

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

IURY ARAÚJO NOGUEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE
DEXTRANA/BIOVIDRO PARA ENGENHARIA TECIDUAL DE OSSOS**

São José dos Campos

2019

IURY ARAÚJO NOGUEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE
DEXTRANA/BIOVIDRO PARA ENGENHARIA TECIDUAL DE OSSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Paulo como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Engenharia de
Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lemes

São José dos Campos

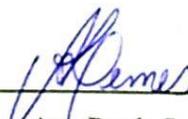
2019

IURY ARAÚJO NOGUEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE DEXTRANA/BIOVIDRO
PARA ENGENHARIA TECIDUAL DE OSSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia de Materiais.

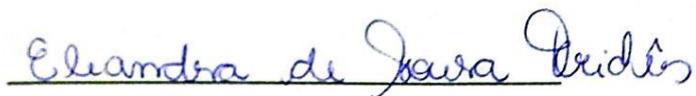
BANCA EXAMINADORA:



Profª. Dra. Ana Paula Lemes

ICT – UNIFESP

Orientadora



Profª. Dra. Eliandra de Sousa Trichês

ICT - UNIFESP

Na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei de direitos autorais nº 9610/98, autorizo a publicação livre e gratuita desse trabalho no Repositório Institucional da UNIFESP ou em outro meio eletrônico da instituição, sem qualquer ressarcimento dos direitos autorais para leitura, impressão e/ou download em meio eletrônico para fins de divulgação intelectual, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNIFESP São José dos Campos com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nogueira, Iury Araújo.

Produção e caracterização de hidrogéis de dextrana/biovidro para engenharia tecidual de ossos/ Iury Araújo Nogueira - 2019

58 f.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia, 2019.

Orientador: Ana Paula Lemes

Título em outro idioma: Production and characterization of dextran/bioglass hydrogels for bone tissue engineering

1. Hidrogel. 2. Dextrana. 3. Biovidro 45S5. 4. Engenharia tecidual óssea. 5. Biomaterial. I. Lemes, Ana Paula. II. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia. III. Produção e caracterização de hidrogéis de dextrana/biovidro para engenharia tecidual de ossos.

AGRADECIMENTOS

Dedico essa monografia aos meus pais, Roseli e Ayrton, por não medirem esforços para que fosse possível a minha graduação, por todo o apoio que sempre demonstraram em horas de dificuldade e pela pessoa que ajudaram a me tornar.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Paula Lemes por toda a dedicação, paciência e suporte fornecido para a realização deste trabalho. Agradeço também aos membros do laboratório TecPBio por toda ajuda durante o trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Eliandra de Sousa Triches e ao laboratório BioCeram pelo fornecimento do biovidro e pela ajuda na realização de algumas caracterizações.

RESUMO

A utilização de hidrogéis na área da engenharia tecidual vem ganhando cada vez mais espaço pois estes materiais apresentam características que os assemelham a matriz extracelular. Um biopolímero hidrofílico que vem sendo estudado para a fabricação de hidrogéis é a dextrana, um polissacarídeo de origem bacteriana. Os hidrogéis de dextrana apresentam alta biocompatibilidade, flexibilidade e grande capacidade de absorver e reter água ou fluidos biológicos na sua rede tridimensional formada após sua reticulação. Apesar destas propriedades, os hidrogéis de dextrana demonstram baixas propriedades mecânicas e grande facilidade de deformação, o que limita a aplicação destes materiais na engenharia tecidual de ossos. Para contornar estes problemas, uma alternativa é a adição de partículas de biovidro a estes hidrogéis. Os biovidros são materiais cerâmicos que apresentam alta biocompatibilidade e capacidade de osteocondução, conferindo a este material grande capacidade de se ligar a tecidos duros. O trabalho teve como objetivo preparar os hidrogéis de dextrana utilizando o agente reticulante N, N' – metilenobisacrilamida com a adição de diferentes teores de biovidro 45S5, além de caracterizá-los e realizar a análise da influência das partículas de biovidro 45S5 nas propriedades morfológicas, mecânicas e de intumescimento dos hidrogéis de dextrana. Os hidrogéis preparados com diferentes teores de biovidro 45S5 foram caracterizados através de microscopia eletrônica de varredura, ensaios mecânicos, de intumescimento e de porosimetria. A adição das partículas de biovidro 45S5 foi capaz de afetar todas as propriedades analisadas dos hidrogéis, sendo que para o teor de 4% (m/m) esta influência foi de baixa relevância. Para teores de 8% (m/m) e 12% (m/m) foi possível observar influência mais significativa, sendo que os hidrogéis com estes teores exibiram propriedades mecânicas mais elevadas, apresentando também cinética de intumescimento maior porém com estabilização em um menor grau quando comparados ao hidrogel padrão. Já a porosidade dos hidrogéis apresentou comportamento decrescente de acordo com o aumento do teor de partículas de biovidro 45S5. O tamanho de poros obtidos para todos os hidrogéis estão dentro da faixa de 100 – 300 μm , considerada ideal para a utilização como *scaffolds*.

Palavras-chave: hidrogel, dextrana, biovidro 45S5, engenharia tecidual óssea, biomaterial.

ABSTRACT

The use of hydrogels in the area of tissue engineering has been gaining more space because these materials have characteristics that resemble the extracellular matrix of the human body. A hydrophilic biopolymer that has been studied for the manufacture of hydrogels is dextran, a polysaccharide of bacterial origin. Dextran hydrogels have high biocompatibility, flexibility and great ability to absorb and retain water or biological fluids in their three-dimensional network formed after their crosslinking. Despite these properties, the dextran hydrogels demonstrate low mechanical properties and great ease of deformation, which limits the application of these materials in the tissue engineering of bones. To overcome these problems, an alternative is the addition of bioglass particles to these hydrogels. Bioglasses are ceramic materials that exhibit high biocompatibility and ability to osteoconduction, giving this material great ability to bind to hard tissues. The objective of this work was to prepare dextran hydrogels using the crosslinking agent N, N'-methylenebisacrylamide, with the addition of different bioglass 45S5 contents, besides characterize them and to analyze the influence of bioglass 45S5 particles on morphological, mechanical and swelling properties of dextran hydrogels. The hydrogels prepared with different bioglass 45S5 contents were characterized by scanning electron microscopy, mechanical, swelling and porosimetry assays. The addition of bioglass 45S5 particles was able to affect all analyzed properties of hydrogels, and for the 4% (m/m) content this influence was of low relevance. For 8% (m/m) and 12% (m/m) contents, it was possible to observe a more significant influence, and the hydrogels with these contents showed higher mechanical properties, also presenting higher swelling kinetics but with a lower degree of stabilization when compared to the standard hydrogel. The porosity of the hydrogels showed a decreasing behavior as the bioglass 45S5 particle content increased. The pore size obtained for all hydrogels is within the range of 100 - 300 μm , considered ideal for use as scaffolds.

Keywords: hydrogel, dextran, bioglass 45S5, bone tissue engineering, biomaterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Utilização de hidrogel para a produção de lentes de contato	23
Figura 2 – Síntese de hidrogéis através da reticulação de polímeros solúveis em água	25
Figura 3 – Representação da estrutura básica da dextrana.....	26
Figura 4 – Resumo das reações interfaciais entre osso e um vidro bioativo.....	29
Figura 5 – Amostras de hidrogel padrão de dextrana (P).....	35
Figura 6 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 4% (m/m) de biovidro (BG4).....	36
Figura 7 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 8% (m/m) de biovidro (BG8).....	37
Figura 8 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 12% (m/m) de biovidro (BG12).....	37
Figura 9 – Comparativo entre as amostras de hidrogéis de dextrana a) padrão (P) e contendo b) 4% (m/m) (BG4), c) 8% (m/m) (BG8) e d) 12% (m/m) (BG12) de biovidro.....	38
Figura 10 – Imagens dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro, após 24h de liofilização.....	39
Figura 11 – Superfície dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4 % (m/m), c) 8 % (m/m) e d)12% (m/m) de biovidro, após fratura em nitrogênio líquido	39
Figura 12 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 150 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro.....	40
Figura 13 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 400x dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro.....	42

Figura 14 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 1500 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro ...	43
Figura 15 – Imagens de MEV com aumento de 150 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro, antes (à esquerda) e depois (à direita) do processo de reconhecimento de poros pelo <i>software ImageJ</i> ®	45
Figura 16 – Contagem e contorno dos poros reconhecido pelo <i>software ImageJ</i> ® dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro. ...	46
Figura 17 – Porosidade dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro obtida pelo <i>software ImageJ</i> ®.....	46
Figura 18 – Porosidade dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro calculada pelo ensaio de porosimetria por imersão em álcool	47
Figura 19 – Cinética de intumescimento dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro, em solução tampão fosfato-salino (PBS), de p.H 7,4.....	48
Figura 20 – Grau máximo de intumescimento dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro.....	49
Figura 21 – Comportamento das diferentes composições de hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro submetidos ao ensaio de resistência à compressão.....	51
Figura 22 – Tensão compressiva máxima obtida pelo ensaio de resistência à compressão dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro.....	52

Figura 23 – Módulo compressivo dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro, obtidos a partir do ensaio de resistência à compressão. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composições de interesse de estudo.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPC	Cimentos de fostato de cálcio
TCP	Trifosfato de cálcio
HA	Hidroxiapatita
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PMMA	Poli (metil metracrilato)
PVC	Poli (cloreto de vinila)
PHEMA	Poli (2 - hidroxietilmetacrilato)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
HDI	1, 6 - hexadiisocianato
PEG	Polietilenoglicol
MBAA	N, N' - metilenobisacrilamida
HCA	Hidroxiapatita carbonatada
PBS	Tampão fostato salino

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
P	Hidrogel padrão de dextrana
BG4	Hidrogel de dextrana contendo 4% (m/m) de biovidro
BG8	Hidrogel de dextrana contendo 8% (m/m) de biovidro
BG12	Hidrogel de dextrana contendo 12% (m/m) de biovidro

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
eq	Equação
P (%)	Porosidade
M_1	Massa da amostra de hidrogel liofilizado
M_2	Massa da amostra de hidrogel após 24h imerso em álcool etílico absolute 99.5%
V_s	Volume da amostra de hydrogel
ρ_e	Massa específica do álcool etílico
Q (%)	Grau de intumescimento
M_t	Massa de hidrogel intumescido em um dado tempo t
M_0	Massa do hidrogel seco
k	kilo
Pa	Pascal

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Objetivos e justificativas	17
2.1 Objetivo	17
2.2 Justificativas	18
3. Revisão da literatura	18
3.1 Biomateriais	18
3.2 Hidrogel	22
3.2.1 Dextrana e hidrogéis de Dextrana	25
3.3 Biovidro	27
3.4 Biomateriais compósitos	30
3.4.1 Hidrogéis de dextrana/biovidro	31
4. Material e métodos	31
4.1 Materiais	31
4.2 Métodos	32
4.2.1 Preparação dos hidrogéis	32
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
4.2.3 Ensaio de porosimetria	34
4.2.4 Ensaio de intumescimento	35
4.2.5 Ensaio mecânico	35
5. Resultados e discussões	36
5.1 Aspectos dos hidrogéis produzidos	36
5.2 Análise da morfologia dos hidrogéis a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio de porosimetria	39
5.3 Cinética e grau de intumescimento	49
5.4 Caracterização mecânica dos hidrogéis de dextrana	51

6. Conclusões	54
7. Referências	56

1. Introdução

A busca por materiais que sejam compatíveis com o organismo humano tem sido alvo de interesse desde a década de 50, onde se iniciaram os estudos sistêmicos nesta classe que foi denominada de biomateriais. Com o envelhecimento da população, uma das aplicações mais necessárias dos biomateriais dá-se na área da engenharia tecidual, para auxiliar na regeneração, crescimento ou também na total substituição tanto de tecidos moles quanto duros, como os ossos. Neste âmbito, materiais que sejam obtidos de fontes biológicas, como é o caso dos biopolímeros, tem grande vantagem sobre outras classes de materiais pois esses apresentam excelente biocompatibilidade e também a capacidade de serem eliminados ou absorvidos de forma natural, através de mecanismos biológicos, pelo organismo. A utilização de biopolímeros como a dextrana, um polissacarídeo natural obtido a partir de bactérias, tem sido estudada para diversas aplicações na engenharia de tecidos moles na forma de hidrogéis, auxiliando na regeneração e crescimento de tecidos moles por apresentarem estrutura semelhante a matrix extracelular, exibindo então ambiente propício para o crescimento celular. Porém sua aplicação na engenharia tecidual óssea ainda é muito restrita pois sozinhos os hidrogéis de dextrana não possuem capacidade osteogênica, não sendo capazes de estimular o crescimento ósseo. Para contornar este problema, a utilização de materiais de reforço, que possuam capacidade osteogênica, sendo bioativos e também biocompatíveis, é uma opção de conferir aos hidrogéis de dextrana as propriedades necessárias para esta aplicação. Os biovidros são uma subclasse dos biomateriais cerâmicos que apresentam as propriedades necessárias para auxiliar na regeneração e crescimento ósseo. Com isso, ao se produzir um biomaterial compósito constituído de uma fase matrix composta pelo hidrogel de dextrana, com uma fase de reforço dada por partículas de biovidros dispersas no hidrogel, dá-se origem então a um biomaterial com grande potencial para aplicação na área da engenharia tecidual de ossos.

2. Objetivos e justificativas

2.1 Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo a preparação e caracterização de hidrogéis de dextrana contendo diferentes teores de biovidro. A adição de biovidro a estes hidrogéis tem

como objetivo o estudo da influência dessas partículas nas características mecânicas, morfológicas e de intumescimento dos hidrogéis de dextrana.

2.2 Justificativas

A utilização de biomateriais que sejam capazes não só de servir de substrato para o crescimento de tecido ósseo como também serem capazes de participar ativamente desse processo vem em contrapartida a utilização de implantes que necessitem de cirurgias altamente invasivas e que ainda apresentem alto risco de rejeição pelo organismo. Neste âmbito, a utilização de biopolímeros é vantajosa pois esta classe de materiais apresenta excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, devido ao fato de serem obtidos a partir de fontes biológicas, como bactérias, e possuem estrutura química similar a componentes orgânicos presentes no organismo humano. Dentre os biopolímeros, a dextrana, um polissacarídeo de origem bacteriana, se destaca na produção de hidrogéis para aplicações na engenharia tecidual pois apresenta estrutura semelhante a matrix extracelular, conferindo um ambiente propício para auxiliar na regeneração e crescimento de tecidos moles. Apesar de não possuírem propriedade osteogênica e com isso não poderem formar novo tecido ósseo, os hidrogéis de dextrana são passíveis de serem combinados com materiais particulados que possuem esta característica, como os biovidros. O Biovidro 45S5 apresenta excelente biocompatibilidade, além de possuir características osteogênicas, sendo capaz de estimular o crescimento de tecido ósseo, além de se ligar a tecidos já existentes. O estudo da adição de diferentes teores de biovidro à hidrogéis de dextrana e o comportamento destes revela-se de grande importância para o desenvolvimento de um biomaterial compósito que seja capaz de auxiliar na regeneração e crescimento de tecido ósseo.

