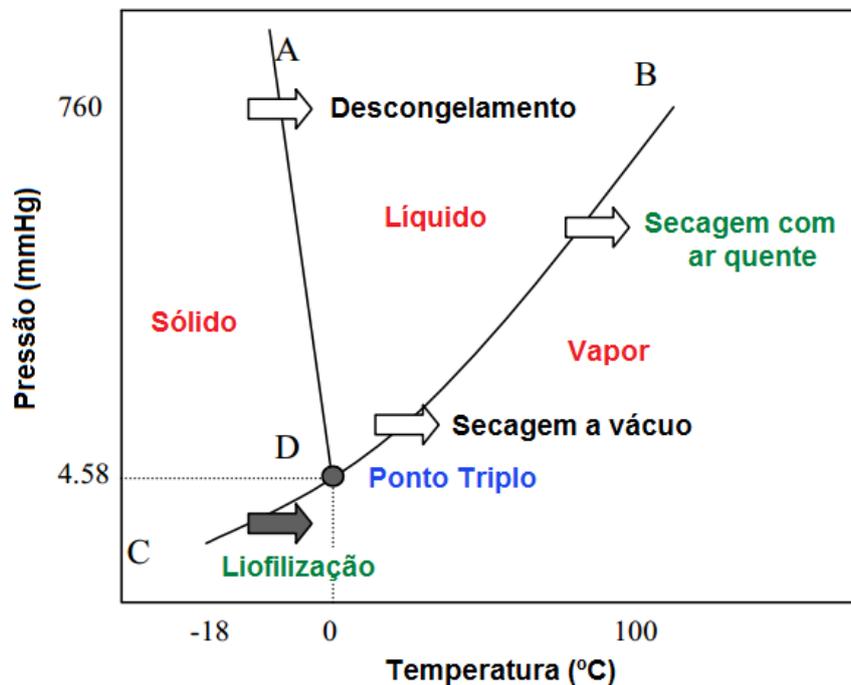


Figura 23- Diagrama de fases P-T para a água e os respectivos processos correspondentes às transições de fase. Os respectivos equilíbrios entre as fases são: linha DB = equilíbrio líquido-vapor, linha DA = equilíbrio sólido-líquido e linha DC = equilíbrio sólido-vapor. Adaptado de [83].

O processo de sublimação origina a morfologia porosa do arcabouço molecular resultando em uma estrutura esponjosa deixada pela saída de água a exemplo da Figura 24 [84].

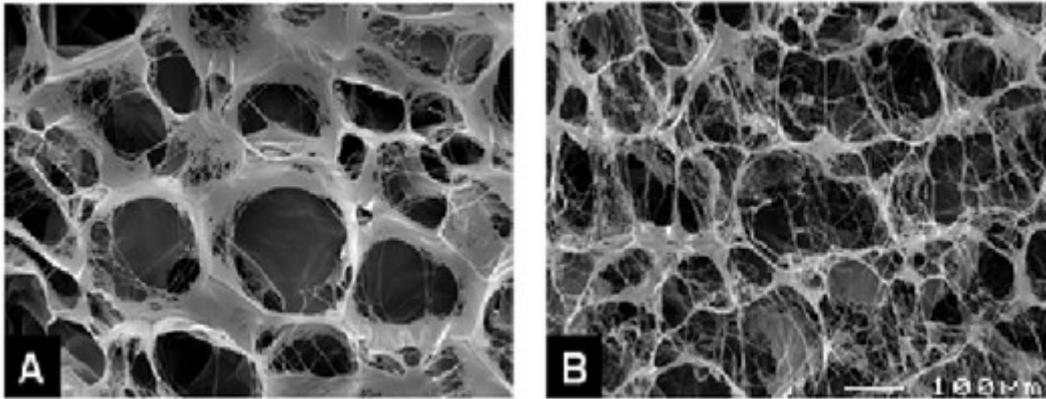


Figura 24 - Arcabouço molecular tipo esponja fabricado a partir da liofilização do colágeno. Em (A) o arcabouço foi liofilizado após lavagem com solução de ácido acético 0,25 M e em (B) após lavagem com água. Adaptado de [84].

### 2.5.2 Gelificação térmica

A utilização da técnica de gelificação térmica consiste inicialmente na dissolução do polímero em seu solvente ideal. Em seguida a solução polimérica é aquecida em um molde até sua gelificação. O gel obtido é então tratado por uma solução precipitante (não solvente) até se obter a estrutura porosa desejada (Figura 25). A principal desvantagem da técnica de gelificação térmica está no fato de que os poros produzidos não apresentam interconectividade [85].

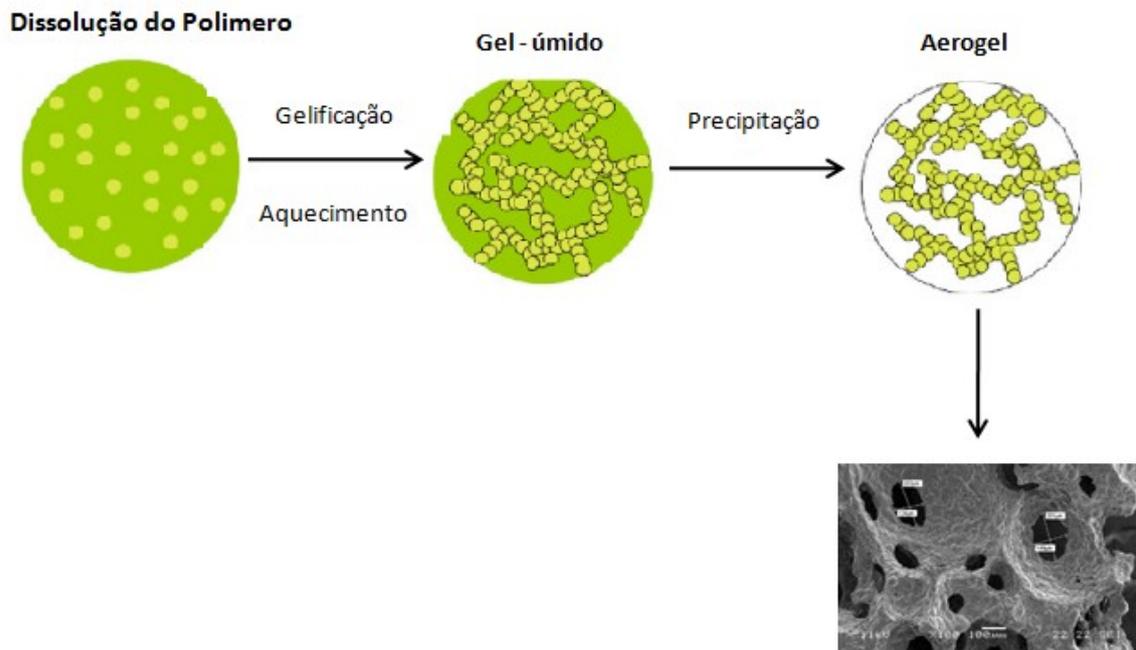


Figura 25 - Arcabouço molecular de PLLA produzido pela técnica de gelificação térmica. Adaptado de [85]

### 2.5.3 Lixiviação de partículas da matriz polimérica

No processo de produção de arcabouços moleculares via lixiviação de partículas, incorpora-se à solução (orgânica) polimérica sais inorgânicos solúveis em água, a exemplo do cloreto de sódio ou substâncias orgânicas a exemplo da sacarose [86]. A mistura é transferida para um molde, o solvente é evaporado ou liofilizado. O arcabouço obtido é lavado continuamente com água destilada ou solução tampão de baixa força iônica para dissolução do sal ou açúcar da matriz restando, então, os poros (Figura 26). A limitação desta técnica está na obtenção de membranas muito finas e presença de sal residual no arcabouço molecular obtido.

Uma variante do método de lixiviação consiste na adição de microesferas de parafina como agentes formadores de poros à matriz polimérica. As microesferas de parafina são removidas após a lavagem do suporte polimérico por um solvente orgânico adequado promovendo interconectividade e boa geometria esférica dos poros formados (Figura 27) [87].

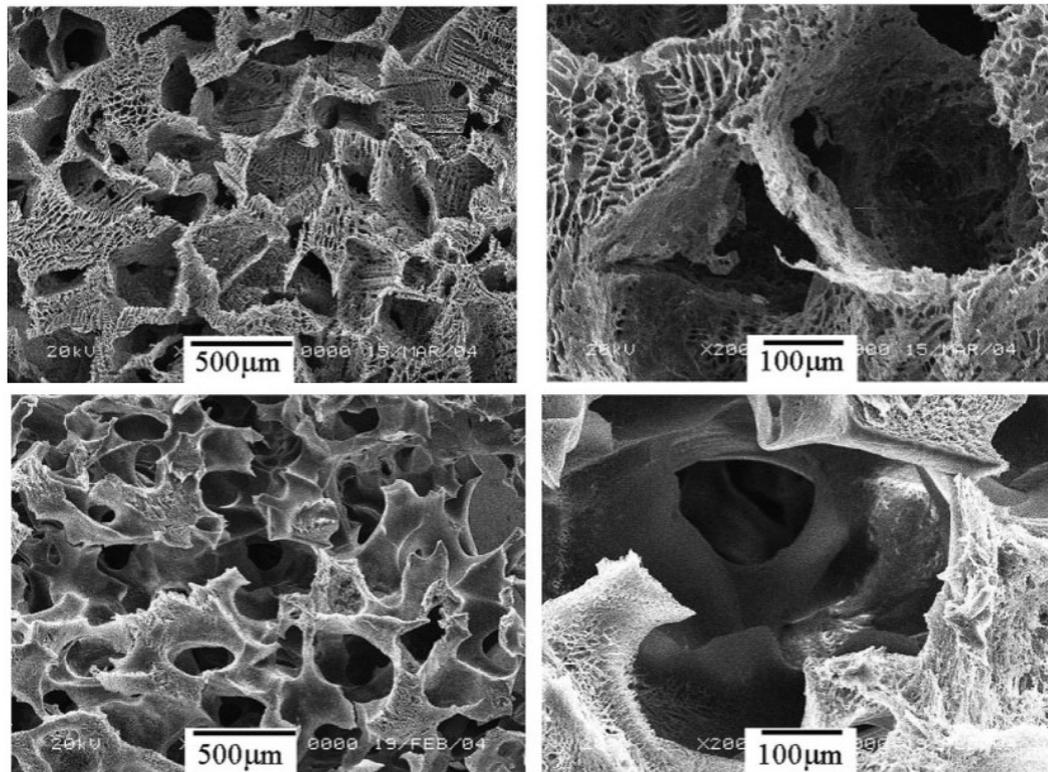


Figura 26 – Arcabouço de PLLA obtido através da técnica de lixiviação de partículas [86].

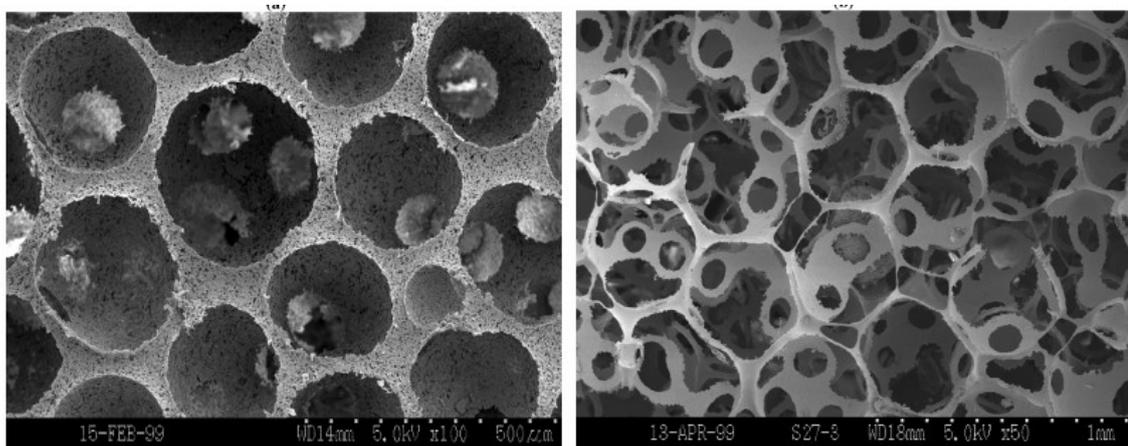


Figura 27 – Micrografia eletrônica de varredura de arcabouço de PLLA preparado utilizando microesferas de parafina. O tamanho de poros varia de 420-500 µm. Adaptado de [87].

#### 2.5.4 Separação de fase induzida termicamente

Na sua essência o processo de separação de fases induzida termicamente (SFIT) não é mais do que um processo de liofilização, gerando estruturas com tamanhos de poros de 10-100  $\mu\text{m}$ . Inicialmente o polímero é dissolvido em seu solvente a temperatura elevada e a separação de fase é induzida pelo resfriamento do material previamente congelado por sublimação.

A base do processo SFIT envolve a absorção de calor pela amostra congelada de forma a vaporizar o gelo. Nesse caso, a utilização de uma bomba de vácuo para aumentar a remoção do vapor de água da superfície da amostra aumenta a velocidade de sublimação deixando poros microscópicos na estrutura resultante devido aos cristais de gelo que sublimam, deixando aberturas (ou poros) no seu lugar.

Os arcabouços poliméricos obtidos através da técnica SFIT são altamente porosas com morfologias tubulares anisotrópicas e boas interconectividade dos poros. A microporosidade das matrizes produzidas pela técnica de TIPS, a morfologia dos poros, as propriedades mecânicas, a bioatividade e a taxa de degradação podem ser controladas simplesmente se variando a concentração do polímero na solução, fração volumétrica da fase secundária, bem como a temperatura de resfriamento da composição sistema polímero/solvente. O método de separação de fase induzida termicamente foi intensivamente estudado durante os últimos 20 anos. Em 1981, Castro foi o primeiro a usar a técnica SFIT para preparar membranas microporosas [88]. Nos anos 1990, Lloyd estudou sistematicamente o mecanismo de separação de fase [89]. Os polímeros mais usados para a fabricação de matrizes pela técnica SFIT, são os polímeros biodegradáveis, em particular, os poli ( $\alpha$ -hidroxiácidos), a exemplo do poli(ácido lático) (PLLA).

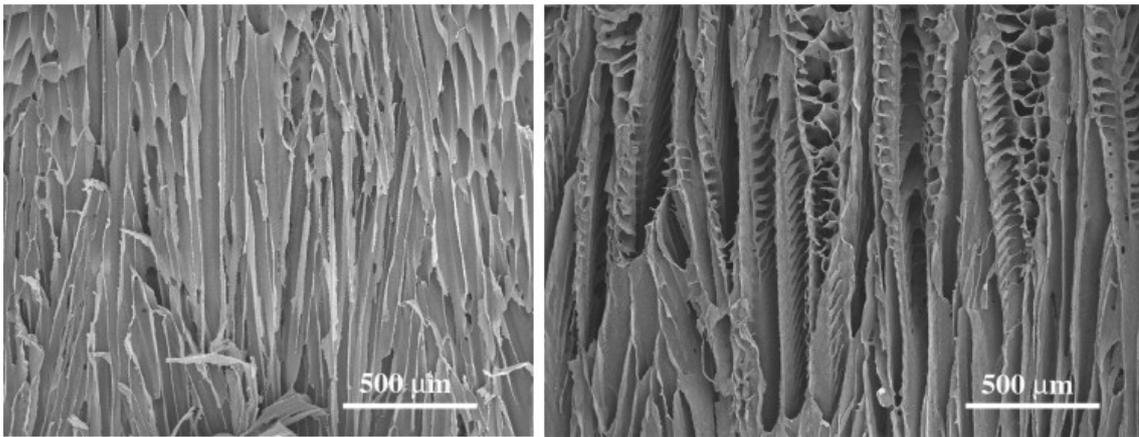


Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura de arcabouço molecular de PLLA fabricado através da técnica SFIT. Adaptado de [87].

### 2.5.5 Fluido Supercrítico

Fluido supercrítico é qualquer substância em uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico ( $P_c$ ,  $T_c$  e  $V_c$ ), no qual as fases líquida e gasosa são indistinguíveis uma vez que as suas densidades são iguais. O fluido supercrítico pode sofrer efusão através de uma substância sólida podendo assim dissolver materiais à semelhança de um líquido. Além disso, perto do seu ponto crítico, pequenas alterações em sua pressão ou temperatura resultam em grandes mudanças de densidade, permitindo assim que as propriedades pressão, volume, temperatura ou densidade do fluido possam ser ajustadas de acordo com sua aplicação [90].

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), é um gás com um baixo ponto crítico particularmente interessante para aplicações industriais devido à sua baixa toxicidade ( $T_c = 31^\circ \text{C}$ ,  $P_c = 73,8 \text{ bar}$  e  $V_c = 2,137 \text{ dm}^3/\text{kg}$ ) é o mais amplamente utilizado no campo fluido supercrítico na produção de arcabouços moleculares [91]. Esta técnica para a produção de arcabouço molecular usando fluido supercrítico (conhecido também como "*gas foaming*"), utiliza um gás para criar poros no interior do arcabouço de polímero, como por exemplo: poli (DL-láctico ácido) (PDLLA) e o poli (ácido láctico-co-glicólico DL-láctico) (PLGA), eliminando assim a necessidade de utilização de grandes volumes de solventes orgânicos. O  $\text{CO}_2$  costuma ser mais comumente utilizado como fluido supercrítico para a obtenção de arcabouços moleculares dadas sua inércia química e baixa toxicidade para o ambiente celular [92].

O arcabouço molecular precisam ter poros de tamanho adequado e interconectividade, sendo estas propriedades fundamentais para utilização na engenharia de tecidos. Estas propriedades influenciam significativamente o crescimento celular. No entanto, o processo de formação de arcabouço por técnica de fluido supercrítico é difícil de controlar em relação ao tamanho e estrutura dos poros principalmente no interior da matriz [90]. A Figura 29 ilustra um equipamento para fabricação de arcabouço molecular utilizando a técnica de fluido supercrítico.

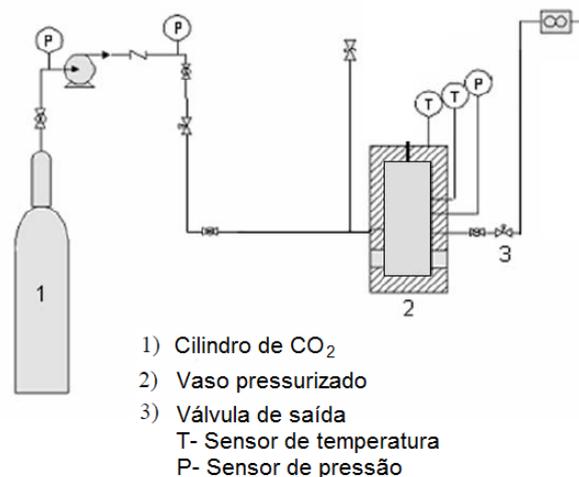


Figura 29 – Diagrama esquemático que mostra o equipamento utilizado para fabricação de arcabouço. Adaptado de [90].

### 2.5.6 Prototipagem Rápida

A prototipagem rápida (PR) é uma técnica recentemente adotada na fabricação de arcabouços para a ETB. A técnica de PR envolve a construção de objetos 3D usando a estratégias de fabricação em camadas. Embora existam diversas variantes desta tecnologia, o processo geral envolve a produção de um modelo gerado por computador através da técnica de desenho assistido por computador (Computer Aided Dispatch - CAD). Os dados do modelo são implementados no CAD para produção física da estrutura, que são reproduzidas em camadas transversais. A partir da primeira camada (camada de base) constroem as camadas posteriores, cada camada recém-formado adere a anterior. Com dados obtidos do paciente como Tomografia Computacional (TC) ou

Ressonância Magnética (RM) dos tecidos danificados, podem ser criadas estruturas específicas no CAD e reproduzir arcabouços personalizados para correção do tecido danificado e conseqüentemente, um arcabouço que possuem uma forma exata para correção [93]. A Figura 30 Ilustra a fabricação de arcabouço usando Prototipagem Rápida.

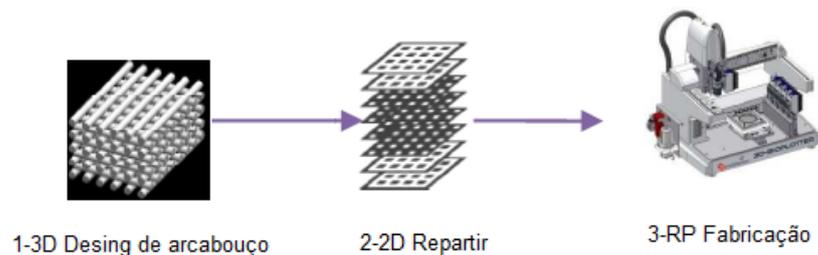


Figura 30 - Ilustração de fabricação de arcabouços usando Prototipagem Rápida (RP).

### 2.5.7 Eletrofiação

No processo de eletrofiação uma solução polimérica é sujeita a um campo elétrico aplicado na extremidade de um tubo capilar. À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, o líquido presente na extremidade do tubo se alonga, adquirindo um formato cônico conhecido como cone de Taylor. Quando o campo elétrico atinge um valor que supera a tensão superficial da solução, um jato eletricamente carregado é expelido da extremidade do cone. Neste trajeto pelo ar, o solvente é evaporado, o polímero é seco e recolhido em uma placa de metal [94]. A Figura 31 ilustra o processo de eletrofiação.

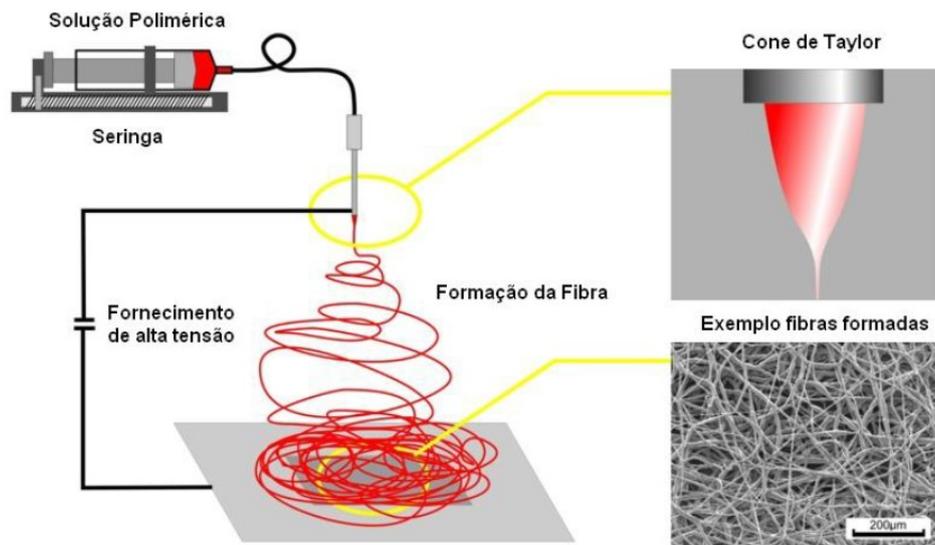


Figura 31- Ilustração do processo de eletrofição. Adaptado de [95]

Com a evaporação do solvente, o jato da solução polimérica é acelerado pela diferença de potencial aplicada, as cargas elétricas condensam-se provocando uma instabilidade no jato, que geralmente adquire uma forma espiralada, embora várias outras configurações tenham também sido observadas na literatura [96]. A Figura 32 ilustra os exemplos de configurações que podem ser adquiridas pelo jato de uma solução polimérica sob a ação de um campo elétrico [97].

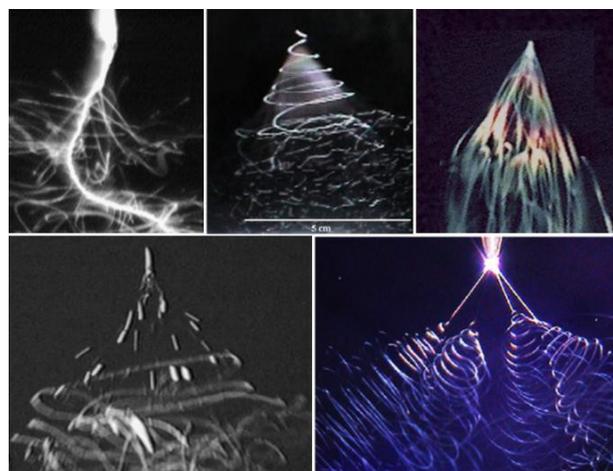


Figura 32 - Alguns exemplos das configurações que podem ser adquiridas pelo jato de uma solução polimérica durante o processo da eletrofição [98].

Dentre as metodologias para a produção de arcabouços moleculares para a ETB a técnica de eletrofiação se destaca devido à possibilidade de obtenção de suportes para o crescimento de tecidos biológicos com diferentes funcionalidades e com diâmetros e geometrias ajustáveis [99-100]. Adicionalmente a técnica permite a obtenção de arcabouços moleculares com elevada porosidade e poros interconectados, características essas desejáveis para a ETB [101-102].

Embora a técnica de eletrofiação possua a capacidade de propiciar uma produção de arcabouços moleculares para a ETB, existem algumas limitações que influenciam diretamente a consolidação desta técnica como uma opção para a produção em escala industrial tais como [103-104]:

- (a) A solução polimérica deve ser suficientemente viscosa,
- (b) Os solventes utilizados devem ser suficientemente voláteis para evaporarem e permitirem a obtenção do polímero sólido,
- (c) A intensidade do campo elétrico deve ser ajustada a um valor ideal.

Atualmente existe um forte crescimento na pesquisa científica e tecnológica quanto à obtenção de materiais eletrofiados, conforme demonstra o número de artigos científicos publicados no período de 1999-2014 (Fig. 33).

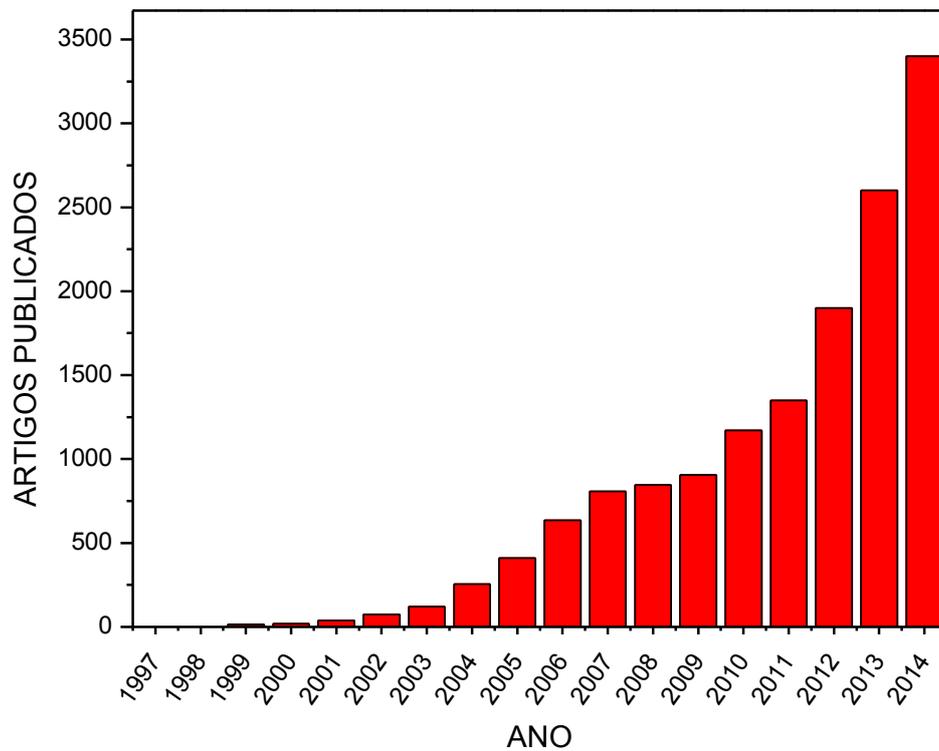


Figura 33 - Número de artigos publicados com a palavra-chave eletrofição no período 1997-2014. Adaptado de [105-106].

A Figura 34 ilustra os países que possuem investimentos no desenvolvimento científico e /ou tecnológico de materiais eletrofiados. Entretanto, atualmente existe apenas um pequeno grupo de empresas que estão produzindo produtos comerciais eletrofiados indicando que há a necessidade de se ampliar os investimentos em pesquisas científicas e tecnológicas nesta área [105-106].

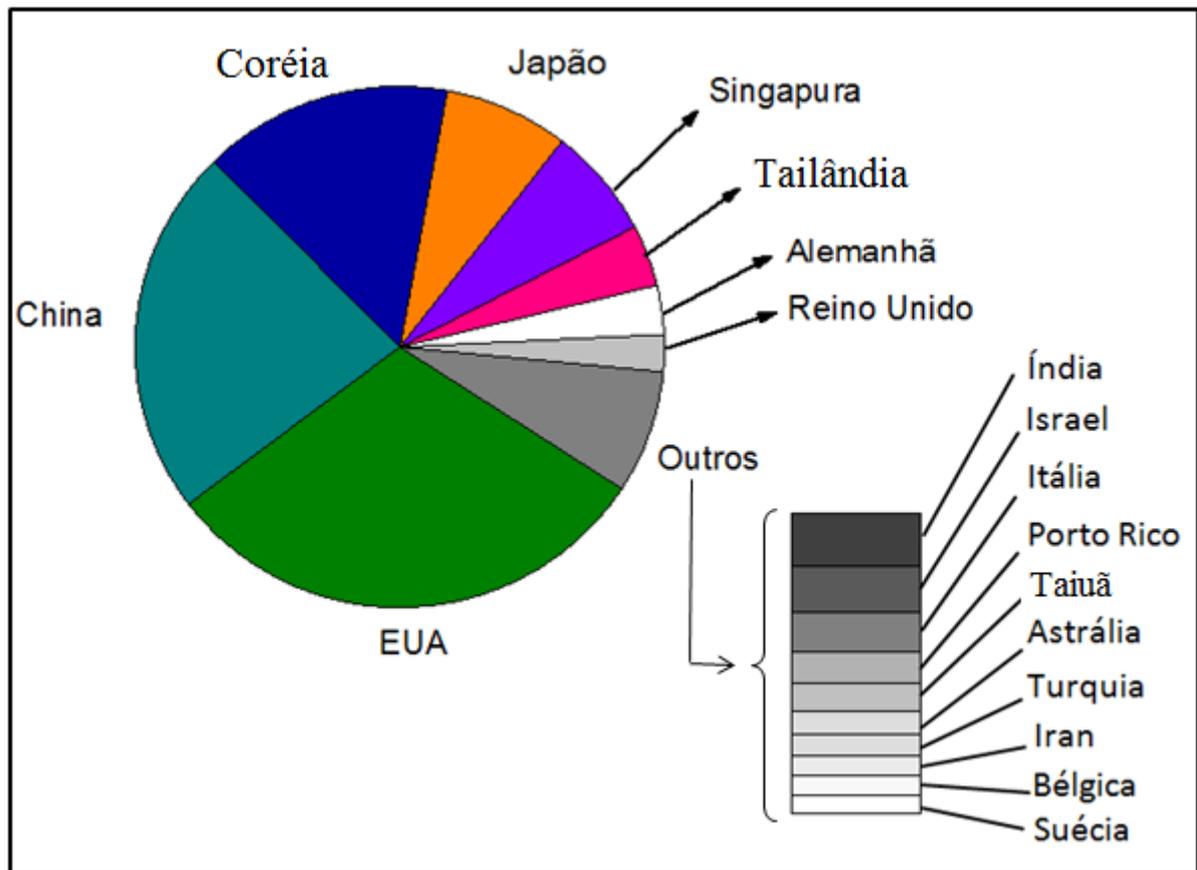


Figura 34 - Países que apresentam produção científica e/ou tecnológica na área de eletrofição. Adaptado de [105].

### 2.5.8 Limitações da utilização dos arcabouços moleculares na ETB

Existem algumas limitações para criação de arcabouços moleculares 3D. Embora várias pesquisas tenham demonstrado o sucesso desses materiais na regeneração do tecido biológico, sua biodegradação altera o microambiente fisiológico alterando por exemplo; seu pH natural através da liberação de subprodutos [107]. Assim, o ácido láctico liberado pelo PLLA durante sua biodegradação, reduz o pH do microambiente, acelerando sua velocidade de degradação devido à autocatálise causando alterações significativas na função da célula biológica [108].

Estudos também tem comprovado que as partículas liberadas durante a biodegradação do arcabouço molecular podem afetar seriamente os processos de regeneração celular provocando uma resposta inflamatória que pode levar à necrose tecidual ou mesmo a formação de tumores [109].

A estrutura de arcabouços sintéticos não possui uma composição química de superfície que mimetizante do tecido celular. O tecido celular produz naturalmente uma matriz extracelular composta principalmente de colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos, laminina e fibronectina. O colágeno é o componente principal da matriz extracelular e é reconhecido pelas células, além de ser quimiotático podendo induzir uma resposta imune. Nesse caso, a antigenicidade do colágeno pode ser reduzida por tratamento com pepsina para remoção das regiões telopeptídicas ou por reticulação [110].

Também deve ser observado que algumas das técnicas de fabricação de arcabouços são incapazes de controlar com precisão o tamanho dos poros, sua geometria, distribuição espacial e a construção de canais no interior do arcabouço.

No processo de produção de arcabouços por gelificação térmica as partículas de lixiviação não podem assegurar a interligação entre os poros, porque isso depende das partículas de sal adjacentes que estão em seu interior. Além disso, as camadas de películas formadas durante a evaporação do solvente levam à aglomeração de partículas tornando muito difícil o controle de uma distribuição de tamanhos de poros no interior do arcabouço [49].

As técnicas que utilizam solventes orgânicos, como clorofórmio e cloreto de metileno, para dissolver inicialmente os polímeros sintéticos é um problema significativo devido aos riscos de toxicidade e carcinogenicidade que a presença residual desses solventes representa para as células biológicas [111].

Uma limitação séria na produção de arcabouços moleculares está no fato de que as células na superfície não podem migrar profundamente devido a falta de nutrientes, oxigênio e a remoção insuficiente de resíduos. A colonização de células na periferia do arcabouço consome os nutrientes forma uma barreira eficaz para a difusão de oxigênio e nutrientes para o interior. Além disso, para a ETB, as altas velocidades de transferência de nutrientes e oxigênio promovem a mineralização da superfície, impedindo a entrada de nutriente e oxigênio, limitando ainda mais a transferência de células para o interior do arcabouço [109].

Experiências têm demonstrado que as células biológicas só são capazes de sobreviver perto da superfície do arcabouço [109]. Neste contexto, nota-se que nenhuma

célula, com exceção de condrócitos, consegue sobreviver em poros de 25-100 $\mu$ m devido em grande parte à sua natureza 3D [112].

O tecido epitelial apresenta topologia aproximadamente 2D e parece não ser dependente de seções transversais espessas, explicando assim o sucesso da produção deste tecido com técnicas de fabricação convencional [49]. No entanto, a maioria de outros tecidos 3D exige uma alta concentração de oxigênio e nutrientes.

O corpo humano fornece para os tecidos biológicos concentrações adequadas de oxigênio e nutrientes através dos vasos sanguíneos. Os arcabouços de engenharia de tecidos devem ser desenvolvidos de tal forma a ser vascularizado o suficiente para o transporte de oxigênio e nutrientes no interior do arcabouço, remoção de resíduos e de subprodutos indesejáveis [113]. A Figura 35 apresenta um resumo do mecanismo de difusão das células biológicas para o interior do arcabouço molecular e a influência do  $O_2$  e nutrientes na formação de uma matriz extracelular.

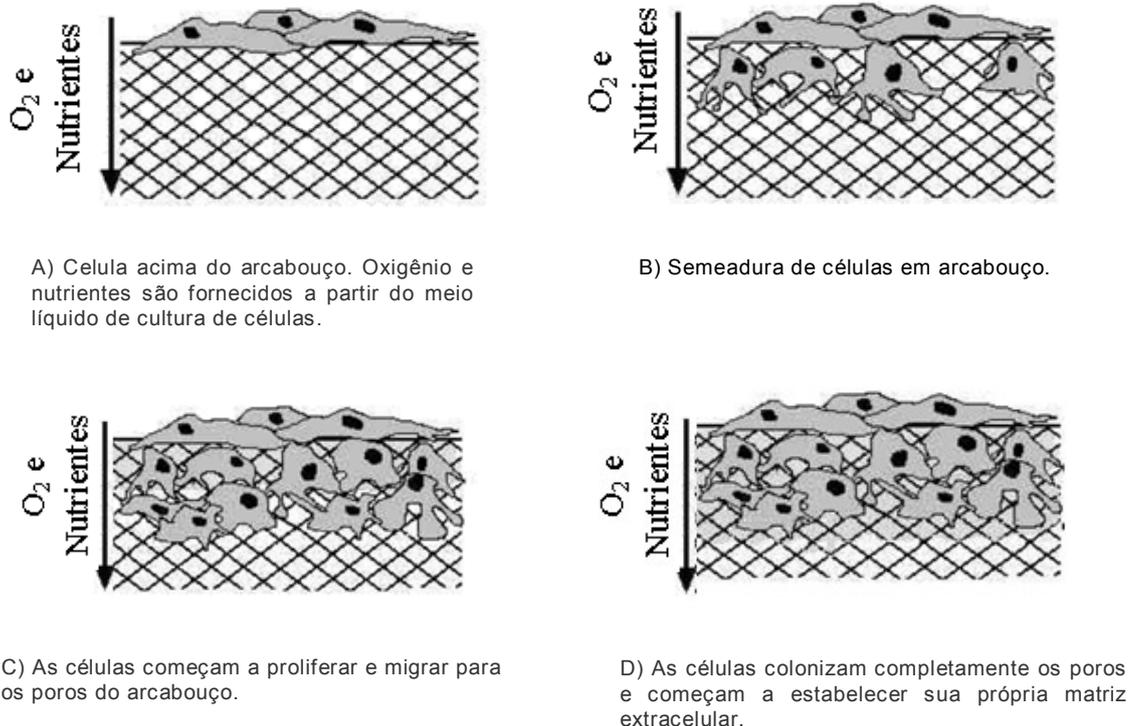


Figura 35 - Diagrama esquemático mostrando as limitações de difusão no arcabouço. Adaptado de [113].

## 2.6 Modelagem *in silico* do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA

O objetivo da modelagem computacional nesse trabalho foi investigar tanto o processo de síntese dos oligômeros PGL como o processo de hidrólise do arcabouço molecular baseado no PGA.

A modelagem molecular ou, modelagem *in silico*, representa atualmente uma importante ferramenta utilizada na interpretação de resultados experimentais e na construção de novos biomateriais com propriedades físico-químicas específicas. A base da modelagem molecular está em relacionar todas as propriedades moleculares importantes do sistema como estabilidade, reatividade e propriedades eletrônicas com a estrutura molecular do biomaterial. Desta forma é possível se desenvolver algoritmos capazes de calcular uma estrutura molecular com uma propriedade do arcabouço molecular como sua biodegradabilidade e correlacioná-la com as propriedades moleculares apresentadas pelo material.

A descrição de um sistema químico através de métodos computacionais requer a formulação de um modelo físico cuja complexidade está determinada pelo sistema em estudo. Nesse caso, o sistema pode ser uma molécula ou um conjunto destas que podem interagir entre si ou não. A modelagem computacional se inicia com a representação gráfica da molécula em uma estrutura plana para, em seguida, ser transladada ao espaço 3D onde os átomos são representados como um conjunto de funções matemáticas para a determinação de suas propriedades físico-químicas, através de um algoritmo de cálculo presentes em pacotes de programas, a exemplo, do Hyperchem.

O Hyperchem é um pacote de programas para a modelagem computacional que possui os algoritmos da mecânica quântica, mecânica molecular e dinâmica molecular que se complementam com uma sofisticada interface gráfica que permite a visualização 3D das propriedades moleculares de um dado sistema, como do potencial eletrostático e os orbitais de fronteiras HOMO e LUMO [114-115]. A Figura 36 ilustra as principais aplicações do Hyperchem.

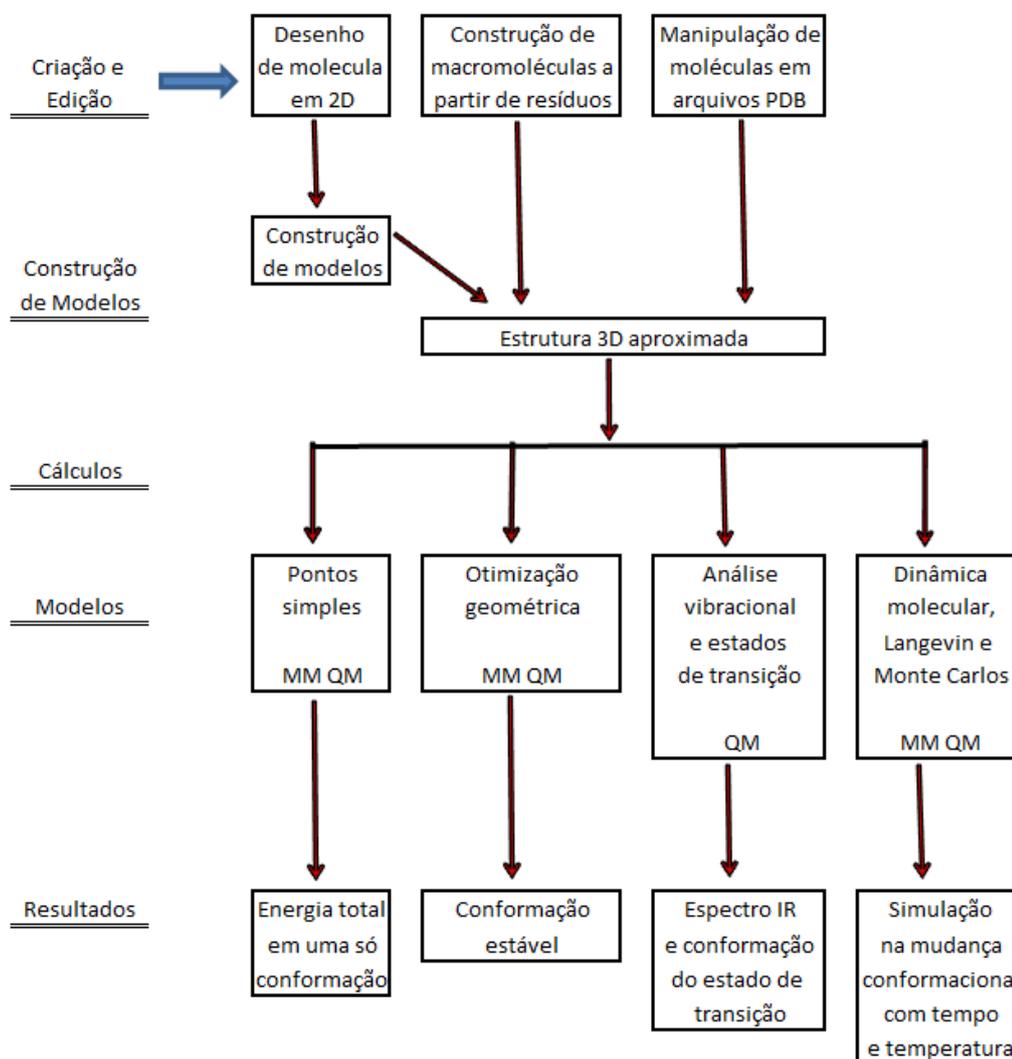


Figura 36 - Ilustração das principais aplicações do pacote de programas Hyperchem (MM = Mecânica Molecular e QM = Mecânica Quântica).

A energia de interação de uma molécula com um átomo com carga unitária positiva é definido como o potencial eletrostático ( $\epsilon_p$ ). Representando um balanço entre as interações de repulsão, envolvendo os núcleos dos átomos carregados positivamente, e as interações de atração, envolvendo os elétrons carregados negativamente [115]. As regiões de uma molécula em que o potencial eletrostático é negativo delineiam os locais que sofrem ataque eletrofílico.

Uma informação que pode ser adicionada a qualquer *iso-superfície* é utilização de cores para representar valores das propriedades eletrostáticas. Cores num extremo do espectro visível representam valores menores que as cores no outro extremo [116]. Por exemplo, o valor do potencial eletrostático mapeado sobre uma superfície de densidade eletrônica

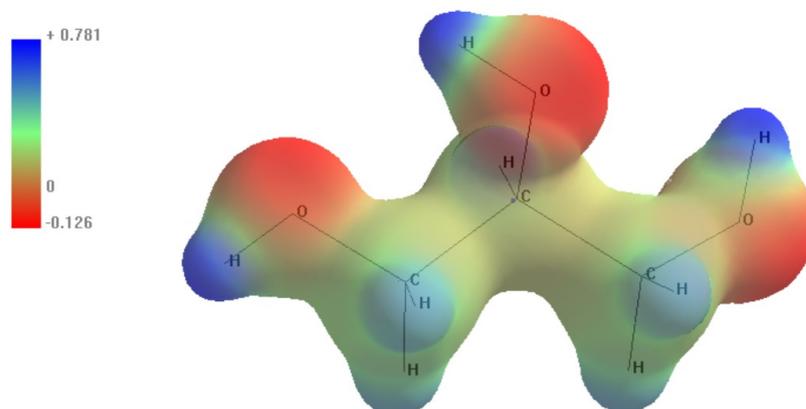
constante pode ser empregado para distinguir regiões ricas e deficientes em elétrons, mostrada em cores diferentes. Em geral, no caso do mapa de potencial eletrostático, inicia-se pela cor vermelha (alta densidade eletrônica) e passando por várias nuances até o azul (baixa densidade eletrônica). Assim, cores próximas ao vermelho indicam altos valores de potencial negativo, enquanto cores próximas do azul representam altos valores de potencial positivo (cores laranja, amarela e verde representam valores de potencial intermediário).

O mapa de potencial eletrostático fornece as regiões de densidade eletrônica correspondente, tamanho da molécula e o potencial eletrostático. A construção do mapa de potencial eletrostático envolve: a) a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula; b) a construção da superfície de potencial eletrostático; c) a aplicação de cores à superfície obtida para designar valores de potencial. Dentre os modelos gráficos, os mapas de potencial eletrostático mostram também estruturas moleculares, estabilidade, reatividade química e seletividade, que são ferramentas com as quais, concluímos investigações químicas [117].

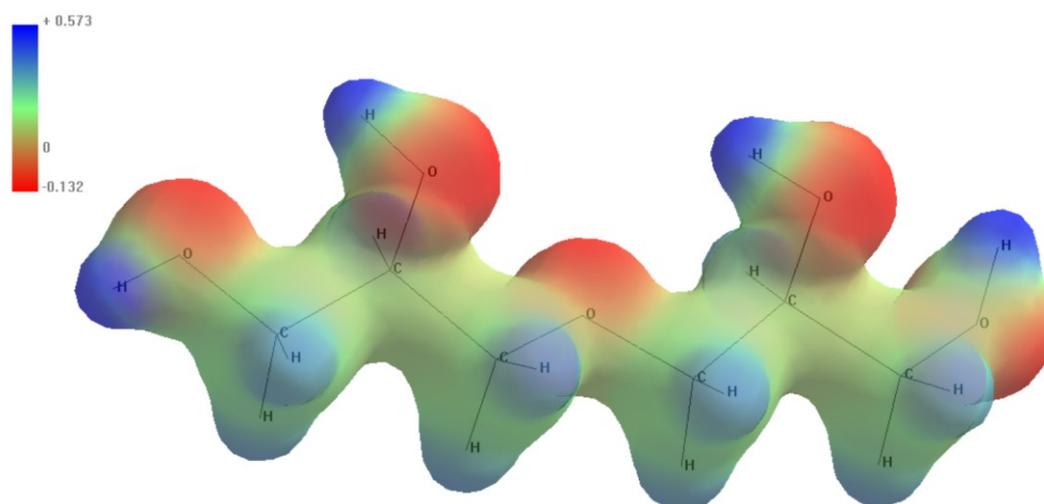
O  $\varepsilon_p$  é definido como a energia de interação de um ponto p de carga positiva localizada no núcleo e os elétrons da molécula, demonstrado na equação 2.6.

$$\varepsilon_p = \sum_A^{\text{nucleo}} \frac{Z_A}{R_{Ap}} - \sum_{\mu}^{\text{funções}} \sum_{\nu}^{\text{de base}} P_{\mu\nu} \int \frac{\phi_{\mu}(\mathbf{r})\phi_{\nu}(\mathbf{r})}{r_p} d\mathbf{r} \quad (2.6)$$

O primeiro termo da equação 2.6 é uma somatória sobre o núcleo A. Os  $Z_A$  são os números atômicos e  $R_{Ap}$  são as distâncias entre o núcleo e o ponto de carga. O segundo termo da equação é composto de somatórias sobre as funções de base  $\phi$ , P é a matriz de densidade e as integrais refletem interações Coulômbicas entre os elétrons e o ponto de carga, onde  $r_p$  é a distância que separa os elétrons e o ponto de carga. Nas regiões onde  $\varepsilon_p$  é positivo, prevalece o efeito do núcleo concentrado sobre os elétrons dispersos. Na maioria das moléculas ocorrem rearranjos de carga eletrônica que acompanham a formação das mesmas, produzindo normalmente uma ou mais regiões de potencial negativo relatado, por exemplo, como pares de elétrons livres ou elétrons  $\pi$  de moléculas insaturadas [118-119]. Cada região como estas descritas, possuem um ou mais locais de mínimos (ex: o mais negativo dos valores negativos). Na Figura 37 ilustra o  $\varepsilon_p$  do glicerol e diglicerol.



Glicerol



Diglicerol

Figura 37 - Potencial eletrostático calculados no HyperChem 5.1 sobre a superfícies moleculares do glicerol e diglicerol. Faixa de função mapeadas de cores: Vermelho, mais negativo e azul escuro, mais positivo.

Neste caso os mapas de potencial mostram claramente o efeito do grupo doador e do grupo retirador de densidade eletrônica. No glicerol e também no diglicerol observamos

regiões de potencial negativo na extremidade onde encontra os oxigênios. O  $\epsilon_p$ , constitui a mais comum e mais importante ferramenta dentre os modelos gráficos (mapas de LUMO, de potencial de ionização, potencial de polarização, dentre outros.). É importante enfatizar que  $\epsilon_p$  é uma propriedade física real, e observável, a qual pode ser determinada experimentalmente, por técnicas de difração de raios X [120], assim como computacionalmente.

Os orbitais moleculares (OM) de um sólido estão fortemente sob a influência uns dos outros e também das moléculas adjacentes, de forma que os níveis de energia não são observados para cada um isoladamente, mas sob a forma de um conjunto de níveis de energia muito próximos entre si, conhecidos por bandas de energia. Tais bandas dependem da estrutura geométrica da célula unitária do sólido e da sua composição química. A banda constituída dos níveis ocupados de menor energia é denominada banda de Valência, enquanto que aquela contendo os níveis mais altos de energia e desocupada é a de condução.

A região existente entre essas duas regiões é chamada “gap” ou banda proibida que define uma região energeticamente proibida aos elétrons e indica a natureza do material. Numa molécula também é possível se observar o agrupamento de níveis eletrônicos em faixas de energia, embora os níveis energéticos sejam nitidamente discretos. Por analogia a nomenclatura adotada para sólidos, é usualmente identificada por estas faixas como bandas de Valência, condução ou proibida.

Na banda de valência o nível eletrônico ocupado de maior energia é chamado HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital). Na banda de condução o nível eletrônico desocupado de menor energia é chamado LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

As energias de HOMO e LUMO são descritores muito eficientes das propriedades eletrônicas de um material. Estes orbitais tem papel fundamental na determinação da reatividade dos compostos poliméricos e das suas bandas eletrônicas. Estes orbitais também determinam a formação de complexos de transferência de carga. A formação dos estados de transições em reações se deve a interação entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO das espécies reagentes. Portanto o tratamento diferenciado para estes orbitais moleculares é baseado em princípios gerais que governam a natureza das reações químicas.

A energia de HOMO é diretamente relacionada ao Potencial de Ionização, grandeza que caracteriza a suscetibilidade da molécula ao ataque de eletrófilos. A energia do LUMO é relacionada à afinidade eletrônica, e caracteriza a suscetibilidade ao ataque por nucleófilos. A

energia de HOMO e LUMO são importantes no caso de reações radiculares. O conceito de “dureza” e “moleza” para nucleófilos e eletrófilos também está diretamente ligado à razão HOMO/LUMO [121]. Nucleófilos “duros” tem HOMO de baixa energia, e nucleófilos “moles” tem LUMO de alta energia. Eletrófilos duros tem alto LUMO e eletrófilos moles tem baixo LUMO.

A lacuna entre HOMO e LUMO é um importante indicador de estabilidade química. Uma grande diferença entre o HOMO e LUMO significa que a molécula tem alta estabilidade, ou baixa reatividade em reações químicas. A diferença entre HOMO e LUMO pode ser usada para aproximar a energia de excitação eletrônica da molécula.

No caso de uma molécula doadora de elétrons, a densidade eletrônica do HOMO é fundamental para a transferência de carga. O descriptor utilizado para este caráter da molécula no átomo “*a*”,  $f_a^{HOMO}$ , é definido pela equação 2.7.

$$f_a^{HOMO} = \sum_n (C_{HOMO}^a)^2 \quad (2.7)$$

sendo:  $C_{HOMO}^a$  e  $n$  os coeficientes dos “ $n$ ” orbitais atômico da camada de valência do átomo “*a*” no HOMO. Analogamente para um receptor de elétrons, a densidade eletrônica do LUMO é importante. Para o orbital LUMO o descriptor utilizado é definido pela equação 2.8.

$$f_a^{LUMO} = \sum_n (C_{LUMO}^a)^2 \quad (2.8)$$

sendo:  $C_{LUMO}^a$  e  $n$  os coeficientes dos “ $n$ ” orbitais atômicos da camada de valência do átomo “*a*” no orbital LUMO.

O mapa da distribuição espacial  $[\psi \text{ mol}]^2$  de um dado OM permite traçar uma superfície, que delimita a região onde há probabilidade de se encontrar um elétron que ocupe esse orbital. O mapa LUMO mostra as regiões de uma molécula onde a população de elétrons é menor. Já o mapa do HOMO mostra as regiões onde a população de elétrons é maior. A Figura 38 ilustra os orbitais HOMO – LUMO para a molécula do Glicerol.

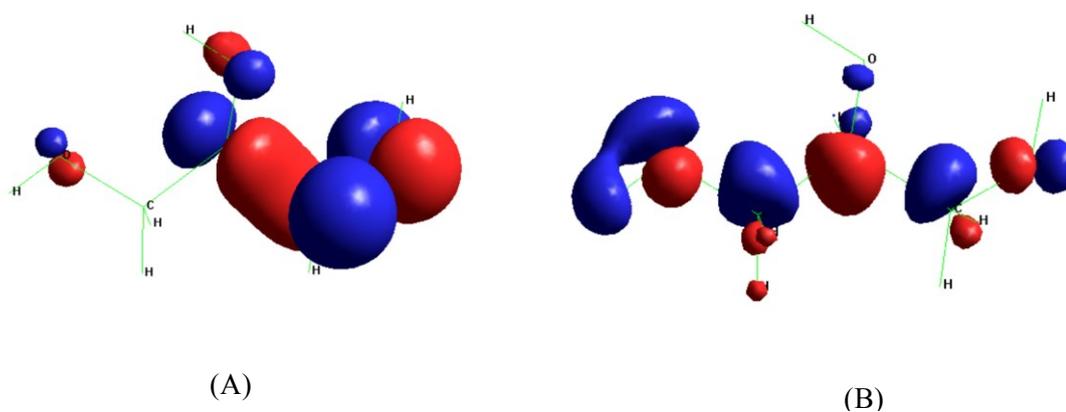


Figura 38 - Representação dos orbitais moleculares HOMO (A) e LUMO (B) para a molécula do Glicerol no Software HyperChem 5.1.

A definição da natureza qualitativa está relacionada com polarizabilidade, geralmente a diminuição na diferença de energia entre HOMO e LUMO facilita a polarização da molécula submetida a um campo eletromagnético orientado. As densidades eletrônicas nos orbitais de fronteira são uma maneira de caracterização detalhada das possíveis interações entre doadores e receptores de elétrons. Espera-se que a maioria das reações químicas aconteça na posição das densidades eletrônicas dos OM's HOMO e LUMO.

# 3

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo reúne de forma detalhada as metodologias empregadas para a preparação do poliglicerol arborescente e sua caracterização físico-química. Também são apresentados os parâmetros físico-químicos utilizados para sua eletrofiação e as condições nas quais foram conduzidas as técnicas de caracterização físico-química e biológicas das membranas de poliglicerol arborescente eletrofiadas.

Síntese e caracterização do PGA

Processo de Eletrofiação do PGA

Modelagem *in silico* do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA

Metodologia - Gromacs

Avaliação Biológica dos Arcabouços

Citotoxicidade

Adesão Celular nos Arcabouços

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de UV-Vis

Análise Térmica

Calorimetria Exploratória Diferencial DSC

Análise Termogravimétrica - TGA

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

### 3.1 Síntese e caracterização do PGA

Para a síntese do PGA foi utilizado um núcleo oligomérico de poliglicerol (PGL). O núcleo oligomérico utilizado para a síntese foi preparado a partir da eterificação da glicerina sob aquecimento (230°C), utilizando o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,34% m/m) como catalizador em atmosfera de nitrogênio sob pressão de 50 mmHg e destilação azeotrópica da água reacional obtendo-se o núcleo oligomérico de decaglicerol ou poliglicerina (PGL-10). O mecanismo da oligoeterificação segue um mecanismo de reação de Williamson onde o glicerol sofre desprotonação em meio alcalino [122]. O rendimento da reação foi maximizado conduzindo a reação em duas fases, sendo a primeira rica em glicerol (contendo o catalisador alcalino) e a segunda contendo olefina, formando poliéteres que podem ser facilmente separados [123].

A purificação do PGL-10 obtido foi feita através da destilação azeotrópica da glicerina não reagida, com tolueno sob pressão de 10 mmHg (p.e. = 85 °C). A reação de eterificação do glicerol para obtenção do PGL-10 está ilustrada na Figura 39.

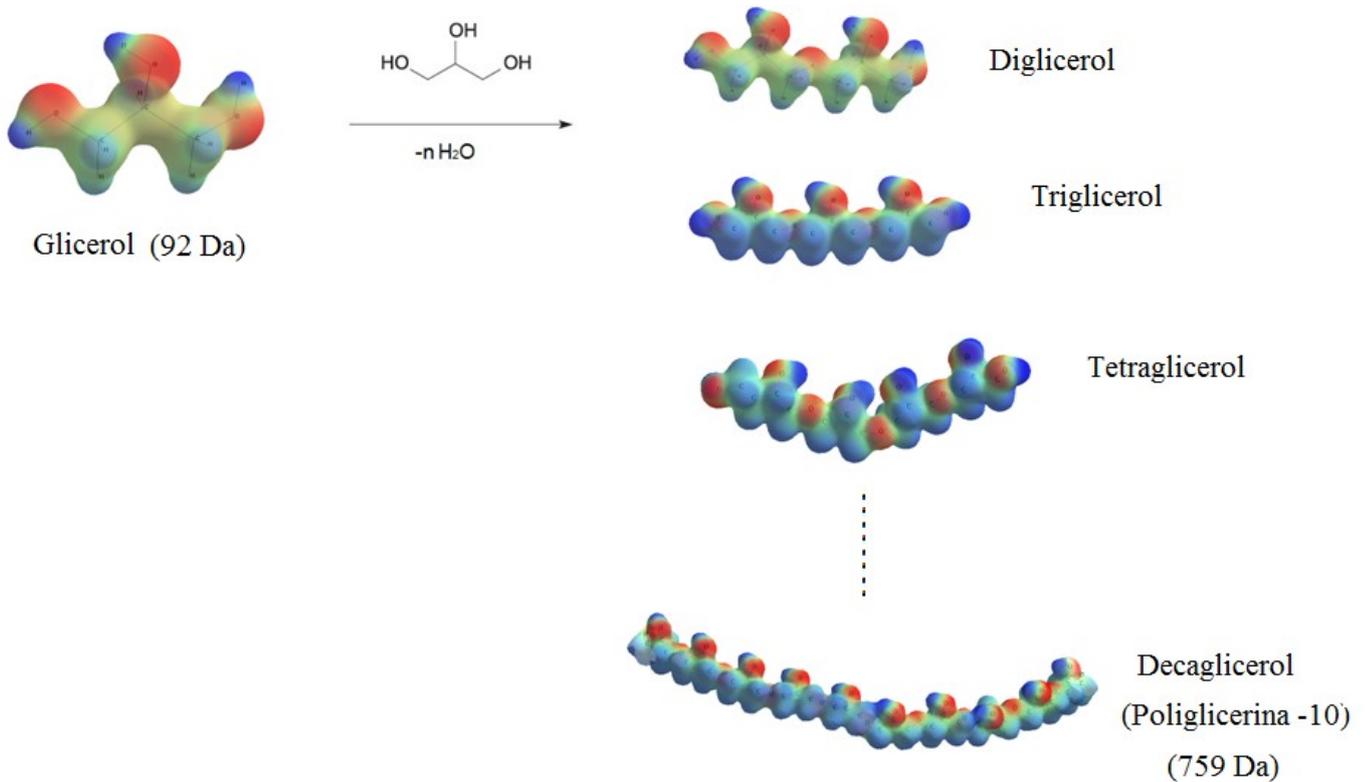


Figura 39 - Ilustração no da reação de obtenção do núcleo oligomérico de PGL-10. O índice n representa o número de moléculas de água removidas durante a reação. Para  $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$  e  $9$ ; os oligômeros formados são: diglicerol, triglicerol, tetraglicerol, pentaglicerol, hexaglicerol, heptaglicerol, octaglicerol, nonaglicerol e decaglicerol; respectivamente.

O índice de hidroxila ( $N_{OH}$ ) do PGL-10 foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6 g) com 10 mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos a solução resultante foi titulada com KOH 1,0 utilizando-se fenolftaleína como indicador. O  $N_{OH}$  foi calculado de acordo com a Equação (3.1) [124]:

$$N_{OH} = \frac{(V_2 - V_1) \times 56,1}{m} + N_A \quad (3.1)$$

sendo  $N_{OH}$  o índice de hidroxila (mg NaOH/g de polímero),  $V_1$  o volume de KOH utilizado na titulação da prova "branca",  $V_2$  o volume de KOH utilizado na titulação da amostra,  $m$  a massa de PGL-10 empregada e 56,1 representa o equivalente-grama do KOH.  $N_A$  representa o número (ou índice) de acidez da amostra.

O  $N_{OH}$  pode ser utilizado para determinar o nível de avanço do processo de esterificação do glicerol, estando relacionado com sua massa molecular (MM) e funcionalidade (F) através da Equação (3.2):

$$MM = \frac{F \times 56,1}{(N_A + N_{OH})} \quad (3.2)$$

Sendo  $N_A$  o número de acidez. Por sua vez, F representa o número de hidroxilas por mol de PGL-10.

A determinação de  $N_A$  foi efetuada após a titulação de 0,2 g de PGL-10 previamente dissolvido em mistura de água/etanol (2:1) com solução padronizada de KOH 0,05 M, utilizando-se fenolftaleína como indicador até aparecimento de coloração rosa. Todas as medidas foram determinadas em triplicata e o cálculo de  $N_A$  foi efetuado através da Equação (3.3) [124-125]:

$$N_A = \frac{V_{KOH} \times 0,1 \times 56,1}{m} \quad (3.3)$$

sendo  $N_A$  [mg KOH/g PGL-10] o número de acidez,  $V_{KOH}$  [L] é o volume de solução de KOH utilizada na titulação, 56,1 representa o equivalente-grama do KOH e m a massa da amostra.

A relação entre a perda de água e a evolução da massa molecular dos oligômeros de glicerol está representada na Figura 40. A massa de água removida durante o processo de esterificação do glicerol foi determinada em separador Dean-Stark. Observa-se uma boa relação linear entre a quantidade de água removida durante o processo de desidratação (n) e a evolução da massa molecular do poliéter (MM), sendo observado um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,999 ( $MM \text{ (Da)} = 75,51n + 90,18$ ).

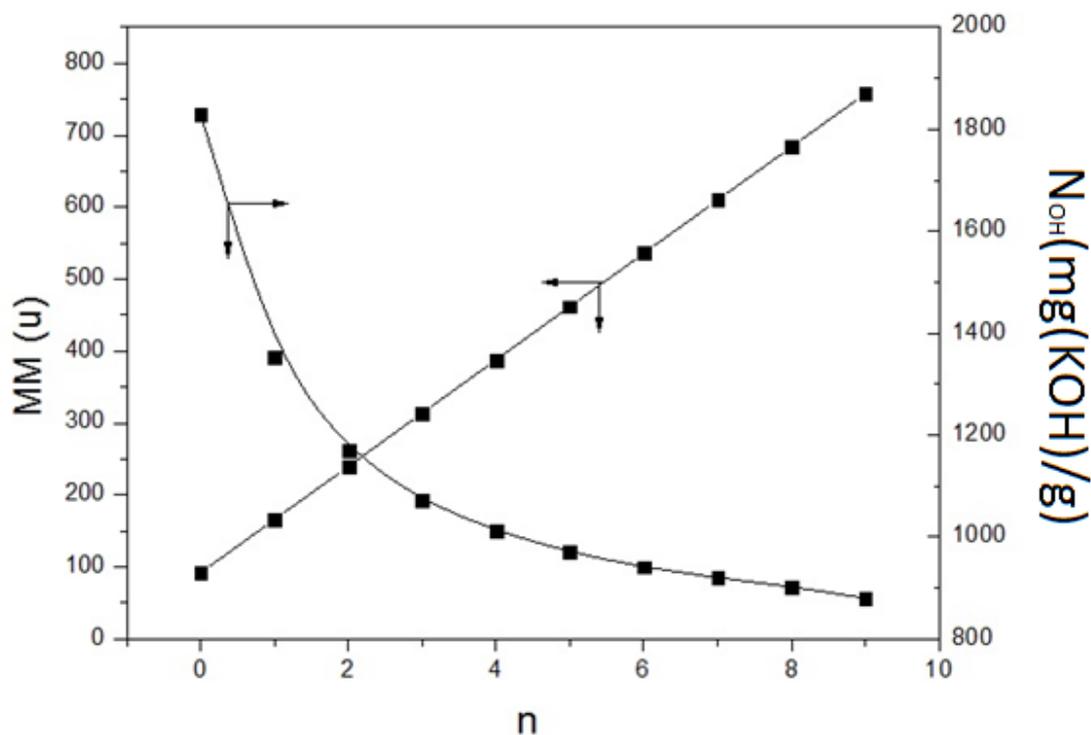


Figura 40 - Relação entre massa molecular (MM) e o número de desidratações (n) envolvidas no processo de oligomerização do glicerol.

A Figura 40 também apresenta os resultados de  $N_{OH}$  em função de n. Foi observada uma redução de  $N_{OH}$  inerente ao processo de esterificação, sendo que para o PGL-10 o valor de  $N_{OH}$  determinado foi igual a 895,1 mg(KOH)/g, equivalente a um número hidroxilas igual a 12 e MM de 762,1 g/mol.

A Figura 41 ilustra o espectro de massa (EM) do PGL-10. Uma quantidade de aproximadamente 10 mg de amostra foi solubilizada em 10 mL de solução água:metanol(1:1) sendo adicionado 0,1% de hidróxido de amônio. Os espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos no modo negativo, num espectrômetro de massa Q-TOF2 Micromass (Manchester, UK). Para as análises 2,5 mL de solução contendo o PGL-10 foi diluída em 200 mL de uma solução 50:50:0.1 (v/v/v) de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas na fonte de ESI a um fluxo de 10 mL/min. Tanto nas análises por MS como nas análises por MS/MS a resolução do analisador de massa de tempo de voo (TOF) foi estimada em aproximadamente 10.000. A voltagem do cone foi de 35 V e a voltagem aplicada no capilar foi de 3 kV. A temperatura da fonte foi

ajustada para 80 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 150 °C. Os espectros de MS/MS foram obtidos utilizando argônio como gás de colisão, estando as energias de colisão situadas entre os 20 e 45 eV. Os resultados foram processados utilizando o software MassLynx.

A análise do EM permite a identificação dos íons de massa referente ao PGL-10, pois a massa molar do glicerol é 92u. Uma vez que a cada etapa de desidratação 1 mol de glicerol (massa molar 92 u) é incorporado após a perda de uma molécula de água, se terá a massa molecular de 166 Da para o diglicerol. O processo de esterificação para formação do PGL-10 leva à perda de 162 Da de água, o que fornece uma massa molar para o PGL-10 igual a 758 u. A análise dos espectros de massa de ESI-MS revelou um valor de  $m/z$  igual a 757,3, correspondente ao (PGL-10 – H).

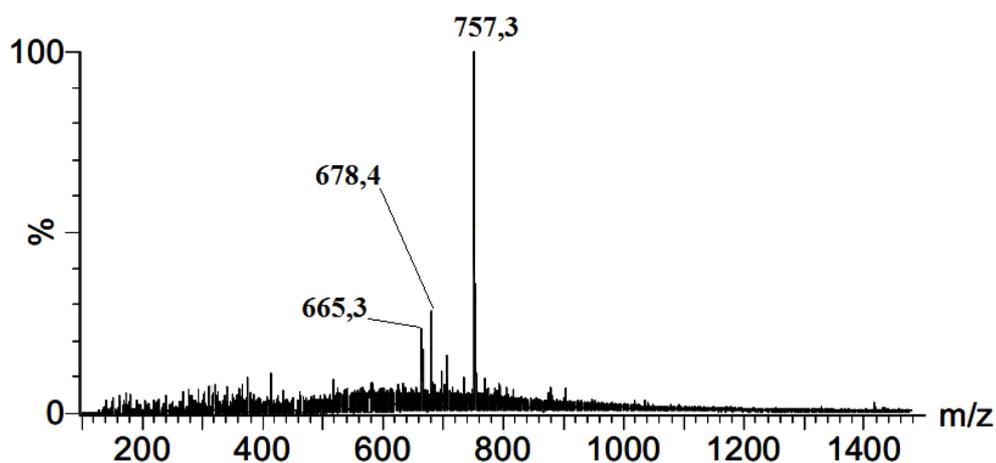


Figura 41 - Espectro de ESI-MS obtido para o PGL-10.

O PGA de gerações (G) 0, 2 e 4 foi sintetizado pelo método divergente seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação a partir do núcleo de PGL-10, seguindo metodologia adaptada da literatura [126-127]. A Figura 42 ilustra o processo de obtenção do PGA a partir do núcleo de PGL-10.

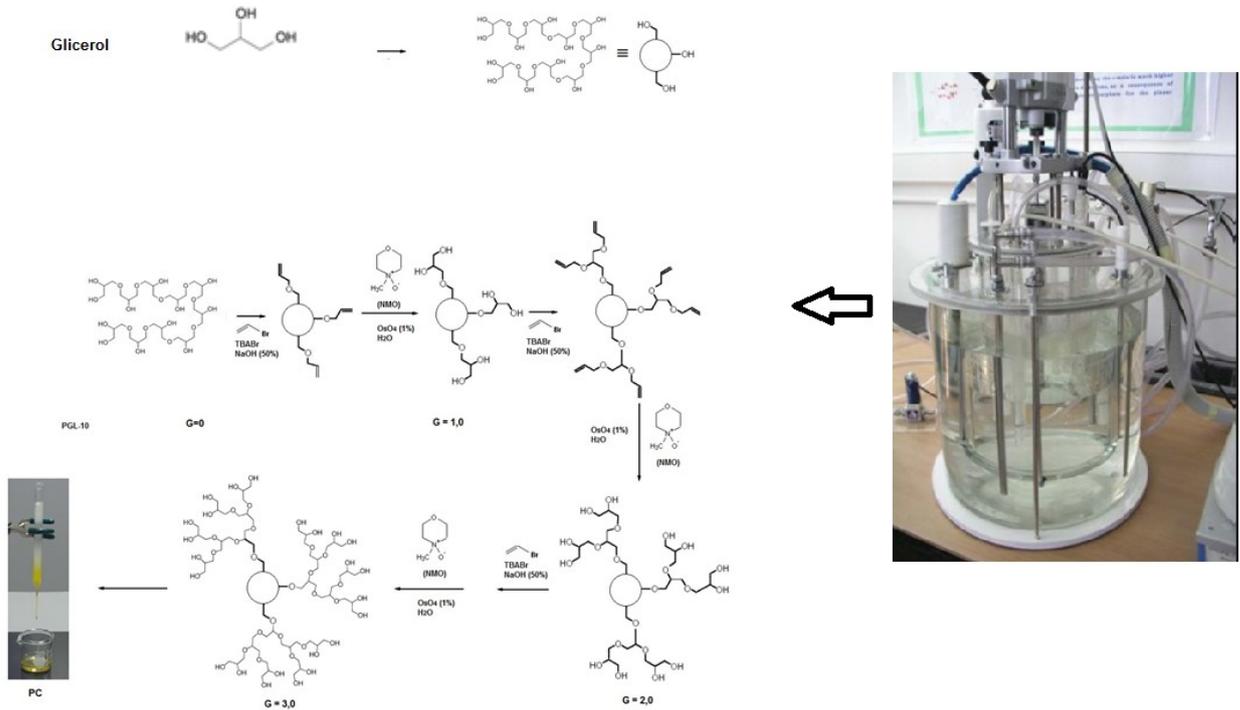


Figura 42 - Ilustração do processo de síntese dos PGA G= 1, 2, 3 e 4 utilizando a rota sintética adaptada de Williamson. TBABr = Brometo de tetrabutil amônio, NMO = N-óxido de N-metil morfolina, OsO<sub>4</sub> = tetróxido de ósmio (solução aquosa), PC = purificação cromatográfica [128-129].