3. Revisão da literatura

3.1 Biomateriais

Desenvolvidos com o intuito de melhorar a qualidade de vida de um número crescente de pessoas a cada ano, os biomateriais possuem uma extensa gama de aplicações, como próteses ósseas e dentárias, *scaffolds* para auxílio de regeneração tecidual, sistema de liberação de medicamentos, lentes intraoculares, válvulas cardíacas, curativos, entre muitas outras.^{1,2,3}

Durantes os anos, diferentes definições foram atribuídas aos biomateriais, algumas restringindo sua funcionalidade como outras tornando mais abrangente os requisitos para que um material entre nesta classe. Uma das mais aceitas pelos especialistas desta área é aquela que diz que os biomateriais podem ser definidos como materiais naturais ou sintéticos que, durante sua utilização, entram em contato com sistemas biológicos, visando substituir parte ou a totalidade de suas funções ou atuar em conjunto com estes para melhorar seu desempenho.^{2,3}

Inicialmente utilizados para conferir simples suporte mecânico e substituir tecidos danificados, sem que causassem grandes respostas biológicas nos pacientes, a aplicação dos biomateriais remonta aos tempos mais antigos, como a utilização de conchas para confecção de dentes artificiais pelos Maias (600 A.C.) e de suturas feitas de linha de ouro pelo Egípcios (2000 A.C.)⁴. A partir da década de 50, principalmente no período entre as décadas de 80 e 90, deu-se início à intensivos estudos sistêmicos na área dos biomateriais, visando não só compreender melhor sua compatibilidade com os sistemas biológicos como também desenvolver materiais os quais pudessem atuar ativamente na região de implante, que pudessem ser absorvidos ou eliminados pelo organismo sem que causassem nenhuma complicação e, mais recentemente, a possibilidade de imitarem à nível molecular tecidos biológicos.^{3,4}

De acordo com o envelhecimento da população e a necessidade crescente de reparo e substituição de tecidos e até mesmo órgãos, aliados aos avanços tecnológicos obtidos nesta área, o mercado dos biomateriais tem apresentado expressivo crescimento nos últimos anos. Dados de 2008 apontam que o montante movimentado neste setor foi de 25,6 bilhões de dólares no mercado mundial, sendo que deste valor o Brasil foi responsável por 2% do faturamento³. No ano 2012, o faturamento subiu para 44 bilhões e, em 2016, para 70.9 bilhões de dólares. A previsão para o mercado dos biomateriais é de que sejam movimentados cerca de 207 bilhões de dólares para o ano de 2024⁵. Os dados de mercado apresentados se referem aos biomateriais como um todo, incluindo todas as suas subdivisões.

A classe dos biomateriais pode ser subdividida quanto a sua resposta quando aplicados em meio biológico. Neste caso, podem ser classificados em biocompatíveis, biodegradáveis ou bioreabsorvíveis, bioativos e biomiméticos. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material em interagir com um tecido sem causar reações adversas, como toxicidade, na região onde foi implantado. Materiais biodegradáveis ou bioreabsorvíveis são aqueles capazes de serem incorporados pelos tecidos adjacentes, sendo substituídos por estes a partir de sua degradação causada por ações biológicas. Os materiais bioativos são capazes de interagir com o tecido ao qual foram implantados, estimulando sua capacidade de regeneração.

Já os materiais biomiméticos tem a capacidade de mimetizar as funções e a composição, a nível molecular, de um tecido biológico.^{1,4,6}

Os biomateriais também podem ser classificados com base nos materiais empregados na sua produção, sendo então divididos em biomateriais metálicos, cerâmicos e poliméricos. Quando duas ou mais classes de materiais são empregados para se produzir um biomaterial, dá-se origem classe dos biomateriais compósitos, que busca integrar propriedades de diferentes tipos de materiais em um único material. Cada uma destas classes de biomateriais tem suas especificidades.⁴

Os biomateriais metálicos tem sua aplicação focada em componentes estruturais por apresentarem características como elevada resistência mecânica e resistência à fadiga, além de boa inércia a fluidos corporais. Tais características levam estes materiais a serem utilizados principalmente como substitutos ou reforços para tecidos duros, como os utilizados para a substituição de articulações. Alguns exemplos destes materiais são os aços inoxidáveis, ligas de Ti, Ti-Ni, Co-Cr, entre outros². Apesar de suas ótimas propriedades estruturais, os biomateriais metálicos pecam na sua biocompatibilidade pois, como são suscetíveis a corrosão quando submetidos à um ambiente biológico, podem liberar substâncias tóxicas no organismo do paciente, como cromo, cobalto e níquel provindos das ligas, causando problemas clínicos como inflamações nos tecidos, além do enfraquecimento em si do implante.^{2,3}

Os biomateriais cerâmicos são extensamente usados na área dos biomateriais por apresentarem excelente compatibilidade química com meios fisiológicos, principalmente com tecidos duros, como ossos e dentes, além de apresentarem ótima resistência à compressão e ao desgaste. Alguns dos principais materiais desta classe são: os cimentos de fosfato de cálcio (CPC), como o trifosfato de cálcio (TCP) e a hidroxiapatita (HA), utilizados para substituição óssea; os compostos a base de alumina (Al_2O_3) e zircônia, utilizados principalmente para a confecção de cabeças femorais em próteses; e os biovidros, derivados do sistema quaternário do SiO_2 -CaO- Na_2O - P_2O_5 , utilizados para estimular o crescimento ósseo devido a sua capacidade de osteocondução e ótima interação interfacial com o osso. Devido a sua natureza iônica, os materiais cerâmicos apresentam pouca ou nenhuma deformação plástica, se tornando duros porém quebradiços, provocando alta suscetibilidade a fraturas quando trincas ou rachaduras estão presentes em sua estrutura, não sendo então indicadas para aplicação onde estarão sob elevadas tensões.¹⁻³

Sendo a classe com a maior quantidade de representantes na área, os biomateriais poliméricos representam cerca de 88% dos biomateriais utilizados. Uma das principais vantagens desta classe frente às cerâmicas e aos metais é sua facilidade de manufatura de

diferentes formas, sejam como filmes, fibras, partículas, entre outras, facilitando então sua aplicação. Além disso, possuem uma vasta gama de produtos com diferentes propriedades mecânicas e físicas, custo mediano e facilidade para o processamento, o que torna mais versátil a sua aplicação para os mais diferentes requisitos específicos. Os biomateriais poliméricos podem ainda ser divididos em duas classes de acordo com a sua origem: os sintéticos e os naturais.^{2,3}

Os polímeros sintéticos são aqueles obtidos através de reações de polimerização, seja pelo mecanismo de adição ou de condensação, sendo responsáveis pela maior parte dos biomateriais poliméricos utilizados atualmente⁴. Tal cenário é possível pois estes materiais apresentam propriedades que são melhor controladas e com maior facilidade de reprodução. Outro aspecto importante nos polímeros sintéticos está no melhor entendimento da sua cinética de degradação, mecanismo de essencial conhecimento quando serão utilizados em meios biológicos¹. A degradação destes polímeros se dá por clivagem eletrolítica e durante esse processo alguns polímeros podem gerar subprodutos tóxicos que ao entrarem em contato com a corrente sanguínea do paciente são capazes de causar reações inflamatórias, como é o caso do poli (tereftalato de etileno) (PET) e do poli (metil metacrilato) (PMMA). Alguns exemplos de polímeros sintéticos e suas aplicações são: poli (cloreto de vinila) (PVC), usado para confecção de tubos intravenosos e sacos para armazenamento de sangue, o poli (2-hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), utilizado para a fabricação de lentes de contato, as poliamidas (Nylon), comumente empregadas como suturas cirúrgicas, entre outros^{2,3}. Dentre os polímeros sintéticos, existem ainda aqueles que apresentam biodegradabilidade, sendo que quando degradados estes polímeros geram subprodutos que são eliminados naturalmente pelo organismo. Exemplos destes são o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL). Estes polímeros são vastamente utilizados na área da engenharia tecidual (PGA) e para a liberação controlada de fármacos (PCL).^{2,3}

Já os polímeros naturais são aqueles obtidos a partir de organismos vivos, sejam eles sistemas microbianos ou plantas, como também sintetizados usando sistemas biológicos simples. Estes polímeros podem ser divididos em 3 principais grupos: as proteínas, dentre as quais se encontram a queratina, colágeno, elastina, miosina; os polinucleotídeos, como DNA e RNA; e os polissacarídeos, tais como a celulose, a quitina e a dextrana. Apesar de serem tecnologicamente mais complexos de serem lidados e demandarem maiores cuidados, os polímeros naturais, quando comparados aos sintéticos, apresentam inúmeros pontos fortes, como sua alta biocompatibilidade com os tecidos biológicos pois apresentam estruturas semelhantes a estes, além do fato de serem obtidos de fontes renováveis. Uma das principais

vantagens destes materiais está na sua biodegradação. Como são obtidos de fontes naturais, quando são degradados pelo organismo do paciente geram subprodutos que são facilmente metabolizados, não causando toxicidade ao meio ao qual foram implantados.^{4,7-9}

Como possuem estruturas mais elaboradas, o mecanismo de degradação dos biopolímeros também se dá de forma mais complexa do que nos polímeros sintéticos. Outro fator que influencia nas propriedades destes polímeros é o fato de que sua estrutura pode variar significativamente de lote para lote, visto que são produzidos por organismos vivos que podem ser influenciados pelas menores variações ambientais as quais estão expostos. Apesar disto, os biopolímeros podem ser combinados a outros materiais de modo a atingirem as propriedades requeridas para uma aplicação, tudo devido a existência de grupos funcionais em suas cadeias, permitindo tanto modificações químicas quanto interação com outras moléculas.^{3,4}

Uma das mais promissoras aplicações dos biopolímeros, especialmente os polissacarídeos por apresentarem propriedades como ótima solubilidade e gelificação, é na confecção de hidrogéis, utilizados, entre muitas outras finalidades, para a liberação controlada de fármacos, além de sua aplicação na área da engenharia tecidual para estimular a regeneração e crescimento de tecidos.³

3.2 Hidrogel

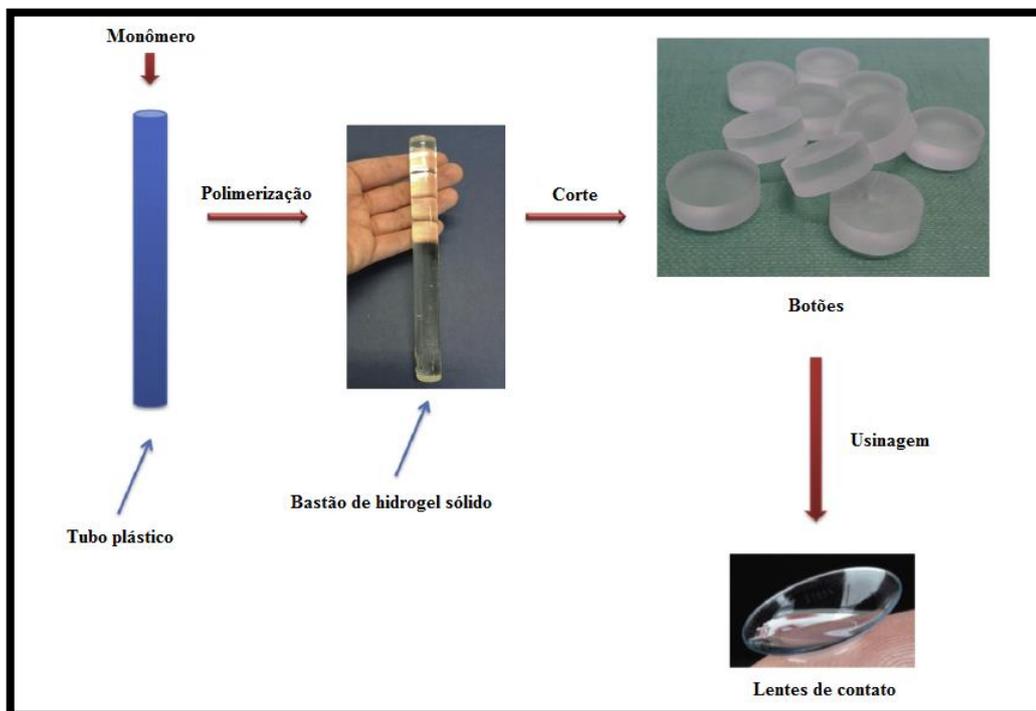
Segundo Ratner et al⁴, os hidrogéis podem ser definidos como polímeros capazes de absorver e reter grandes quantidades de água em sua rede tridimensional, sem que sejam solubilizados, obtidos a partir da reticulação de um ou mais monômeros. A capacidade dos hidrogéis em absorver grandes quantidades de água dá-se pelos grupos funcionais hidrofílicos presentes nas cadeias poliméricas. Já sua capacidade em reter água e ser insolúvel nesta dá-se pela presença de reticulações e cristalitos em sua estrutura. A classificação dos hidrogéis pode ser feita com base em diferentes fatores. Estes são:

- Origem: sintética ou natural;
- Composição polimérica: homopolímeros, copolímeros, multipolímeros ou hidrogéis de polímeros interpenetrantes;
- Morfologia: amorfo, semi-cristalino ou ligações de hidrogênio (ou complexação estrutural);
- Carga iônica: neutra, aniônica, catiônica ou anfótera (ambas aniônica e catiônica);

- Tipo de reticulação: química ou física.^{4,10}

A utilização de hidrogéis no setor biomédico vem ganhando cada vez mais espaço devido a propriedades e características propícias para aplicações biológicas, como sua alta biocompatibilidade, alta absorção de água ou fluidos biológicos, além de sua flexibilidade e da presença de poros na sua estrutura. A união dessas propriedades confere aos hidrogéis grande semelhança aos tecidos vivos, o que os tornam de grande interesse para aplicações na área da engenharia tecidual¹¹. Além da sua utilização no ramo da engenharia tecidual, atuando como curativos e *scaffolds* para regeneração e crescimento tecidual, a gama de aplicações dos hidrogéis é vasta, sendo utilizados como sistema de liberação de fármacos, produtos higiênicos como fraldas, meio para adesão e crescimento direto de células neurais, entre outros¹⁰⁻¹². Uma aplicação cotidiana dos hidrogéis é para a fabricação de lentes de contato. A figura 1 abaixo mostra, de forma resumida, o processo de fabricação destas lentes. Primeiro, o monômero é introduzido em um molde cilíndrico plástico, onde sofrerá polimerização, dando origem ao hidrogel sólido que é então cortado em pequenas partes que serão em seguidas usinadas, resultando em lentes de contato com diversas espessuras.

Figura 1 – Utilização de hidrogel para a produção de lentes de contato.