A pureza dos PGA (G=0, 2 e 4) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi observado o tempo de retenção ( $t_R$ ) de 28,6 min. para o PGA de geração 3 (G = 3,0) (Figura 43-A). A dependência de  $t_R$  em função de G está ilustrado na Figura 43-B. Os valores do tempo de retenção neste sistema de análise (filtração em gel) estão diretamente relacionados com o tamanho molecular do composto que está sendo analisado, portanto, o PGA de maior G apresentará a filtração mais lenta por ser a molécula maior. O melhor ajuste na análise da dependência de  $t_R$  em função de G indicou ser o exponencial (Figura 43-B).

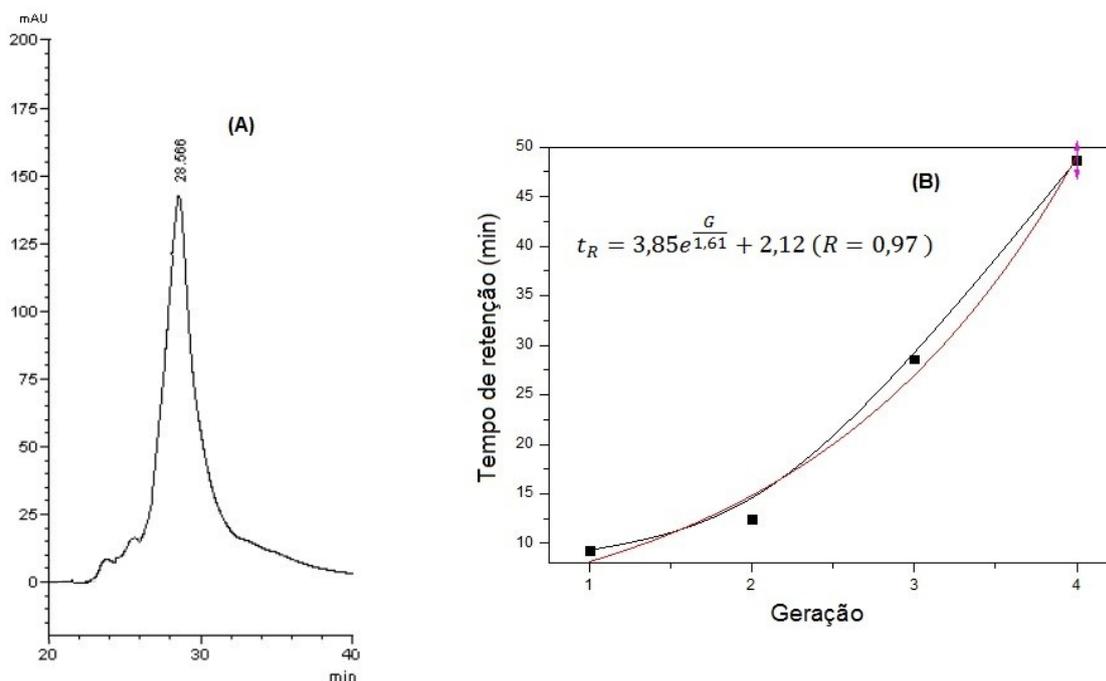


Figura 43 - Perfil cromatográfico CLAE do PGA (G3) (A) e dependência entre  $t_R$  e o número de geração do PGA (B).

O rendimento do processo de síntese foi de 88% ( $G=3,0$ ), tendo os PGA obtidos as seguintes características espectroscópicas (os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Bruker ARX300 a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente): RMN-H, (300 MHz,  $D_2O$ ), deslocamentos ( $\delta$ , ppm): 4,8 (OH); 4,04 ( $CH_2-OH$ ;  $CH-OH$ ;  $CH_2-O-CH_2$ ;  $CHO-CH_2$ ); RMN- $^{13}C$  (75 MHz,  $D_2O$ ), deslocamentos ( $\delta$ , ppm): 64-64 ( $CH-CH_2-O-CH_2$ ) 70-75 ( $CH-OH$ ;  $O-CH_2$ ;  $CH_2-OH$ ) E 80( $CHO-CH_2$ ). Os sinais obtidos na espectroscopia de RMN estão em boa concordância com os valores da literatura [130].

### 3.2 Processo de Eletrofição do PGA

Para a obtenção de membranas eletrofiadas foi utilizado um PGA de geração G4. PGA de gerações inferiores não levaram à obtenção de membranas estáveis, provavelmente devido à sua massa molecular mais elevada relativamente aos PGA de menor geração. A literatura indica que uma das variáveis de processo da eletrofição de polímeros consiste em se garantir uma massa molecular suficientemente adequada para se

atingir níveis de viscosidade de solução que propiciem o entrelaçamento entre as cadeias do polímero [131-132]. Assim, a massa molecular elevada do PGA G=4 parece levar a um aumento do nível de entrelaçamento entre as cadeias do polímero, evitando assim a quebra do jato da solução polimérica que está sendo alongada durante o processo de eletrofiação.

No processo de eletrofiação do PGA foi utilizada uma mistura de DMF/acetona na proporção 75/25 em volume. A adição da acetona como solvente foi realizada de modo a se obter uma solução volátil o suficiente para facilitar a formação das fibras no processamento de eletrofiação. Uma concentração de 25% em massa de PGA foi dissolvida inicialmente em DMF à temperatura ambiente (25 °C) por 4 horas. Em seguida, a solução foi completada com acetona e mantida sob agitação durante todo o tempo de preparação da solução.

O processo de eletrofiação foi realizado à temperatura ambiente (~25°C) e umidade de aproximadamente 50% (desumidificador de ar GR2, Maxlabor). A montagem do equipamento envolveu a utilização de uma bomba infusora (B. Braun), seringa de vidro de 20 mL conectada a uma agulha de aço para raquianestesia de 120 mm de comprimento e 0,53 mm de diâmetro (Braun 25 G), uma fonte de alta tensão (20 kv) e uma placa de acrílico de 100 mm x 200 mm revestida de alumínio (anteparo coletor). O sistema para eletrofiação está ilustrado na Figura 44.

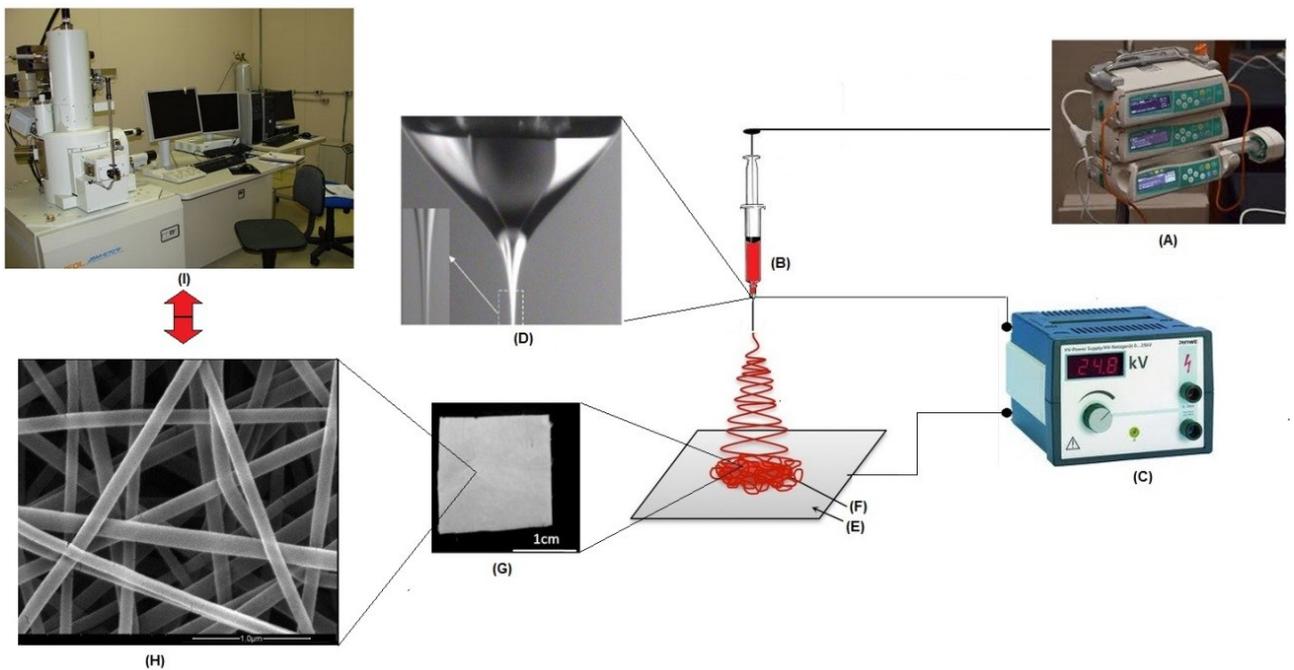


Figura 44 - Montagem experimental para o processo de eletrofição: Bomba infusora (Braun), Seringa de vidro (20 mL) (B), fonte de alta tensão (Phywe) (C), detalhe do cone de Taylor formado após aplicação do campo elétrico (D), placa coletora de alumínio (E), deposição das fibras (F), aspecto da membrana formada (G) e microestrutura da membrana formada (H) caracterizada através da microscopia eletrônica de varredura (I).

As condições operacionais de eletrofição favoráveis para a formação de membranas efetuaram-se com base em observações visuais e imagens das membranas obtidas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram efetuadas observações quanto à tensão aplicada, distância agulha-coletor e o fluxo da solução. As condições aperfeiçoadas para a obtenção de membranas estáveis mecanicamente são apontadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no processo de eletrofição de modo a se obter membranas estáveis.

Distância capilar-coletor (cm)	Tensão (kV)	Fluxo da solução PGA/Solvente (mL/h)
15	20	0,5

A distância entre a agulha e o coletor foi de 15 cm. Distâncias inferiores a 15 cm levaram à perda da solução polimérica por deposição fora do coletor. O fluxo da solução durante o processo de eletrofiação foi de 0,5 mL/h pois fluxos inferiores levam à formação de defeitos como estrutura de gotas devido à desestabilização do cone de Taylor. Aplicou-se valores de tensão de 20 kV para a formação de membranas. Valores inferiores a 20 kV não contribuíram para a formação de membranas estáveis.

As soluções poliméricas foram transferidas para uma seringa de vidro de 20 mL, ligou-se a fonte e aplicou-se a tensão de 20 kV após a formação da primeira gota na agulha. Quando a tensão foi aplicada entre o capilar e o coletor a gota adquiriu a forma do cone de Taylor ocorrendo em seguida à formação de um jato aleatório da solução polimérica que se dirigiu para o coletor revestido de papel alumínio. O solvente evaporou durante a trajetória do jato formando-se uma membrana estável mecanicamente no coletor de alumínio. Em seguida, as membranas foram submetidas à luz UV de 280 nm para cura por 30 min, lavadas com água bidestilada e liofilizadas.

### **3.3 Modelagem *in silico* do mecanismo reacional de síntese e propriedades físico-químicas do PGA**

O pacote de modelagem molecular utilizado neste trabalho foi o Hyperchem, disponível na web com diferentes versões de “demos”. Inicialmente desenhou-se as moléculas de oligômeros de PGL no software e realizou os cálculos quânticos utilizando o método semi-empírico PM3 (parametric method 3), aproximação RHF e gradiente inferior a 0,1 ps. Em seguida foi feita a otimização geométrica da molécula. A otimização da geometria é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse, deixando a molécula em sua conformação de menor energia. Desta etapa obteve-se as Cargas de Mulliken, determinação dos orbitais de fronteira HOMO-LUMO, Calor de formação, Mapa de potencial eletrostático, Momento de dipolo e a Superfície de van der Waals.

### 3.4 Metodologia - Gromacs

Para investigar a estrutura dos oligômeros de poliésteres foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM). Este método consiste em resolver as equações de Newton acopladas para todas as partículas do sistema. Logo, é necessário o uso de um programa tipo "core" (programa que realiza os cálculos científicos) como o Gromacs.

O primeiro passo para se iniciar a simulação de (DM) foi inserir um arquivo de estrutura molecular (*arquivo. pdb*) para cada oligômeros de PGL(s) e de PGA.

Se desenhou as moléculas no Software HyperChem 5.1 para realização dos cálculos quânticos e utilizando o método semi-empírico PM3 (parametric method 3) e em seguida foi feita a otimização geométrica da molécula. A otimização da geometria é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse, deixando a molécula em sua conformação de menor energia. Desta etapa obtêm-se as Cargas de Mulliken, utilizadas como arquivo de entrada para o programa Mktop. Utilizando o programa Open Babel (programa que converte formatos de arquivos gerados por softwares químicos) transformando o arquivo de extensão.hin (gerado pelo HyperChem) para extensão.pdb. Para iniciar a preparação da dinâmica molecular no Gromacs é necessário ter o arquivo de extensão.pdb e o arquivo de topologia. O arquivo de topologia (extensão.top) foi gerado pelo programa Mktop [133], software gratuito capaz de construir topologias moleculares para o GROMACS, utilizando o campo de força OPLS-AA. Para que a topologia fosse gerada foi necessário dois arquivos de entrada, o arquivos.pdb e o arquivo.txt, sendo este último o que contém as cargas de Mulliken.

As simulações moleculares foram realizados utilizando software GROMACS 4 [134]. Em cada sistema simulação, a água foi modelada com o modelo TIP3P [135] e as proteínas foram modelados com o campo de força OPLS -AA [136] implementado no GROMACS; cada sistema também incluiu 100 mM de NaCl, com parâmetros utilizados da literatura para descrever os íons [137-138], a um sistema de pH de 7,0. NaCl foi usado devido ser os íons predominantes presente no organismo biológico humano. O tamanho do sistema de cada simulação foi dependente do volume específico de cada proteína, determinada por Hydropro [139], o volume final da caixa foi ajustado de modo a que cada sistema contivesse 100 , 200 ou 300 mg / mL de PGL 3350 com 6, 12 e 18

moléculas PGL, respectivamente. Todas as simulações usaram uma caixa dodecaédrica com aproximadamente  $80\text{Å}$  de distância entre o centro de um sistema para o outro da imagem, e aplicada com condições de contorno periódicas.

Todas as estruturas de PGL foram primeiramente energia minimizada utilizando o algoritmo mais íngreme de descida para 1000 passos e, em seguida, gradualmente aquecido a 310 K ( $37^\circ\text{C}$ ) ao longo de 500 ps no conjunto TNP, durante este período inicial, a uma pressão de 1 atm, foi mantido com a Berendsen baróstato [140] e a temperatura foi mantida com termostato Berendsen [141]. Imediatamente após, cada sistema foi equilibrada por mais de 10,5 ns no conjunto NPT, a mudança para os sistemas de acoplamento canônicos do Parrinello -Rahman baróstato à pressão de 1 atm e o termostato Nosé -Hoover [142-143] em 310 K. Cada simulação de produção durou 500 ns no esquema de ligação canônica. Pontos de corte para ambos os de curto alcance eletrostáticas e van der Waals foram definidos a  $10\text{Å}$ , e as interações eletrostáticas de longo alcance utilizado o método [144] Particle malha Ewald (PME). Um intervalo de tempo de 2,5 fs foi empregado com todas as ligações covalentes restringidas usando o algoritmo LINCS [145]. Todas as coordenadas atômicas foram salvas em um intervalo PS para análise posterior.

Os passos de simulação (DM) no Gromacs podem ser vistos no fluxograma abaixo na Figura 45 [146]:

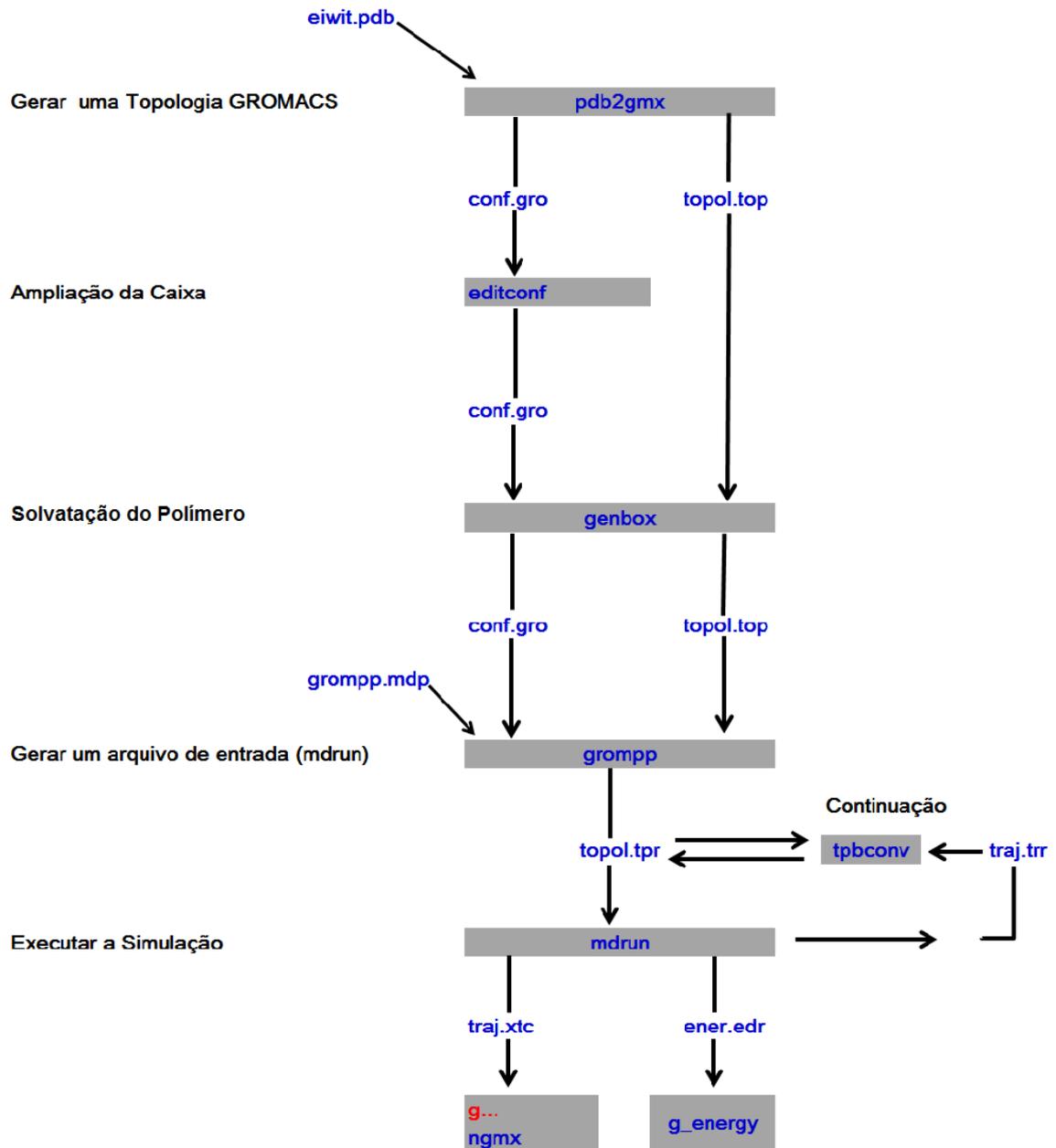


Figura 45 - Fluxograma de (DM) - Gromacs 4.0. Adaptado de [146].

### 3.5 Avaliação Biológica dos Arcabouços

#### 3.5.1 Citotoxicidade

Os estudos sobre a citotoxicidade do material foram conduzidos segundo a norma ISO 10993 [147] e a técnica aplicada nos experimentos foi a de coloração com o corante supra vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico) e reagente acoplador de elétrons PMS (fenazina metassulfato).

Foi preparado um extrato do polímero em meio RPMI contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico, na proporção de 6cm<sup>2</sup> da amostra para cada mL de meio extrator. O meio extrator em contato com as amostras foi incubado por 24 horas a 37°C e em seguida filtrado com filtros de seringa com poros de 0,22µm. A solução resultante foi submetida à diluição seriada 1:2 até a concentração de 6,25%. Em uma placa de 96 poços, uma suspensão celular em meio RPMI com soro de 100µL com  $1 \times 10^4$  células de linhagem permanente de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foi previamente incubada por 24 horas, antes da exposição com o extrato das amostras. Após este período, 100µL de cada extrato foram pipetados em quadruplicata e 100µL de meio de cultura RPMI com soro pipetado nos poços controle e nos poços do branco. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, uma solução de 80µl de meio RPMI com soro e 20µL da solução 20:1 MTS/PMS foi adicionada em cada poço e as placas incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por duas horas. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Device®) no comprimento de onda 490nm.

A disposição do extrato, dos controles e do branco nas placas de 96 poços está ilustrada na Figura 46.

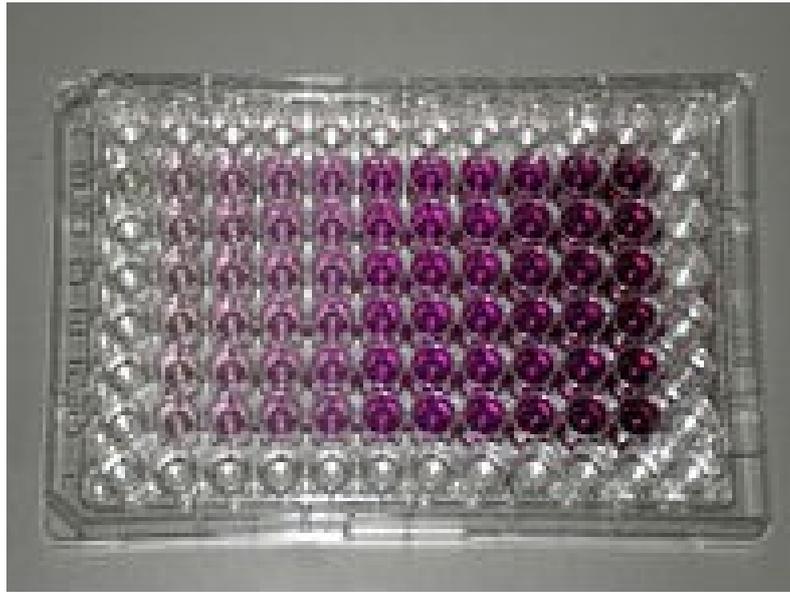


Figura 46 - Ilustração da distribuição em uma placa de cultura de 96 poços do branco, dos controles e das diluições do extrato de uma amostra em um teste de citotoxicidade.

### **3.5.2 Adesão Celular nos Arcabouços**

#### **3.5.2.1 Cultura Celular**

A análise da adesão celular foi promovida com células do tipo fibroblastos, da linhagem celular imortalizada BALB3-T3 (ATCC). As células foram previamente cultivadas em placas de cultura e posteriormente aplicadas nos suportes poliméricos com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de DBS (Donor Bovine Serum), 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico. Os suportes foram acondicionados em duplicata em placas de 12 poços e esterilizados com radiação gama. Após esta etapa, foi aplicado meio de cultivo DMEM (10% DBS, 1% L-glutamina, 1% antibiótico/antimicótico) para acondicionamento das membranas por 20 minutos. Os fibroblastos BALB/3T3 (ATCC) foram semeados na concentração de  $1 \times 10^4$  sobre os suportes com o auxílio de um anel de aço inoxidável de 1cm de diâmetro, delimitando desta maneira a área de aplicação. Após 48 horas de cultivo os anéis foram retirados e o meio de cultura DMEM (10% DBS, 1% L-glutamina, 1% antibiótico/antimicótico) foi

trocado. Após mais 24 horas, as células foram fixadas nos suportes com glutaraldeído 2,5% por 10 minutos, lavadas com PBS e secas a temperatura ambiente (25 °C).

### **3.5.2.2 Microscopia Óptica de Fluorescência**

As amostras foram acondicionadas por cinco minutos com o fluoróforo alaranjado de acridina diluído em PBS na concentração  $6,67 \times 10^{-5}$  e analisadas em um microscópio de fluorescência Carl Zeiss, modelo Axioskop 40, nas ampliações de 20x e 40x.

### **3.5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para observação da morfologia celular, as amostras foram previamente desidratadas em solução etanólica seriada (20%, 30%, 50%, 70% e 90%), secas no ponto crítico e metalizadas com ouro e analisadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-7401F.

## **3.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Radiações eletromagnéticas com energias inferiores às energias do espectro visível são chamadas de radiação no infravermelho. A radiação infravermelha (IR) é classificada como uma radiação térmica. Desta forma, uma radiação IR é capaz de estimular as moléculas de nossa pele e fazê-las vibrar. As vibrações são detectadas pelas células nervosas que interpretam o sinal como uma sensação de calor (Figura 47).

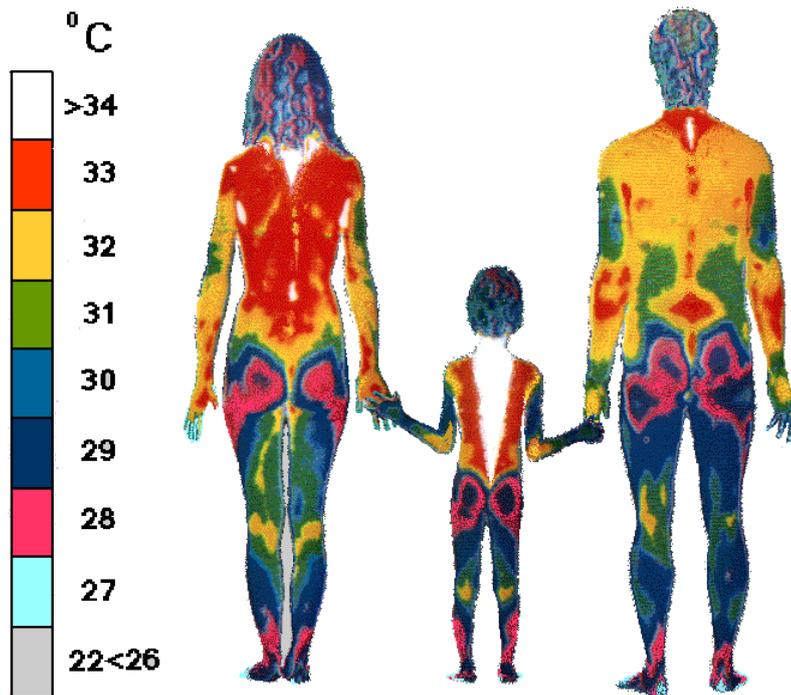


Figura 47 - Termográfica (IR) do corpo humano. Adaptado de [148]

As radiações eletromagnéticas na região do espectro IR são divididas em três regiões: IR próximo ( $14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), IR médio ( $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ) e IR distante ( $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ).

A espectroscopia IR é uma técnica que pode também ser utilizada para identificar moléculas através da análise da frequência vibracional de suas ligações químicas. Cada ligação química em uma molécula vibra a uma frequência característica e, geralmente, esta frequência se encontra dentro do intervalo de radiação infravermelha.

Considerando uma molécula diatômica, os átomos se mantêm unidos através da ligação covalente mediante a sobreposição de seus vários orbitais atômicos. A uma certa distância internuclear existe um balanço entre as forças atrativas (elétron-núcleo) e repulsivas (elétron-elétron, núcleo-núcleo). Considerando o sistema como um oscilador harmônico, pode-se escrever que a relação entre a frequência de vibração e a constante de força da mola (ligação química) a frequência vibracional será dada por:

$$V = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.4)$$

$$\mu = \frac{M_1 M_2}{M_1 + M_2} \quad (3.5)$$

Sendo  $v$  a frequência normal de vibração das massas,  $k$  é a constante de força (medida de sua rigidez e  $\mu$  é a massa reduzida).

Observa-se experimentalmente que quanto mais forte ou rígida for a ligação química, maiores serão as frequências observadas. Por outro lado massas atômicas menores tendem a originar frequências maiores. Portanto, as observações experimentais estão em boa concordância com a Equação (3.4).

Apesar do êxito, existem algumas limitações da Equação (3.4), principalmente nos extremos de vibração molecular onde a expressão deveria contemplar tanto a repulsão inter-eletrônica quanto a dissociação molecular. Adicionalmente não se pode deixar de mencionar que a teoria quântica para a matéria mostra que os níveis de energia são quantizados de acordo com a teoria ondulatória de Schroedinger onde as energias permitidas são dadas pela equação (3.6):

$$E = hv \left( v + \frac{1}{2} \right) \quad v = 1, 2, \dots \quad (3.6)$$

O estado energético do oscilador harmônico não possui energia vibracional zero, mas  $E = 1/2hv$ , enquanto que a separação entre os níveis de energias adjacentes é dado por  $hv$ .

As vibrações nas moléculas poliatômicas são muito mais complexas do que simples molécula diatômica que só vibra pelo modo estiramento. O número de modos de vibração independentes em uma molécula de  $N$  átomos é calculada assumindo que o movimento de cada átomo pode ser descrito em termos de deslocamentos ao longo de três direções espaciais, por isso vamos considerar deslocamentos  $3N$  (a molécula tem  $3N$  graus de liberdade). Três combinações destes deslocamentos resultam no movimento no

espaço de toda a molécula e deste modo, corresponde à tradução do seu centro de massa. Se a molécula é não-linear, três outras combinações de deslocamentos especificam a rotação de toda a molécula em torno do seu centro de massa, que são combinações de átomos de  $3N-6$  deslocamentos saiam do centro de massa e orientação a molécula é inalterada, e são distorções de molécula de interesse.

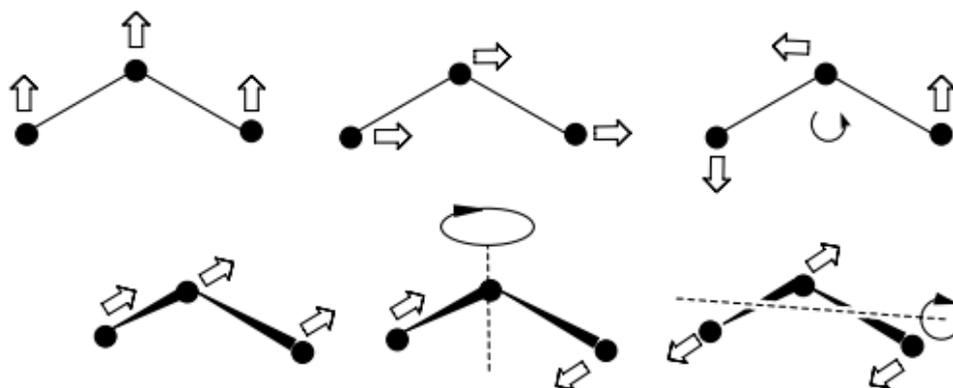


Figura 48 - Modos normais de vibração de uma molécula. Adaptado de [149].

Estes modos são normais e assim os movimentos independentes norteiam o grupo de átomos que formam a molécula, uns com os outros e a sua característica de frequência de vibração (Figura 49). Embora esses movimentos são coletivos, em muitos casos, é possível identificar o tipo de vibração como alongamento principalmente ou flexão.

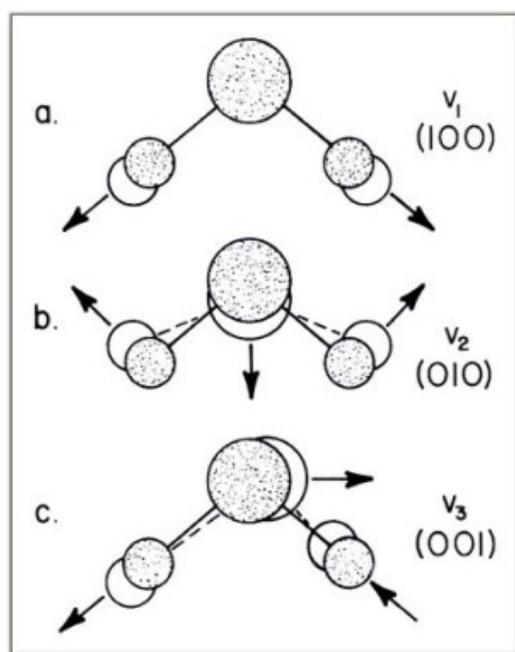


Figura 49 - Os tres modos normais de  $\text{H}_2\text{O}$   $\nu_1 = 3652 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$ . Adaptado de [149].

À medida que aumenta o número de átomos na molécula maior, o número de modos normais e a dificuldade de visualizá-los individualmente. O conhecimento da simetria da molécula como um todo é simétrica para cada modo normal, crucial para racionalizar o estudo das vibrações moleculares. A Teoria de grupo aborda o conhecimento em profundidade de simetria e é uma obrigação para a compreensão teórica da ferramenta de espectroscopia vibracional.

Nem todos os modos normais de uma molécula necessariamente aparecem no espectro nos picos de absorção, que é determinada para a seleção da simetria da mesma molécula:

- O requisito geral para absorver a radiação infravermelha é que a vibração deva produzir uma alteração líquida no momento dipolar da molécula. (Inativo  $\text{N}\equiv\text{N}$ ;  $\text{C}\equiv\text{O}$  ativa),
- Moléculas altamente simétricas freqüentemente pares ou trios de modos são idênticos. Neste caso, eles são chamados modos de vibração degenerados dando origem a uma única banda. (Ex.  $\text{W}(\text{CO})_6$  uma única faixa que se estende),

- Regra de exclusão: Se uma molécula não possui um centro de inversão de seus modos normais pode estar ativo em um momento em IR e Raman, que pode ser um modo de repouso em ambos,
- As vibrações têm frequências muito próximas, muitas vezes aparecem como uma única banda,
- As vibrações de baixa intensidade não podem ser observadas.

Neste trabalho foi utilizado o espectrômetro IR PerkinElmer Spectrum™100 do Laboratório de Biomateriais da UNIFEI (Figura 50).



Figura 50 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

### 3.7 Espectroscopia de UV-Vis

A espectroscopia de UV-Visível baseia-se na absorção de energia, por átomos e moléculas, na região de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 190-800 nm, gerando-se portanto, transições eletrônicas do estado fundamental a estados excitados (Figura 51). A absorção da radiação está diretamente ligada ao fato de as moléculas terem elétrons que pode ser promovidos a níveis de energia mais elevados por decorrência da absorção da radiação.

Desta forma cada transição eletrônica que ocorre resultará em uma absorção específica e característica [150].

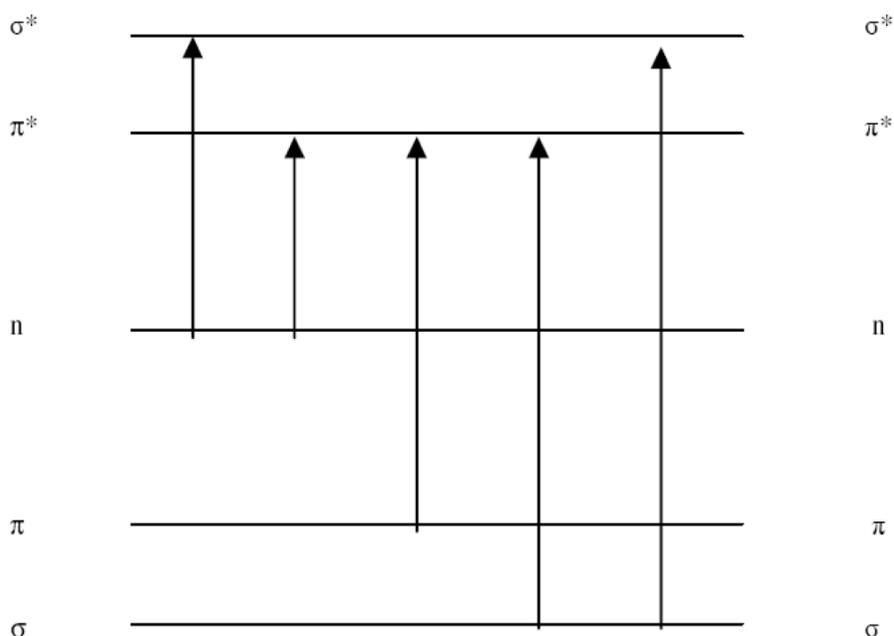


Figura 51- Níveis de energia eletrônicos e seus estados de transição. Adaptado de [151].

A aparição de uma banda no espectro de UV-Vis está diretamente vinculada à presença de um grupo cromóforo no composto em questão. Um grupo cromóforo, por tanto, é um grupo funcional que possui elétrons capazes de absorver energia UV-Vis e passar a um estado energético excitado. Quando da perda deste excedente de energia, os elétrons retornam ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de luz equivalente a banda no respectivo espectro.

Por conta de restrições envolvendo simetria, que controlam a intensidade das transições eletrônicas, somente quatro transições são observadas e permitidas, sendo elas: elétrons não ligados para orbitais antiligantes de mesma simetria ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) e de elétrons não ligados, ou seja, elétrons de orbitais atômicos, para orbitais moleculares antiligantes ( $n \rightarrow \sigma^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ ) [152]. Na Figura 52 ilustração do Espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 UV-Vis do Laboratório de Biomateriais da UNIFEI.



Figura 52 - Espectroscopia de UV-Vis.

### 3.8 Análise Térmica

Análise térmica é o termo utilizado para definir um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a um *software* que controla a temperatura [153]. Dentre as técnicas termoanalíticas (TA), a derivada termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC).

#### 3.8.1 Calorimetria Exploratória Diferencial DSC

Um polímero pode existir em três estados físicos: vítreo, altamente elástico e fluido viscoso. É importante ressaltar que a passagem de um estado físico a outro não ocorre em uma temperatura definida, mas em certo intervalo de temperaturas onde existe uma variação gradual nas propriedades termodinâmicas do material. Neste caso os valores médios da temperatura na região de transição são denominados de temperatura de transição [154].

A transição do estado vítreo para o estado altamente elástico é denominada de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e comumente se associa a este estado a estrutura de

um líquido congelado. A temperatura de Tg é comumente associada a uma transição de fase de segunda ordem uma vez que os potenciais termodinâmicos são contínuos, mas a primeira e segunda derivada são caracterizadas por exibirem uma variação brusca com a temperatura, conforme a Equação (3.7):

$$\frac{\partial^2 G}{\partial P^2} = \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T; \frac{\partial^2 G}{\partial P \partial T} = \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_P; \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = -\frac{c_p}{T} \quad (3.7)$$

A temperatura de transição vítrea pode ser medida experimentalmente pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica que tem sido amplamente utilizada na obtenção de informações relativas ao estado sólido das substâncias macromoleculares [155]. Neste caso, na transição de fase correspondente à temperatura vítrea (Tg) a técnica DSC exibirá uma resposta endotérmica correspondente a uma variação na capacidade calorífica do material. Embora exista uma certa controvérsia com relação ao equilíbrio de fases em um sistema macromolecular, existe um consenso no meio científico de que a Tg de um material polimérico está diretamente relacionada às interações intermoleculares de longo ou curto alcance bem como interações intramoleculares na cadeia da macromolécula [156].

A natureza da estrutura arborecente com relação à existência de grupos funcionais polares ou apolares na periferia da macromolécula exerce uma influência significativa nas propriedades macroscópicas do polímero destacando-se a temperatura de transição vítrea e seu comportamento reológico. Na Figura 53 ilustra o Termoanalizador Shimadzu DSC -60 do Laboratório de Biomateriais.



Figura 53 - Ilustra o calorímetro exploratório diferencial do Laboratório de Análise Térmica da UNIFEI.

### 3.8.2 Análise Termogravimétrica - TGA

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica simples que permite medir a variação de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou do tempo. As medidas são realizadas numa determinada atmosfera, geralmente gás nitrogênio (para condição de atmosfera inerte), ou em ar ou gás oxigênio (para uma atmosfera oxidante), onde a massa da amostra é monitorada por uma balança eletrônica altamente sensível. É utilizada para caracterizar a decomposição e estabilidade térmica dos materiais bem como para examinar as cinéticas dos processos físico-químicos que ocorrem na amostra. Na Figura 54 o Termoanalisador TA 4000, Mettler, dotado de uma microbalança M3 com capacidade máxima para 150 mg e sensibilidade de 1 mg; forno TG50 capaz de operar até 1000 °C, controlado por um microprocessador TC-11 do Laboratório de Biomateriais da UNIFEI.



Figura 54 – Equipamento de análise da marca Metler Toledo do laboratório de análise térmica do Laboratório de Biomateriais.

### **3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)**

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 x) de resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados.

O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons, gerados dentro da coluna de alto vácuo, por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro

e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra.

A Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre determinado material, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento e onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais elementos químicos estão presentes naquela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição atômica em amostras de tamanhos muito reduzidos ( $<5\ \mu\text{m}$ ), permitindo uma análise quase que pontual. Na Figura 55 a ilustração do Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Shimadzu SS550 Superscan do Laboratório de Biomateriais.



Figura 55 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Shimadzu, modelo SS 550.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão organizadas as informações obtidas e os comentários relevantes sobre a síntese e caracterização físico-química do poliglicerol arborescente, precursor polimérico das membranas eletrofiadas. Acreditou-se que a apresentação dos resultados paralelamente às discussões pertinentes, tornará o capítulo mais inteligível e sequenciado. São apresentados os resultados das caracterizações físico-químicas e biológicas das membranas eletrofiadas. No que concerne às caracterizações físico-químicas das membranas eletrofiadas, foram exploradas as técnicas espectroscopia vibracional (FTIR), as técnicas termoanalíticas TGA e DSC, a difusão de fluido simulado do corpo e a microscopia eletrônica de varredura para a investigação microestrutural. O método de dinâmica molecular utilizando o software Gromacs foi utilizado na interpretação do processo de intumescimento das membranas de poliglicerol eletrofiadas em solução de fluido simulado do corpo. O comportamento da membrana eletrofiada de poliglicerol arborescente quanto à sua citotoxicidade a células de mamíferos e aos

# 4

Síntese do poliglicerol (PGL) como núcleo oligomérico

Análise da síntese do PGL utilizando química quântica computacional

Síntese de membranas de PGA por eletrofição e estudo de suas características físico-químicas

Absorção de água

Ensaio biológicos

Citotoxicidade

Ensaio de Adesão e Proliferação Celular

processos de adesão e proliferação celular são apresentados.

#### 4.1 Síntese do poliglicerol (PGL) como núcleo oligomérico

É bem conhecido na literatura que o glicerol sofre oligomerização na presença de catalisadores de caráter básico tais como NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaO em um mecanismo do tipo SN<sub>2</sub> (Substituição Nucleofílica de Segunda ordem) com destilação direta da água reacional originando poliéteres alifáticos cuja estrutura geral está ilustrado na Figura 56 [157-158].

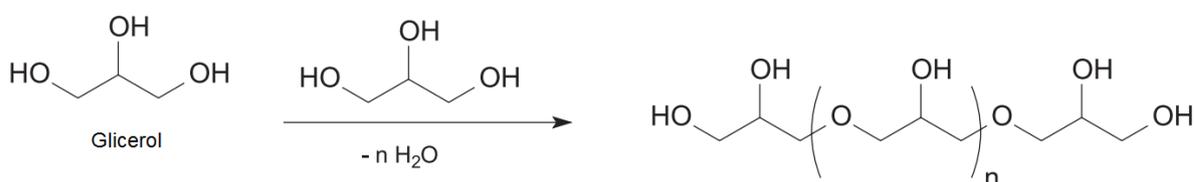


Figura 56- Estrutura mérica de poliéter derivado do poliglicerol. Quando  $n=0$  a estrutura resultante é do diglicerol,  $n=1$  a estrutura é do triglicerol,  $n=2$  a estrutura é do tetraglicerol e assim sucessivamente.

Na reação de eterificação do glicerol ocorre a condensação dos grupos hidroxilas do polioliol em um mecanismo reacional com a formação de poliéteres de cadeias carbônicas de comprimento e complexidade variada. Embora existam na literatura vários estudos abordando a oligomerização do glicerol no intervalo de obtenção de produtos com grau de polimerização ( $n$ ) no intervalo  $1 \leq n \leq 18$  geralmente esses trabalhos apresentam moléculas de cadeia curta e simples como produto. No entanto, a polimerização para a formação de poligliceróis arborescentes ainda foi pouco estudada até o presente momento.

No presente trabalho, estudou-se a reação de síntese do PGA utilizando um núcleo oligomérico de poliglicerol (PG) com  $n=8$ . As reações de síntese para o preparo do PGA foram conduzidas em bateladas, empregando a técnica de polimerização em massa sob atmosfera de nitrogênio. Foi utilizado um reator de vidro com capacidade de 1 litro, equipado com sistema de agitação pneumático, coluna de Vigreux, Dean Stark, condensador e injetor de nitrogênio. Para aquecimento do reator foi, utilizada uma manta

elétrica e a temperatura do meio reacional foi monitorada com o auxílio de um controlador de temperatura e uma termorresistência do tipo PT-100. A Figura 57 apresenta o equipamento utilizado na síntese do políglicerol, conforme descrito anteriormente.

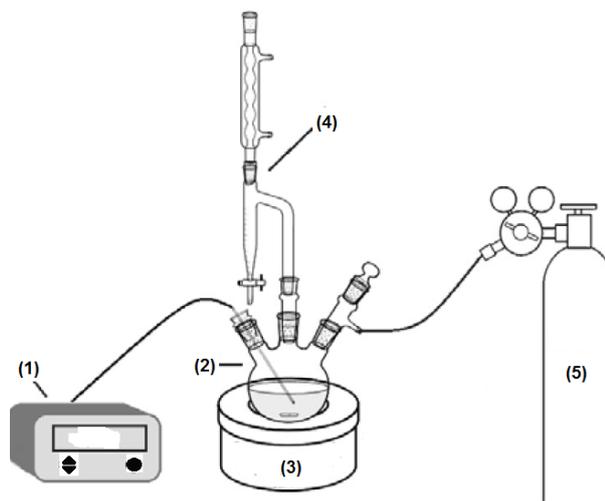


Figura 57- Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na síntese do núcleo oligomérico PG: Termopar controlador de temperatura (1), balão tribulado (2), manta de aquecimento (3), sistema Dean-Stark para remoção de água (4), cilindro de nitrogênio (5).

A extensão da reação de eterificação para obtenção do políglicerol pode ser seguida refratometricamente ou avaliando-se experimentalmente o número de hidroxila ( $N_{OH}$ ) e a massa molar por técnicas como o GPC. A Figura 58 (A) mostra o percentual de conversão da glicerina em políglicerol oligomérico com  $n=8$ , correspondente ao decaglicerol, em função do tempo no qual foi conduzida a reação. Percebe-se que a massa molar limite correspondente ao decaglicerol, com massa molar de 835,32 g/mol (Fig. 58(B)), foi obtida após 10 horas de reação com significativa diminuição de seu número de hidroxila ( $N_{OH}$ ).

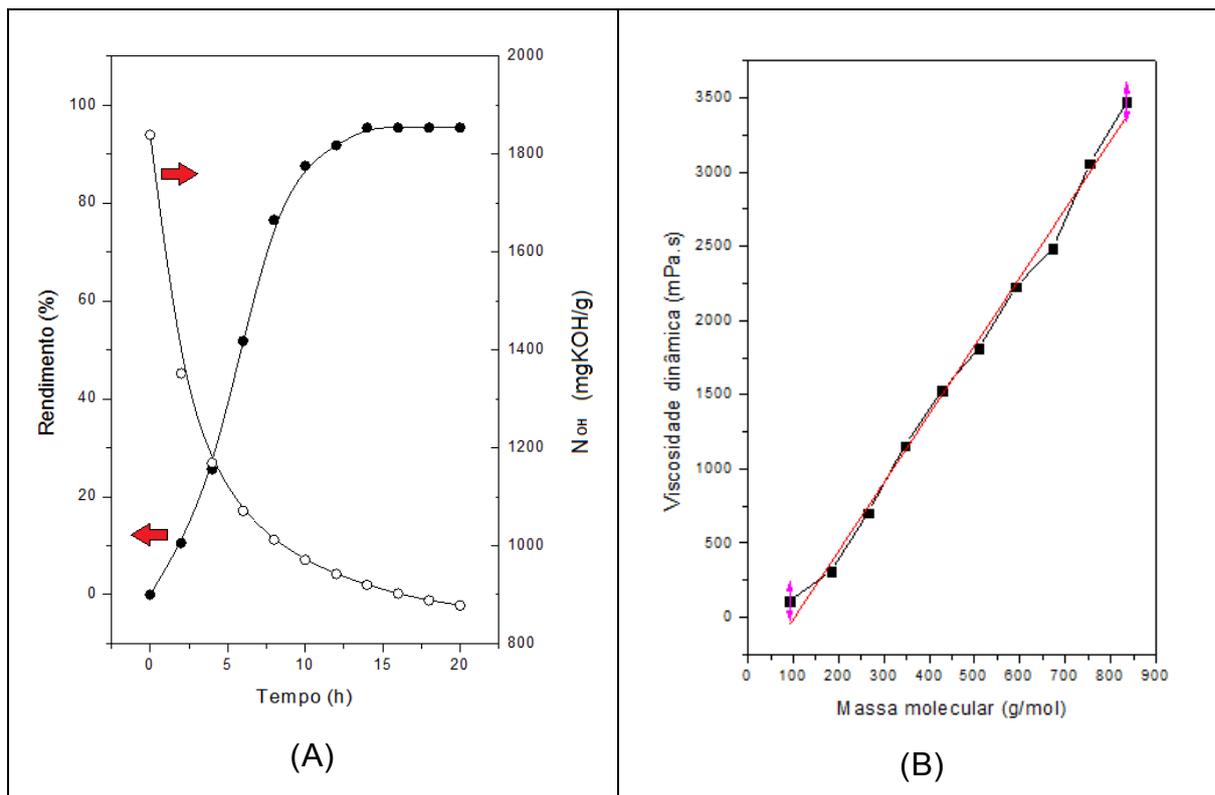


Figura 58- Relação entre o percentual de conversão do glicerol a decaglicerol e o tempo de reação (A) e, dependência da viscosidade dinâmica e a massa molar dos poligliceróis (B). As medidas de viscosidade dinâmica foram efetuadas em viscosímetro Brookfield a 25 °C utilizando-se spindles LV-3 e LV-4.

O mecanismo de oligoeterificação parece obedecer a um mecanismo de substituição nucleofílica de 2ª ordem (SN2) e está representado na Figura 59. A molécula de glicerol possui o grupo -OH que é suscetível a reações de substituição possuindo caráter nucleofílico [147].

Na catálise básica inicialmente o glicerol sofre ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes do oxigênio da hidroxila do catalisador havendo assim um aumento na densidade eletrônica da hidroxila do polioliol com a consequente formação de um intermediário tetraédrico que vai dar origem a um íon alcóxido após eliminação de água. O alcóxido formado remove um próton de outra molécula do glicerol, com a formação de uma molécula de diglicerol, regenerando assim o sítio básico para um novo ciclo catalítico [147].

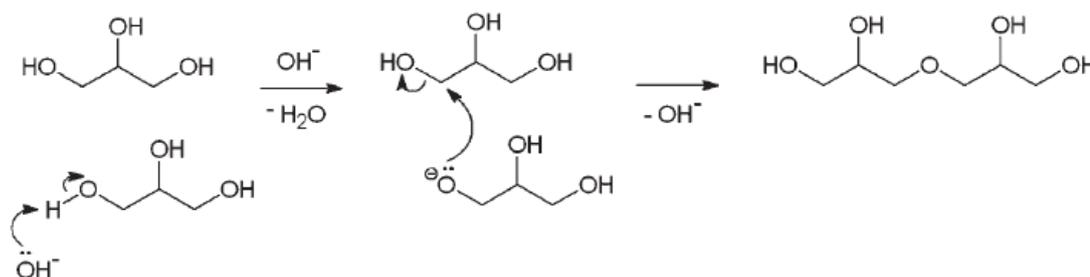


Figura 59 -Mecanismo de formação de poliéteres do glicerol a partir da catálise alcalina. Adaptado de [147].

A avaliação da viscosidade pode fornecer de modo indireto a massa molecular e o grau de polimerização do poliglicerol e pode ser adotada, portanto; como variável de controle de processo.

Os poligliceróis sintetizados foram caracterizados por um aumento da viscosidade com o decréscimo do valor de  $N_{OH}$ , indicando assim; o aumento de sua massa molecular (Figura 58 (B)). O  $N_{OH}$  é uma medida do conteúdo de hidroxila (OH) no poliglicerol e pode ser definido como o miliequivalente de hidroxila existente em um grama de amostra. A determinação do  $N_{OH}$  do PG foi feita empregando-se o método da acetilação com os grupos OH do poliglicerol sendo acetilado com um excesso de anidrido acético em piridina [159-160].

A viscosidade dinâmica dos poligliceróis obtidos foi determinada utilizando-se um viscosímetro da marca Brookfield (Modelo LVDV-III+). O instrumento é equipado com cilindros de diâmetros diferentes (spindles), em que é utilizado o cilindro adequado conforme a viscosidade do fluido. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim mensurar a viscosidade dos poligliceróis obtidos a 20 °C, com precisão na temperatura de 0,5 °C.

Observou-se uma relação linear entre a viscosidade dinâmica e a massa molecular dos poligliceróis sintetizados (Fig. 58(B)). A cromatografia de permeação em gel com detecção por índice de refração (SEC-RI) foi empregada para analisar a curva de distribuição de massas moleculares dos poligliceróis. A distribuição de massa molecular do diglicerol até o decaglicerol obedeceu a uma equação do tipo  $y = 4,61X - 474,24$  com

$r^2 = 0,9950$ , sendo  $y$  a viscosidade dinâmica e  $X$  a massa molecular do poliglicerol obtido.

O mecanismo de oligomerização do glicerol e sua relação com a massa molecular do composto ainda é pouco estudado utilizada na química quântica computacional. Sob esse aspecto, a motivação para estudar os oligômeros de glicerol utilizando as ferramentas da química computacional deriva do potencial para adequar as propriedades macroscópicas do sistema desejáveis a exemplo da viscosidade, e as características de processamento por manipulação da estrutura química primária. Assim, seria relativamente “fácil” se projetar a viscosidade do sistema ao nível dos orbitais moleculares do sistema incluindo nesse caso, o controle de comprimento do oligômero. Assim, regulando os níveis de energia dos orbitais moleculares torna-se possível um ajuste fino da viscosidade do sistema, propriedade esta de grande importância para a obtenção de uma membrana estável mecanicamente através da técnica de eletrofiação.

#### **4.2 Análise da síntese do PGL utilizando química quântica computacional**

Atualmente a química computacional conquistou seu espaço entre as metodologias que investigam os fenômenos químicos uma vez que é possível se obter resultados confiáveis a partir do estudo *in-silico* de vários problemas de interesse do químico tais como a cinética de reação (estados de transição), propriedades magnéticas bem como a reatividade e estabilidade conformacional de moléculas [161-162].

É nos trabalhos de Fukui que se inicia a utilização da química computacional na identificação dos orbitais moleculares de fronteira (OMF) HOMO-LUMO como um agente descritor das reações químicas orgânicas bem como na previsão da estabilidade conformacional das moléculas formadas [163-164]. Entretanto, é somente a partir da década de 80 que uma grande quantidade de estudos utilizando a teoria dos OMF se dedicam ao estudo do mecanismo das reações orgânicas [165-166]. Vale mencionar que isto só é possível devido à significativa melhoria das técnicas de cálculos e ao grande avanço na tecnologia dos computadores, o que resultou no desenvolvimento de métodos e pacotes de programas de livre acesso, tanto para realização de cálculos como para visualização de seus resultados.

Nesse trabalho utilizaram-se as energias dos orbitais moleculares nos cálculos das energias do orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) e do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO). A energia do HOMO mede o caráter elétron-doador de um composto e a energia do LUMO mede o caráter elétron-aceitador. Destas definições deve ser observado que quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora. Ao mesmo tempo, quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. As energias do HOMO e do LUMO têm sido utilizadas como índices de reatividade química e são comumente correlacionadas com a afinidade eletrônica e potencial de ionização através de um índice denominado dureza absoluta ( $\eta$ ) [167-168]:

$$\eta = \frac{1}{2}(I - A) \quad (4.1)$$

sendo  $I$  o potencial de ionização e  $A$  afinidade eletrônica.

Por sua vez, os OMF HOMO-LUMO estão relacionados ao potencial de ionização ( $I$ ) e a afinidade eletrônica ( $A$ ) através das relações [169]:

$$I = -\epsilon_{HOMO} \quad (4.2)$$

$$A = -\epsilon_{LUMO} \quad (4.3)$$

Logo, a dureza absoluta ( $\eta$ ) pode ser reescrita como:

$$\eta = \frac{1}{2}(\epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO}) \quad (4.4)$$

sendo  $\epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO}$  caracterizada como o “gap” de energia da molécula.

A diferença entre as energias dos orbitais HOMO-LUMO é um importante indicador de estabilidade molecular. Moléculas com baixo valor de “gap” são reativas, enquanto moléculas com alto valor de “gap” indicam alta estabilidade da molécula, logo apresenta baixa reatividade nas reações [170].

Considerando a reação de eterificação do glicerol, as estruturas oligoméricas foram aperfeiçoadas utilizando os cálculos semi-empíricos PM3 e ZINDO/1, no vácuo.

Os cálculos termodinâmicos foram realizados com estes métodos semi-empíricos disponíveis no programa MOPAC 2007, PM3 (Parametric Method 3) e ZINDO/1 a fim de verificar se as estruturas obtidas estavam localizadas realmente em um mínimo e para conhecer o comportamento energético envolvido na formação das espécies oligoméricas do poliglicerol.

Na química quântica computacional o calor de formação pode ser relacionado à estabilidade do composto. Quanto mais negativo o calor de formação, mais estável será o composto em consideração. Pacotes computacionais, a exemplo do HyperChem, calculam o calor de formação através de uma modelagem semi-empírica, a partir da Equação 4.5:

$$\Delta H_f^A = E_{el}^{mol} + E_{nuclear}^{mol} - \sum_A E_{el}^A + \sum_A \Delta H_f^A \quad (4.5)$$

sendo  $E_{el}^{mol}$  e  $E_{nuclear}^{mol}$  as energias de repulsão eletrônica e nuclear, respectivamente, e  $E_{el}^A$  e  $\Delta H_f^A$  a energia eletrônica e o calor de formação experimental para o átomo A isoladamente.

Em um sistema no estado fundamental, isto significa que a geometria é tal que o calor de formação ( $\Delta H_f$ ) é um mínimo irreduzível (na verdade um mínimo irreduzível local), ou seja, todas as suas constantes de força são positivas; para estados de transição, o sistema deve ter exatamente uma constante de força negativa. Deste modo, tem-se tornado prática comum nos trabalhos teóricos de qualidade a avaliação de todas as segundas derivadas (constantes de força) da energia molecular em função dos parâmetros moleculares, para se determinar inequivocamente a natureza dos pontos estacionários encontrados no processo de aperfeiçoamento da geometria molecular.

Nesse trabalho, os cálculos de otimização de geometria foram realizados com o programa HyperChem Release 6.02 [171] em um computador com processador Core 2 Duo (3 GHz), com 4,00 Gb de RAM. Os parâmetros energéticos como a energia total, calor de formação, a energia dos orbitais moleculares de fronteiras (HOMO e LUMO) e a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (“gap”), foram utilizadas para correlacionar estrutura, estabilidade e a reatividade das moléculas, sendo obtidos pelo método semi-empírico PM3.

As Figuras 60-61 apresentam uma ilustração das geometrias otimizadas dos oligômeros de glicerol e a Figura 62, apresenta a variação do calor de formação em função do crescimento da cadeia oligomérica.

A partir dos dados das Figuras 60-62 pode-se perceber que ambos, ZINDO e PM3 apresentam a mesma tendência e indicam que os cálculos fornecem as estruturas dos oligômeros de glicerol como mínimos de energia (com relação às coordenadas dos átomos). A maioria dos comprimentos de ligação calculados apresenta um erro menor que  $0,02\text{Å}$ , algo aceitável dentro da precisão esperada para cálculos semi-empíricos. Observa-se também que o método ZINDO/1 exibe valores de  $\Delta H_f$  mais negativos, indicando que o aumento na massa molecular do oligômero leva à estruturas de oligômeros mais estáveis, comportamento este similar ao observado no método PM3.

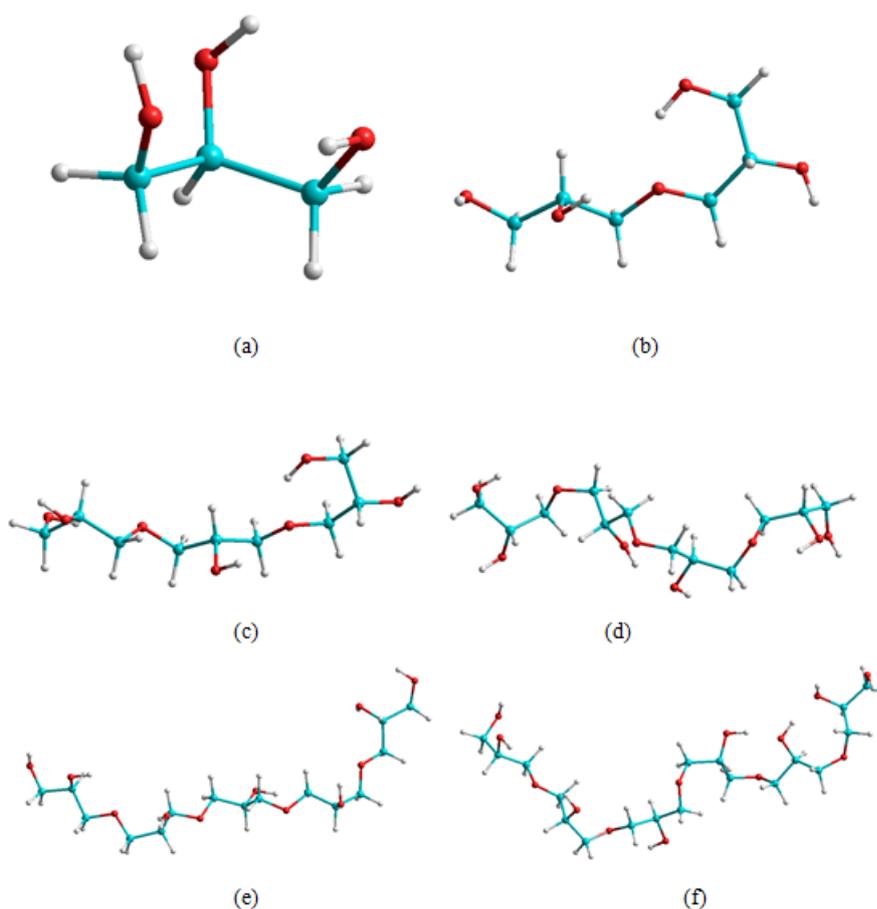


Figura 60- Ilustração da geometria aperfeiçoada dos oligômeros de glicerol no nível PM3: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d), pentaglicerol (e) e hexaglicerol (f).

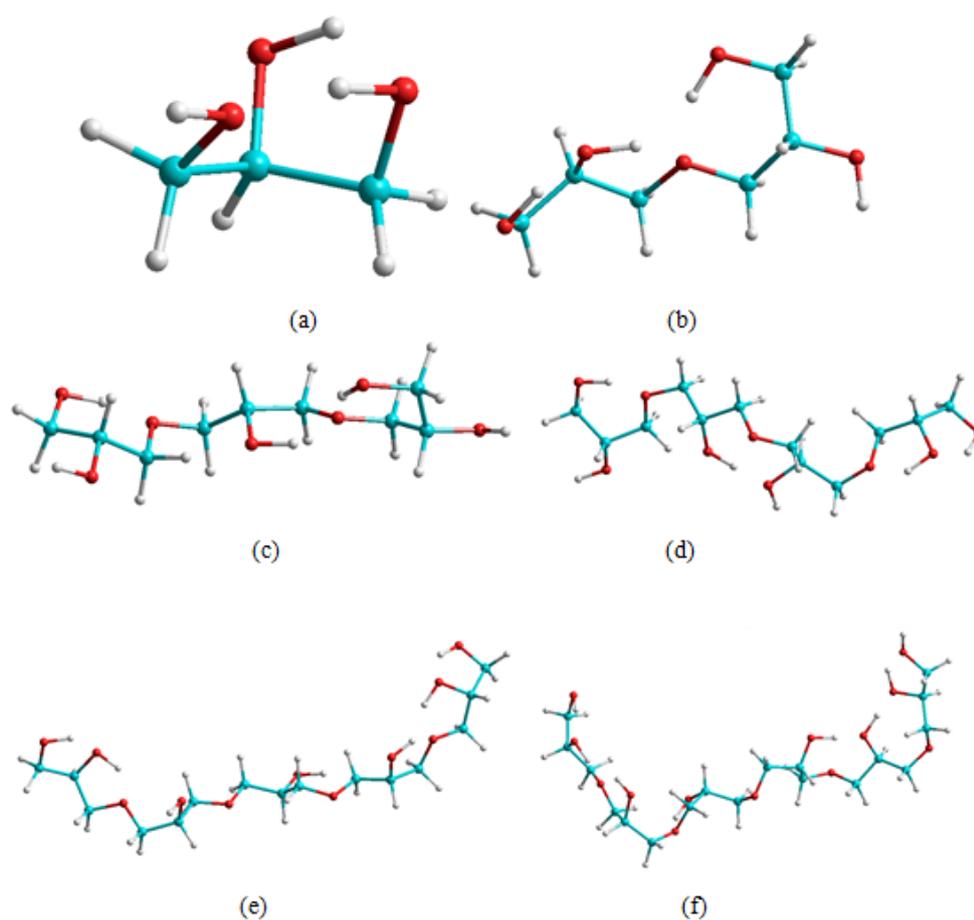


Figura 61- Ilustração da geometria otimizada dos oligômeros de glicerol no nível ZINDO/1: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d), pentaglicerol (e) e hexaglicerol (f).

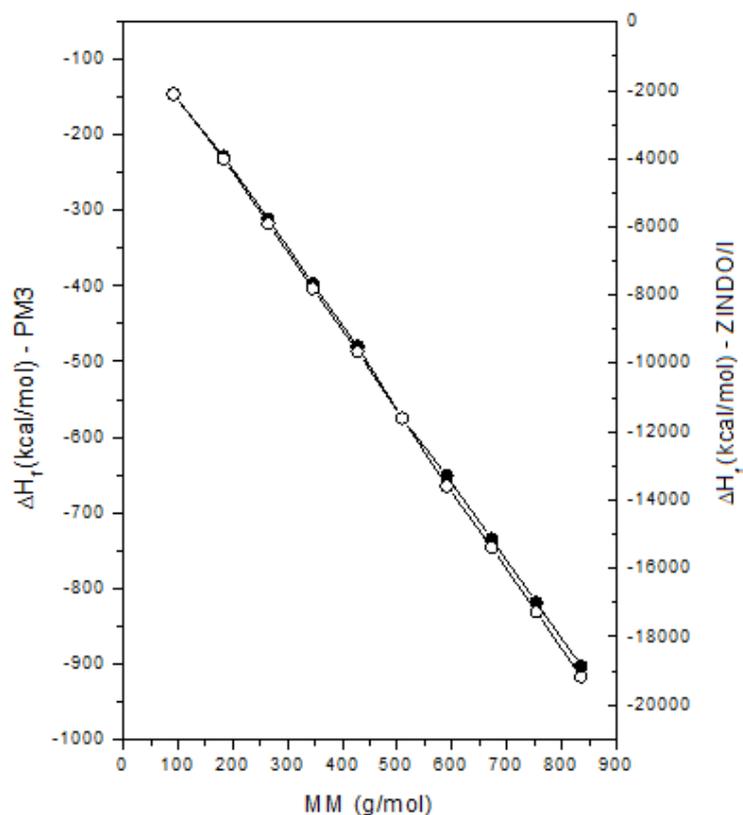


Figura 62- Variação no calor de formação ( $\Delta H_f$ ) para a reação de eterificação do glicerol em função da massa molecular do oligômero sintetizado: (●)PM3 e (○)ZINDO/1.

Para elucidar o mecanismo de eterificação do glicerol foram calculados os descritores relacionados às energias dos OMF, com a finalidade de verificar a estabilidade das moléculas estudadas em função dos seus “gap’s” de energia. No caso da formação de oligômeros do glicerol, quando duas moléculas do polioliol se aproximam para reagir, ocorre recombinação de seus orbitais moleculares relacionados aos grupos  $-OH$  da molécula. A combinação de orbitais moleculares que contenham dois elétrons resulta em um aumento da energia potencial. Por isso, a diminuição de energia potencial pela combinação HOMO+LUMO tem que ser superior ao aumento mencionado para que o produto tenha menos energia que os materiais (reagentes) de partida. É essencial, portanto, que a diferença de energia entre HOMO e LUMO seja relativamente pequena. Considerando que quanto menor o valor do “gap”, menor será a estabilidade da molécula, e quanto maior o valor do “gap” mais estável será a molécula. Sendo assim, a estabilidade da molécula é diretamente proporcional ao valor do “gap”.

Conhecendo a relação entre a viscosidade e o “gap” fica claro que poderíamos determinar a partir de qual valor de diferença de energia HOMO/LUMO a reação proporciona a viscosidade mais adequada para o processo de eletrofição tornando possível prever a viscosidade ideal para o processo de eletrofição utilizando unicamente os OMF.

A Figura 63 ilustra os OMF para alguns dos oligômeros de poliglicerol estudados nesse trabalho. A superfície de cor vermelha indica a parte negativa da função de onda e a de cor azul, a parte positiva. Ao se observar a localização dos elétrons mais energéticos no glicerol, nota-se que parte  $-CH_2OH$  é a que apresenta uma maior localização da densidade eletrônica. De forma similar, é possível destacar que os estados com maior energia não preenchidos (LUMO) apresentam uma densidade eletrônica virtual localizada sobre o hidrogênios do grupo  $-OH$ . Portanto, os resultados sugerem que o processo de oligomerização, ocorrerá preferencialmente onde os orbitais HOMO-LUMO estão localizados, favorecendo a formação de poliéteres. Observa-se ainda que o aumento da massa molecular parece levar ao espalhamento da carga eletrônica ao longo da molécula.

Outro ponto importante a ser explorado é se a posição energética dos OMF pode ser utilizada como algum parâmetro de correlação entre a viscosidade do poliglicerol, ou seja, entre sua massa molecular. Para tanto, foi construída a Figura 64, que evidencia a diferença de energia entre os níveis HOMO-LUMO, determinada pelo método semi-empírico PM3 e a massa molecular dos poliglicerois.

A reação  $SN_2$  se processa por meio da doação de densidade eletrônica de um orbital de fronteira preenchido (HOMO) do nucleófilo para um orbital de fronteira vazio (LUMO) do eletrófilo. A aproximação de um grupo rico em densidade eletrônica ( $-OH$ ) provoca o afastamento do grupo oposto até sua posterior eliminação ( $H_2O$ ). Assim, a correlação observada na Figura 64(B) é altamente satisfatória ( $R^2 = 0,9975$ ), mesmo com tamanho reduzido de amostras. Correlação semelhante foi observada também no ZINDO/I (resultados não apresentados). A tendência observada vai de encontro aos fundamentos da teoria dos OMF. Quanto maior o HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e, quanto menor o LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. A energia de HOMO está relacionada ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos. Na Figura 64 é mostrado o

LUMO da glicerina e dos poligliceróis, e pode-se notar que esta região está diretamente ligada à afinidade eletrônica, e caracteriza a suscetibilidade ao ataque por nucleófilos.

Os coeficientes relativamente elevados em ambos os casos indicam que há correlação entre a energia de interação orbitalar com a carga líquida transferida, mesmo com o tamanho reduzido da amostra.

Através de cálculos teóricos semi-empíricos usando o método PM3, foi construído o mapa de potencial eletrostático (Figura 65) no qual se pode visualizar o melhor local para ocorrer o ataque SN2 durante a reação de oligomerização do glicerol.