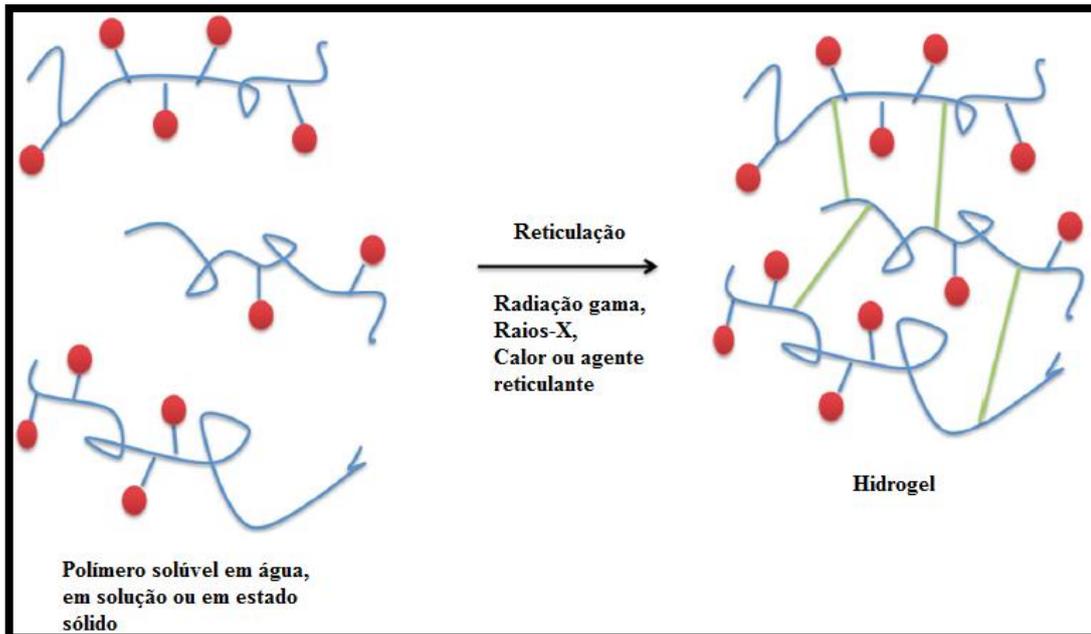
Fonte: CALÓ, 2015¹¹. Adaptado.

Para que os hidrogéis sejam capazes não só de reter, mas também de serem insolúveis em água ou fluidos biológicos, é necessário o desenvolvimento de uma rede tridimensional elástica na estrutura do polímero. Este processo é chamado de reticulação, podendo ser obtida por dois meios: reticulação física ou reticulação química.⁴

No processo de reticulação física, a rede tridimensional é formada por ligações cruzadas originadas pelo emaranhamento de cadeias poliméricas, assim como pela existência de interações químicas fracas, como ligações de hidrogênio, interações iônicas e forças de Van der Waals, entre as cadeias poliméricas. A reticulação também pode ser causada pela formação de cristalitos que aproximam duas ou mais cadeias poliméricas entre si. Além disso, a reticulação física pode ser atingida ao se utilizar copolímeros em bloco e enxertos anfífilos que, quando em meio aquoso, dão origem aos hidrogéis. Por não possuírem ligações químicas, as ligações cruzadas formadas são classificadas como semi-permanentes, dando origem a hidrogéis descritos como reversíveis, ou seja, que podem se tornar solúveis devido a variações de pH e temperatura, por exemplo, além de apresentarem menor resistência mecânica quando comparados aos obtidos por reticulação química.^{10,11}

No processo de reticulação química, a formação da rede tridimensional é originada a partir de ligações químicas primárias de caráter covalente entre as cadeias poliméricas, dando origem a ligações cruzadas permanentes, que conferem ao hidrogel melhores propriedades mecânicas. A reticulação química pode ser feita a partir da utilização de um polímero, em solução, juntamente com um agente de reticulação, o qual deve apresentar no mínimo bifuncionalidade, sendo este responsável por unir as cadeias poliméricas através dos seus grupos funcionais^{4,13}. Outro método de obtenção dá-se pela polimerização de um monômero solúvel em água juntamente com este agente. Neste último método é comum a existência de monômeros que não reagiram no hidrogel final, sendo então necessária a purificação deste para posterior uso. A reticulação também pode ser alcançada ao se copolimerizar um ou mais monômeros, que estão em maior quantidade, com um monômero que se encontra em menor quantidade. Além destes, um outro método utilizado é o de reticulação por radiação ionizante, onde são utilizados raios-X, raios gama ou feixe de elétrons, responsáveis por produzirem reticulação via reação de radicais livres. Estes mesmos tipos de radiação podem ser utilizados para polimerizar e reticular compostos insaturados^{4,10,13}. A figura 2 ilustra a obtenção de um hidrogel partindo de um polímero já formado, solúvel em água, e fazendo uso de diversas técnicas.

Figura 2 – Síntese de hidrogéis através da reticulação de polímeros solúveis em água.



Fonte: CALÓ, 2015¹¹. Adaptado.

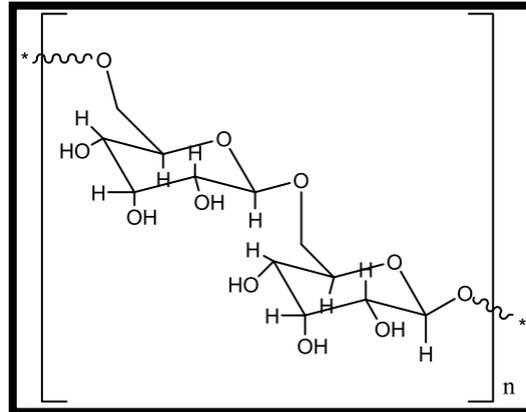
A partir da presença de grupos hidrofílicos em sua cadeia poliméricas e da rede tridimensional originada pela reticulação, seja ela química ou física, dá-se então origem a principal propriedade dos hidrogéis: a capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, sem sofrer dissolução nestes. O ambiente aquoso formado após a absorção de água ou fluidos corporais pelo hidrogel permite o transporte de substâncias como nutrientes e outras células metabólicas para dentro e fora da sua estrutura. Outra propriedade muito importante que deve ser presente nos hidrogéis quando utilizados para aplicações biomédicas é sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Como o material estará em contato direto com tecidos vivos, quando sofrer degradação o hidrogel deve liberar subprodutos atóxicos e que sejam eliminados facilmente por mecanismos biológicos¹⁴. Uma subclasse de biopolímeros que apresenta estas características e que é de grande interesse para a produção de hidrogéis são os polissacarídeos, em especial a dextrana.

3.2.1 Dextrana e hidrogéis de dextrana

Como mencionado anteriormente, uma das subclasses de biopolímeros que apresentam ótimas propriedades para serem utilizados como hidrogéis são os polissacarídeos. Dentre eles, um biopolímero que apresenta excelente potencial para a produção de hidrogéis é a dextrana. A dextrana, um polímero natural, é originada a partir de um polissacarídeo de glicose produzido

através de bactérias, como a *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc spp.* Sua estrutura é constituída de ligações α -(1-6) à cadeia principal da D-glicose, consistindo de aproximadamente 50% do total de ligações, também possuindo ramificações originadas das ligações α -(1-2), α -(1-3) e α -(1-4).^{15,16} A estrutura básica da dextrana é apresentada na figura 3.

Figura 3 – Representação da estrutura básica da dextrana.



Fonte: CAMPOS, 2009.¹⁵

A dextrana é um biopolímero hidrofílico, atóxico, biodegradável e que apresenta ótima biocompatibilidade com tecidos vivos. Tais propriedades justificam os estudos e as aplicações já existentes da dextrana na área biomédica. A presença de grupos hidroxila em sua estrutura possibilita que substituições sejam feitas em sua estrutura, impactando assim suas propriedades e ampliando ainda mais a gama de aplicações da dextrana e seus derivados¹⁷. Uma das principais aplicações da dextrana, e que tem demonstrado ótimos resultados, encontra-se na preparação de hidrogéis.

Os hidrogéis de dextrana, assim como a maioria dos hidrogéis, podem ser obtidos a partir de reticulação física ou química, aproveitando a presença dos grupos hidroxila na estrutura da dextrana. A reticulação química é a mais usual para a obtenção destes hidrogéis e pode ser atingida por diferentes métodos, como a reticulação utilizando os sítios bifuncionais de isocianatos, gluteraldeídos ou outros, para realizar ligações covalentes.¹⁸

Diferentes agentes reticulantes podem ser empregadas para a produção dos hidrogéis de dextrana. Dentre os estudados, podem ser citados o 1,6 – hexadiisocianato (HDI), o polietilenoglicol (PEG) e o N, N' – metilenobisacrilamida (MBAA), sendo este último o utilizado no presente trabalho. No caso da utilização do N, N' – metilenobisacrilamida, os grupos hidroxila presentes na dextrana reagirão com os grupos amina presentes no MBAA, dando origem então a estrutura reticulada destes hidrogéis.¹⁹

Os hidrogéis de dextrana, assim como a dextrana em si, apresentam ótima biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo degradados pelo organismo sem que gerem subprodutos tóxicos. Uma das aplicações mais comuns destes hidrogéis é para a liberação controlada de fármacos. Além disso, apresentam boa estabilidade frente a condições fisiológicas, baixa absorção de proteínas, alta absorção e retenção de água ou fluidos corporais, capacidade de interagir com células e tecidos específicos, flexibilidade e a presença de porosidade em sua estrutura. Estas propriedades proporcionam aos hidrogéis de dextrana condições favoráveis para a atuação como matrix extracelular, sendo reportado por trabalhos anteriores a capacidade destes hidrogéis de cultivo e proliferação celular²¹. Sendo assim, uma aplicação que se torna viável para estes materiais é a de serem utilizados na engenharia tecidual para aplicação em tecidos moles como *scaffolds* e curativos, estimulando o crescimento celular de diferentes tecidos.^{18, 20.}

Apesar das propriedades já citadas dos hidrogéis de dextrana, uma aplicação que requer melhorias em algumas de suas propriedades encontra-se na sua utilização na engenharia tecidual de ossos. Ainda que apresentem capacidade de cultivo e proliferação celular, estudos mostram que as células aderidas formaram agregados, sendo que para sua aplicação óssea o comportamento que se mostra mais adequado é aquele onde as células se espalham pela superfície dos *scaffolds*, conferindo assim melhor adesão celular²². Além disto, sua flexibilidade e consequente facilidade em deformação, aliada a sua baixa resistência mecânica, limitam sua aplicação em tecidos duros, como os ossos.²³

Para contornar os problemas encontrados e melhorar suas características para aplicações ósseas, trabalhos mostram que a introdução de partículas de certos materiais inorgânicos é capaz de prover aumento da resistência mecânica e também da bioatividade dos hidrogéis de dextrana. Dentre os materiais incorporados podem ser citados trabalhos utilizando hidroxiapatita para a produção de *scaffolds* compósitos de hidroxiapatita/dextrana²² e de nano-hidroxiapatita - pululano/dextrana²¹. Outros materiais inorgânicos que apresentam excelentes propriedades como elevada bioatividade, ótima interação interfacial com osso e capacidade de osteocondução, além de melhorar as propriedades mecânicas de hidrogéis, são os biovidros.^{23,24}

3.3 Biovidro

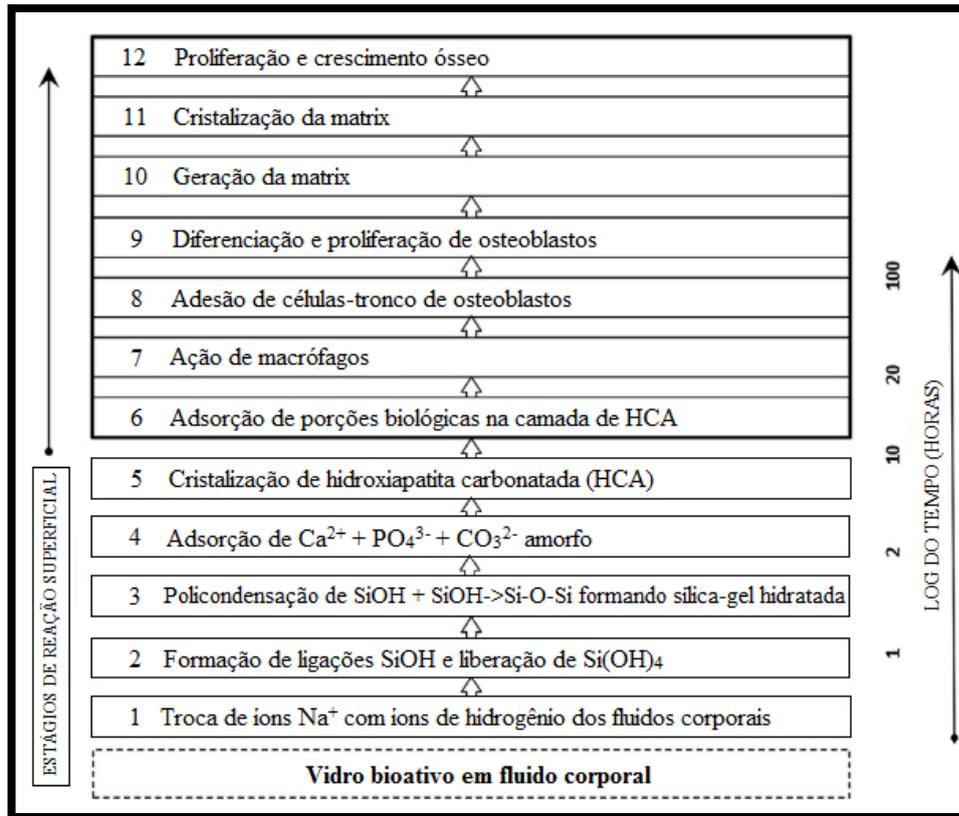
Os biovidros compõe uma classe dos biomateriais cerâmicos com extensa gama de aplicações graças às suas características peculiares quando introduzidos em meio biológico, principalmente em contato com tecido ósseo. O termo biovidro foi cunhado pelo professor

Larry Hench, da Universidade da Flórida, em 1969 durante um projeto que tinha como objetivo avaliar se vidros e vitrocerâmicas baseadas em silicatos e que continham grandes quantidades de Ca e P seriam ou não rejeitadas por tecidos ósseos. Durante este projeto, uma composição específica de vidro foi capaz de se ligar fortemente ao fêmur de ratos, mostrando-se de difícil remoção⁴. Este vidro tinha composição de 45% SiO₂, 6% P₂O₅, 24.5% Na₂O e 24.5% CaO em porcentagem de peso e recebeu o nome de Biovidro® 45S5, tornando-se então o primeiro biovidro sintetizado.²⁴

Algumas características desse material o tornam singular para aplicações onde se faz necessário o contato com tecido ósseo para estimular sua regeneração e crescimento. O Biovidro® 45S5 além de apresentar excelente biocompatibilidade, apresenta também a capacidade de osteocondução e osteoindução, tornando-se então um material bioativo e assim inibindo a formação de um tecido fibroso ao seu redor, indo de encontro com algumas propriedades necessárias para sua utilização como *scaffolds* na engenharia tecidual de ossos²⁵. A osteocondução é dada como sendo a capacidade do material em servir de suporte para a migração de tecido ósseo dos arredores. Já a osteoindução é a capacidade do material em ser colonizado com células com propriedade osteogênica, dando origem então a um novo osso naquela região²⁴.