Na Figura 65, as cores próximas ao azul mostram regiões de potenciais mais positivos, ou seja, de deficiência de elétrons, enquanto as zonas vermelhas correspondem a potenciais mais negativos e, portanto, a maiores densidades eletrônicas. Não havendo qualquer impedimento estérico, o ponto mais eletrofílico da molécula do glicerol ou seus oligômeros é a região em que o ataque nucleofílico é mais efetivo, formando-se uma ligação mais forte entre o nucleófilo (ion alcóxido) e o substrato (glicerol), formando-se assim um sistema mais estável. Observa-se ainda que os átomos de oxigênio do grupo éter do esqueleto da cadeia de poliglicerol apresentam uma carga negativa que tende a se tornar positiva com o aumento da massa molecular do oligômero. Por outro lado, os átomos de oxigênio dos grupos hidroxilas laterais apresentam uma carga muito negativa e parecem apresentar uma dependência da massa molecular do polglicerol o que favorece a formação de ligação de hidrogênio intra- e intermolecular com consequente aumento da viscosidade do sistema.

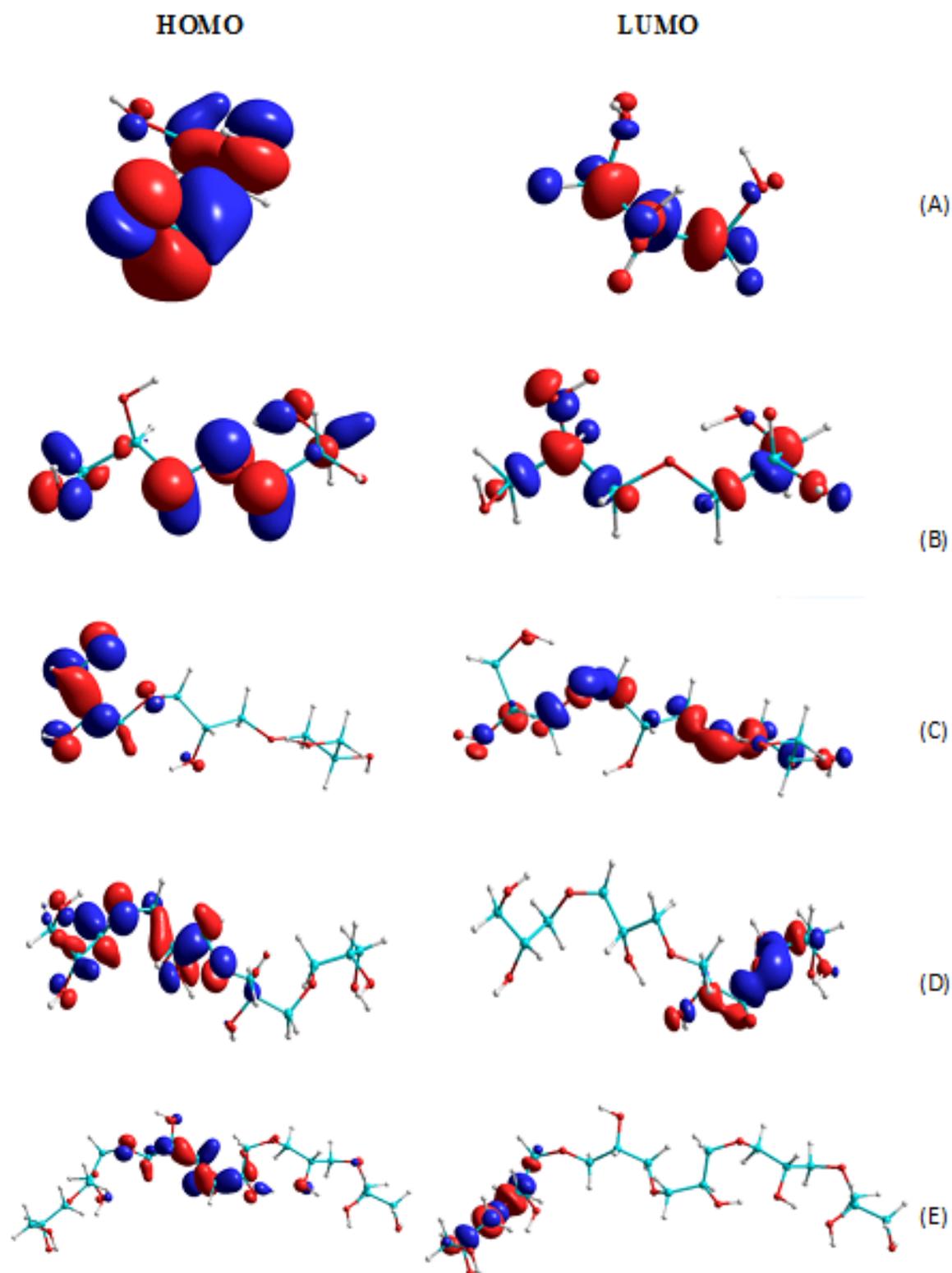


Figura 63- Densidade eletrônica dos OMF calculados ao nível PM3 para os oligômeros de glicerol estudados nesse trabalho: glicerol (A), diglicerol (B), triglicerol (C), tetraglicerol (D) e hexaglicerol (E). Os átomos em azul claro representam o carbono, em vermelho o oxigênio e em cinza o hidrogênio.

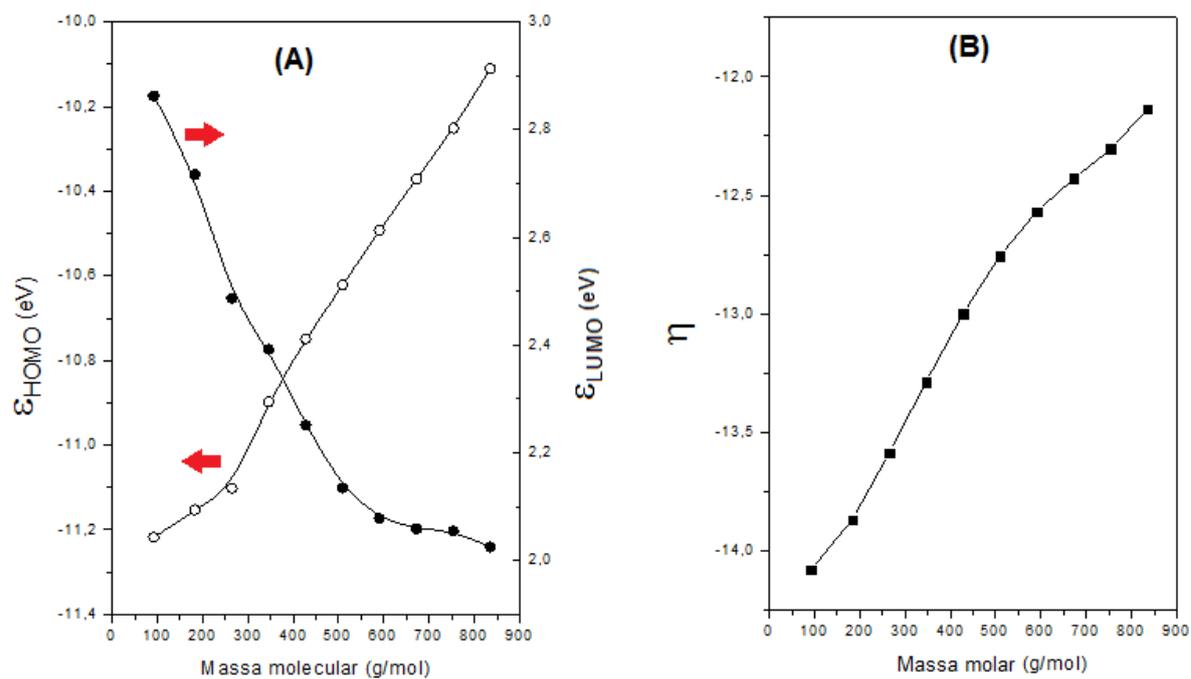


Figura 64- Relação entre os orbitais moleculares de fronteira (HOMO-LUMO) e a massa molecular dos oligômeros de glicerol (A) e, relação entre a dureza absoluta e a massa molecular dos oligômeros de poliglicerol (B).

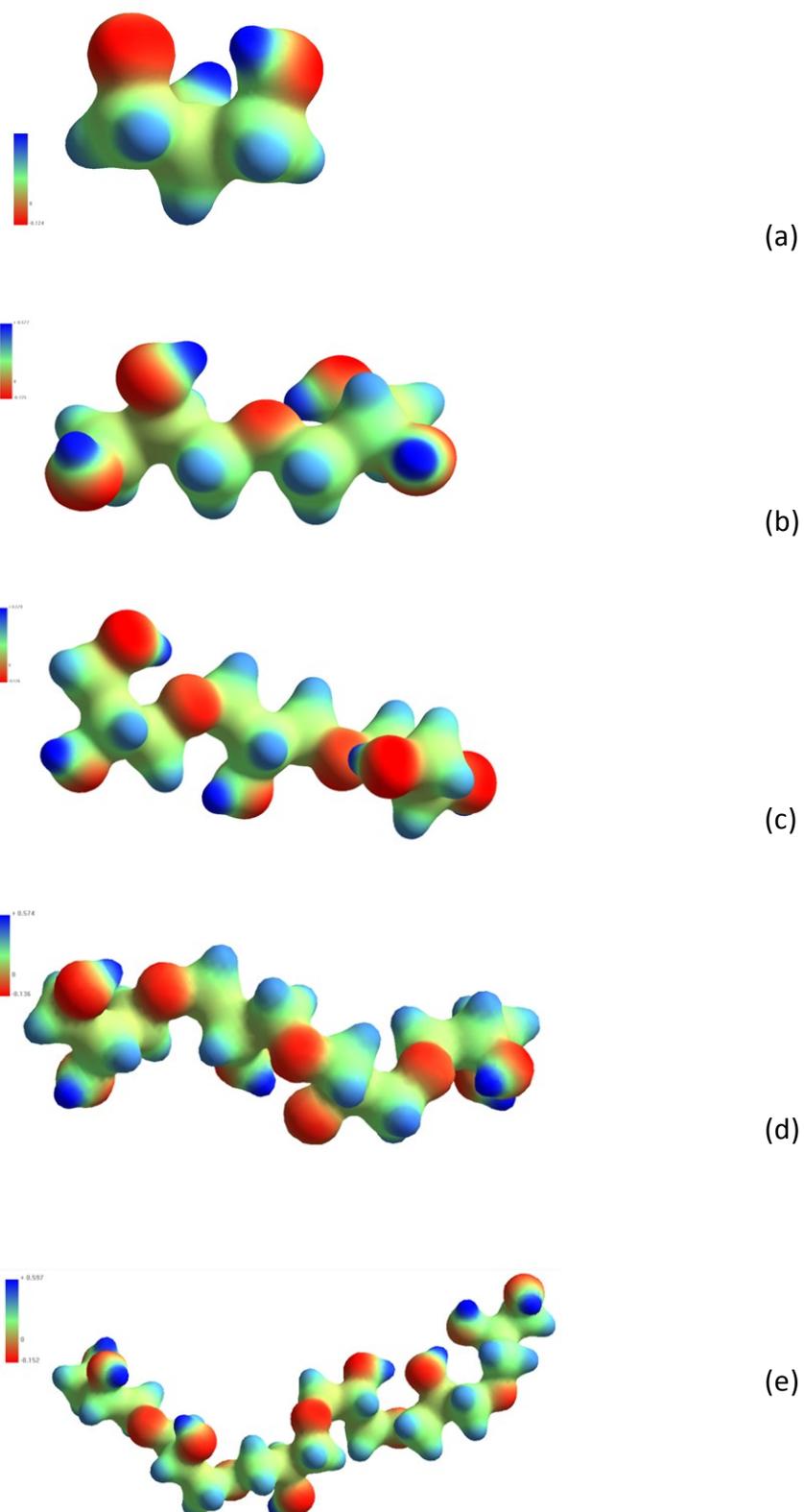


Figura 65- Mapas de potencial eletrostático para os oligômeros de poliglicerol construído utilizando PM3: glicerol (a), diglicerol (b), triglicerol (c), tetraglicerol (d) e hexaglicerol (e).

### **4.3 Síntese de membranas de PGA por eletrofiação e estudo de suas características físico-químicas**

A forma e o comprimento das ramificações presentes na cadeia macromolecular têm um papel importante nas propriedades físico-químicas que afetam a formação de fibras poliméricas através da técnica de eletrofiação. Os fundamentos da técnica de eletrofiação foram lançados há aproximadamente sete décadas por Anton Formhals através da publicação de cerca de 20 patentes entre os anos de 1931 e 1944 descrevendo montagens experimentais para a produção de filamentos de polímeros usando a força eletrostática [172-173].

Observações experimentais evidenciam que soluções de viscosidade elevada permitem a obtenção de fibras contínuas, enquanto que soluções de baixa viscosidade levam à formação de fibras mais curtas [174-175].

No caso do PGA, deve ser observado que as ligações de hidrogênio e as interações dipolo-dipolo, ao lado de forças de van der Waals, que atuam nessas macromoléculas, criam resistência muito maior no caso de oligômeros de poliglicerol de massa molecular maior do que no caso de oligômeros de poliglicerol de massa molecular menos elevada. Em solução, essas interações entre PGA de alta massa molecular acarretam um pronunciado aumento da viscosidade o que poderá proporcionar melhores condições para o processo de eletrofiação.

Como já mencionado anteriormente, a técnica de eletrofiação é um processo para produzir fibras muito finas ao forçar um polímero viscoso sob a ação de um campo elétrico através de orifício, na maior parte dos casos numa ponta metálica de uma agulha. O campo elétrico transforma a gotícula pendente na agulha da seringa submetida à um campo elétrico numa estrutura chamada cone de Taylor (Figura 66).

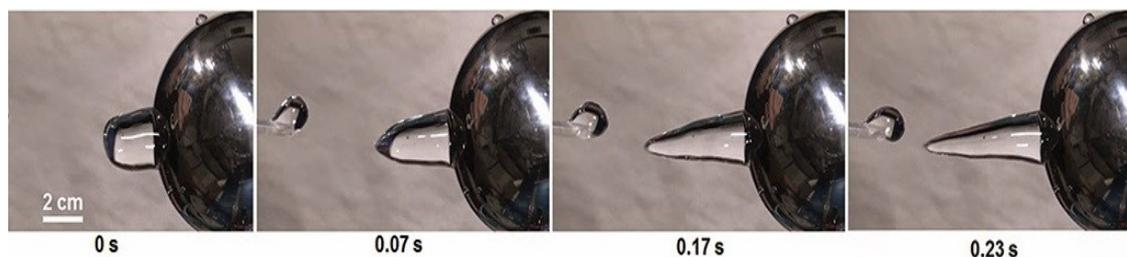


Figura 66- Experimento acerca da formação do Cone de Taylor pela ação de um campo elétrico sobre uma gota de 10 mL de água realizado em um ambiente de microgravidade. Fonte [176].

A estabilidade do cone de Taylor e conseqüentemente da formação do jato da solução polimérica é mantida pela viscosidade da solução. Se a viscosidade e a tensão superficial da solução forem apropriadas, a quebra do cone de Taylor é evitada e um jato estável da solução é formado. À medida que o jato continua a alongar-se, a sua área superficial aumenta e por esse motivo, a perda de solvente também aumenta. A um dado momento todo o solvente é perdido e o jato deixa de ser um fluido e transforma-se num material com um módulo de elasticidade em vez de uma viscosidade o que leva à uma alteração no modo de alongação do material aproximando-se de um alongamento elástico o que reduz a velocidade de alongamento do jato [176].

Desta forma, a fim de se obter soluções poliméricas com elevada viscosidades, efetuou-se a síntese do PGA a partir de um núcleo oligomérico de decaglicerol. A obtenção de PGA com núcleo oligomérico baseado no decaglicerol parece favorecer o processo de eletrofiação uma vez que pequenas concentrações do polímero proporcionarão soluções de elevada viscosidade. Soluções de viscosidades mais elevadas significarão maior interação entre as moléculas de solvente e, assim, quando a solução polimérica for esticada sob a influência das cargas originadas pela ação do campo elétrico, as moléculas do solvente tendem a se espalhar sobre as moléculas do polímero o que permite a estabilização do cone de Taylor e do jato polimérico, respectivamente.

A síntese do PGA foi acompanhada por espectroscopia RMN, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 67. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 67-A) mostra na região de 3,2 e 4,1 ppm os sinais referentes aos hidrogênios dos carbonos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  da cadeia do poliéter. Já o sinal próximo a 5,0 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio da hidroxila ( $\text{OH}$ ). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 67-B) aparecem os sinais correspondentes ao  $\text{CH}_2$  terminais (60-64 ppm),  $-\text{CHOH}-$  (68-73 ppm),  $-\text{CH}_2-\text{O}-$  (72-75

ppm) e  $-\underline{\text{C}}\text{H-O}$  (79-82 ppm). Os sinais obtidos na espectroscopia de RMN estão em boa concordância com os valores da literatura [177-178].

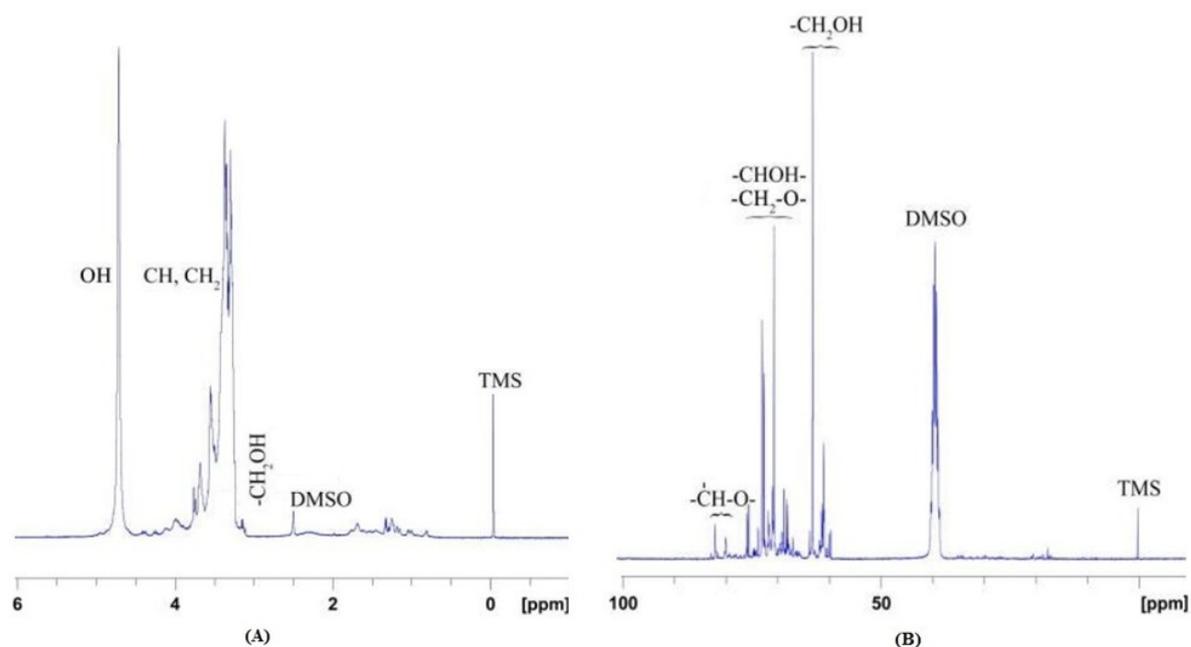


Figura 67- Espectro RMN de hidrogênio e carbono do PGL sintetizado nesse trabalho:  $^1\text{H}$ -RMN (A) e  $^{13}\text{C}$ -RMN (B). Os espectros RMN foram obtidos à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).

A pureza dos PGA's ( $G=0, 2,3$  e  $4$ ) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi observado o tempos de retenção ( $t_R$ ) de 28,6 min para o PGA de geração 3 ( $G = 3,0$ ) (A). A dependência de  $t_r$  em função de  $G$  está ilustrado na Figura 68-B. Os valores do tempo de retenção neste sistema de análise (filtração em gel) estão diretamente relacionados com o tamanho molecular do composto que está sendo analisado, portanto, o PGA de maior  $G$  apresentará a filtração mais lenta por ser a molécula maior. O melhor ajuste na análise da dependência de  $t_R$  em função de  $G$  indicou ser o exponencial (Fig. 68-B).

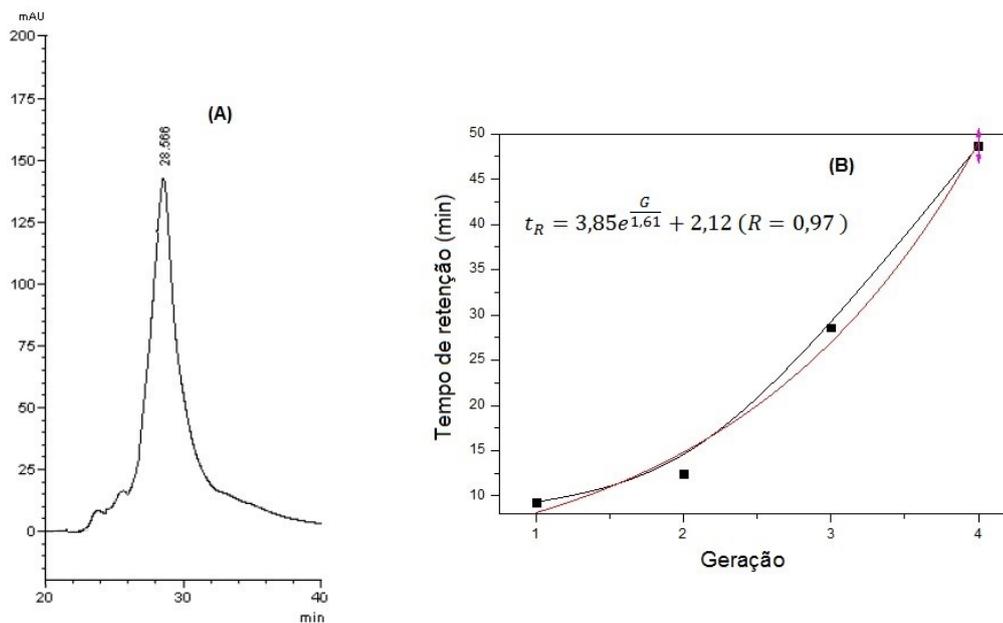


Figura 68- Perfil cromatográfico CLAE do PGA (G3) (A) e dependência entre  $t_r$  e o número de geração do PGA (B).

A técnica de eletrofiação representa atualmente a tecnologia mais barata para a produção de membranas para a medicina regenerativa e pode representar uma importância significativa para o crescimento científico e econômico do Brasil com relação ao desenvolvimento de novos materiais para a área da saúde.

A técnica de eletrofiação é um processo que produz membranas muito finas de PGA ao forçar o polímero arborescente viscoso através de uma ponta metálica de uma agulha submetida à ação de um campo elétrico. O campo elétrico transforma a gota de PGA pendente em uma estrutura denominada de cone de Taylor. Se a viscosidade e a tensão superficial da solução de PGA são apropriadas, a quebra deste cone é evitada e a formação de um jato estável é favorecida. A eletrofiação é uma técnica particularmente atrativa para o processamento de biomateriais poliméricos permitindo o controle simultâneo de sua porosidade e composição.

A Figura 69 ilustra a micrografia ótica (na região visível) das membranas de PGA obtidas por eletrofiação após o aperfeiçoamento do processo (concentração da solução e campo elétrico).

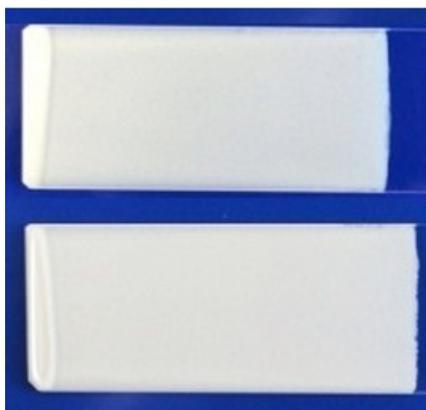


Figura 69- Aspecto ótico das membranas de PGA obtidas pela técnica de eletrofiação. As membranas estão fixadas em lâminas de vidro para a estabilidade mecânica.

Para as soluções de PGA o resultado do processo de eletrofiação levou à formação de fibras bem definidas como as apresentadas na micrografia MEV da Figura 70. A elevada massa molecular do núcleo oligomérico do PGA parece ter garantido que mesmo em baixas concentrações o sistema em solução apresente enovelamento de suas cadeias, suficiente para ser estirado pela ação do campo elétrico. O diâmetro médio das fibras de PGA obtidas através da técnica de eletrofiação foi de aproximadamente  $12,23 \pm 0,91 \mu\text{m}$ . A porosidade das membranas de PGA eletrofiadas estimadas pela sua adsorção de hexadecano foi de  $73 \pm 5\%$ .

Conforme pode ser observado na Figura 71, a eletrofiação do PGA utilizando núcleos oligoméricos de tetraglicerol ou hexaglicerol leva à formação de fitas e uma estrutura heterogênea de fibras pode ser observada. A mudança na morfologia das fibras eletrofiadas de PGA em função da massa molecular do núcleo oligomérico de poliglicerol, passando de uma forma cilíndrica para forma de fita com junções pode ser explicada pela diminuição do diâmetro médio das fibras durante a eletrofiação o que facilita a evaporação do solvente durante a sua deposição no coletor.

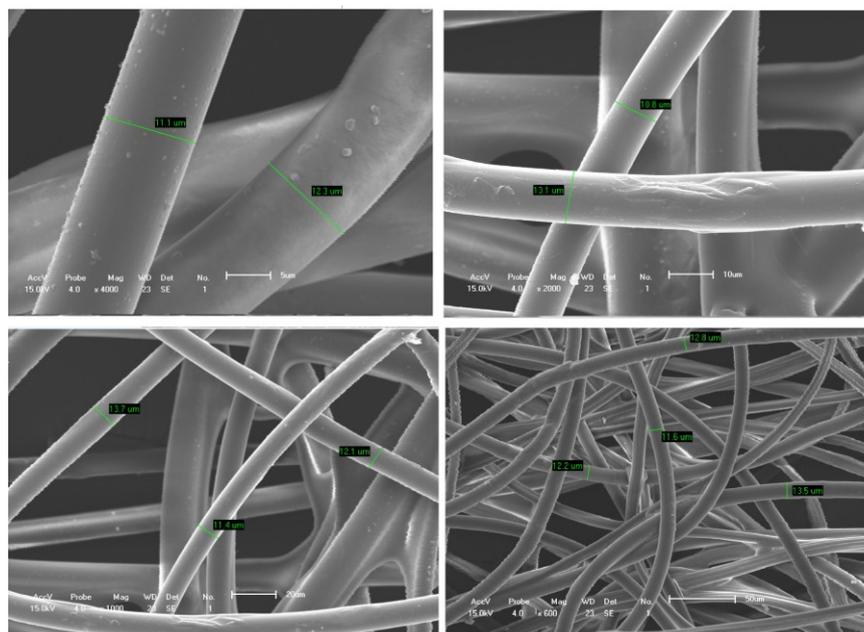


Figura 70- Micrografia MEV de membranas do PGA eletrofiado utilizando como núcleo oligomérico o decaglicerol.

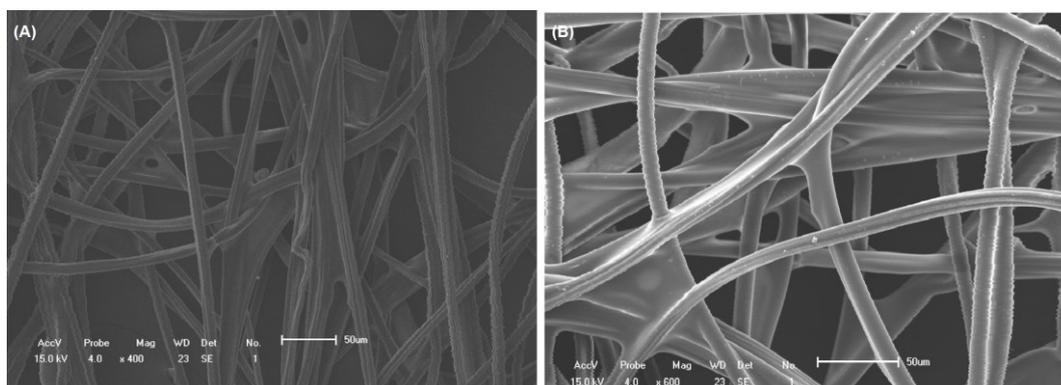


Figura 71- Micrografia MEV de membranas do PGA eletrofiado utilizando como núcleo oligomérico o tetraglicerol (A) e o hexaglicerol (B).

A espectroscopia FTIR foi utilizada para caracterizar a microestrutura da membrana de PGA eletrofiada. Os resultados dos espectros FTIR obtidos são apresentados na figura 72.

Observa-se (Fig. 72) que o espectro FTIR apresenta características do espectro vibracional de um poliálcool-poliéster apresentando bandas de absorção no intervalo de 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento do grupamento O-H e ligações de hidrogênio) e uma banda intensa em 1035  $\text{cm}^{-1}$  devida ao estiramento assimétrico C-O-C. Ao mesmo tempo é

importante observar o desaparecimento da banda a  $1700\text{ cm}^{-1}$  após o processo de eletrofiação quando a membrana é submetida à luz UV. O desaparecimento da banda de absorção a  $1700\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao processo de reticulação da banda C=C do metacrilato de glicidila (GMA) incorporado ao PGA, garantindo assim a estabilidade mecânica da membrana obtida.

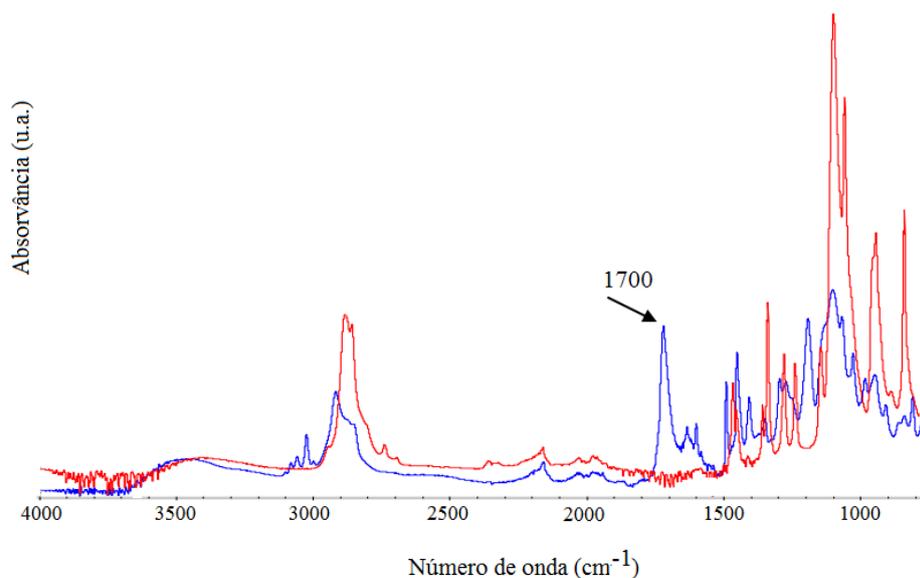


Figura 72-Espectroscopia FTIR de membranas do PGA eletrofiado comparativamente aos oligômeros de glicerol. Em vermelho observa-se o FTIR do PGA após o processo de eletrofiação e em azul o FTIR antes da eletrofiação.

A Figura 73 do calorimetria exploratória diferencial (DSC) ilustra o efeito do campo elétrico do diâmetro médio das fibras eletrofiadas em duas concentrações de PGA. Observa-se que o aumento do campo elétrico leva a uma diminuição no diâmetro médio das fibras. Entretanto, existe uma controvérsia na literatura com relação à redução do diâmetro médio de fibras eletrofiadas em função do campo elétrico aplicado. Observações experimentais indicam que o diâmetro da fibra eletrofiada depende da viscosidade da solução através da Equação (4.6) [179].

$$d \approx \eta^{0,5} \quad (4.6)$$

sendo  $d$  o diâmetro e  $\eta$  a viscosidade da solução.

Observa-se experimentalmente que diâmetro do jato torna-se cada vez mais fino ao longo do trajeto até o polo oposto devido ao contínuo alongamento do jato em função do campo elétrico e à evaporação do solvente. Desta maneira, os trabalhos na literatura discutem uma relação entre a tensão aplicada e o diâmetro do jato sem que haja, entretanto; uma teoria conclusiva a esse respeito [180-181].

Com a finalidade específica de se investigar a presença de cristalitos na membrana de PGA eletrofiada realizou-se experimentos de DSC. A técnica de DSC é uma das técnicas mais adequadas para a análise de transições de primeira ordem a exemplo da fusão e cristalização. Observa-se um pequeno pico relacionado à endoterma de fusão (Figura 73) o que indica a presença de uma única fase amorfa apresentando pequenos cristalitos distribuídos uniformemente pela membrana [182].

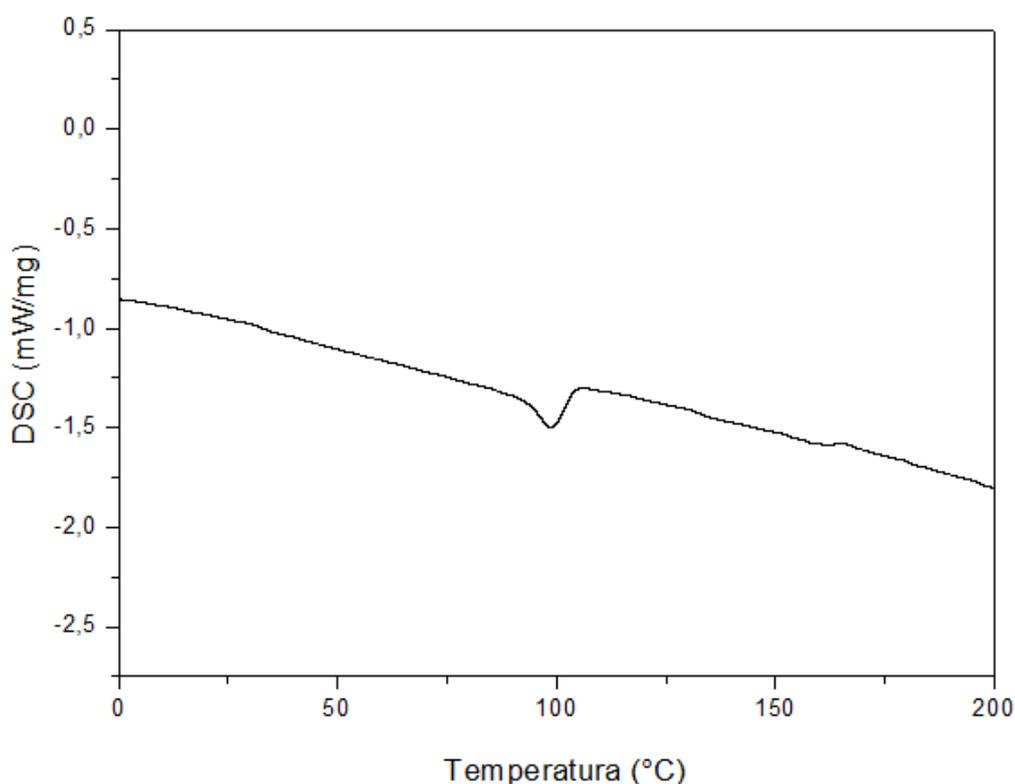


Figura 73 - Curva DSC normalizada da membrana eletrofiada de PGA. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio gasoso.

A estabilidade térmica da membrana de PGA eletrofiada foi avaliada através da análise termogravimétrica (TGA) realizada em uma termobalança Mettler modelo TA

4000. As amostras foram aquecidas em cadinhos de alumina sob atmosfera inerte de  $N_2$  desde a temperatura ambiente (aproximadamente  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) até  $800\text{ }^\circ\text{C}$  utilizando-se as velocidades de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $30\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

A Figura 74(A) ilustra as curvas termogravimétricas e suas correspondentes derivadas (Fig. 74 (B)) para a membrana de PGA eletrofiada. Observa-se que a degradação térmica da membrana de PGA ocorre essencialmente em dois eventos térmicos em atmosfera de  $N_2$  (Fig. 74). O primeiro se inicia a aproximadamente  $250\text{ }^\circ\text{C}$  com uma perda de massa de aproximadamente 50%. O segundo evento incia a aproximadamente  $350\text{ }^\circ\text{C}$  com perda de massa igual a 50 %. Não foi observada a formação de resíduo referente à formação parcial de carbono elementar durante a decomposição do material.