Quando *in vivo*, o Biovidro® 45S5 tem a capacidade de se ligar fortemente ao tecido ósseo através da formação de uma camada superficial de hidroxiapatita carbonatada (HCA), que possui estrutura e componentes similares aos presentes nos ossos²⁶. A formação desta camada dá-se pela troca de cátions presentes no biovidro com prótons presentes no fluido corporal, deixando assim uma camada rica em sílica e que está fracamente conectada, sendo que esta camada servirá de substrato para a formação de um filme rico em CaO – P₂O₅, compostos que migraram do biovidro através da camada de sílica^{3,27}. Pela incorporação de fosfatos e cálcio presentes no fluido corporal ocorre o crescimento de uma fase amorfa de CaO – P₂O₅, que em seguida cristaliza pela incorporação de ânions OH⁻ e CO₃²⁻, também presentes no fluido corporal, dando origem então à camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA), que possui cristais em escala nanométrica, similar aos encontrados no osso²⁷. A figura 4 a seguir mostra um esquema resumido da sequência de reações para a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) em biovidros, além das reações biológicas que levam a formação da ligação do biovidro com o tecido ósseo e seu posterior crescimento.

Figura 4 – Resumo das reações interfaciais entre osso e um vidro bioativo.



Fonte: HENCH, 2014²⁷. Adaptado.

Alguns trabalhos mostram que a capacidade do biovidro em estimular o crescimento ósseo é superior ao observado em implantes que fazem uso de hidroxiapatita³. Estudos *in vivo* foram realizados e foi constatado que o Biovidro® 45S5 foi capaz de produzir tecido ósseo mais rápido, de melhor qualidade e em maior quantidade, chegando até uma quantidade 17 vezes maior em um mesmo período de tempo do que aqueles produzidos por implantes utilizando hidroxiapatita sintetizada e apatita/wollastonita^{4,28}.

Apesar de todas as excelentes propriedades dos biovidros, algumas características dessa classe de materiais que ainda restringem certas aplicações na engenharia tecidual de ossos são sua fragilidade, baixa flexibilidade e baixa resistência à fadiga, fatores que dificultam o seu manuseio^{3,29}. Para contornar estas deficiências em propriedades, estudos foram realizados utilizando recobrimento polimérico em *scaffolds* de biovidro²⁵ e outros utilizando o Biovidro® 45S5 como material de reforço e capaz de conferir bioatividade em hidrogéis poliméricos^{23,29}. A integração de dois ou mais tipos de biomateriais, cada um contribuindo com alguma propriedade específica e visando a obtenção de um material com as melhores propriedades de cada material separadamente dá origem então à classe dos biomateriais compósitos.^{3,29}

3.4 Biomateriais compósitos

De acordo com Parker e Bronzino e Ratner et al, os materiais compósitos podem ser entendidos como materiais obtidos pela junção de dois ou mais componentes que são distintos quimicamente, em escala macrométrica, com intuito de produzir um material que une as melhores características de cada um de seus constituintes^{2,4}. São formados por uma fase contínua denominada matrix e outra fase dispersa chamada de componente de reforço ou modificador, que é geralmente mais rígida que a fase matrix, sendo estes separados por interfaces, de modo que as características destas impactam diretamente nas propriedades do material. A adição do material de reforço, que para aplicação como biomateriais geralmente estão na forma de fibras ou particulados, tem como objetivo melhorar e/ou conferir propriedades ao material que constitui a fase matrix, como aumento de sua resistência mecânica, biocompatibilidade e bioatividade^{2,3}. A contribuição para as propriedades finais do compósito pode ser expressa simplesmente pela soma das frações volumétricas das propriedades de cada constituinte, o que não pode ser levado em consideração para os cálculos em casos mais especiais onde os materiais interagem de forma sinérgica devido a orientação, concentração, distribuição e geometria do material de reforço⁴. Os principais tipos de junções para a criação de biomateriais compósitos se dão por combinações do tipo metal-cerâmica e polímero-cerâmica.

As combinações do tipo metal-cerâmica são geralmente utilizadas para exercer função estrutural como em aplicações dentárias e ortopédicas onde, por exemplo, implantes metálicos são recobertos com fosfatos de cálcio para induzir o crescimento ósseo em sua superfície, aumentando sua estabilidade⁴. Os biomateriais compósitos oriundos da junção polímero-cerâmica visam combinar o fácil processamento dos materiais poliméricos, suas características mecânicas e sua biodegradabilidade, principalmente no caso de biopolímeros, com a excelente biocompatibilidade e bioatividade das cerâmicas como o biovidro, hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio. Estudos mostram a utilização de diversos tipos de polímeros reforçados com particulados cerâmicos, sejam para aumentar sua rigidez e resistência a fadiga como no caso do cimento de PMMA reforçado com partículas ósseas², além de conferir melhor biocompatibilidade e bioatividade aos materiais para aplicações na engenharia tecidual como os compósitos elastoméricos de poli (glicerol sebacato) - Biovidro®³⁰ e dos compósitos de colágeno-Biovidro®³¹. Outro biomaterial utilizado na engenharia tecidual é o hidrogel de elastina-Biovidro® que apresenta mecanismo de auto-reparação para tecidos moles³². A utilização de hidrogéis produzidos a partir de biopolímeros, como é o caso da elastina, do

colágeno e da dextrana, combinados com as excelentes propriedades de bioatividade do biovidro são capazes de produzir materiais que interagem de forma benéfica com o tecido biológico. A adição de diferentes teores de biovidro tem potencial de conferir não só uma melhora na biocompatibilidade mas como também prover propriedades osteogênicas aos hidrogéis, além de melhorar a rigidez da matrix de biopolímero, comportamentos esperados para os hidrogéis de dextrana com particulados de biovidro.

3.4.1 Hidrogéis de dextrana/biovidro

A dextrana por si só, apesar de apresentar capacidade de cultura e proliferação celular²³, não possui nenhuma característica osteogênica, ou seja, quando utilizada para a produção de hidrogéis este material não é capaz de servir de substrato para a formação de tecido ósseo por meio de células de osteoblastos²⁴. Mesmo assim, por possuírem ótima biocompatibilidade, biodegradação, porosidade, flexibilidade e capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água, os hidrogéis de dextrana tem estrutura que os tornam similares a matrix extracelular, elemento chave que serve de suporte e estimulador para o crescimento celular para a engenharia de tecidos moles². Já o Biovidro® 45S5 apresenta baixa resistência a fadiga, fragilidade e não apresenta flexibilidade alguma. Apesar disso, apresenta alta rigidez, excelente biocompatibilidade, bioatividade e capacidade osteogênica, sendo então apto a formar novas células ósseas e de se ligar com o tecido ósseo já existente.

A adição de particulados de Biovidro® 45S5 a uma matrix feita de hidrogel de dextrana, formando assim um biomaterial compósito, tem sido objeto de estudo para a produção de *scaffolds*²³ para a engenharia tecidual de ossos. A contribuição do hidrogel de dextrana em atuar similarmente à matrix extracelular, junto com a capacidade osteogênica do Biovidro® 45S5 tem excelente potencial de produzir um material capaz de estimular a regeneração e crescimento ósseo quando introduzidos em meio biológico, observado pela sua capacidade de biomineralização, além de influenciar nas suas propriedades de intumescimento.

4. Material e métodos

4.1 Materiais

Para a produção dos hidrogéis foi utilizada dextrana obtida da bactéria *Leuconostoc spp*, que apresenta massa molar de 100.000 g.mol⁻¹, da marca Sigma-Aldrich®. O agente reticulante

escolhido foi o N, N' – metilenobisacrilamida (MBAA), também da marca Sigma-Aldrich. O biovidro utilizado foi o 45S5, produzido e fornecido pelo Laboratório de Biocerâmicas – BioCeram, do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo – Campus São José dos Campos.

Para a realização do ensaio de intumescimento utilizou-se uma solução tampão PBS, com concentração de 1 Mol. L⁻¹ e p.H. 7.4, preparada no próprio laboratório. Fez-se uso também de álcool etílico absoluto 99.5% para a realização do ensaio de porosimetria.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos hidrogéis

Para a preparação dos hidrogéis foi utilizada dextrana em concentração de 20% (g/100 mL). Além disso foi utilizada a proporção molar de 1:6 de agente reticulante (MBAA) para mols de dextrana, sendo então um mol de MBAA para seis mols de mols de dextrana. Foram feitas 4 composições distintas de hidrogel com teores de 0, 4, 8 e 12% (m/m), em relação ao peso total de sólidos utilizados, de Biovidro 45S5. As composições estão presentes na tabela 1.

O preparo de todos os hidrogéis seguiu a mesma metodologia, sendo somente necessária a adição de uma etapa para a produção dos hidrogéis que continham diferentes teores de biovidro. No primeiro momento, as massas de dextrana e MBAA foram pesadas em uma balança de precisão Radwag AS 60/220.R2. Em seguida, a dextrana foi solubilizada em uma solução de NaOH 2,8 mols.L⁻¹ durante aproximadamente 3 horas sob temperatura e agitação controladas no agitador magnético Corning PC-420D. O MBAA foi solubilizado em água deionizada durante 3 horas, também sob temperatura e agitação controladas.

Para os hidrogéis padrão, a solução de MBAA foi vertida na solução de dextrana e a mistura foi agitada durante 5 minutos sob temperatura e agitação controlados. Em seguida, a mistura foi submetida à sonicação no processador ultrassônico Sonics Vibra Cell modelo VCX 750 durante 30 segundos com intuito de eliminar bolhas presentes na mistura, além de proporcionar uma melhor mistura entre a dextrana e o MBAA.

Para os hidrogéis contendo biovidro, foram adicionados os teores de 4, 8 e 12% (m/m) de biovidro às soluções de dextrana após 3 horas de solubilização. A mistura resultante foi agitada durante 5 minutos no agitador magnético, sob temperatura e agitação controlada. Em seguida, foi submetida a sonicação durante 10 minutos visando uma melhor dispersão das partículas de biovidro na solução. Após o processo de sonicação, verteu-se a solução de MBAA

no recipiente contendo a dispersão de biovidro na solução de dextrana. A mistura resultante foi então agitada, sob temperatura e agitação controladas, por 3 minutos e em seguida sonicada durante 30 segundos.

O hidrogel padrão e os hidrogéis contendo biovidro foram vertidos em moldes cilíndricos de *Teflon*® com diâmetro de 10 mm e altura de 20mm e cobertos com *Parafilm*®. Os hidrogéis foram armazenados à temperatura ambiente durante 24h para que a reação de reticulação ocorresse. Após este período os hidrogéis foram retirados dos moldes e lavados em água destilada durante 30 minutos, repetindo-se o processo 3 vezes, para que fossem removidos a dextrana e o agente reticulante que não reagiram, além de causar uma redução no pH das amostras, ideal para que seu processo de degradação não seja acelerado. O excesso de água adsorvida na superfície dos hidrogéis foi retirado com auxílio de papel toalha. Em seguida, os hidrogéis foram colocados em tubos *Falcon* e condicionados sobre refrigeração de 8 °C durante 1 dia. Após este período, parte dos hidrogéis foram cortados em amostras de 10 mm de altura e congelados em um freezer à -20 °C durante 24h. Em seguida, os hidrogéis foram liofilizados no equipamento LABCONCO FreeZone Plus 2,5 Litros (modelo 7670041) durante 24h. As amostras obtidas foram condicionadas à temperatura ambiente em tubos *Falcon* para serem então caracterizadas.

A tabela 1 mostra de forma resumida a nomenclatura para cada hidrogel e as respectivas massas utilizadas para a sua produção.

Tabela 1: Composições de interesse de estudo dos hidrogéis de dextrana.

Composição	Biovidro (% m/m)	Biovidro (g)	Dextrana (g)	MBAA (g)
P	0	-	1,2	0,19079
BG4	4	0,05795	1,2	0,19079
BG8	8	0,12094	1,2	0,19079
BG12	12	0,18965	1,2	0,19079

Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica dos hidrogéis foi feita utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para esta caracterização, amostras de diferentes composições de hidrogel previamente liofilizadas, como descrito na seção **4.2.1 Preparação dos hidrogéis**, foram congeladas e fraturadas em nitrogênio líquido. As amostras então foram fixadas em um porta amostras e em seguida metalizadas no metalizador Sputter Coater SCD 050 Baltec, utilizando ouro e uma corrente de 20mA, com tempo de metalização de 90 segundos. Para analisar a superfície de fratura dos hidrogéis foi utilizado o equipamento Inspect S50 – FEI Company®, operando a 12,5 kV, configurado para detecção de elétrons secundários, com diversas magnitudes de aumento. Utilizando-se o software *ImageJ*® foi feita uma análise complementar das imagens obtidas através do MEV com magnitude de 150 vezes. Para isso inicialmente foram escolhidas as imagens e calibradas as barras de escala de cada uma delas utilizando a função *Analyze -> Set Scale*. Após esta etapa a porção da imagem que exibia os parâmetros utilizados no MEV foi removida ao se selecionar o restante da imagem e utilizar a função *Image -> Crop*. Em seguida, filtros foram aplicados às imagens com intuito de evitar ruídos que pudessem atrapalhar os cálculos realizados pelo software, sendo que para esta etapa utilizou-se da função *Process -> FFT -> Bandpass Filter*. Para que o software reconhecesse as porções das imagens que se tratavam de poros foi preciso aplicar as funções *Image -> Adjust -> Threshold*. Com a imagem realçando em preto os poros, foi possível fazer uso das funções *Analyze -> Set Measurements* para escolher as informações de interesse. A análise então foi feita utilizando as funções *Analyze -> Analyze Particles*. Através das funções aplicadas foi possível obter a porosidade de cada um dos hidrogéis analisados. O diâmetro médio dos poros foi obtido através da seleção e medida de 20 poros aleatórios na estrutura dos hidrogéis.

4.2.3 Ensaio de porosimetria pelo método de Arquimedes

O ensaio de porosimetria teve como objetivo obter a porcentagem de poros presentes nas estruturas dos hidrogéis produzidos. Para isto foi utilizado o método de deslocamento de líquido. As amostras de hidrogéis liofilizados foram pesadas e em seguida imersas em álcool etílico absoluto 99.5% durante 24 horas. Após este tempo, as amostras foram removidas e tiveram a camada de álcool adsorvida em sua superfície retirada com auxílio de papel toalha e,

sem seguida, as amostras foram pesadas e suas massas anotadas. Para o cálculo da porosimetria a equação 2 foi utilizada:

$$P (\%) = \frac{M_2 - M_1}{V_s \cdot \rho_e} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo M_1 a massa da amostra de hidrogel liofilizado, M_2 a massa da amostra de hidrogel após 24 horas imerso em álcool etílico absoluto 99.5%, V_s o volume da amostra de hidrogel que foi cortado em pedaço de aproximadamente 1 cm de altura antes da liofilização, tendo suas dimensões medidas em triplicata com auxílio de um paquímetro, e ρ_e a massa específica do álcool etílico.

4.2.4 Ensaio de intumescimento

O grau de intumescimento (Q) de um material é a medida da quantidade de água ou fluidos corporais que este material é capaz de reter em sua estrutura.

Para a realização do ensaio de intumescimento dos hidrogéis, amostras do hidrogel padrão e dos hidrogéis com diferentes concentrações de biovidro, foram submersas em solução tampão fosfato-salino (PBS), de pH 7,4. As amostras foram retiradas a cada 1 minuto de permanência na solução, sendo removida, com auxílio de papel, a camada de solução adsorvida na superfície do hidrogel antes de serem pesadas e terem sua massa anotada. O ensaio foi dado como concluído quando a massa pesada dos hidrogéis se manteve constante. As diferentes massas pesadas foram utilizadas para observar a cinética de intumescimento dos hidrogéis. O grau de intumescimento (Q) foi calculado a partir da seguinte equação:

$$Q (\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo M_t a massa do hidrogel intumescido em um dado tempo t e M_0 a massa do hidrogel liofilizado. Os dados obtidos foram plotados em gráficos para melhor análise dos resultados.

4.2.5 Ensaio mecânico

Para a caracterização mecânica dos hidrogéis foi realizado ensaio de compressão. Para tanto, 5 amostras cilíndricas de 4 mm de altura e 10 mm de diâmetro de cada composição no estado intumescido foram ensaiadas entre duas placas de aço, com uma carga de 250N a uma

taxa de $0.5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, até que a ruptura do material. Para a determinação do módulo de compressão dos hidrogéis foi utilizada a inclinação da região linear da curva tensão-deformação para deformações de 0-40%.

5. Resultados e discussões

5.1 Aspectos dos hidrogéis produzidos

Os hidrogéis de dextrana contendo teores de 0, 4, 8 e 12% (m/m) de biovidro foram produzidos de acordo com a metodologia apresentada na seção 5.2.1.

Para a composição padrão, denominada P, foram obtidos hidrogéis transparentes de coloração amarelada, característica da solução de dextrana de massa molar de $100.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, de aspecto homogêneo e com resistência à manipulação. Alguns hidrogéis apresentaram em sua parte superior bolhas causadas pela camada de *Parafilm*. As partes contendo bolhas foram cortadas e descartadas. Algumas amostras do hidrogel padrão são vistas na figura 5.

Figura 5 – Amostras de hidrogel padrão de dextrana (P).

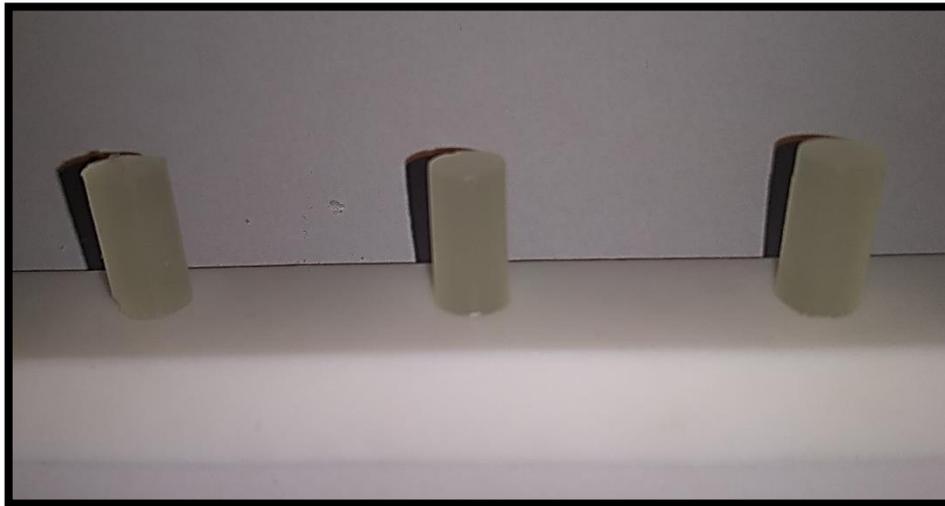


Fonte: Elaboração própria.

Durante a preparação dos hidrogéis contendo um teor de 4% (m/m) de biovidro foi observada uma mudança no aspecto das soluções e, conseqüentemente, do hidrogel pronto. O biovidro foi adicionado à solução de dextrana, mudando o aspecto da solução de transparente com coloração amarelada para opaco e esbranquiçado, de coloração levemente amarelada. Essa mudança de comportamento dá-se pela introdução das partículas de biovidro que são brancas e insolúveis na solução, o que leva a formação de uma suspensão de partículas de biovidro

dispersas na solução de dextrana, dificultando a passagem de luz. Os hidrogéis produzidos possuíram também o aspecto opaco, esbranquiçado e homogêneo, sem a formação de uma faixa de coloração branca mais intensa causada pela decantação das partículas de biovidro, o que evidencia uma boa dispersão das partículas de biovidro na solução. Os hidrogéis contendo um teor de 4% (m/m) de biovidro, denominados BG4, podem ser vistos na figura 6.

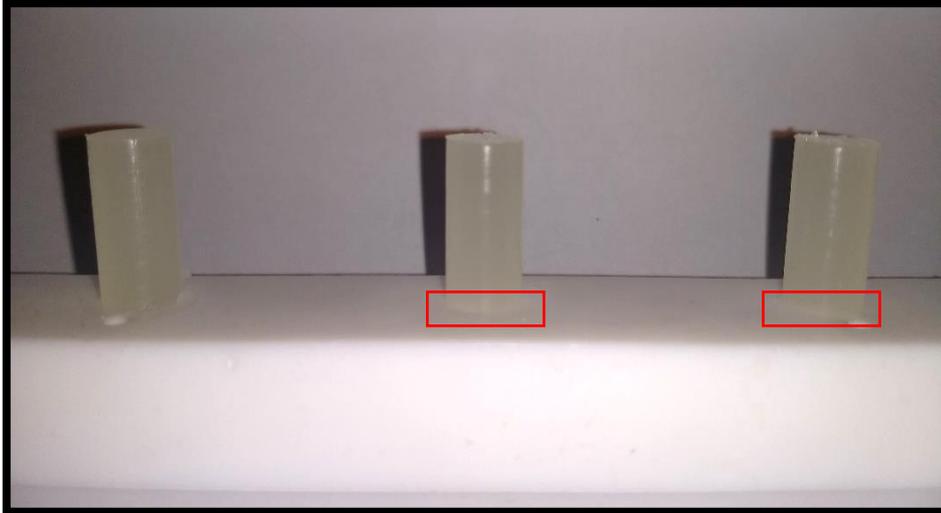
Figura 6 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 4% (m/m) de biovidro (BG4).



Fonte: Elaboração própria.

Os hidrogéis de dextrana contendo um teor de 8% (m/m) de biovidro, denominados BG8, apresentaram aspecto semelhante ao obtido nos hidrogéis BG4, porém levemente mais esbranquiçados devido ao maior teor de biovidro, que resultou numa maior dispersão dessas partículas na solução. Apesar de apresentarem aspecto homogêneo, pode-se perceber que na base dos hidrogéis BG8 houve a formação de uma leve camada branca, causada pela decantação de partículas de biovidro que não ficaram dispersas na solução. A formação dessa camada foi causada pelo aumento no teor de partículas de biovidro, que são mais densas que a solução de dextrana e conseqüentemente tendem a decantar na solução caso não estejam sob agitação. Os hidrogéis BG8 podem ser observados na figura 7.

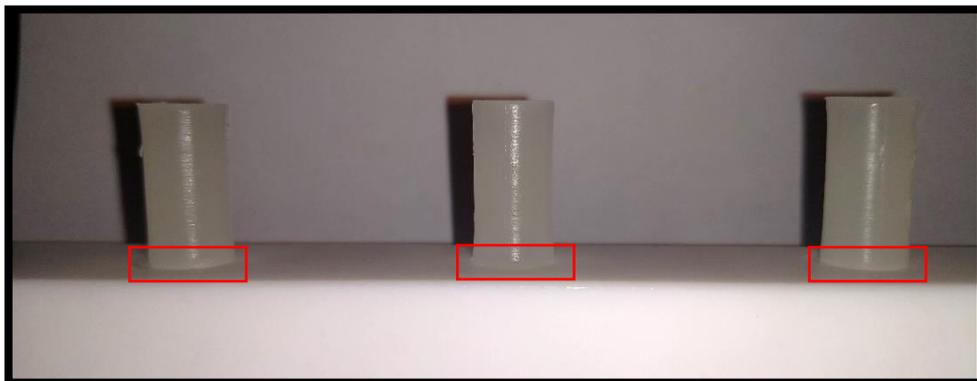
Figura 7 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 8% (m/m) de biovidro (BG8)



Fonte: Elaboração própria.

Assim como observado nas composições BG4 e BG8, os hidrogéis contendo um teor de 12% (m/m) de biovidro, denominados BG12, apresentaram também o aspecto opaco e esbranquiçado. Pôde-se também notar a presença de uma maior camada branca na base dos hidrogéis causados pela decantação de partículas de biovidro que estavam em concentração superior aos outros hidrogéis estudados. Apesar da formação desta camada, foi possível observar que houve uma distribuição homogênea e em maior quantidade das partículas de biovidro no restante dos hidrogéis, o que resultou numa coloração mais esbranquiçada, levando a concluir que houve uma boa dispersão destas partículas na solução de dextrana. A figura 8 expõe os hidrogéis BG12.

Figura 8 – Amostras de hidrogel de dextrana contendo 12% (m/m) de biovidro (BG12).



Fonte: Elaboração própria.

Uma alternativa que deve ser estudada para a não formação ou minimização da camada decantada de biovidro na base dos hidrogéis está na reticulação destes sob agitação em ultrassom de banho, o que pode prevenir a formação desta camada devido ao processo de reticulação estar acontecendo enquanto as partículas de biovidro estão sob agitação. Dentre os 4 hidrogéis, o padrão apresentou a maior resistência ao manuseamento. Com o aumento do teor de biovidro adicionado os hidrogéis tornaram-se ligeiramente mais frágeis e quebradiços, comportamento já esperado devido a contribuição do biovidro nas características mecânicas do hidrogel. Na figura 9 a seguir tem-se uma comparação entre os hidrogéis obtidos. De modo geral, o hidrogel padrão apresentou aspecto transparente de coloração levemente amarelada e os hidrogéis contendo diferentes teores de biovidro apresentaram aspectos semelhantes entre si, variando somente a tonalidade de branco e formação da camada decantada, ambos mais intensos com o aumento do teor de biovidro.

Figura 9 – Comparativo entre as amostras de hidrogéis de dextrana a) padrão (P) e contendo b) 4% (m/m) (BG4), c) 8% (m/m) (BG8) e d) 12% (m/m) (BG12) de biovidro.

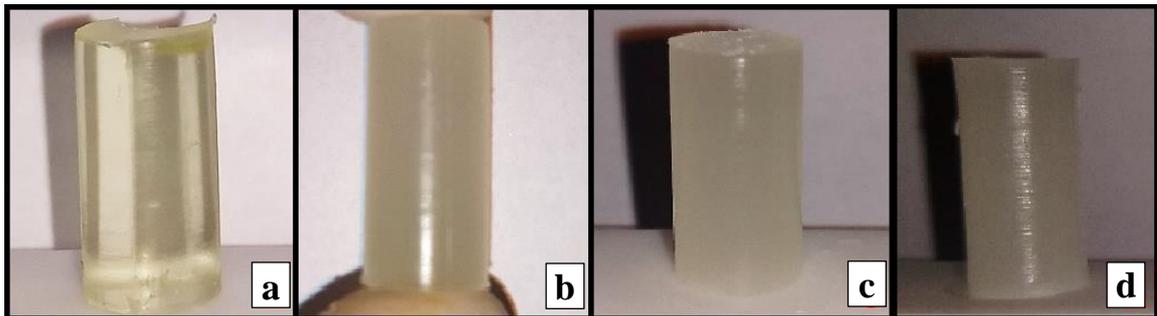
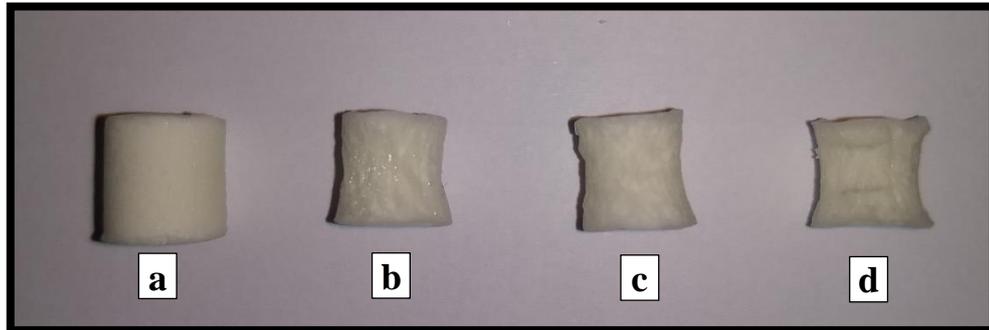


Figura 9: Elaboração própria.

5.2 Análise da morfologia dos hidrogéis a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio de porosimetria

Para a realização da análise por MEV e do ensaio de porosimetria amostras de hidrogéis de dextrana padrão e com diferentes teores de biovidro foram liofilizados durante 24h. Os hidrogéis liofilizados podem ser observados na figura 10.

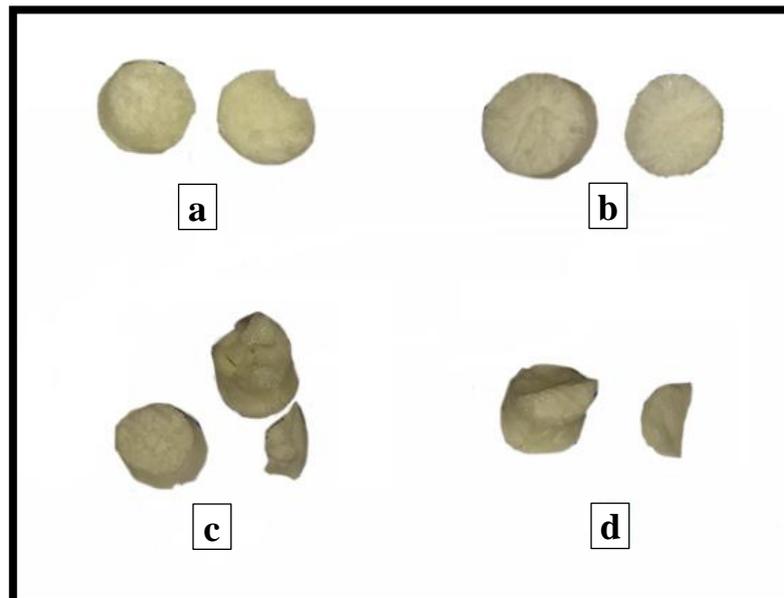
Figura 10 – Imagens dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro, após 24h de liofilização.



Fonte: Elaboração própria.

Inicialmente pode-se observar que o hidrogel padrão manteve o paralelismo entre suas paredes mesmo após a liofilização. Para as amostras contendo diferentes teores de biovidro foi possível observar que o hidrogel perdeu seu formato cilíndrico e que este efeito foi intensificado com o aumento do teor de biovidro. Para a realização do MEV, as amostras de hidrogéis foram fraturadas longitudinalmente em nitrogênio líquido. A superfície dos hidrogéis fraturados são apresentados na figura 11.