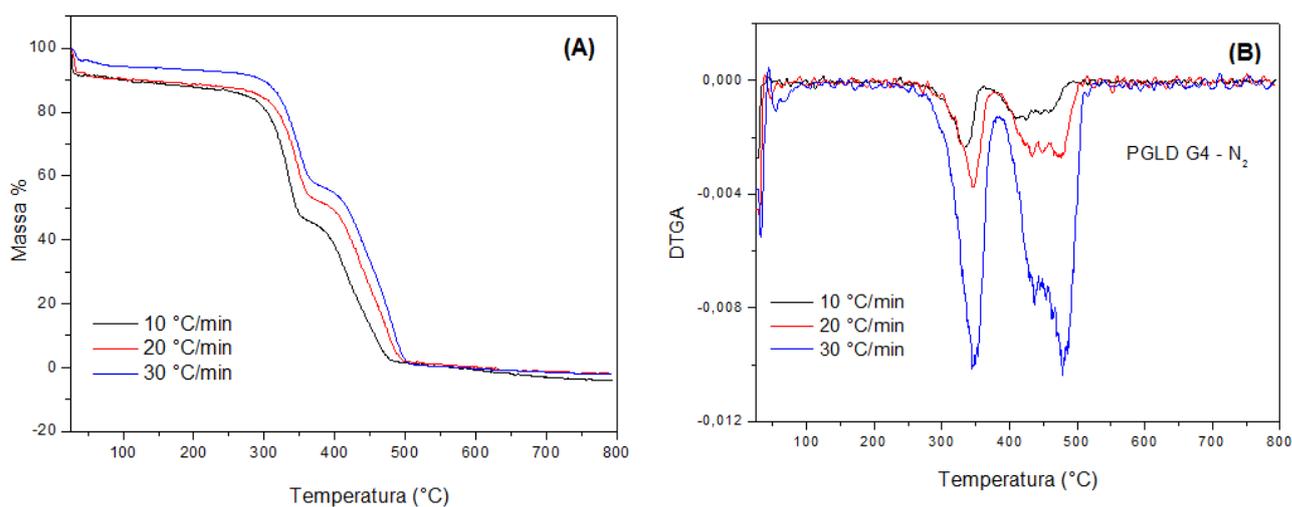


Figura 74- Curva termogravimétrica da membrana eletrofiada de PGA. A análise foi efetuada em atmosfera dinâmica de  $N_2$  e velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $30\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

O estudo da cinética de decomposição térmica da membrana eletrofiada de PGA por TG foi efetuado segundo o método de Kissinger [183]. Essa metodologia considera que o fluxo de calor consumido pela amostra é diretamente proporcional à massa da macromolécula arborescente que é volatilizada, e que também pode ser detectado mais eficientemente pela curva DTGA, cujo pico indica efetivamente a condição de máxima taxa de volatilização da amostra.

Durante o aquecimento da membrana de PGA, considera-se que a velocidade de sua decomposição térmica é diretamente proporcional ao fluxo térmico recebido pela amostra, sendo o calor de decomposição função da velocidade de aquecimento. Admitindo-se que durante a decomposição térmica das membranas de PGA eletrofiadas ocorra somente a volatilização, a velocidade de volatilização será diretamente proporcional ao fluxo térmico recebido pela amostra, sendo o calor de volatilização função da temperatura de operação.

Todo estudo cinético pode ser descrito pela equação básica que relaciona a velocidade de reação  $da/dt$ , também chamada de velocidade de conversão, em função da concentração de um dos reagentes  $g(\alpha)$  por meio da constante de velocidade  $k$  a temperatura constante como descrito pela Equação 4.7 [184]:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k \cdot g(\alpha) \quad (4.7)$$

O fator de conversão ( $\alpha$ ) (também chamado grau conversão) do o processo decomposição ao longo do tempo é dado pela Equação 4.8 [185]:

$$\alpha = \frac{m_i - m}{m_i - m_f} \quad (4.8)$$

sendo  $m_i$  e  $m_f$  correspondem à massa inicial e final da amostra, respectivamente, e  $m$  representa a massa em determinado instante.

A "força motriz" da reação de decomposição da membrana de PGA é a temperatura, e seu efeito é introduzido através da equação de Arrhenius na determinação da constante de velocidade associada à perda de massa,  $k$  (Equação 4.9):

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{kT}\right)} \quad (4.9)$$

sendo  $A$  é o fator pré-exponencial de Arrhenius (também chamado de fator de frequência por representar o número de colisões inter-atômicas durante a reação de decomposição da amostra,  $E_a$  é a energia de ativação em J,  $R$  a constante dos gases (8,3145 J mol<sup>-1</sup>k<sup>-1</sup>), e  $T$  a temperatura absoluta em K.

Substituindo  $k$  na Equação 4.7, de acordo com a equação de Arrhenius obtém-se:

$$\frac{d\alpha}{dt} = Ae^{\left(\frac{-E\alpha}{kT}\right)} \cdot g(\alpha) \quad (4.10)$$

Para sistemas termofixos que obedecem à uma cinética de reação de ordem  $n$ , a velocidade de conversão é função do consumo do reagente, decomposição do composto, assumindo-se que  $g(\alpha) = (1-\alpha)^n$ , onde o grau de conversão  $\alpha$  é a concentração fracionária dos reagentes consumidos no tempo  $t$ , tem-se a Equação 4.11:

$$\frac{d\alpha}{dt} = Ae^{\left(\frac{-E}{RT}\right)} (1-\alpha)^n \quad (4.11)$$

sendo  $n$  a ordem da reação e  $\alpha$  a fração mássica volatilizada.

Diferenciando-se a Equação 7.5, para uma dada taxa constante de aquecimento  $\beta$ , a degradação máxima se dará em uma correspondente temperatura  $T_m$  expressa na Equação 4.12 como [183]:

$$\frac{E\beta}{R(T_m)^2} = An(1-x)_m^{(n-1)} e^{-\frac{E}{RT_m}} \quad (4.12)$$

sendo  $(1-x)_m$  é a fração mássica residual,  $\beta$  é uma constante de aquecimento,  $T$  a temperatura absoluta,  $E$  é a energia de ativação para a reação de degradação térmica,  $R$  é a constante dos gases,  $T_m$  é a temperatura referente à taxa máxima de perda de massa e corresponde à temperatura do pico DTG, visto que nessa temperatura ocorre a máxima taxa de variação de massa do PGA durante o aquecimento.

Por sua vez, a linearização da Equação 4.13 fornece:

$$\ln \frac{\beta}{(T_m)^2} = -\frac{E}{R} \times \frac{1}{T_m} + \ln \left( A \frac{R}{E} \right) \quad (4.13)$$

A equação de Kissinger [183] pode ser associada com a equação da reta:  $y = bx + a$ . O procedimento consiste em obter os valores de  $\ln(\phi/T_p^2)$  e, representá-lo em função de  $(1/T_p)$ . Nesse caso,  $T_p$  representa a temperatura absoluta de pico da curva DTG e  $\phi$  é a velocidade de aquecimento da amostra. A temperatura de pico,  $T_p$ , de cada etapa de decomposição, representa o ponto onde a velocidade da reação de decomposição é máxima. Logo, fazendo um gráfico de  $\ln(\phi/T_p^2)$  contra  $1/T_p$  obtém-se uma reta cujo

coeficiente angular é  $-E_a/R$ . O método não isotérmico é rápido uma vez que as análises são realizadas sob aquecimento contínuo, atingindo-se facilmente as transformações estudadas, quer sejam efeitos físicos ou químicos. Neste trabalho são apresentados os estudos de determinação da energia de ativação das membranas de PGA obtidas através da técnica de eletrofição.

A Figura 75 contém as curvas DTA da membrana de PGA eletrofiada. Observa-se que, com o aumento da velocidade de aquecimento, as temperaturas dos picos de decomposição térmica aumentam de forma proporcional, indicando que o mecanismo de decomposição térmica não é alterado. O gráfico de  $\ln(\phi/T_p^2)$  contra  $1/T_p$  para a membrana de PGA eletrofiada está representado na Figura 75. Através do coeficiente angular obtido pela equação da reta, e utilizando-se a inclinação pode-se determinar a Energia de Ativação de cada etapa da decomposição da membrana de PGA. Observou-se uma primeira etapa de decomposição térmica com uma energia de ativação próxima a  $240 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e é atribuída à quebra da molécula na posição do grupo éter. As segunda etapa de decomposição apresentou energia de ativação bastante inferior (aproximadamente  $80 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ).

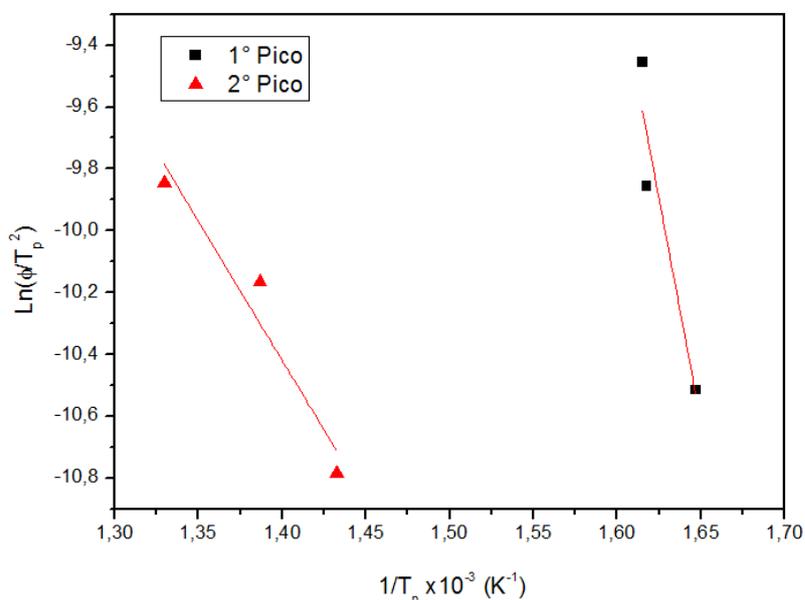


Figura 75 - Gráfico de Kissinger para a decomposição térmica da membrana de PGA eletrofiada: Primeiro pico referente à primeira etapa de decomposição térmica (■) e, segundo pico correspondente à segunda etapa de decomposição térmica (▲).

#### 4.4 Absorção de água

O estudo do transporte de água em arcabouços poliméricos hidrofílicos pode ser tratado quantitativamente utilizando-se a 2ª lei de Fick, uma equação diferencial parcial de ordem 2, representada na Equação 4.14.

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} \quad (4.14)$$

A difusão é um processo de transporte no qual uma força motriz originada pelo gradiente de concentração produz o transporte de um componente da mistura de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração. O processo de absorção de água por materiais poliméricos é um importante descritor de suas propriedades biocompatíveis.

A água absorvida geralmente exerce um efeito plastificante no material polimérico aumentando os processos de transições e relaxações moleculares [186]. Quando um polímero é imerso em um meio aquoso ou solução fisiológica, as interações entre a estrutura química da macromolécula e a água (através, por exemplo, de ligações de hidrogênio) favorecem seu intumescimento.

À medida que as moléculas de água penetram na matriz as cadeias poliméricas tornam-se mais estendidas causando uma expansão e conseqüente ordenamento da estrutura polimérica. Uma vez que este processo é desfavorecido entropicamente, passa a existir então uma força motriz no sentido oposto ao da força osmótica das moléculas de água em permearem a matriz hidrofílica.

Quando a força osmótica de moléculas de água para dentro do sistema polimérico é balanceada pela força exercida pelas cadeias poliméricas em resistir ao processo de expansão, diz-se que neste ponto o equilíbrio no intumescimento foi atingido. Alguns dos fatores responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis em meio aquoso estão relacionados à alta flexibilidade da cadeia da macromolécula, baixa densidade de ligações cruzadas, fortes interações com a água e a existência de um potencial osmótico [186]. O mecanismo de transporte de água nas membranas de PGA pode ser descrito pela Equação 4.15 [187]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.15)$$

sendo  $n$  o tipo de transporte na membrana,  $M_t$  e  $M_\infty$  representam as massas de água absorvidas no tempo  $t$  e equilíbrio, respectivamente.

Para o caso I (transporte fickiano),  $n = 0,5$  com velocidade de difusão muito menor que a relaxação; no caso de transporte II,  $n = 1,0$ . Neste caso, a velocidade de difusão da água é muito maior comparativamente ao processo de relaxação do sistema polimérico. Para sistemas não-fickianos o valor de  $n$  está compreendido entre 0,5 e 1,0. Quando a concentração inicial do agente permeante (água) é constante na superfície e atinge valores  $C_{\text{máx}}$ , no equilíbrio de intumescimento a solução para a Equação 4.16 assume a forma [187]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{[-D(2n+1)^2 \frac{\pi^2}{2h^2} t]} \quad (4.16)$$

sendo  $h$  a espessura inicial da membrana.

Integrando a Equação 7.12 obtém-se a massa da água absorvida pelo PGLD em função do tempo expressa na Equação 4.17 [188-189]:

$$\ln \left[ 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right] = \ln \left( \frac{8}{\pi^2} \right) - \frac{D\pi^2 t}{2h^2} \quad (4.17)$$

sendo  $D$  o coeficiente de difusão na membrana polimérica,  $h$  sua espessura e  $t$  o tempo [188-189].

De acordo com a Equação 4.17, o gráfico de  $\ln[1-M_t/M_\infty]$  versus  $t$  e aplica-se método dos quadrados mínimos, sendo sua inclinação proporcional ao coeficiente de difusão ( $D\pi^2/2h^2$ ).

O resultado da difusão de fluido corpóreo simulado (SBF- *simulated body fluid*) pH 7,4 nas membranas de PGA eletrofiadas é mostrado na Figura 76. A solução de SBF foi preparada segundo metodologia proposta por Kokubo [190].

O aumento gradativo no intumescimento da membrana eletrofiada se deve ao aumento na quantidade de grupos hidrofílicos nas cadeias poliméricas do PGA. Os

grupos –OH presentes na molécula de PGA são capazes de formar ligações de hidrogênio com a água facilitando assim a difusão da água para dentro da matriz polimérica, bem como o relaxamento das cadeias, provocando dessa forma o inchamento da membrana eletrofiada. Ao mesmo tempo, a análise da Figura 76 mostra que o aumento da temperatura provoca um aumento no percentual de inchamento no equilíbrio das membranas de PGA eletrofiada.

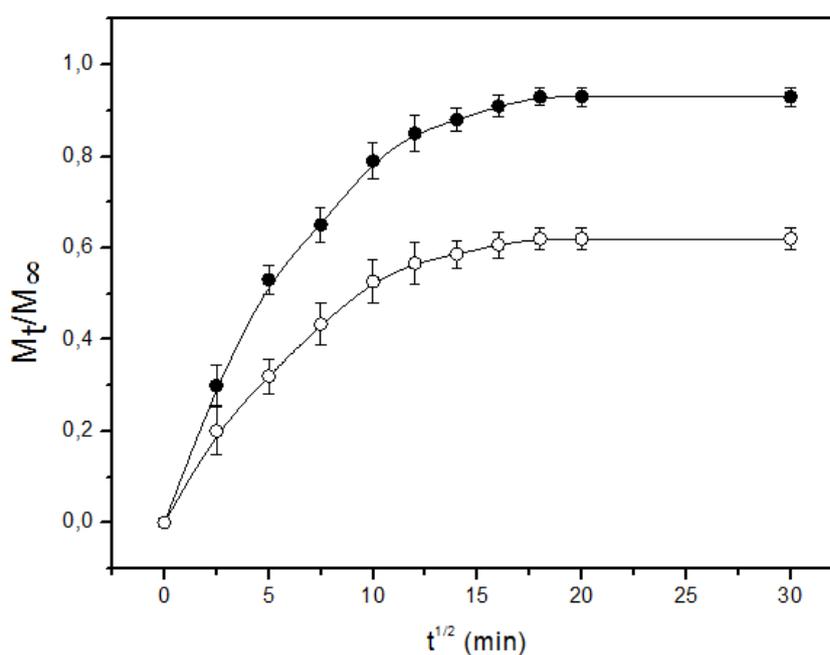


Figura 76- Perfil da curva de difusão de solução SBF, pH 7,4 nas membranas de PGA eletrofiadas: 25 °C (○) e a 37 °C (●).

Vários fatores podem contribuir para o aumento no percentual de inchamento no equilíbrio ( $M_t/M_\infty$ ) de um gel frente a um aumento na temperatura, entre eles pode-se destacar o aumento no percentual de ligações de hidrogênio devido à interação entre as moléculas de água e os grupos –OH, fornecimento de energia térmica às moléculas de água e aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, permitindo novas conformações para a rede polimérica.

A Figura 77 mostra os gráficos de  $\ln(M_t/M_\infty)$  como função de  $\ln(t)$  a temperatura de 25 °C e 37 °C e a Tabela 3 mostra os valores obtidos para os coeficientes  $n$ ,  $K$  e os coeficientes de correlação das retas. Observa-se na Tabela 3 que o tipo de transporte tende a ser Fickiano [191-192], ou seja; o tempo de relaxação das cadeias poliméricas é muito mais curto que o tempo gasto para o transporte do fluido SBF. Nesse caso; a difusão de água para dentro da matriz polimérica governa a dinâmica de inchamento da membrana de PGA eletrofiada. Devido às propriedades viscoelásticas da rede polimérica de PGA, o mecanismo de transporte da solução de SBF através da membrana eletrofiada pode se dar devido a fatores como gradiente de concentração, relaxação das cadeias poliméricas ou gradientes de pressão osmótica na membrana polimérica eletrofiada.

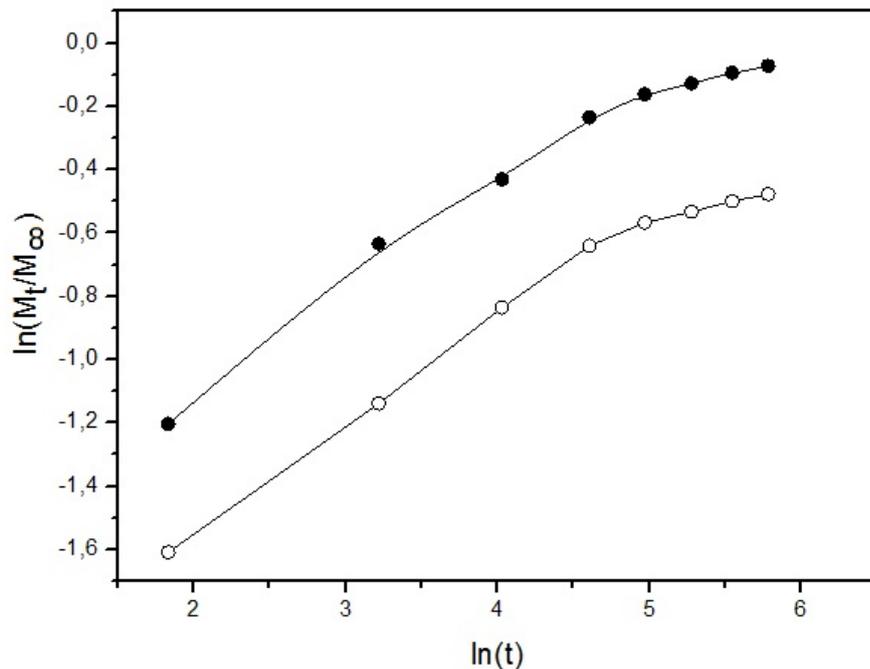


Figura 77-  $\ln(M_t/M_\infty)$  como função de  $\ln(t)$  para a membrana de PGA eletrofiada a 25 °C (○) e 37 °C (●).

Tabela 3- Valores dos coeficientes de intumescimento medidos em diferentes temperaturas para as membranas de PGA eletrofiadas.

Temperatura (°C)	N	k (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
25	0,30	0,12	0,9687
37	0,29	0,20	0,9588

Uma descrição mais completa do processo de absorção de água pelas membranas de PGA eletrofiadas pode ser efetuada num intervalo de tempo longo o suficiente para que absorção de água ocorra essencialmente devido à relaxação das cadeias poliméricas. Nesse caso, pode-se utilizar a Equação 4.18 [193-194]:

$$\frac{dM_t}{dt} = k'(M_\infty - M_t) \quad (4.18)$$

sendo  $k'$  a constante da velocidade de relaxação da rede polimérica.

A integração da Equação 4.19 fornece:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - Ae^{-k't} \quad (4.19)$$

sendo  $A$  é uma constante. Os valores de  $k'$  foram calculados pela inclinação da reta obtida no gráfico de  $\ln(1 - M_t/M_\infty)$  em função de  $t$ .

A Figura 78 ilustra a curva de  $\ln(1 - M_t/M_\infty)$  em função de  $t$  e a Tabela 4 mostra os valores encontrados para  $k'$  e os coeficientes de correlação das retas obtidas.

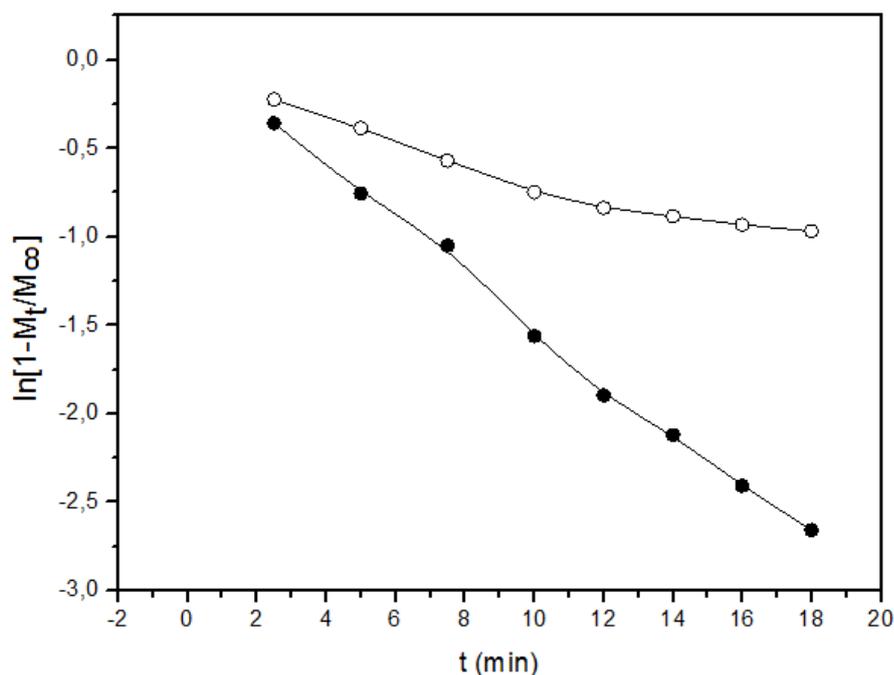


Figura 78 - Curva  $\ln(1 - M_t/M_\infty)$  em função de  $t$  para as membranas de PGA eletrofiadas a 25 °C (○) e 37 °C (●).

Os bons coeficientes de correlação encontrados (Tabela 4) para as membranas de PGA eletrofiadas parece validar a hipótese de que o mecanismo de relaxação é o mecanismo dominante para grandes tempos de intumescimento. Ao mesmo tempo, os valores da constante da velocidade de relaxação variaram de modo homogêneo frente a variações da temperatura exibindo um aumento na velocidade de relaxação frente ao aumento na temperatura.

Deve ser observado que para longo intervalos de tempo de intumescimento as moléculas de água já se ligaram aos grupos  $-OH$  da membrana de PGA eletrofiada e reduziram assim os efeitos de sua carga no processo de intumescimento. Ao mesmo tempo, em intervalos longos de tempo, a hidratação dos grupos  $-OH$  permite que a rede polimérica de PGA eletrofiada possa ser tratada como uma rede não carregada eletrostaticamente, onde um aumento na temperatura irá provocar uma maior mobilidade das cadeias poliméricas e conseqüentemente, aumentar sua velocidade de relaxamento. Portanto, a hipótese de que a relaxação das cadeias poliméricas é responsável pelo mecanismo de inchamento para longos intervalos de tempo se mostrou válida as membranas de PGA eletrofiadas.

Tabela 4- Valores da constante da velocidade de relaxação e do coeficiente de correlação das membranas de PGA eletrofiadas a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
25	0,0492	0,9360
37	0,151	0,9949

Uma vez que as propriedades mecânicas da membrana eletrofiada de PGA são determinantes para sua aplicação na Engenharia de Tecidos Biológicos, foram avaliados seus módulos de elasticidade em função da densidade aparente de reticulação. A densidade aparente de reticulação,  $\nu_e$ , foi determinada utilizando a Equação 4.20 [195]:

$$\sigma = RT \left( \frac{\phi_{p,0}}{\phi} \right)^{2/3} \phi_p \nu_e (\lambda - \lambda^{-2}) \quad (4.20)$$

sendo  $\phi_{p,0}$  e  $\phi_p$  a fração do volume do gel do polímero no estado relaxado (logo após a polimerização) e em equilíbrio de intumescimento, respectivamente; R é a constante dos gases e T é a temperatura (K). A fração volumétrica do polímero,  $\phi$ , foi obtida a partir da Equação 2.21:

$$\phi = [1 + \delta_p \delta_s^{-1} (m_{eq} \cdot m_s^{-1}) - \delta_p \delta_s^{-1}]^{-1} \quad (4.21)$$

sendo  $\delta$  a densidade do polímero,  $\delta_s$  a densidade do solvente,  $m_{eq}$  representa a massa da membrana de PGA em equilíbrio (intumescida) e  $m_s$  é a massa da membrana de PGA seca.

A Figura 79 ilustra os resultados obtidos para a variação do módulo de elasticidade (E) com a densidade de reticulação ( $\nu_e$ ). Observou-se que membranas eletrofiadas de PGA com alto teor de metacrilato de glicidila (GMA) apresentam maior densidade de reticulação. Além disso, a formação de interações não covalentes entre os segmentos poliméricos parece contribuir para aumentar o valor de  $\nu_e$ .

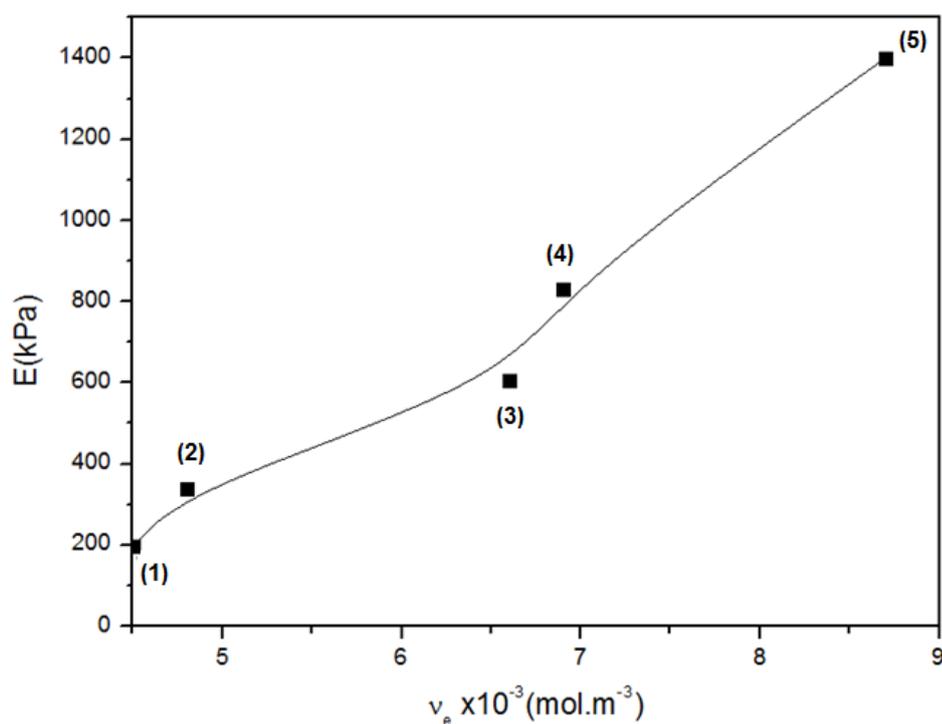


Figura 79- Valores de módulo de elasticidade,  $E$ , e densidade aparente de reticulação,  $v_e$ , para hidrogéis de PGL. As amostras diferem em quantidades de GMA: 0,25% m/m (1), 0,50% m/m (2), 0,75% m/m (3), 1,0% m/m (4) e 2,0% m/m (5).

Os mecanismos de interação do PGA com a água não são totalmente conhecidos, porém, sabe-se que sua tendência a anfipaticidade poderá facilitar sua interação com a superfície celular de mamíferos e exercer influência no processo de adesão e proliferação celular.

O fluido biológico poderá fornecer uma contribuição importante para a estrutura, a dinâmica e a proliferação celular no arcabouço de PGA eletrofiado. Representar a interação explícita do SBF com o PGA eletrofiado seria desejável do ponto de vista biológico mas na visão da química computacional isso aumentaria significativamente o tempo de simulação incentivando assim a se trabalhar com modelos que representem implicitamente a interação entre o fluido biológico e o PGA. Dentre os modelos implícitos, encontram-se os modelos baseados na área/superfície acessível ao solvente (SAS).

A SAS do PGA seria uma forma de se quantificar seu efeito hidrofóbico. O conceito de SAS tem sua origem no trabalho de Lee e Richards [196] na década de 70. A

superfície acessível ao solvente descreve a área na qual o contato entre a molécula (PGA) e o solvente ocorre. A SAS é definida como o lugar geométrico dos centros de uma esfera de prova (representando a molécula do solvente) como se esta rodasse sobre uma superfície de van der Waals do PGA (Figura 80).

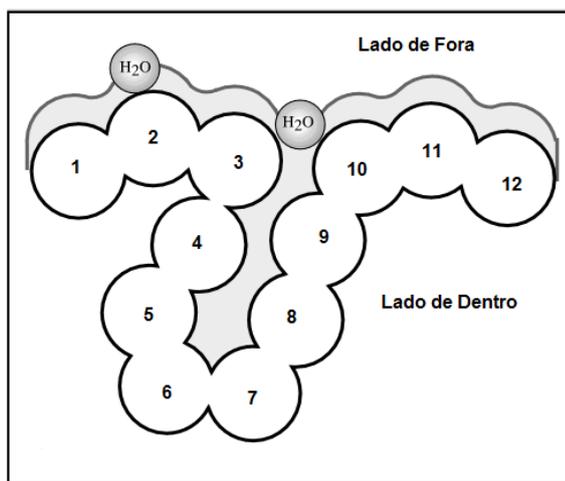


Figura 80 - Ilustração da medida de acessibilidade da água à superfície do PGA. A acessibilidade das moléculas de água pode ser medida fazendo "rolar" uma molécula de água "esférica" sobre uma superfície do PGA e somando a área que pode ser acessada por esta molécula em cada unidade mérica do polímero. Adaptado de [197].

A Figura 81 ilustra a área acessível ao solvente do PGA. A avaliação das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas do PGA expostas ao solvente foi computada sobre os últimos 9,5 ns de trajetória (Figura 81), utilizando o Gromacs. Calcularam-se as propriedades moleculares ASA+ (superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva), ASA- (superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa), ASA-H (superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos), ASA-P (superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofílicos). A análise revela que existe uma contribuição significativa de ASA-H, indicando que o PGA possui propriedades anfífilicas o que contribui para a distribuição da carga ao longo da cadeia polimérica, o que poderá contribuir para o processo de eletrofiação e ao mesmo tempo para a relaxação da membrana de PGA eletrofiada durante seu intumescimento em fluido fisiológico.

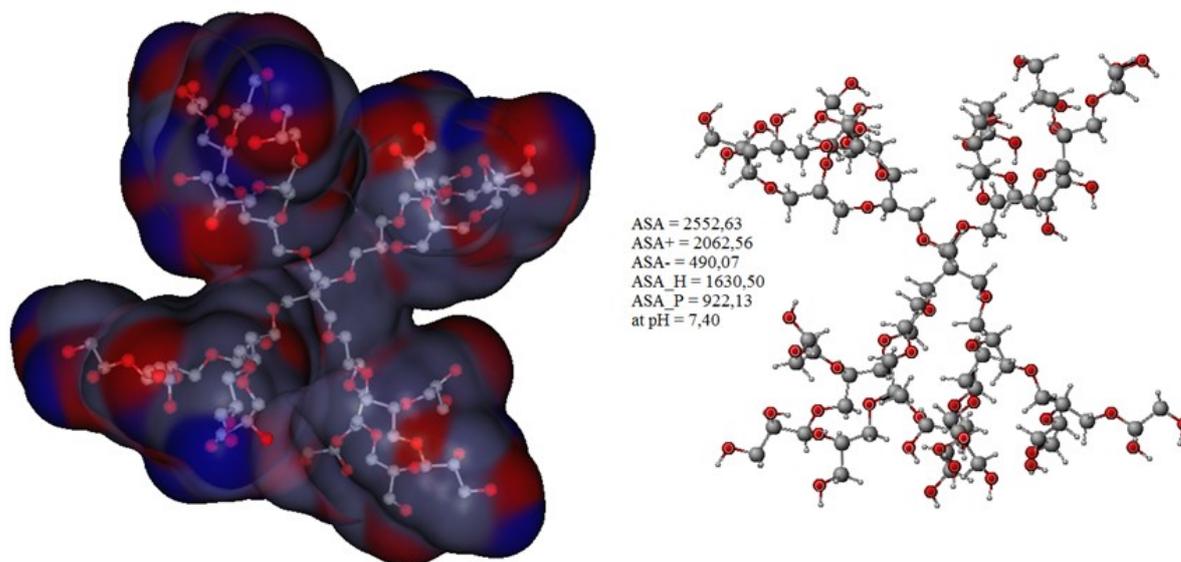


Figura 81- Ilustração da SAS (água) para o PGA, calculado utilizando o GROMACS 4.0. Superfície ( $\text{\AA}^2$ ) em vermelho e azul indicam o potencial eletrostático negativo e positivo, respectivamente.

#### 4.5 Ensaio biológicos

O modelo de experimentação animal tem contribuído grandemente para o desenvolvimento da ciência e tecnologia promovendo até o presente século a utilização segura de novos medicamentos para o tratamento de enfermidades que acometem os seres vivos a exemplo da insulina, desenvolvimento de vacinas e a produção de soros contra toxinas de animais e insetos [198].

A indústria dos biomateriais também é uma grande usuária de animais no sentido de se detectar a toxicidade de dispositivos implantáveis para uso em seres humanos, tanto os dispositivos clássicos como aqueles desenvolvidos com base na nanotecnologia (Figura 82). Nesse caso, os biomateriais devem ser avaliados pré-clinicamente para que não causem reações adversas e nem lesem o organismo do paciente.

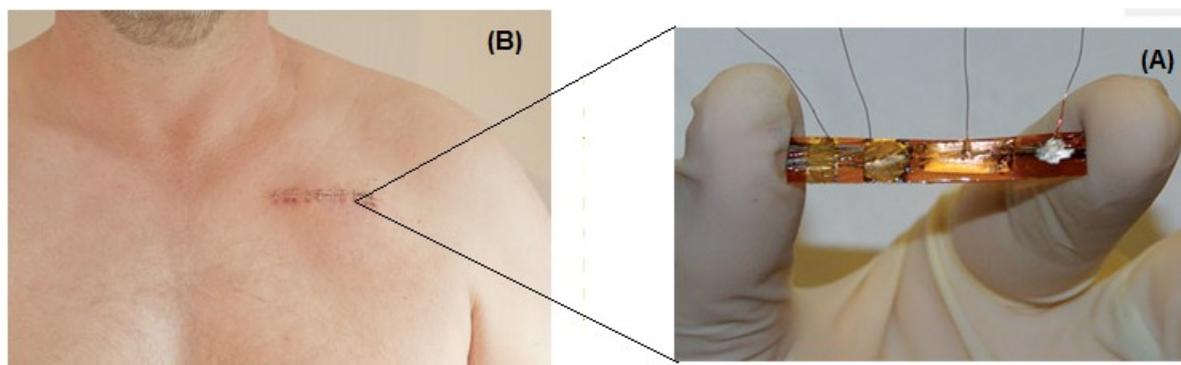


Figura 82 - A medicina do século XXI trabalha com dispositivos complexos oriundos da nanotecnologia a exemplo da pilha de combustível implantável. O nanodispositivo converte a energia mecânica e bioquímica para alimentar outros dispositivos implantados a exemplo dos nanosensores e marca-passos. A biocompatibilidade com o tecido humano é fundamental para o sucesso da aplicação do dispositivo. Adaptado de [199].

Nesse século, a adoção de sistemas *in vitro* envolvendo a cultura de células biológicas de linhagens específicas, pode substituir completamente a utilização de animais nas fases de síntese em escala de bancada e semi-industrial dos biomateriais cerâmicos, poliméricos ou metálicos. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro ensaio de laboratório com a finalidade específica de se avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Somente após comprovada a não toxicidade do candidato a biomaterial nos ensaios padronizados ISO é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade através do modelo de experimentação animal, observando-se nesse caso o princípio dos 3R's [200].