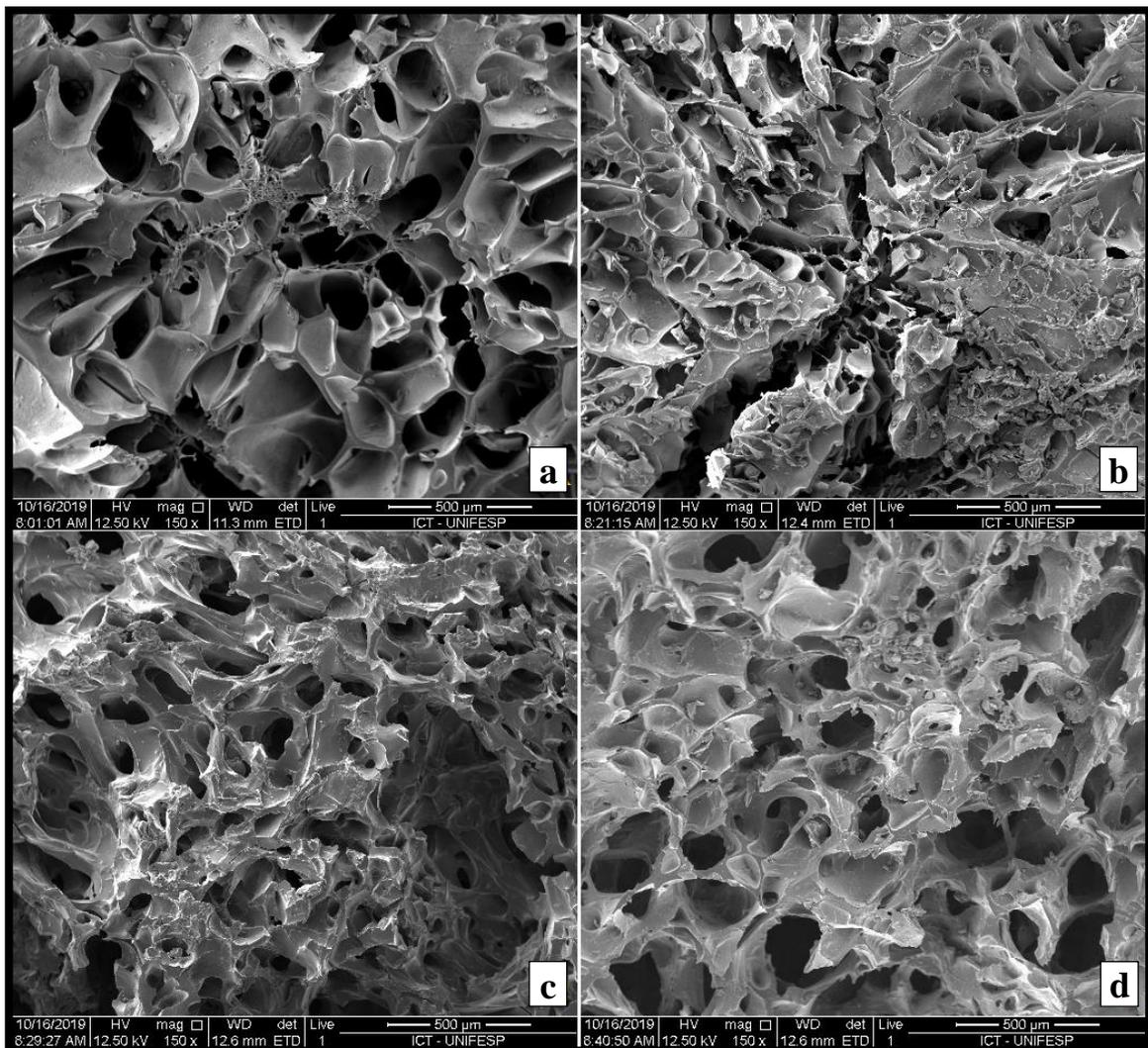
Figura 11 – Superfície dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4 % (m/m), c) 8 % (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro, após fratura em nitrogênio líquido.



Fonte: Elaboração própria.

Os hidrogéis padrão e com 4% (m/m) de biovidro (Figura 11 – a e b, respectivamente) foram fraturados com maior facilidade que os demais hidrogéis e apresentaram, em aspecto macroscópico, superfície de fratura mais homogênea. O hidrogel contendo 8% (m/m) de biovidro (Figura 11 – c) apresentou interior com porções ocas e porosidade em escala macroscópica, sendo que a superfície de fratura apresentou irregularidade. O hidrogel contendo 12% (m/m) de biovidro (figura 11 – d) se mostrou o mais difícil de fraturar entre os hidrogéis, evidenciado pelo aspecto da sua fratura. Apesar disso, o hidrogel com 12% (m/m) de biovidro apresentou superfície de fratura homogênea, assim como os hidrogéis padrão e com 4% (m/m) de biovidro. Os hidrogéis fraturados foram levados para análise em MEV onde suas superfícies de fratura foram observadas com diversas magnificações.

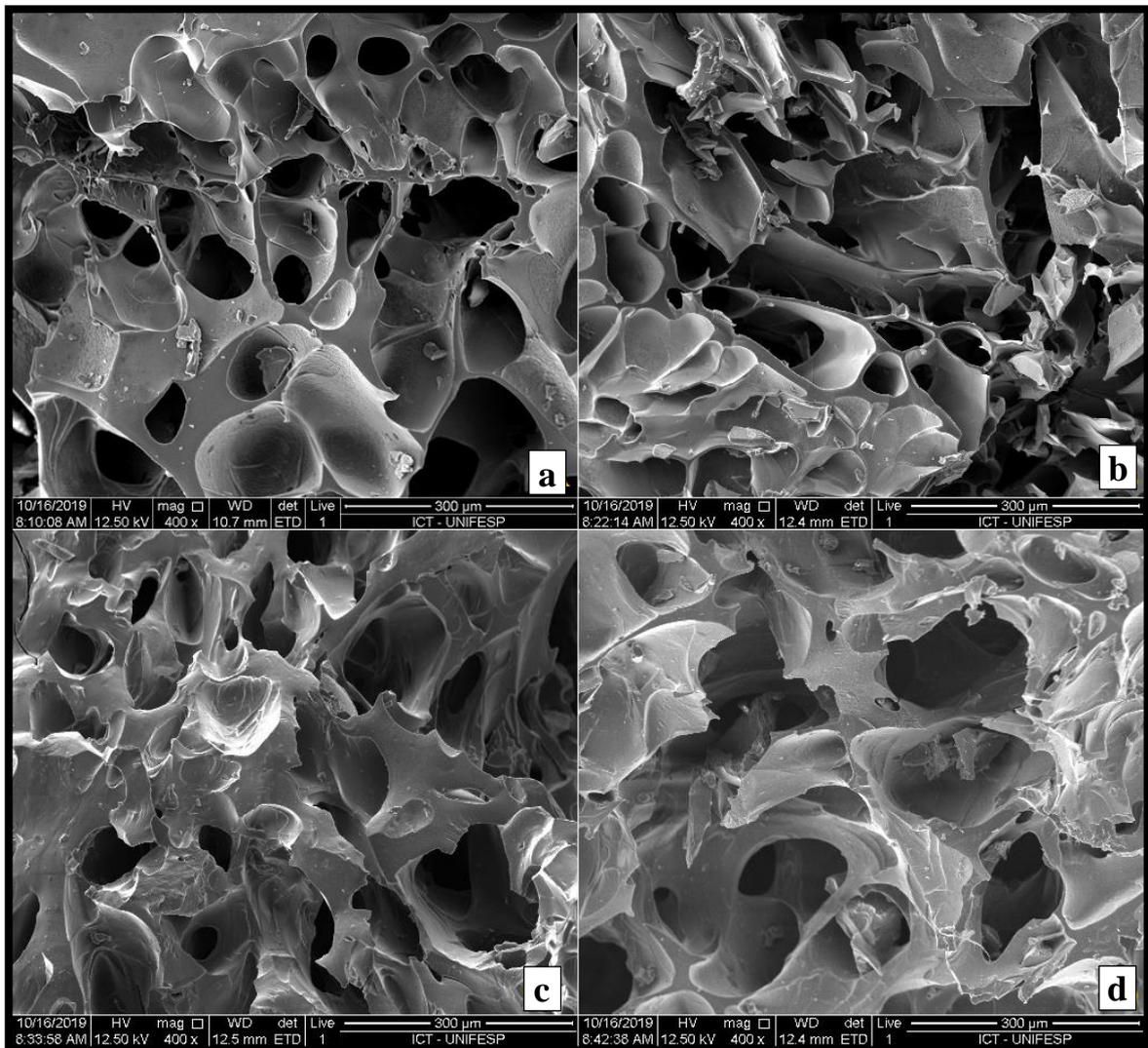
Figura 12 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 150 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro.



Fonte: Elaboração própria.

As imagens obtidas por MEV mostram o perfil dos poros, assim como seu formato e espessura da parede presentes nos diferentes hidrogéis. O aparecimento dos poros na estrutura dos hidrogéis dá-se graças ao processo de liofilização onde a água presente nos hidrogéis é sublimada gerando então os poros observados nas imagens. O tamanho dos poros é afetado pela temperatura de congelamento dos hidrogéis e a homogeneidade destes é afetada pela taxa de congelamento^{23,33}. Como todos os hidrogéis foram submetidos as mesmas condições de liofilização a diferença na estrutura destes não pode ser associada a este processo. A partir das imagens com aumento de 150 vezes, presentes na figura 12, é possível observar que dentre as quatro composições de hidrogéis analisadas a que apresentou poros de maior tamanho foi o hidrogel padrão (Figura 12 – a), com diâmetro médio de aproximadamente 250 μm , sendo também a composição que apresentou paredes de aparência mais lisa. O hidrogel com 4% (m/m) de biovidro (Figura 12 – b) apresentou uma região irregular de poros causada pela fratura em nitrogênio líquido, o que ocasionou o colapso de alguns poros. Apesar disto é possível observar uma distribuição irregular de poros, com dimensões menores aos encontrados no hidrogel padrão. Além disso, excluindo a região que apresentou colapso na estrutura do hidrogel e analisando o restante da imagem, obteve-se um diâmetro médio de poros de aproximadamente de 120 μm . Os hidrogéis com 8% (m/m) e 12% (m/m) de biovidro (Figura 12 – c e d, respectivamente) apresentaram paredes de maior espessura que os demais hidrogéis, sendo que este aspecto pode ter sido causado por uma aglomeração de partículas de biovidro nas paredes do hidrogel. Além disso, as paredes destes hidrogéis apresentaram aspecto mais áspero quando comparados ao hidrogel padrão sem adição de biovidro. Para o hidrogel com 8% (m/m) de biovidro foi observado poros com diâmetro médio de 160 μm , ignorando-se o macroporo que possuía diâmetro de aproximadamente 1 mm presente na estrutura. O hidrogel com 12% (m/m) de biovidro apresentou poros com diâmetro médio de 200 μm . De acordo com Levésque *et al* e Peter *et al*³⁴, o tamanho de poros ideal para *scaffolds* de aplicação na engenharia tecidual varia entre 100 - 300 μm , sendo estes poros importantes na engenharia tecidual óssea por permitirem a migração e proliferação de células de osteoblastos e mesenquimais. Visto isso, a porosidade presente nos hidrogéis está dentro do tamanho ideal para esta função. Levésque *et al* também cita que poros compreendidos entre 0,8 e 3,5 μm são importantes para a difusão de sais e transporte de proteínas nos *scaffolds*.

Figura 13 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 400x dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro.

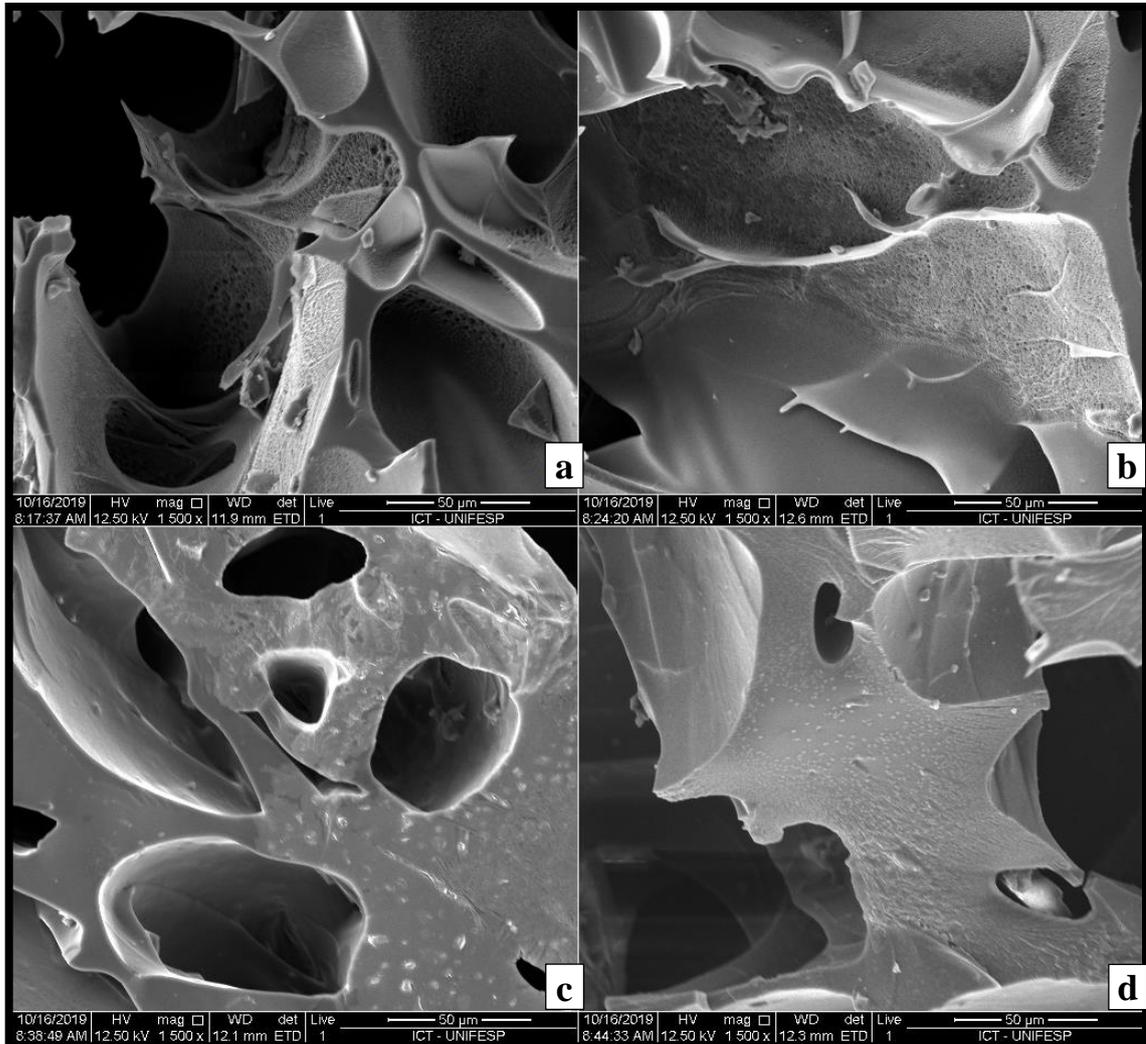


Fonte: Elaboração própria.