O princípio dos 3 R's envolve três palavras de profundo significado na experimentação animal: *replace*, *refinement* e *reduction*. Nesse caso, *replace*, indica a substituição absoluta por técnicas que não usem animais ou, substituição por animais menos evoluídos. A segunda palavra *reduction*, significa a redução do número de animais usados na experimentação ou o desenvolvimento de estratégias que resulte num menor número de animais, maximizando-se assim a informação obtida por animal. Finalmente o *refinement* orienta para a diminuição do nível de estresse (pressão) e dor causada ao animal durante a experimentação. Como pode ser observado, o princípio dos 3R's define na verdade uma nova ciência ética, daí o neologismo Bioético; combinando humildade,

responsabilidade e uma competência interdisciplinar, intercultural potencializando assim o senso de humanidade no planejamento experimental.

Tendo em vista uma perspectiva de futura aplicação das membranas de PGA eletrofiadas na Engenharia de Tecidos Biológicos, torna-se necessária a realização de testes biológicos com as membranas de PGA produzidas por eletrofição. São apresentados a seguir os ensaios de citotoxicidade utilizando linhagens celulares de células de ovário de Hamster Chinês (CHO-k1) e estudos da adesão e proliferação de fibroblastos da linhagem BALB/3T3, do banco de células da ATCC. Ambos os ensaios, estão em boa concordância com o princípio dos 3R's.

#### 4.5.1 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade utilizando as linhagens CHO desenvolvido nesse trabalho consiste em colocar o material indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares com base na incorporação de corantes. Nesse caso, a velocidade de crescimento e multiplicação celular pode ser medida indiretamente após contato com a solução do extrato do material sintético, utilizando o corante supravital MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio)]. No ensaio de citotoxicidade utilizando o MTS, o corante é bio-reduzido através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase pelas células viáveis ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura. A quantidade de MTS metabolizada pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis e a intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional ao número de células viáveis (vivas) presentes no meio [201]. Nesse caso, a curva dose resposta da amostra, determinada após 48 horas de exposição, pode ser construída para permitir a obtenção dos valores de IC50, índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50 % das células inicialmente presentes no meio.

A Figura 83 mostra o ensaio de citotoxicidade das membranas de PGA eletrofiadas contra as células CHO. De acordo com os dados obtidos neste ensaio, a membrana eletrofiada de PGA não apresentou citotoxicidade, pois a viabilidade celular manteve-se acima de 100% para todas as concentrações, tendo-se o PEAD como controle negativo e

o fenol a 0,3% como controle positivo (Fig. 83). O resultado de citotoxicidade obtido parece favorecer a utilização das membranas eletrofiadas de PGA como arcabouço molecular para a Engenharia de Tecidos Biológicos.

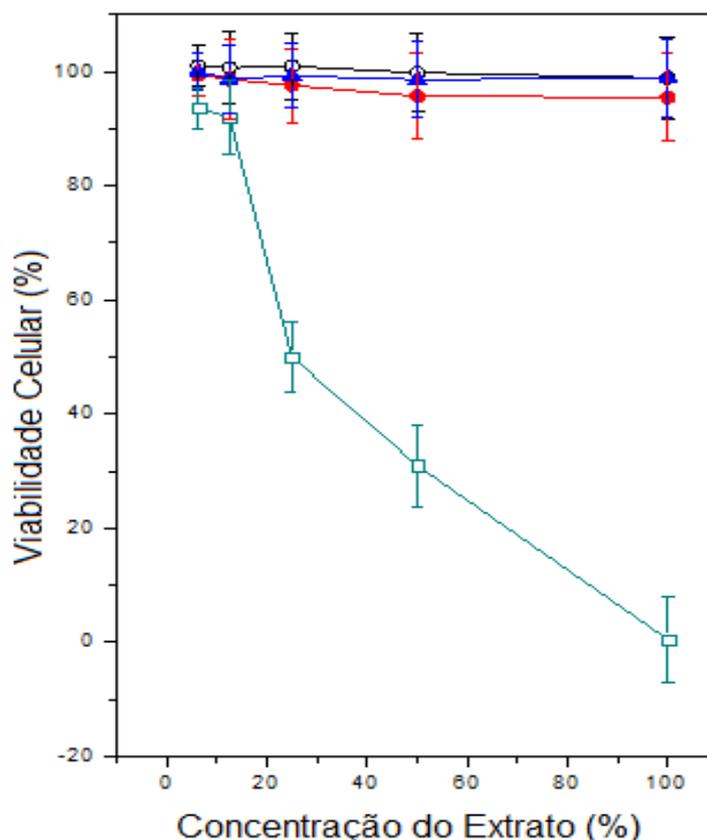


Figura 83- Ensaio de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de PGA (▲) e decaglicerol (●). Os controles positivo e negativo são o fenol a 0,3% (□) e o polietileno de alta densidade (○), respectivamente.

#### 4.5.2 Ensaio de Adesão e Proliferação Celular

Atualmente os experimentos envolvendo estudos de adesão e proliferação celular na superfície de arcabouços moleculares fornece um melhor entendimento a respeito das interações interfaciais entre a célula biológica e a superfície do material sintético.

É fato conhecido na literatura que os eventos iniciais na interface implante-material sintéticos envolvem a adsorção protéica seguido do processo de adesão celular [202-203]. A adesão celular por sua vez se deve à existência de forças de van der Waals e eletrostáticas entre o implante sintético e a membrana celular havendo nesse caso, o envolvimento de

proteínas e receptores que compõem a matriz extracelular mediado por integrinas, as moléculas responsáveis pelo fenômeno de adesão celular no arcabouço molecular sintético [204-205].

O sucesso da membrana eletrofiada de PGA em sua utilização na Engenharia de Tecidos Biológicos dependerá em grande parte da adesão e do crescimento das células biológicas de interesse. A química da superfície das membranas de PGA poderá assim, definir a resposta celular a ela e, dessa forma, afetar a adesão, proliferação, migração e função das células biológicas. Sendo assim, esse trabalho estudou o processo de adesão e crescimento celular de fibroblastos na superfície da membrana de PGA eletrofiada pelas técnicas de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

As células foram colocadas na superfície das membranas de PGA eletrofiadas na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células e mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$  por cinco dias. Após este período os suportes foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e as células fixadas com formalina 10% por 10 minutos. Para a MEV, o material foi liofilizado.

As Figuras 84-86 mostram micrografias de microscopia de fluorescência da confluência das células da linhagem BALB/3T3 sobre a superfície da membrana de PGA eletrofiada após 24 h de cultivo. Observa-se uma grande quantidade de células que migraram e proliferaram para o interior dos poros da membrana de PGA eletrofiada o que permite concluir que o material possui além da biocompatibilidade as características adequadas para a adesão e migração das células fibroblásticas no arcabouço polimérico.

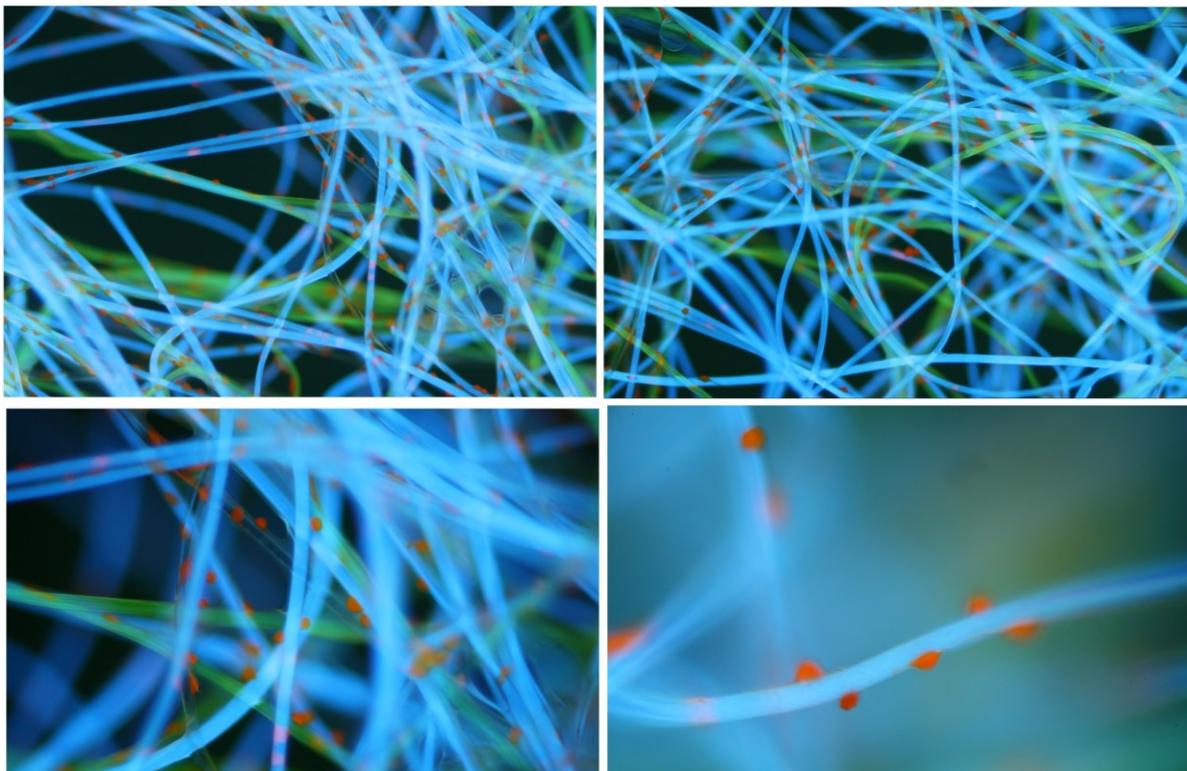


Figura 84- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 aderidas na membrana de PGA eletrofiada após 24 h de cultivo. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas aderidas nas fibras de PGA eletrofiadas. A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro azul com excitação de 450-490 nm. Objetiva: 4X.

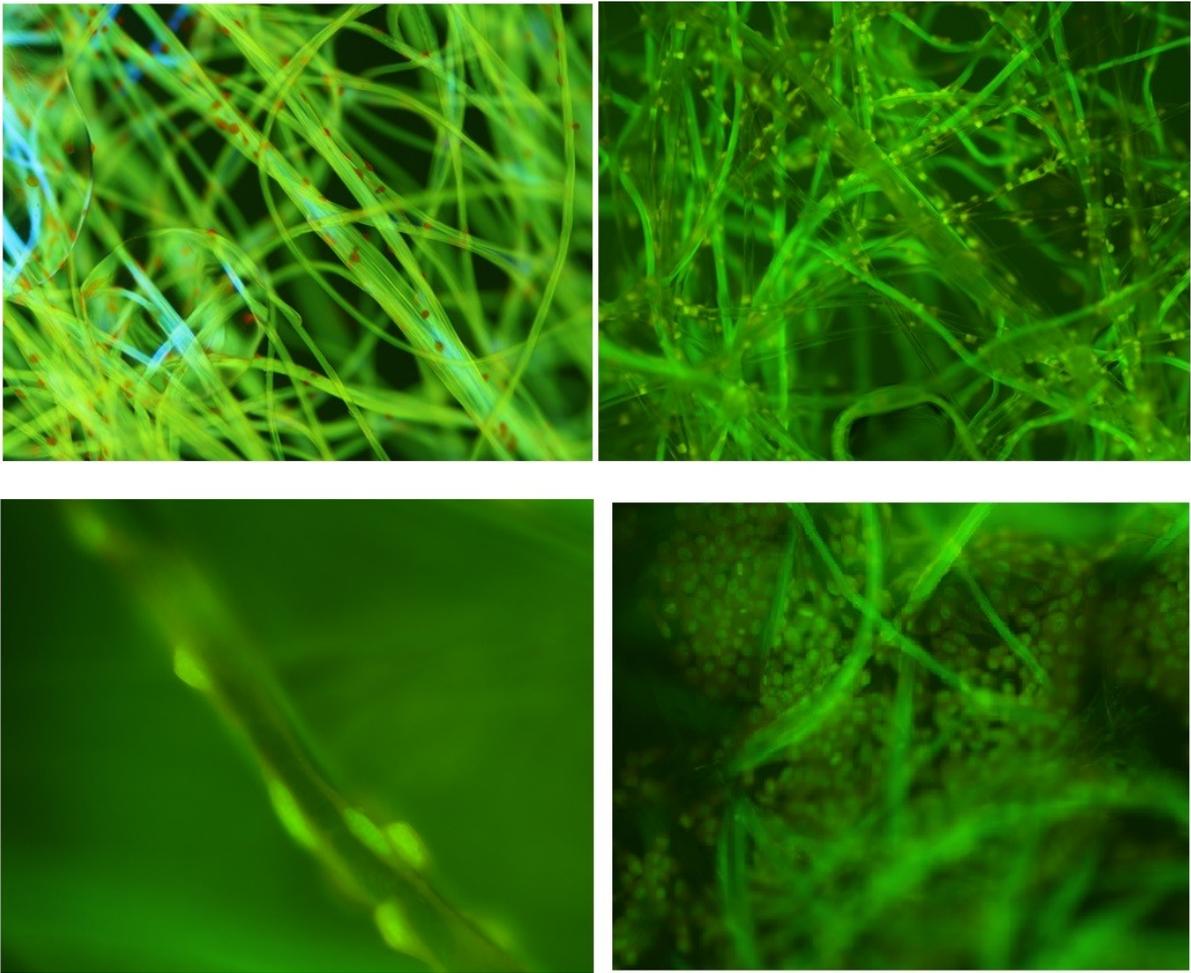


Figura 85- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 aderidas na membrana de PGA eletrofiada após 24 h de cultivo. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas aderidas nas fibras de PGA eletrofiadas. A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro de excitação FITC-Texas Red. Objetiva: 4X.

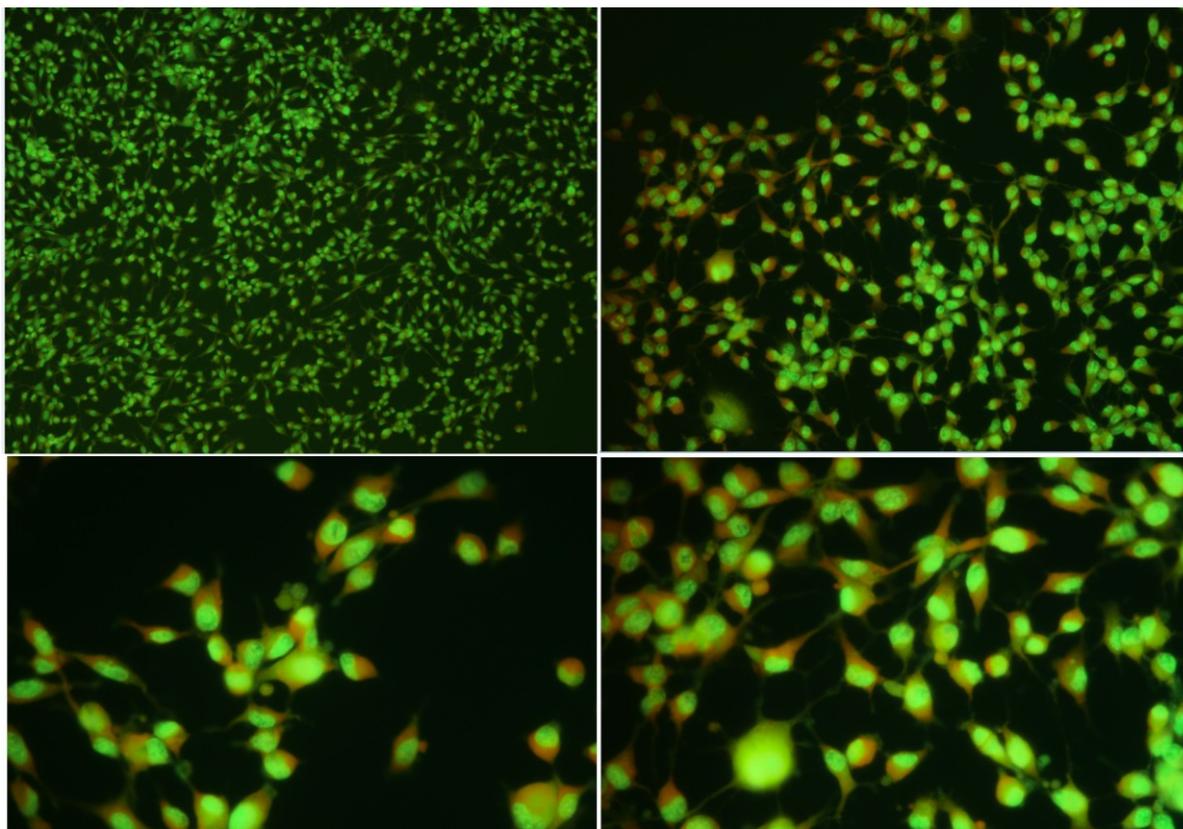


Figura 86- Análise em microscopia de fluorescência das células de fibroblasto da linhagem BALB/3T3 do grupo de controle. Foram utilizados os marcadores laranja de acridina para identificação das células fibroblásticas. A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 com filtro de excitação FITC-Texas Red. Objetiva: 4X.

A viabilidade e proliferação celular nos arcabouços de PGA foram determinadas através do ensaio do MTS (capacidade das células viáveis reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio com a formação de cristais de formazan de cor púrpura), executado em diferentes períodos de interação das células com os suportes.

As células foram colocadas na superfície das membranas de PGA eletrofiadas (1x1 cm) na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células e mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$  por cinco dias. A cada 24h, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4 e adicionado MTS (solução de 5 mg/mL) juntamente com meio DMEM (sem soro) na proporção de 1:5. As células foram incubadas por 3 h a  $37^\circ\text{C}$ . Após este período, o meio foi aspirado e adicionado 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a dissolução dos cristais, a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 490 nm. Para células viáveis o reagente MTT, de coloração amarelada, é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através das enzimas

redutases. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis aderidas na membrana de PGA eletrofiada.

A Figura 87 mostra o gráfico relacionado ao crescimento das células aderidas na membrana de PGA eletrofiada. Observa-se que a linhagem celular de fibroblasto aderiu ao suporte desde o primeiro dia, sem perder sua viabilidade e exibiu uma tendência de crescimento linear durante os cinco dias da experimentação.

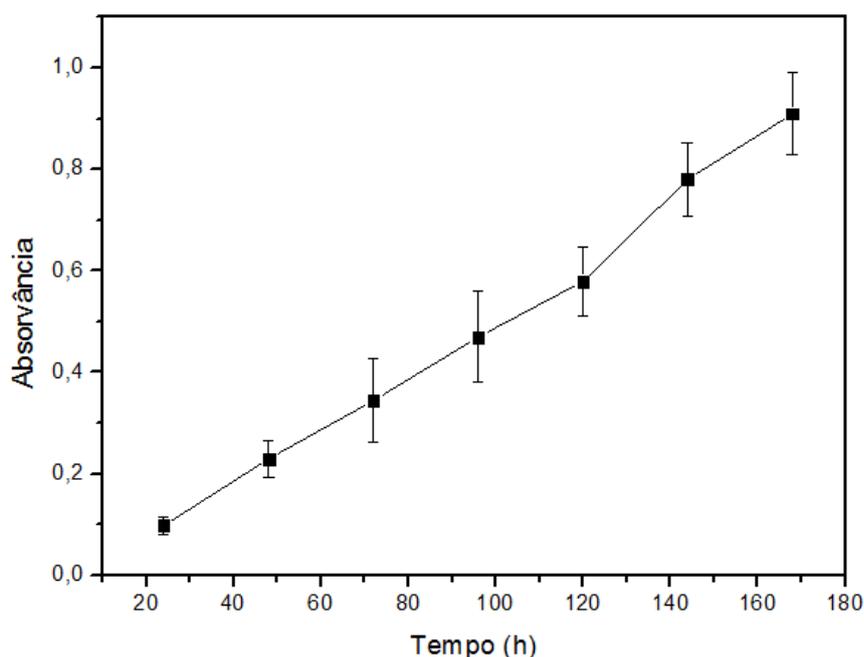


Figura 87- Ensaio de proliferação da linhagem de fibroblastos BALB/3T3 na membrana de PGA eletrofiada. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> na presença das membranas e a cada intervalo de tempo de 24h, uma membrana foi retirada para a realização do método de redução de MTT. O crescimento celular apresentou comportamento linear ( $y = 0,00548X - 0,0348/R^2 = 0,9960$ ). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

As membranas de PGA eletrofiadas contendo as células de fibroblastos BALB/3T3 foram em seguida avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, para observação do citoesqueleto das células fibroblásticas aderidas.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas no processo de cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo através da síntese dos componentes da matriz extracelular [206]. Os fibroblastos são estimulados a

produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização [207].

Os fibroblastos são suscetíveis a alterações devido às forças mecânicas as quais são submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas, além de estarem diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula [208].

As células fibroblásticas são obtidas a partir de tecido conjuntivo, cartilagens, revestimentos de vasos sanguíneos, músculos e estromas de vários órgãos. Em cultura, as células fibroblásticas apresentam-se alongadas, fusiformes e com pouca capacidade de formar lâmina basal, conforme é ilustrado pelas micrografias MEV na Figura 88 do grupo controle das linhagens celulares BALB/3T3.

A adesão e proliferação das células fibroblásticas na membrana eletrofiada de PGA são aspectos importantes para a Engenharia de Tecidos Biológicos [209]. O estudo da morfologia celular por MEV (Figura 89) permitiu a observação de células fibroblásticas aderidas e espaiadas sobre a membrana de PGA eletrofiada com citoesqueleto de actina organizado em fibras de estresse (*stress fibers*). A adesão das células fibroblásticas à membrana de PGA eletrofiada parece regular o crescimento, migração e a viabilidade celular além da organização tecidual e o remodelamento do arcabouço molecular (PGA) [210-211].

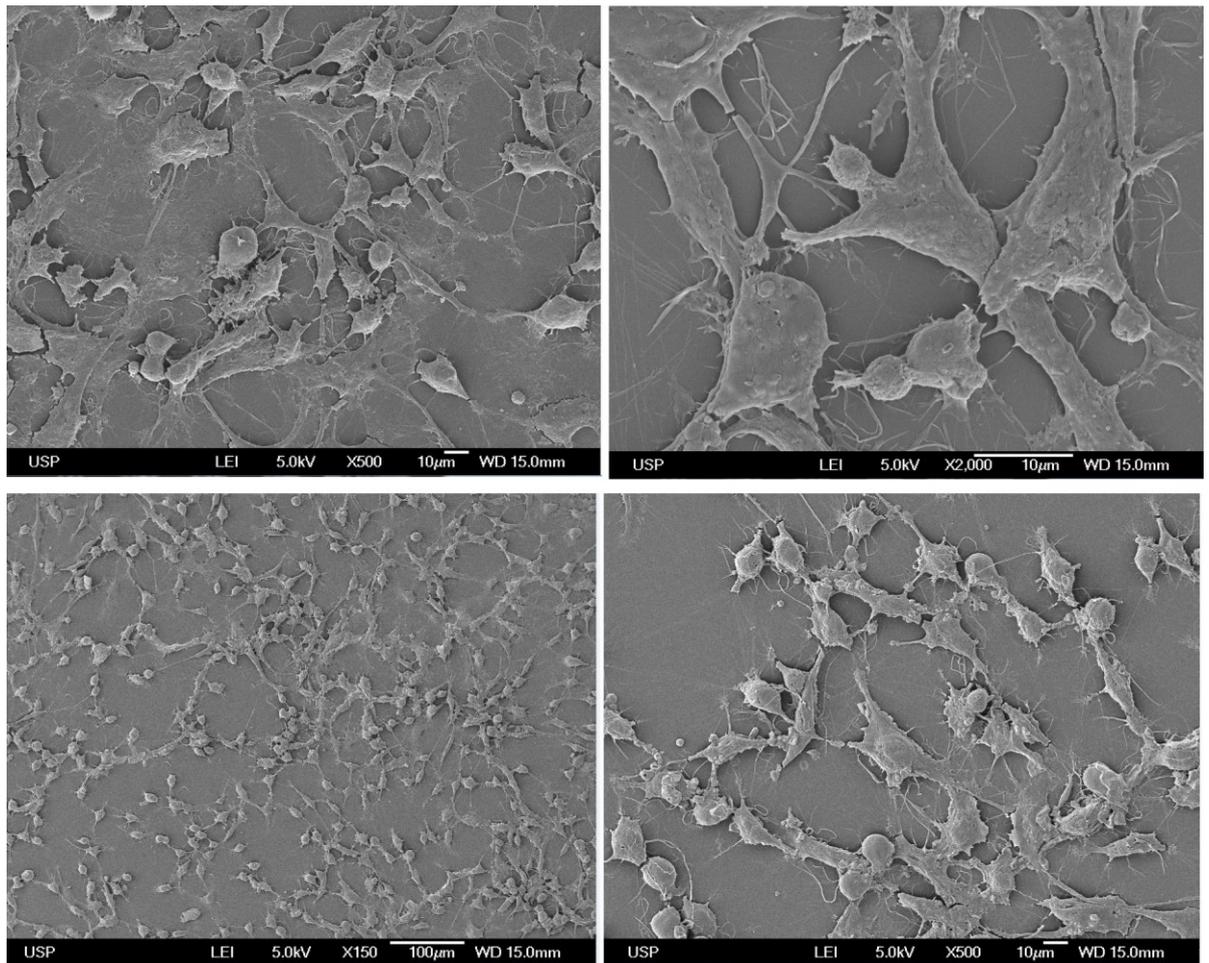


Figura 88- Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle referente às células fibroblásticas da linhagem BALB/3T3 utilizadas nesse trabalho. As células foram liofilizadas.

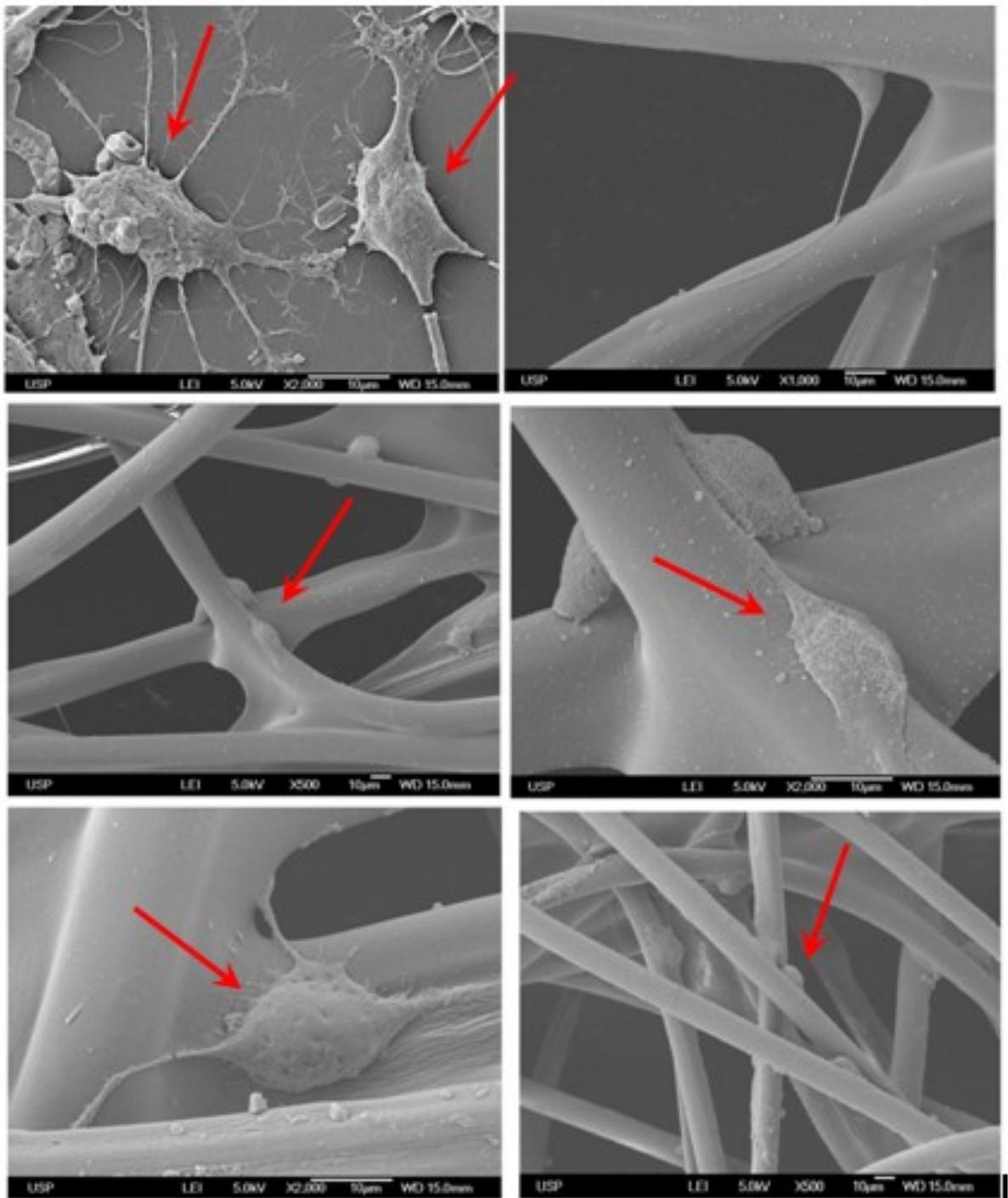


Figura 89- Microscopia eletrônica de varredura evidenciando os fibroblastos aderidos nas fibras de PGA eletrofiadas. As membranas de PGA foram liofilizadas.

# 5

## **CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS**

Este capítulo faz o balanço final do trabalho, realçando os aspectos principais da utilização da técnica de eletrofiação para a obtenção de arcabouços moleculares de poliglicerol arborescente e suas propriedades biológicas quanto ao processo de adesão e proliferação celular. Algumas perspectivas futuras interessantes para o desenvolvimento de outros estudos complementares tomando em conta as limitações inerentes a este trabalho foram destacadas.

Arcabouços de PGA foram obtidos com sucesso através da técnica de eletrofiação e apresentaram-se como candidatos promissores para utilização na engenharia de tecidos como uma plataforma para cultivo 3D de células biológicas, dados os resultados positivos alcançados através dos ensaios *in vitro* de adesão e proliferação de fibroblastos.

O arcabouço de PGA eletrofiado foi biocompatível e sustentou a adesão e o crescimento de células de fibroblastos. Estudos *in vitro* de cultura celular de fibroblastos indicaram que os arcabouços de PGA eletrofiado promoveram a adesão celular e o mais importante, promoveram o crescimento celular.

É fato que a adesão celular é crucial para a união de células nos tecidos de mamíferos. Sob esse aspecto, não há uma simples adesão das células no arcabouço para formar os tecidos. As células se organizam em padrões muito diferentes e altamente distintos. Também é conhecido na literatura que há uma grande variedade de mecanismos de adesão celular responsáveis pela união das células, juntamente com suas conexões com o citoesqueleto interno [212].

As células são responsáveis por secretar matriz extracelular, organizá-la e degradá-la. O arcabouço, por sua vez exerce influências potentes sobre as células durante o seu processo de adesão, crescimento e diferenciação. As influências são exercidas principalmente através de proteínas transmembranares de adesão celular que atuam como receptores de matriz [213]. Os receptores da matriz têm um papel importante nas células epiteliais, mediando suas interações com a lâmina basal. Vários tipos de moléculas podem funcionar como receptores da matriz ou co-receptores, incluindo os proteoglicanos transmembranares, mas os principais receptores em células de animais para proteínas de ligação da matriz extracelulares são as integrinas [214].

Para ampliar o campo do conhecimento a respeito da utilização de arcabouços de PGA eletrofiados na Engenharia de Tecidos, é importante desenvolver técnicas de eletrofiação ao nível 3-D de forma a se mimetizar a matriz extracelular, controlando assim o processo de adesão celular estabelecendo variáveis de controle de processo como distribuição do tamanho de poros, topografia e físico-química da superfície de forma a se aperfeiçoar os parâmetros de processo de modo a se atingir uma matriz não somente biocompatível, mas também biodegradável.

Os estudos desenvolvidos nessa pesquisa permitiram que “aprendêssemos” a manipular os parâmetros de eletrofiação, no âmbito do sistema experimental desenvolvido nesse trabalho, o que permitiu a observação de tendências da máquina montada em nossos laboratórios em produzir arcabouços eletrofiados que suportam a adesão e o crescimento celular de células fibroblásticas. Pode-se concluir, portanto, que as membranas de PGA eletrofiadas suportam a adesão e o crescimento celular e que esse processo biológico pode ser controlado através do controle das variáveis de processo na máquina de eletrofiação e da química de superfície do material.

Nosso próximo passo envolverá a realização de ensaios bioquímicos que permitam avaliar a absorção de fibronectina (FN) e seus anticorpos específicos nas membranas eletrofiadas de PGA de modo a se quantificar o quão intensa é sua influência no processo de adesão celular.

Ainda no estágio atual de nosso conhecimento, ainda não podemos realizar uma análise quantitativa da força de adesão das células fibroblásticas no arcabouço de PGA eletrofiado.

No futuro, uma análise quantitativa da força envolvida na adesão celular fornecerá informações valiosas quanto aos sinais bioquímicos desencadeados pelo arcabouço de PGA eletrofiado e os mecanismos envolvidos nos processos de adesão e crescimento celular. Certamente esse projeto de pesquisa também será inovador, pois integra o conhecimento dos descritores do processo de micro/nanofabricação de arcabouços eletrofiados na manipulação ao nível celular de adesão e composição local de FN na organização da matriz extracelular. Os resultados obtidos poderão contribuir com novos conhecimentos para o desenvolvimento de arcabouços biomiméticos, biodegradáveis e biocompatíveis com biofuncionalidades específicas para a Engenharia de Tecidos Biológicos.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

**6**

- 
- [1] PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. *Tissue Engineering*. New Jersey, Pearson Prentice Hall, 2004.
- [2] RINIE, V. E; KEULEN, V. I; GEESINK I; SCHUIJFF, M. *Making Perfect Life: Bio-engineering (in) the 21st century, European Parliament, STOA - Science and Technology Options Assessment*, 2010. Disponível em: [https://www.itas.kit.edu/downloads/etag\\_esua10a.pdf](https://www.itas.kit.edu/downloads/etag_esua10a.pdf). Acessado em: 13/Fev/2015.
- [3] CHAPEKAP, M. *Tissue Engineering: Chllenges and opportunities*, Journal of Biomedical Materials Research, Applied Biomaterials, 53, p.617-620, 2000.
- [4] KARP, M. J; DALTON, D. P; SHOICHET, S. M. *Scaffolds for Tissue Engineering*, Mrs Bulletin, April, pp. 301-306, 2003.
- [5] YANG, S; LEONG, K; ZHAOHUI, D; CHUA, C. *The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering Part I. Traditional Factors*. TISSUE ENGINEERING Volume 7 (6), pp. 679-689, 2001.
- [6] SHALAK, R.; FOX, C. *Tissue engineering proceedings:Workshop held at Granlibakken*. Lake Tahoe, New York, February 26-29, 1988.
- [7] LANGER, R.; VACANTI J.P.*Tissue engineering*. Science 260: 1993, 920-926.
- [8] PATRICK, C.W; MIKOS, A.G; MCINTIRE, L.V. *Prospects of tissue engineering*. In: *Frontiers in Tissue Engineering*. Elsevier Science Ltd, Oxford. pp. 3-11, 1998.
- [9] CIMA. L. G., VACANTI, J. P., VACANTI, C.,*Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates*. J. Biomech. Eng. 113, 143-151, 1991.
- [10] IRSEN, S. H; SEITZ,C; TILLE, G; BERMES, E; WOLFINGER, R; SADER, H; ZEILHOFER, F. *Anatomical Rapid Prototyping models with soft and hard tissue representation for surgical planning*. ESEM 2003, Technology and Health Care Special Issue 12, 110-111, 2004.
- [11] KALITA, S. J; BOSE, S; BANDYOPADHYAY, A; HOSICK, H. L. *Development of controlled porosity polymer ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling*. Materials Science and Engineering C 23, 611–620, 2003.

- 
- [12] LEONG K. F; CHEAH C. M; CHUA C. K. *Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs*. Biomaterials 24, 2363-2378, 2003.
- [13] YOSHIKAWA, H; TAMAI, N; MURASE, T; MYOUI, A. *Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering*, J. R. Soc. Interface, Vol. 6, pp. S341–S348, 2009.
- [14] Disponível em <http://blogs.discovermagazine.com/80beats/2010/06/24/stem-cell-treatment-lets-those-with-scorched-corneas-see-again/#.VOOyKObF9ic>. Acessado em 17/02/2015.
- [15] VOORHEES A. B; JARETZKI A; BLAKEMORE A. H. *The use of tubes from vinyon N cloth in bridging arterial defects*. Ann. Surg. Vol. 135, pp. 332-6, 1952.
- [16] WESOLEWSKI, S. A; FRIES, C. C; KARLSON, K. E; DEBAKEY, M; SAYER P. N. *Porosity: primary determinant of ultimate fate os synthetic vascular grafts*. Surgery, Vol. 50, pp. 91-96, 1961.
- [17] KIM, H.W; KIM, H. E; SALIH, V. *Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds*. Biomaterials. Sep, 26(25), 5221-30, 2005.
- [18] LI, W. J; LAURENCIN, C. T; CATERSON, E. J; TUAN, R.S; KO, F. K. *Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering*. J Biomed Mater Res, 60,613–21, 2002.
- [19] CHEN, M; PATRA P. K; WARNER, S. B; BHOWMICK, S. *Optimization of electrospinning process parameters for tissue engineering scaffolds*. Biophys Rev. Lett, 1,153–78, 2006.
- [20] GRIFFITH, L.G. *Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering*. Ann N Y Acad Sci, 961,p.83-95, 2002.
- [21] FREITAS, JANDERSON LEITE. *Propriedades Hemocompatíveis do Dendrímero Bioativo de Poliglicerol Conjugado com Estreptoquinase*. 2008. Dissertação(Mestrado em

---

Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá. *Orientador*: Álvaro Antonio Alencar de Queiroz.

[22] MENDES, RENATA MOURA. *Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrímero de poliglicerol salicilado em diferentes linhagens celulares*. 2011. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. *Orientador*: Álvaro Antonio Alencar de Queiroz.

[23] RENEKER, D. H., YARIN, A. L. *Electrospinning jets and polymer nanofibers*. *Polymer*, v.49, n.10 p.2387-2425, 2008.

[24] PAVIA, F. C; RIGOGLIUSO, S; CARRUBBA, V. L; MANNELLA, G. A; BRUCATO, G. G. V. *Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering*. *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 27, pp. 409-414, 2012.

[25] SALGADO, A. J; COUTINHO, O. P; REIS, R. L; DAVIES, J. E. *In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications*. *J. Biomed Mater Res* 80A, pp. 983–989, 2007.

[26] CIMA. L. G., VACANTI, J. P., VACANTI, C., *Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates*. *J. Biomech. Eng.* 113, 143-151; 1991.

[27] HADLOCK, T; SUNDBACK, C; KOKA, R; HUNTER D; CHENEY, M; VACANTI, J. A. *Biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration*. *Laryngoscope*, 109(9):1412-6, 1999.

[28] BERGSMA, J.E; BRUIJN, W.C; ROZEMA, F. R; BOS, R. R; BOERING, G. *Late Degradation Tissue Response to poly(L-lactide) Bone Plates and Screws*. *Biomaterials*, v. 16, pp. 25-31,1995.

[29] SRISUWAN, T; TILKORN, D. J; WILSON, J. L; MORRISON, W.A; MESSER, H. M; THOMPSON, E. W. *Aspectos moleculares da engenharia tecidual na odontologia*. *Periodontologia*, (15),88-108, 2008

- 
- [30] BARTOLD, P. M; XIAO, Y; LYNGSTADAAS S. P; PAINE, M.L; SNEAD, M. L. *Princípios e aplicações dos sistemas de liberação celular para a regeneração periodontal*. Periodontologia, v.15, p.123-35, 2008
- [31] SHAO, X; GOH, J. C; HUTMACHER, D. W; LEE, E. H; ZIGANG, G. *Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model*. Tissue Eng. v.12, n.6, p.1539-51, 2006.
- [32] ELST, V. D; M.; KLEIN, C. P. A. T.; BLIECK-HOGERVORST, J. M; PATKA, P; HAARMAN, H. J. TH. M. – Biomaterials, v.20, p. 121,1999.
- [33] LIANG-WAN, C; XI-JIE, W; LIN, L; GUI-CAN, Z; GUO-FENG, Y; ZHAO-WEI, Y; YI, D. *Total Arch Repair for Acute Type A Aortic Dissection With 2 Modified Techniques: Open Single-Branched Stent Graft Placement and Reinforcement of the Dissected Arch Vessel Stump With Stent Graft*. Circulation, v. 123, p. 2536-2541, 2011.
- [34] VAN DER ELST, M; KLEIN, C. P. A. T; BLIECK-HOGERVORST, J. M; PATKA, P; HAARMAN, H. J. TH. M. Biomaterials, v.20, p.121, 1999.
- [35] BERGSMA, J. E; DE BRUIJN, W. C; ROZEMA, F. R; BOS, R. R; BOERING, G. *Late Degradation Tissue Response to poly(L-lactide) Bone Plates and Screws*. Biomaterials, v.16, p.25-31, 1995.
- [36] ELKE, M; ROLF-JOACHIM, M; WOLF-DIETER, D. – *Polym. Degrad. Stab.*, v. 80, p.485 (2003).
- [37] TANAKA, Y; GONG, J. P; OSADA, Y. *Novel hydrogels with excellent mechanical performance*. Prog Polym Sci, 30, p.1–9, 2005.
- [38] ZI-HENG, L; SHI-CHEN, J; YA-ZHEN, W; XING-CAN, S; HONG, L. S; . *Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering*. Frontiers of Materials Science, v.7, p.237-247, 2013.
- [39] DE QUEIROZ, A. A. A; BRESSIANIJ, J. C. A; BRESSIANI, A. H. A; HIGA, O. Z; ABRAHAM, G. A. *A novel bone scaffolds basedon hyperbranched polyglycerol fibers*

---

*filled with hydroxyapatite nanoparticles: In vitro cell response.* Key Engineering Materials, v. 396-398, p. 633-636, 2009.

[40] HIGA, O. Z; FARIA, H. A. M; DE QUEIROZ, A. A. A. *Polyglycerol dendrimers immobilized on radiation grafted poly-HEMA hydrogels: Surface chemistry characterization and cell adhesion.* Radiation Physics and Chemistry, v.98, p.118-123, 2014.

[41] TANAKA, Y; GONG, J. P; OSADA, Y. *Novel hydrogels with excellent mechanical performance.* Prog Polym Sci, v.30, p.1–9, 2005.

[42] BARRAULT, J.; JEROME, F; POUILLOUX, Y. Lipid Technol, v.17, p.131, 2005.

[43] MEDEIROS, M. A; REZENDE, J. C; ARAÚJO, M. H; LAGO, R. M. *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Foz do Iguaçu- BR., 2009.

[44] STYLIOS, C. D; GROUMPOS, P. P. *A combined fuzzy cognitive map and decision trees model for medical decision making.* Proc 28th IEEE EMBS Annual Inter. Conference in Medicine and Biology Society, EMBS, p. 6118-6120, 2006.

[45] MIKOS, A.G; SARAKINOS, G; LEITE, S.M; VACANTI, J. P; LANGER, R. *Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering.* Biomaterials, v.14, p. 323-330; 1993.

[46] HADLOCK, T; SUNDBACK, C; KOKA, R; HUNTER, D; CHENEY, M; VACANTI, J. *A novel, Biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration.* Laryngoscope, v.109, n.9, p.1412-6, 1990.

[47] ACQUATI, F; BARBANTI, B. G. *Tumor and metastasis suppression by the human RNASET2 gene.* Int. J. Oncol, v.26, p.1159-1168, 2005.

[48] HERBERT, S; AGNIESZKA, B; NERZ, C; KRAUS, D; PESCHEL, A; GOERKE, C; MEEHL, M; CHEUNG, A; GÖTZ, F. *Molecular basis of resistance to lysozyme's muramidase and antimicrobial peptide activity in staphylococci.* Plos Pathogens, v.3, p.981-994. 2007.

- 
- [49] PATRICK, C.W; MIKOS, A. G; MCINTIRE, L. V. *Prospects of tissue engineering. In: Frontiers in Tissue Engineering*. Elsevier Science Ltd, Oxford, p.3-11; 1998.
- [50] YONEDA, J; KUNIYASU, H; CRISPENS, M. A; PRICE, J. E; BUCANA C. D; FIDLER, I. J. *Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice*. J. Natl Cancer Inst., v.90, p.447-454. 1998.
- [51] CHEEMA, U; YANG, S. Y; MUDERA, V; GOLDSPINK, G. G; BROWN, R. A. *3-d in vitro model of early skeletal muscle development*, Cell Mot Cytoskel, v.54, p.226–236, 2003.
- [52] REVATHI, A; EHRLICHER, A. *The Forces Behind Cell Movement*, Int. J BiolSci, v.3, 5, p.303-317, 2007.
- [53] YANG et al., 2003; Ma et al., 2007.
- [54] KESSLER, F; STEFFENS, D; GABRIELA A. L; PRANKE, P; E. WEIBEL, D. *Wettability and cell spreading enhancement in poly(sulfone) and polyurethane surfaces by UV-assisted treatment for tissue engineering purposes*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine , v.11, n.1, p. 23-31, 2014.
- [55] WEI, J; IGARASHI, T; OKUMORI, N; MAETANI, T; LIU, B. S; YOSHINARI, M. *Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts*. Biomedical Materials, v.4, 2009
- [56] CHUNG, H. J. *Tae Gwan Park Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, v.59, p.249–262, 2007.
- [57] ORÉFICE, R. L; PEREIRA, M. M; MANSUETI, H. S. *Biomateriais: Fundamentos e aplicações*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.
- [58] CHATTERJEE, N. A; QING, Y; J. S. MOORE, J. S; ALURU, N. R. *Mathematical Modeling and Simulation of Dissolvable Hydrogels*. Journal of Aerospace Engineering, v.16, n. 2, April 1, 2003.
- [59] ANGELL, M. *Is academic medicine for sale*. New England Journal of Medicine, v.342, n.20, p.1516–1518, 2000.

- 
- [60] PAGLIARO, M; ROSSI, M. *Chapter 1 Glycerol: Properties and Production, in The Future of Glycerol. New Uses of a Versatile Raw Material*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, p. 1-17, 2008.
- [61] ABDALLAH, D.J; WEISS, R. G. *Organogels and low molecular mass organic gelators*. Adv. Mater, v.12, n.17, p.1237-1247, 2000.
- [62] ALMDAL, K. *Towards a phenomenological definition of the term 'gel'*. Polym. Gels Network, v.1, p.5-17, 1993.
- [63] Wichterle, O; Lim D. Nature; p.185 and 117. 1960.
- [64] LIM, D; WICHTERLE, O. *Chain transfer of polymer in radical polymerization*. Journal of Polymer Science, v.29, p.579-84, 1958.
- [65] <http://www.thesocialcavity.com/eye-mazing-facts-contact-lenses-came.html>
- [66] AHMED, E. M. *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications-review*. J Adv Res, p.1-17, 2013. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969>.
- [67] HOFFMAN, A. S. *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews v.43, p. 3–12, 2002.
- [68] EBARA, M; KOTSUCHIBASHI, Y; NARAIN, R; IDOTA, N; KIM, Y. J; HOFFMAN, J. M; UTO, K; AOYAGI, T. *Smart Biomaterials*, Tsukuba, Japan, Springer, 2014.
- [69] CALDERÓN, M; QUADIR, M.A; SHARMA, S.K; HAAG, R. *Dendritic polyglycerols for biomedical applications*. Adv Mater. Jan 12, v.22, n.2, p.190-218. 2000.
- [70] HOLGER, FREY; RAINER, H. *Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material*, Rev Mol Biotechn, v.90, p.257-67, 2002.
- [71] RUBINSTEIN, M; COLBY, R. H. *Polymer physics*.Oxford . New York (EUA), Oxford University, 2003.
- [72] [http://cssb.biology.gatech.edu/cell\\_simulation](http://cssb.biology.gatech.edu/cell_simulation)

- 
- [73] SADANOBU, J; GODDARD, W. A. *The continuous configurational Boltzmann biased direct Monte Carlo method for free energy properties of polymer chains*. J. Chem. Phys., v.106, n.16, p.6722-6729, 1997.
- [74] WYATT, P.J. *Light scattering and the absolute characterization of macromolecules*. Analytica Chimica Acta, v.272, p.1-40, 1993.
- [75] GIACOMELLI, F. *Tópicos em nanociência e nanotecnologia*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, v. 1, p. 93-106, 2008.
- [76] REY, A; MARVIN, F; BISHOP, J; H. R. CLARKE, H. *Radius of gyration and viscosity of linear and star polymers in different regimes*. Macromolecules, v.2, n.4, p.1311–1315, 1992.
- [77] TANAKA T. GELS. Sci Am, v.244, p.110–123, 1981.
- [78] SUENG, H. J; JEONG, S. S. *Biomimetic Adhesive Materials Containing Cyanoacryl Group for Medical Application*. Molecules, v.19, p.16779-16793, 2014.
- [79] XIAODONG, D, MCLAUGHLIN, C; GRIFFITH, M; SHEARDOWN, H. *Biofunctionalization of collagen for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering*, Biomaterials, v. 28, p.78–88, 2007.
- [80] PAGLIARO, M; CIRIMINNA, R; KIMURA, H; ROSSI, M; PINA, C. D. *From Glycerol to Value-Added Products. Institute for Scientific Methodology, and Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati*. Palermo, Italy, Angew. Chem. Int. Ed. 46, p. 4434-4440, 2007.
- [81] HAUGH, G. M; MURPHY, C. M; FERGAL J. O. *Novel Freeze-Drying Methods to Produce a Range of Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds with Tailored Mean Pore Sizes*, Tissue Engineering Part C, v.16, n.5, p. 887-894, 2010.
- [82] HUTMACHER, D.W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials. v.21, p.2529-2543, 2000.
- [83] NIREESHA, G.R; DIVYA, L; SOWMYA, C; VENKATESHAN, N; NIRANJANBABU. M; LAVAKUMAR, V. *Lyophilization/Freeze Drying - An Review*,

---

International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences, v.3, n.4, p. 87-98, 2013.

[84] FARAJ, K. A; KUPPEVELT, T. H. V; DAAMEN, W. F. *Construction of Collagen Scaffolds That Mimic the Three-Dimensional Architecture of Specific Tissues*. Tissue Engineering, v.13, n.10, p.2387-2394, 2007.

[85] CANNAVALE, A.; FIORITO, F.; MANCA, M.; TORTORICI, G.; CINGOLANI, R.; GIGLI, G. *Multifunctional bioinspired sol-gel coatings for architectural glasses*. Building and Environment, v. 45, n. 5, p. 1233-1243, 2010.

[86] QINGLIANG Z; YIHONG G; CHANGYOU, G. *Microstructure and Mechanical Properties of Poly(L-lactide) Scaffolds Fabricated by Gelatin Particle Leaching Method*. J. Appl. Polym Sci., v.98, p.1373–1379, 2005.

[87] MA, P. X; JCHOI, J. W. *Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network*. Tissue Eng., v.7, p.23–33, 2001.

[88] CASTRO, A. J. *Methods for making microporous products*. US Patent, v.4, n.247, p.498, January 27, 1981.

[89] LLOYD, D. R; KIM, S. S; KINZER, K. E. *Microporous membrane formation in thermally induced phase separation*. J. Membr. Sci., v.64, n.1, 1991.

[90] COLLINS, NIKI JANE. *Supercritical Fluid Processing of Novel Tissue Engineering Scaffolds Contains Silica*. October 2010, a thesis submitted (Doctor of Philosophy), Department of Chemical Engineering School of Engineering and Physical Sciences - The University of Birmingham.

[91] HONGYUN, T; MELISSA, L; MATHER, D. H; WENXIN W; LISA J. W; CROWE, J. A; MORGAN, S. P; AMIT CHANDRA, D. J; WILLIAMS, S. M; HOWDLE, K. M. S. *Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing*. Control European Cells and Materials, v.14, p.64-77, 2007.

[92] FARAJ, K. A; KUPPEVELT, T. H. V; DAAMEN, W. F. *Construction of Collagen Scaffolds That Mimic the Three-Dimensional Architecture of Specific Tissues*. Tissue Engineering, v.13, n.10, p.2387-2394, 2007.

- 
- [93] MA, P.X. *Scaffolds for tissue fabrication*. *Materials Today* 7: 30–40, 2004.
- [94] DOSHI, J; RENEKER, D. H. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. *J. Electrostat.*, v.35, n.2-3, p.151-160, 1995.
- [95] <http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/background.htm>.
- [96] GARG, K; BOWLIN, G. L. *Electrospinning jets and nanofibrous structures*. *Biomicrofluidics*. n.013403-1, September, 2011.
- [97] RENEKER, D. H; YARIN, A. L; FONG, H; KOOMBHONGSE, S. *Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning*. *J. Appl. Phys.*, v.87, n.9, p. 4531–4547, 2000.
- [98] RENEKER, D. H; YARIN, A. L. *Electrospinning jets and polymer nanofibers*. *Polymer*, v.49, n.10, p.2387-2425, 2008.
- [99] AGARWALA, S; GREINEIRA, A; WENDORFF, J. H. *Functional materials by electrospinning of polymers*. *Progress in Polymer Science*, v.38, p.963-991, 2013.
- [100] BHARDWAJ, N; KUNDU, S. C. *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique*. *Biotechnology Advances*, v.28, p.325-347, 2010.
- [101] LI, W. J, MAUCK, R. L, TUAN, R. S. *Electrospun Nanofibrous Scaffolds: Production, Characterization, and Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery*. *J. Biomed Nanotechnol*, v.1, p. 259, 2005.
- [102] LUTOLF, M.P; HUBBELL, J. A. *Synthetic Biomaterials as Instructive Extracellular Microenvironments for Morphogenesis in Tissue Engineering*, *Nat. Biotechnol.*, v.23, p.47, 2005.
- [103] HE, J; WU, Y; ZUO, W. *Critical length of straight jet in electrospinning*. *Polymer*, v.46, p.1637-12640, 2005.
- [104] RUTLEDGE, G. C; FRIDRIKH, S. V. *Formation of fibers by electrospinning*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.1384-139, 2007.
- [105] STANGER, J; TUCKER, N; STAIGER, M. *Electrospinning*. *Rapra. Review Reports*, v.16, n.10, 2005.

- 
- [106] ISI Web of Knowledge – pesquisa realizada com a palavra chave “electrospinning” em 05/06/2015.
- [107] RAMAKRISHNA, S. *Nanotechnology for nanomedicine and delivery of drugs*. *Curr Pharm Des.* v.14, n.22, p.2184-200, 2008.
- [108] KOHN, D. G; SARMADI, M; HELMAN, J. I; KREBSBACH, P. H. *Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone*. *J Biomed Mater Res*, v.60, p.292-299, 2002.
- [109] MURRAY, F. *Innovation as co-evolution of scientific and technological networks: exploring tissue engineering*. *Research Policy*, v.31, p.1389–1403, 2002.
- [110] HERBERT, S; AGNIESZKA, B; NERZ, C; KRAUS, D; PESCHEL, A; GOERKE, C; MEEHL, M; CHEUNG, A; GÖTZ, F. *Molecular basis of resistance to lysozyme's muramidase and antimicrobial peptide activity in staphylococci*. *Plos Pathogens*. v.3, p.981-994, 2007.
- [111] YONEDA, j; KUNIYASU, H; CRISPENS, M. A; PRICE, J. E; BUCANA, C. D; FIDLER, I. J. *Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice*. *J. natl Cancer Inst.*, v.90, p.447-454, 1998.
- [112] STYLIOS, C. D; GROUMPOS, P. P. *Novel architecture for supporting medical decision making of different data types based on fuzzy cognitive map framework*. *Proc 28th IEEE EMBS Annual Inter. Conference in Medicine and Biology Society, EMBS*, p. 6118-6120, 2006.
- [113] SUNDER, A; TURK, H; HAAG, R; FREY, H. *Macromolecules*. v.33, n.21, p.7682–7692. 2000.
- [114] ALMEIDA, W. B. *Química Quântica: Métodos Semi-empíricos e Mecânica Molecular (apostila)*. Escola de Química Teórica, Dept. de Química – ICEX – Universidade Federal de Minas Gerais, p.18-19, 1993.
- [115] HEHRE, W. J. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. Wave function, Inc., Irvine, USA. Capítulo 4 e 19, 2003.

- 
- [116] MURRAY F.; *Innovation as co-evolution of scientific and technological networks: exploring tissue engineering*, Research Policy, 31:1389–1403,2002.
- [117] YONEDA, j; KUNIYASU, H; CRISPENS, M. A; PRICE, J. E; BUCANA, C. D; FIDLER, I. J. *Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice*. J. natl Cancer Inst., v.90, p.447-454, 1998.
- [118] ALMEIDA, P., KOGUT, B., *Localization of knowledge and the mobility of engineers in regional networks*, Management Science 45 (7), 905–917, 1999.
- [119] ANGELL, M., *Is academic medicine for sale?* New England Journal of Medicine 342 (20),1516–1518, 2000.
- [120] PAGLIARO, M. AND M. ROSSI, *Chapter 1 Glycerol: Properties and Production, in The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material*. 2008, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 1-17.
- [121] ANSLYN, E. V; DOUGHERTY, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Book, 2004.
- [122] WILLIAMSON, A. *Theory of aetherification*. Philosophical Magazine. v.37, p 350-356, 1850.
- [123] PAGLIARO, M; CIRIMINNA, R; KIMURA H; ROSSI, MICHELE; PINA C. *From Glycerol to Value-Added Products*. Angewandte Chemie International Edition, v.46, p.4434 - 4440, 2007.
- [124] The United States Pharmacopeia. Rockville (USA), USP Convention, NF XXI edition. P. 1200-01, 1985.
- [125] ALMEIDA, W. B. *Química Quântica: Métodos Semi-empíricos e Mecânica Molecular (apostila)*. Escola de Química Teórica, Dept. de Química – ICEX – Universidade Federal de Minas Gerais, p.18-19, 1993.
- [126] HAAG, R; SUNDER, A; STUMBÉ, J. F. *An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols*. J. Am. Chem. Soc., v.122, p.2954-2955, 2000.

- 
- [127] SUNDER, A; HANSELMANN, R; FREY, H; MÜLHAUPT, R. *Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization*, *Macromolecules*, v.32, p.4240-4246, 1999.
- [128] VERÍSSIMO, LUCIANA MILITÃO. *Propriedades biofísicas de dendrímeros de Poliglicerol como sistemas transportadores de clorofila para terapia fotodinâmica*. 2014, Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Álvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [129] MARTINS, TESSA CARVALHO CARNEIRO. *Poliéteres arborescentes oticamente ativos para a terapia fotodinâmica*. 2014, Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Álvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [130] SUNDER, A; HANSELMANN, R; FREY, H; MÜLHAUPT, R. *Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization*, *Macromolecules*, v.32, p.4240-4246, 1999.
- [131] KOSKI, A; YIM, K; SHIVKUMAR, S. *Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning*. *Mater Lett*, v.58, n.3–4, p.493–497, 2004.
- [132] ZHAO, Y. Y; YANG, Q. B; LU, X. F; WANG, C; WEI, Y. *Study on correlation of morphology of electrospun products of polyacrylamide with ultrahigh molecular weight*. *J PolymSci, Part B: PolymPhys*, v.43, n.16, p.2190–2195, 2005.
- [133] RIBEIRO T.S.A.A.;HORTA C.A.B.;ALENCASTRO B.R.; *MKTOP: A program for automatic construction of molecular topologies*; *J. Braz. Chem. Soc.* vol.19 no.7 São Paulo 2008, doi: 10.1590/S0103-50532008000700031.
- [134] DE QUEIROZ A.A.A.; GALLARDO, A.; ROMÁN, J.S. *Vinylpyrrolidone-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: Synthesis, Physical chemical properties and proteic interactions*. *Biomaterials*, v. 21, p. 1631-1643, 2000.
- [135] HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. *J. Chem. Theory Comput.* 2008, 4, 435.

- 
- [136] JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926.
- [137] JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADORIVES, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11225.
- [138] AQVIST, J. *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 8021.
- [139] CHANDRASEKHAR, J.; SPELLMEYER, D. C.; JORGENSEN, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 903.
- [140] BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VANGUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. *J. Chem. Phys.* 1984, 81, 3684.
- [141] DE LA TORRE, J. G.; HUERTAS, M. L.; CARRASCO, B. *Biophys. J.* 2000, 78, 719.
- [142] ALMEIDA, P., KOGUT, B., *Localization of knowledge and the mobility of engineers in regional networks*, Management Science 45 (7), 905–917, 1999.
- [143] ANGELL, M., *Is academic medicine for sale?* New England Journal of Medicine 342 (20),1516–1518, 2000.
- [144] HOOVER, W. G. *Phys. Rev. A* 1985, 31, 1695.
- [145] ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; DARDEN, T.; LEE, H.; PEDERSEN, L. G. *J. Chem. Phys.* 1995, 103, 8577.
- [146] ALLEN, MICHAEL P.; *Introduction to Molekuler Dynamics Simulastion*. John Von Neuman Institute for computing.2004, vol23.
- [147] Internantional Organization for Standardization. *Biological evaluation of medical devices – Part 5*. Tests for in vitro cytotoxicity, Suiça, 2009.
- [148] <http://pixgood.com/human-body-heat-thermal.html>.
- [149] NAKAMOTO, K. WILEY. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, 2004.

- 
- [150] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, J. D., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro, 7<sup>o</sup> Ed., LTC.
- [151] PAVIA, D L; LAMPMAN, G. M; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy (Saunders Golden Sunburst Series)*. 2<sup>o</sup> ed. 2, 1997.
- [152] FARIAS, R. F. , *Química de Coordenação: Fundamentos e Atualidades*, Ed. Átomo, Brasil, 2005.
- [153] IONASHIRO, M. GIOLITO: *Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial*. São Paulo: Giz Editorial, 2005.
- [154] TAGER, A. *Physical chemistry of polymers*. Moscow, Mir Publishers, 1972. p.130-34.
- [155] McNAUGHTON, J.L.; MORTIMER, C.T. *Calorimetria diferencial de barrido*. New York, Perkin Elmer, 1975.
- [156] IBAR, J.P. Do we need a new theory in polymer physics? *J.M.S. Rev.Macromol.Chem.Phys.* C37(3): 389-458, 1997.
- [157] BARRAULT, J; CLACENS, J. M; POUILLOUX, Y. *Selective oligomerization of glycerol over mesoporous catalysts*. Topics in Catalysis, v. 27, n.1-4, p.137-142, 2004.
- [158] GHOLAMI, Z; ABDULLAH, A. Z; LEE, K. T. “*Glycerol etherification to polyglycerols using  $Ca_{1+x}Al_{1-x}La_xO_3$  composite catalysts in a solventless medium*”, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v.44 ,n.1, p.117-122, 2013.
- [159] ASTM D 1957 – 86 – Standard test method for hydroxyl value of fatty oils and acids (1995).
- [160] American Oil Chemists’ Society – AOCS. - ”AOCS Official Method Cd 13-60 - Hidroxil Value”, AOCS (2009).

- 
- [161] LUIS, R; DOMINGO, M; AURELL, J; PÉREZ, P; CONTRERAS, R. *Origin of the synchronicity on the transition structures of polar Diels–Alder reactions. Are these reactions [4 + 2] processes?* J. Org. Chem, v.68 n.10, p.3884–3890, 2003.
- [162] WEINHOLD, F. *Chemistry: A new twist on molecular shape*, Nature, v.411, p.539–541, 2001.
- [163] FUKUI, K; FUJIMOTO, H. *Frontier orbitals and reaction paths- Selected Papers of Kenichi Fukui*, World Scientific Series in 20th Century Chemistry, World Scientific, London (UK), v.7, 1997.
- [164] FUKUI, K. *In Molecular Orbitals in Chemistry, Physics and Biology*, Löwdin, P.–O.; Pullman, B. (Eds.), Academic Press, New York, p.513, 1964.
- [165] FLEMING, I. *Frontier orbitals and organic chemical reactions*. John Wiley and Sons: New York, 1976.
- [166] PARR, R. G; YANG, W. *Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, New York, 1989.
- [167] PEARSON, R. G. J. Am. Chem. Soc, v.107, n.6801, 1985.
- [168] PARR, R. G.; PEARSON, R. G. J. Am. Chem. Soc, v.105, n.7512, 1983.
- [169] KOOPMANS, T. Physica, v.1, p.104, 1933
- [170] ZHANG, G; MUSGRAVE, C. B; *Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations*. J. Phys. Chem. A. v.111, p.1554–1561. 2007.
- [171] CHEMPLUS. *Modular Extensions for HyperChem Release 6.02*, Molecular Modeling for Windows, HyperClub, Inc., Gainesville, 2000.
- [172] FORMHALS ANTON., *Process and apparatus for preparing artificial threads*. U.S. Patent 1,975,504 Issue date: October 2, 1934.
- [173] FORMHALS ANTON et al., *Method and apparatus for spinning*. U.S. Patent 2,349,950 Issue date: May 30, 1944.

- 
- [174] MCKEE, M .G; WILKES, G. L; COLBY, R. H; LONG, T. M. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules*, v.37, p.1760-1767,. 2004.
- [175] GUPTA, P; ELKINS, C; LONG T.E; WILKES, G.L. *Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent*. *Polymer*, v.46, p.4799-4810. 2005.
- [176] Controlling water drops on the space station with legos and eletricity, <http://physicsbuzz.physicscentral.com/2015/02/controlling-water-drops-on-space.html>. Acessado em 19/Fev/2015.
- [177] SUNDER, A; TURK, H; HAAG, R; FREY, H. *Macromolecules*. v.33, n.21, p.7682– 7692, 2000.
- [178] MENDES, Renata Moura. Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrímero de poliglicerol salicilado em diferentes linhagens celulares.. 2011. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [179] RENEKER, D. A; YARIN, A. L. *Electrospinning jets and polymer nanofibers*. *Polymer*, v.49, n.10, p.2387-2425, 2008.
- [180] DEMIR, M. M; YILGOR, I; YILGOR, E; ERMAN, B. *Electrospinning of polyurethane fibers*. *Polymer*, v.43, p.3303-3309, 2002.
- [181] ZHANG, C; YUAN, X; WU, L; HAN, Y; SHENG, J. *Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats*. *European Polymer Journal*, v. 41, n.3, p.423–432, 2005.
- [182] ROBERTS, G.E.; WHITE, E.F.T. "Relaxation Processes in Amorphous Polymers" in "The Physics of Glassy Polymers", R.N. Haward (ed.), Applied Sci. Publ., London, Chapter 3 (1973).

- 
- [183] KISSINGER, H. E. *Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. Analytical Chemistry*, v. 29, n. 11, p. 1702–1706, 1957.
- [184] KOOMBHONGSE, S; LIU, W. X; RENEKER, D. H. J. *Polym. Sci. Pol. Phys.*, v.39, p.2598, 2001.
- [185] PERESIN, M. S; HABIBI, Y; VESTERINEN, A. H; ROJAS, O. J. *Pawlak, J. J. & Seppälä, J. V. Biomacromolecules*, v.11, p.2471, 2010.
- [186] LEE, K. H; KIM, H. Y; LA, Y. M; LEE, D. R; SUNG, N. H. *J. Polym. Sci. Pol. Phys*, v.40, p.2259, 2002.
- [187] SINGH, D. K; RAY, A. R. *Biomedical applications of chitin, chitosan and their derivatives. Journal Macromolecular Science Review. Macromolecular. Chemistry. Physics*, v.40, n.1, p.69-83, 2000.
- [188] FIGUEREDO, D. G. *Análise de Fourier e Equações Diferenciais Parciais. Projeto Euclides*.
- [189] BUTKOV, E. *Mathematical Physics*. Addison-Wesley Publishing Company.
- [190] ABE, Y; KOKUBO, T; YAMAMURO, T. *Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. Journal of Mater Science: Materials in Medicine*. v.1, p.233-238, 1990.
- [191] BAJPAI, A. K; BAJPAI, J; SHUKLA, S. *Water sorption through a semiinterpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains. Reactive & Functional Polymers*, v.50, n.1, p.9-21, 2002.
- [192] BAJPAI, A. K; GIRI, A. *Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. Reactive and Functional Polymers*, v.53, n.2, p.125-141, 2002.
- [193] KARADAG, E; SARAYDIN, D; GÜVEN, O. *Water absorbency studies of  $\gamma$ radiation crosslinked poly(acrylamide-co-2,3-dihydroxybutanedioic acid) hydrogels. NIMB Beam Interactions with Materials & Atoms*, v.225, p.489-496. 2004.

- 
- [194] KARADAG, E; ÜZÜM, O. B; SARAYDIN, D. *Swelling equilibria and dye adsorption studies of chemically crosslinked superabsorbent acrylamide/maleic acid hydrogels*. European Polymer Journal, v.38, p.2133-2141, 2002.
- [195] HUANG, M. H; LI, S; HUTMACHER, D. W; SCHANTZ, J. T; VACANTI, C. A; BRAUD, C; VERT, M. J. *Biomed. Mater. Res.*, v.69, p.417. 2004.
- [196] LEE, B; RICHARDS, F. M. *"The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility"*. J Mol Biol, v.55, n.3, p.379–400, 1971.
- [197] ROST, B. *Prediction in 1D: secondary structure, membrane helices, and accessibility*. Methods Biochem Anal, v.44, p.559-87, 2003.
- [198] ANDRADE, A; PINTO, S. C; OLIVEIRA, R. S. orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books .
- [199] PAN, C; ZETANG LI, GUO, W; JING ZHU, J; ZHONG LIN, Z. W. *Fiber-Based Hybrid Nanogenerators for/as Self-Powered Systems in Biological Liquid*. Angewandte Chemie International Edition, v.50, n.47, p.11192–11196, 2011.
- [200] BROWN, F; CUSSLER, K; HENDRIKSEN, C. F. M. *Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products*. Developments in Biological Standardization. Basel, Ed Karger, v.86, 1996.
- [201] KEEPERS, Y. P; PIZAO, P. E; PETERS, G. J; VAN ARK-OTTE, J; WINOGRAD, B; PINEDO, H. M. *Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing*. European Journal of Cancer, n.27, p.1717, 1991.
- [202] HORBETT, T. A. *Protein Adsorption on Biomaterials*”, in *Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications*, S. L. Cooper, and N. L. Peppas, Eds., American Chemical Society, Washington, DC, p. 233, 1982.
- [203] ALLEN, L. T; TOSETTO, M; MILLER, I. S; O'CONNOR, D. P; PENNEY, S. C; LYNCH, I. *Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction*. Biomaterials, v.27, p.3096-3108, 2006.

- 
- [204] FLIER, V. D. A, SONNENBERG, A. *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res, v.305, p.285–298, 2001.
- [205] POZZI, A; ZENT, R. *Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function*. Nephron Exp Nephrol, v.94, p.77–84. 2003.
- [206] JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia básica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- [207] AMADEU, T. P, COULOMB, B. B; DESMOULIERE, A; COSTA, A. M. A. *Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models*. Int J Low Extrem Wounds, v.2, p.60-8, 2003.
- [208] HILDEBRAND, K. A; GALLANT-BEHM, C. L; KYDD, A.S; HART, A. D. *The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing*. Sports Med Arthrosc, v.13, p.136-44, 2005.
- [209] WANG, H. J; CHOU, T. D; CHEN, T.M; CHEN, S. G; WEI, L. G; YEH, K. J; KO, Y, H; WANG, C.S; LEE, WH. *The application of new biosynthetic artificial skin for long-term temporary wound coverage*. Burms, v.31, p.991-997, 2005.
- [210] NG, K. W; KHOR, H. L; HUTMACHER, D. W. *In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts*. Biomaterials, v.25, p.2807-2818, 2004.
- [211] HILMANN, G; STTEINKAMP-ZUCHAT, A; GEURTSSEN, W; GROSS, G; HOFFMANN, A. *Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes*. Biomaterials, v.23, p.1461-1469, 2002.
- [212] PURVA SINGH, P; SCHWARZBAUER, J. E. *Fibronectin and stem cell differentiation – lessons from chondrogenesis*. Journal of Cell Science, v.125, p.3703–3712, 2012.
- [213] GUMBINER, B. M. *Cell Adhesion: Review The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis*. Cell Press, v.84, p.345–357, 1996.

---

[214] TO, W. S; MIDWOOD, K. S. *Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair*. Fibrogenesis Tissue Repair, v.16, p.1-17, 2011.