A figura 13 mostra as imagens de MEV com aumento de 400 vezes. Para os hidrogéis padrão e contendo 4% (m/m) de biovidro (Figura 13 – a e b, respectivamente) é possível observar uma grande semelhança entre a estrutura de poros e paredes entre as duas composições. Pôde-se observar também que as paredes do interior dos poros apresentaram aspecto diferente da superfície da fratura, exibindo o que pareciam ser poros em escala muito inferior do que os macroporos vistos em imagem com 150 vezes de aumento. Os hidrogéis com 8% (m/m) e 12% (m/m) de biovidro (Figura 13 – c e d, respectivamente) apresentaram também semelhanças entre si sendo possível observar em ambos a presença de partículas na superfície de fratura dos hidrogéis. Foi possível também observar que, em comparação aos hidrogéis

padrão e com 4% (m/m) de biovidro, este hidrogéis não apresentaram o que pareciam ser poros nas paredes do interior dos poros.

Figura 14 – Imagens obtidas a partir de MEV com magnificação de 1500 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4 % (m/m), c) 8 % (m/m) e d) 12 % (m/m) de biovidro.



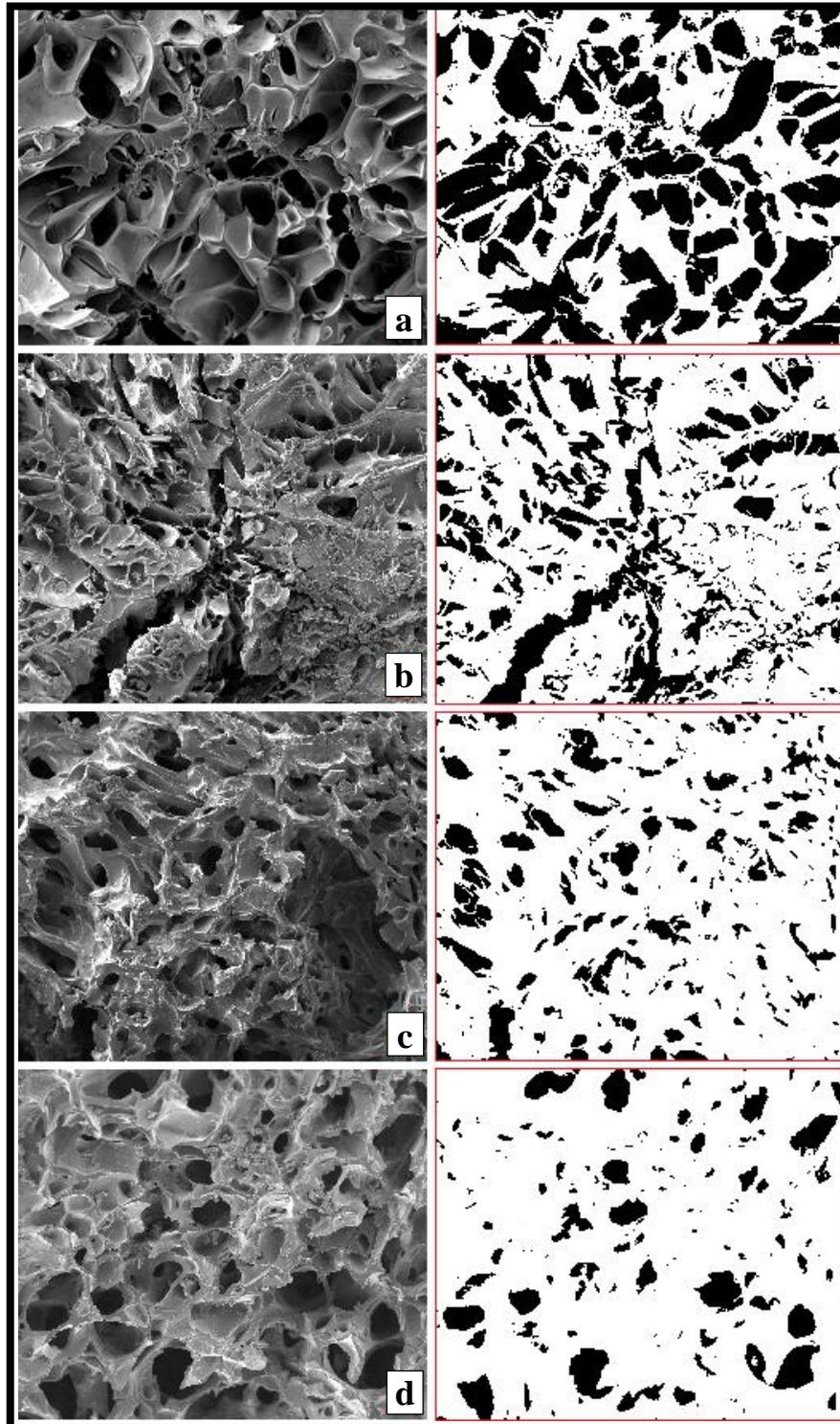
Fonte: Elaboração própria.

A figura 14 exhibe as imagens por MEV com aumento de 1500 vezes. A partir das imagens do hidrogel padrão e com teor de 4% (m/m) (Figura 14 – a e b, respectivamente) pôde-se confirmar a suspeita feita a partir da análise das imagens com aumento de 400 vezes, sendo possível então observar a presença de porosidade nas paredes do interior dos poros para estas composições, com estes sendo de tamanho muito inferior aos observados para menores aumentos. Para a imagem do hidrogel com 4% (m/m) de biovidro esperava-se observar partículas de biovidro na superfície de fratura dos hidrogéis, o que não foi observado. Além

disso, em comparação com o hidrogel padrão foi possível observar uma menor quantidade de poros presentes nas paredes do hidrogel. Para os hidrogéis com 8% (m/m) e 12% (m/m) de biovidro (Figura 14 – c e d, respectivamente) foi observada a ausência de porosidade vista nos hidrogéis padrão e com 4% (m/m) de biovidro. Outro aspecto importante e que foi observado em ambos os hidrogéis é a presença de partículas de biovidro na superfície da fratura dos hidrogéis. Estas partículas estão embebidas na matrix de dextrana e apresentaram uma melhor distribuição no hidrogel com 12% (m/m) de biovidro do que no hidrogel contendo 8% (m/m), nas regiões analisadas. A distribuição de partículas na matrix influencia diretamente nas propriedades mecânicas dos hidrogéis. A ausência de poros nas paredes interiores do hidrogel pode ter sido causada pelas partículas de biovidro, que podem ter se aglomerado e causado a oclusão desses poros, efeito intensificado com o aumento do teor de biovidro. Outra possível causa para a ausência dos poros pode estar ligada à viscosidade da amostra, visto que a adição de partículas de biovidro pode ter elevado a viscosidade da solução.

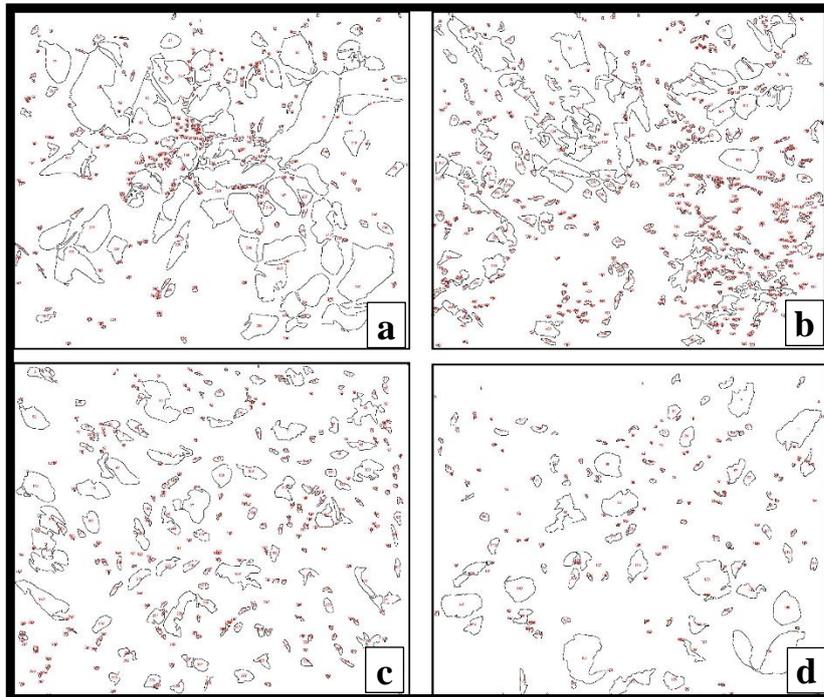
Como forma complementar de análise das imagens do MEV foi utilizado o *software ImageJ*® para se calcular a porosidade dos hidrogéis fazendo uso das imagens com aumento de 150 vezes. As figuras 15 e 16 mostram os procedimentos feitos pelo *software* de reconhecimento e contagem dos poros, respectivamente.

Figura 15 – Imagens de MEV com aumento de 150 vezes dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro, antes (à esquerda) e depois (à direita) do processo de reconhecimento de poros pelo *software ImageJ*®.



Fonte: Elaboração própria.

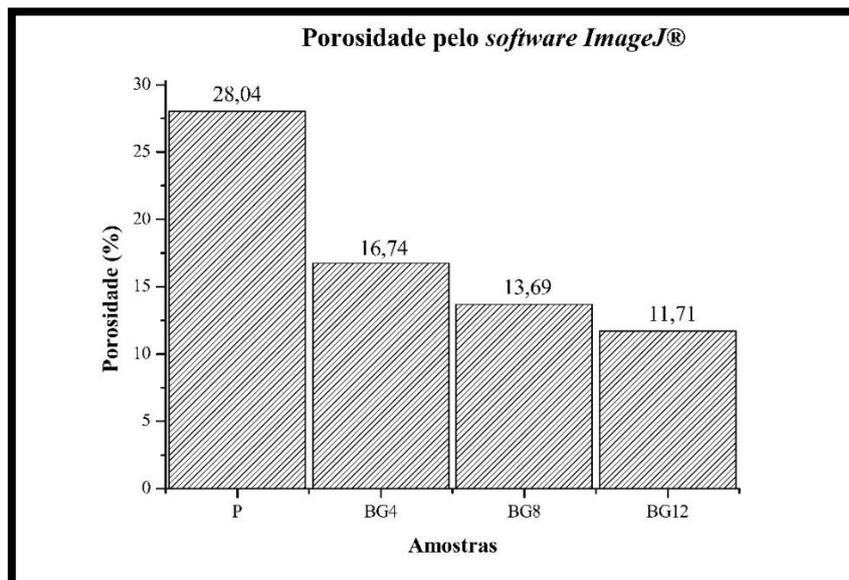
Figura 16 – Contagem e contorno dos poros reconhecido pelo *software ImageJ*® dos hidrogéis de dextrana a) padrão e contendo b) 4% (m/m), c) 8% (m/m) e d) 12% (m/m) de biovidro.



Fonte: Elaboração própria.

A partir da análise dos poros reconhecidos, o software retornou a porosidade dos hidrogéis. Os dados obtidos podem ser vistos na imagem 17.

Figura 17 – Porosidade dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro obtida pelo *software ImageJ*®.

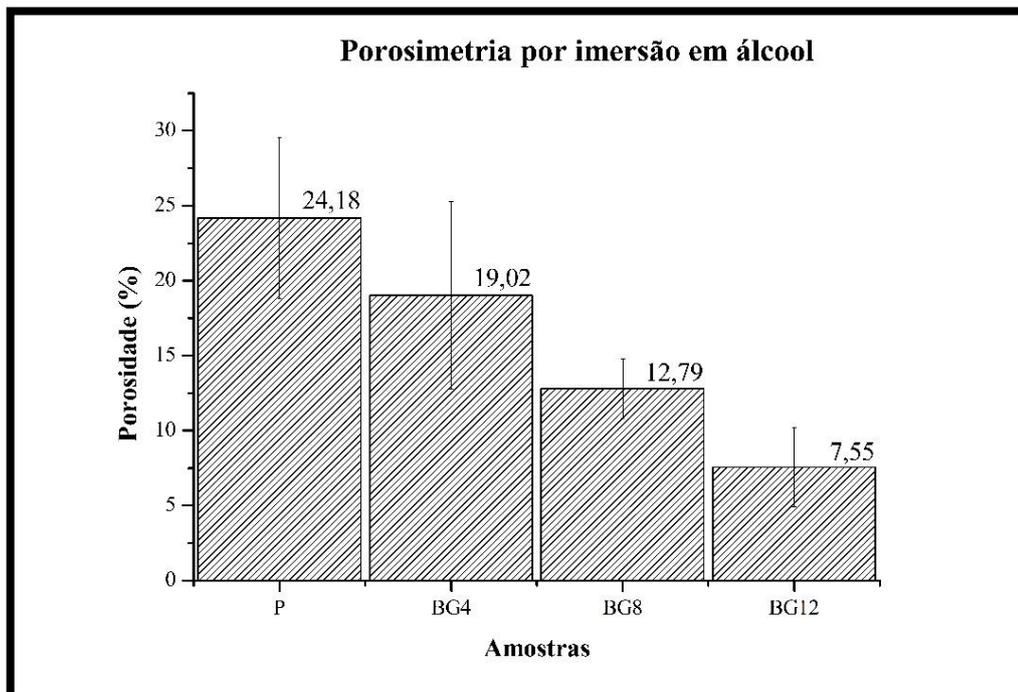


Fonte: Elaboração própria.

Pelos dados de porosidade obtidos pelo *software ImageJ*® foi possível observar que a porosidade dos hidrogéis decresceu com o aumento do teor de biovidro em sua composição. Tal comportamento pode ter sido causado também pela oclusão dos poros presentes nas paredes dos hidrogéis, como já citado.

Outro método utilizado para calcular a porosidade dos hidrogéis foi a porosimetria por imersão em álcool etílico, que tem como base o método de determinação da densidade de sólidos utilizando o princípio de Arquimedes. Os dados obtidos pelo ensaio estão dispostos em um gráfico de barras na figura 18.

Figura 18 – Porosidade dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro calculada pelo ensaio de porosimetria por imersão em álcool.



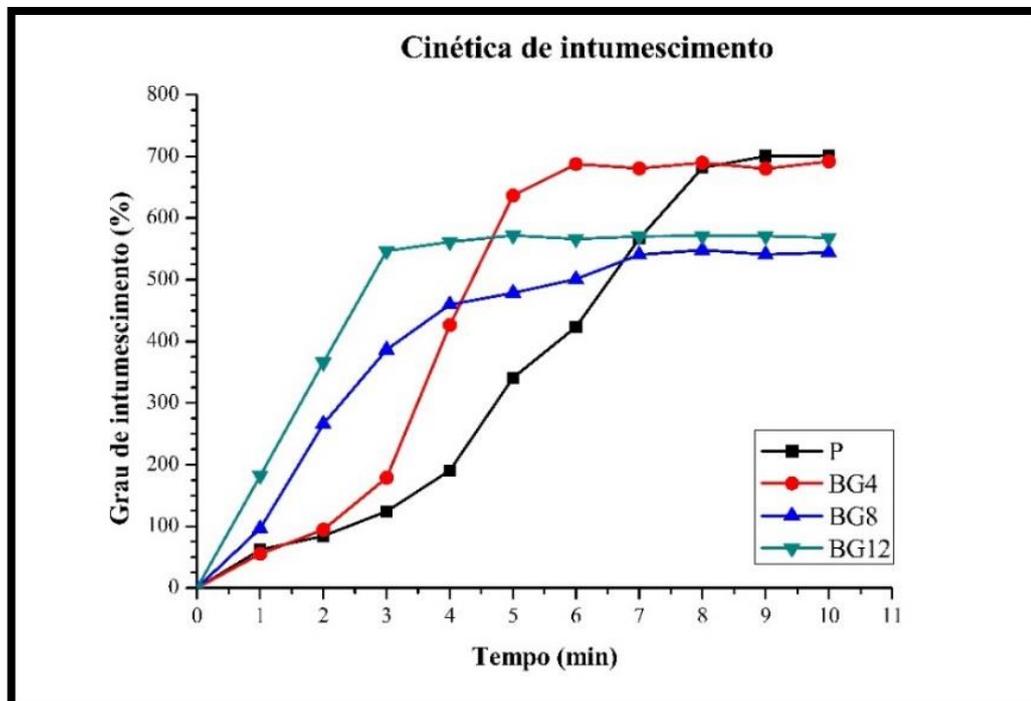
Fonte: Elaboração própria.

O comportamento observado dos dados obtidos pela porosimetria por imersão em álcool assemelha-se aos encontrados pelo *ImageJ*®, ou seja, com o aumento do teor de biovidro a porosidade dos hidrogéis decresceu. Vale ressaltar que apesar dos valores encontrados por este método e pelo *ImageJ*® apresentarem diferenças entre si, esta análise apresenta a tendência real da porosidade com o aumento do teor de biovidro, sendo que as diferenças observadas podem ter sido causadas pelo reconhecimento errado por parte do *software* dos poros presentes na superfície de fratura dos hidrogéis, o que leva ao erro no cálculo da porosidade.

5.3 Cinética e grau de intumescimento

A cinética e o grau de intumescimento, ou seja, a capacidade dos hidrogéis em absorver e reter água ou fluidos corporais em sua estrutura reticulada foram calculadas para todas as composições de hidrogel de dextrana/biovidro. Os resultados obtidos estão dispostos em gráficos nas figuras 19 e 20.

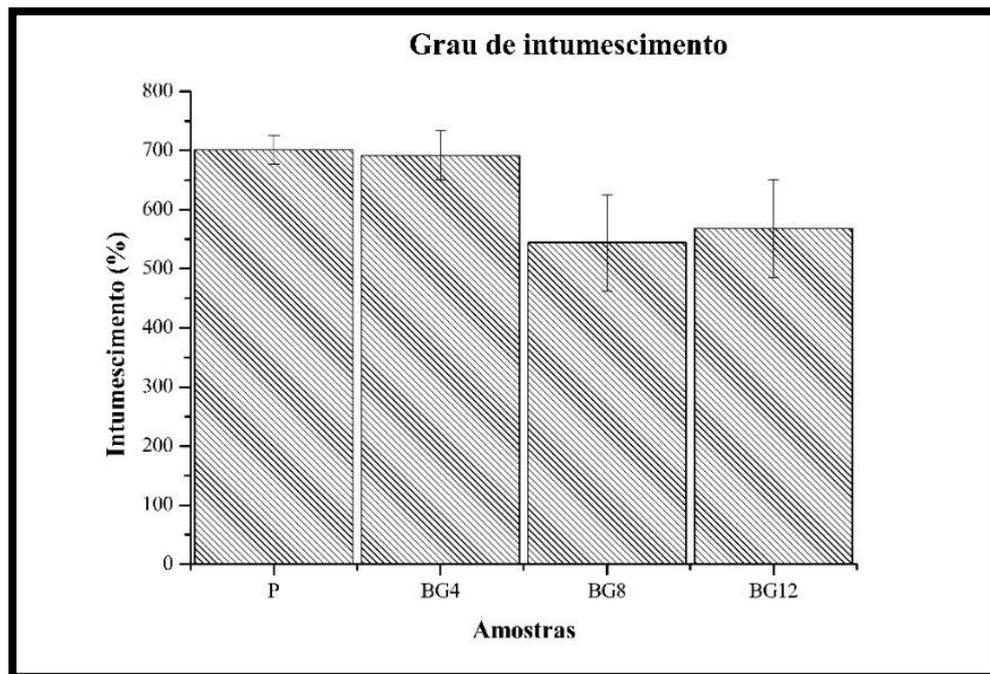
Figura 19 – Cinética de intumescimento dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro, em solução tampão fosfato-salino (PBS), de p.H 7,4.



Fonte: Elaboração própria.

Vale ressaltar que as barras de erros da figura 19 foram omitidas para uma melhor visualização dos resultados.

Figura 20 – Grau máximo de intumescimento dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro.



Fonte: Elaboração própria.

Analisando o gráfico de cinética de intumescimento da figura 19 foi possível observar que em poucos minutos todos os hidrogéis de dextrana produzidos atingiram um patamar de intumescimento, sendo que este patamar é atingido mais rapidamente de acordo com o aumento do teor de biovidro adicionado aos hidrogéis. No caso do hidrogel de dextrana padrão o intumescimento se torna constante entre 8 e 9 minutos. Para o hidrogel BG4 esse patamar é atingido em 7 minutos. O hidrogel BG8 apresentou patamar entre 6 e 7 minutos. O hidrogel que apresentou a cinética de intumescimento mais veloz foi o BG12, atingindo o patamar a partir de 4 minutos.

A partir do gráfico 20 observou-se que o hidrogel padrão de dextrana foi o que apresentou maior grau de intumescimento, aproximadamente 700%. O hidrogel contendo 4% (m/m) de biovidro apresentou grau de intumescimento de aproximadamente 690%, muito próximo ao observado no hidrogel padrão. Com a adição de 8% (m/m) de biovidro no hidrogel de dextrana o grau de intumescimento caiu para aproximadamente 545%. Por último, o hidrogel contendo 12% (m/m) de biovidro apresentou grau de intumescimento de aproximadamente 570%, ligeiramente superior ao observado para o hidrogel com 8% (m/m) de biovidro. Vale ressaltar que os resultados do grau máximo de intumescimento entre os hidrogéis padrão e com

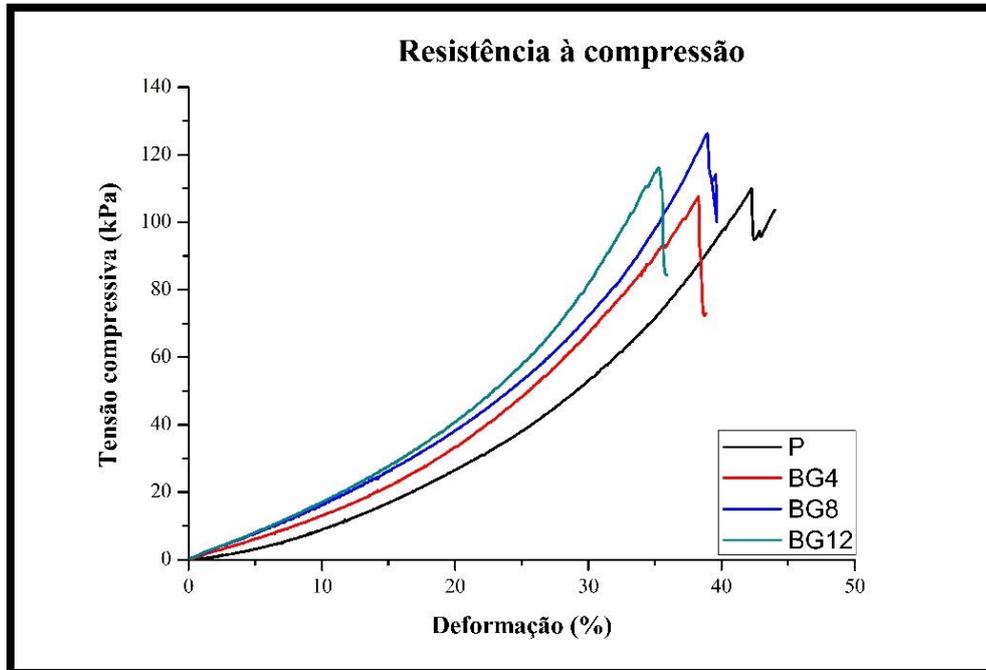
4% (m/m) de biovidro, e entre os hidrogéis com 8% (m/m) e 12% (m/m) de biovidro não apresentaram variação significativa entre si.

Com o aumento do teor de biovidro os hidrogéis apresentaram cinética de intumescimento mais veloz, porém com um menor grau de intumescimento. Segundo Nikpour *et al*, este comportamento pode ser atribuído pela interação física entre as partículas de biovidro e a dextrana. Íons g fracamente ligados na estrutura da sílica das partículas de biovidro podem ser liberados quando misturados sob agitação à solução de dextrana. Estes íons podem atuar como um agente de reticulação, causando interação entre os grupos hidroxilas presentes na estrutura da dextrana, formando então uma rede tridimensional que pode ter causado um aumento no grau de reticulação dos hidrogéis. O aumento do grau de reticulação faz com que o grau de intumescimento dos hidrogéis caísse, o que é observado para a adição de 8% (m/m) de biovidro. Com a adição de 12% (m/m) de biovidro observou-se que houve um ligeiro aumento no grau de intumescimento. Segundo Nikpour *et al* e Livney *et al*³⁵ esse comportamento pode ser explicado pois para maiores concentrações as partículas de biovidro podem formar um aglomerado, causando uma diminuição na sua área superficial e consequentemente menor interação física com as partículas de dextrana, o que resulta numa rede tridimensional mais fraca, sendo capaz então de absorver mais água na sua estrutura. Sendo assim, para teores acima de 12% (m/m) de biovidro espera-se que o grau de intumescimento dos hidrogéis de dextrana continue a crescer.

5.4 Caracterização mecânica dos hidrogéis de dextrana

A partir do ensaio de resistência à compressão dos hidrogéis foi possível observar o comportamento mecânico para cada uma das composições analisadas. A figura 21 apresenta a curva tensão compressiva x deformação para os diferentes hidrogéis de dextrana.

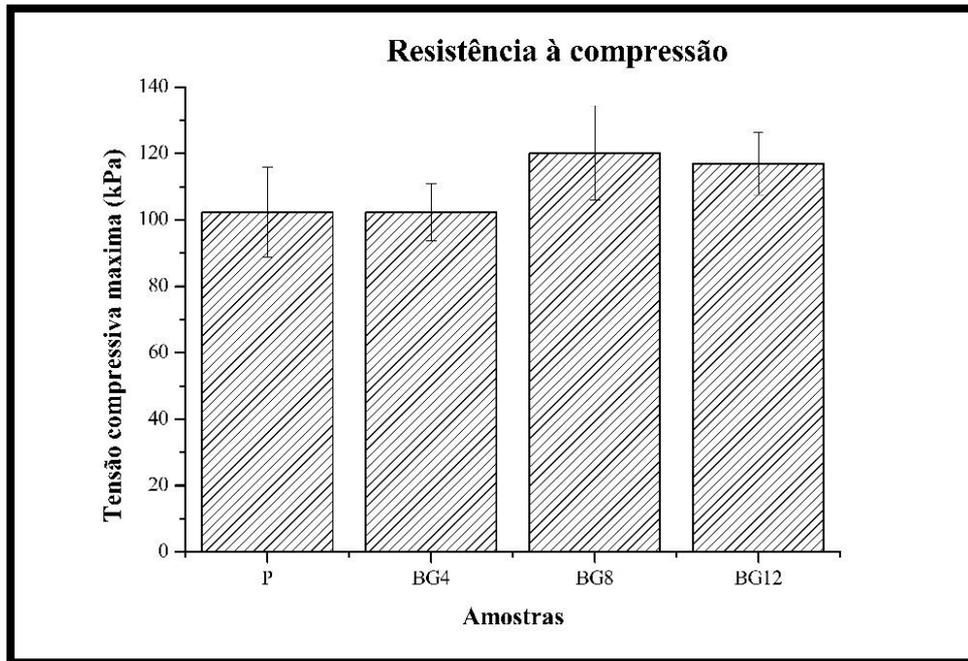
Figura 21 – Comportamento das diferentes composições de hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro submetidos ao ensaio de resistência à compressão.



Fonte: Elaboração própria.

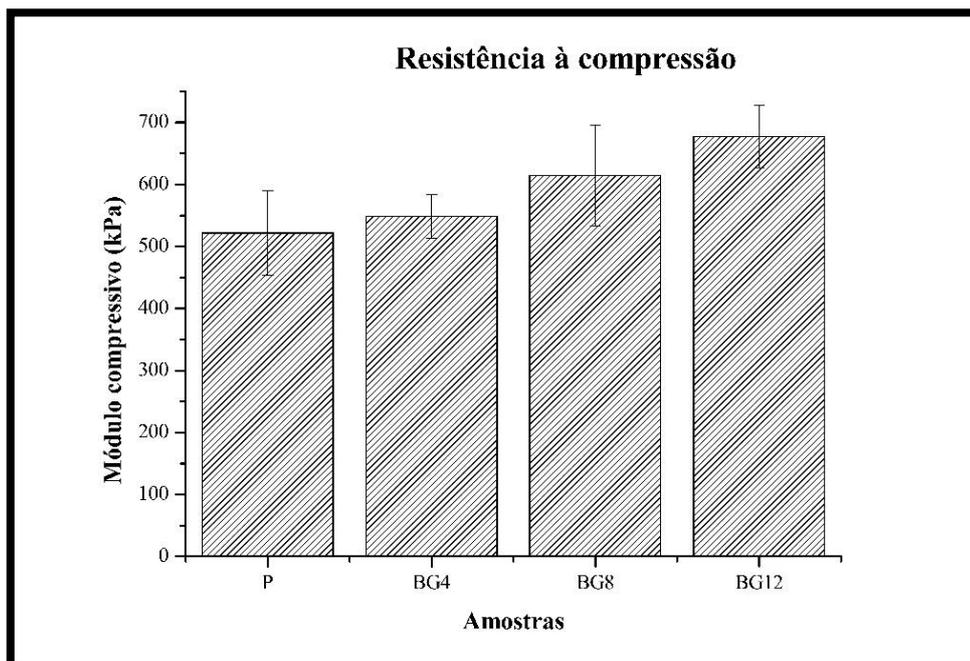
A figura 21 mostra o resultado do ensaio de resistência à compressão, representado por curvas que possuem comportamento semelhante à média dos dados obtidos. O hidrogel que demonstrou a maior deformação foi o padrão. Com o aumento do teor de biovidro nas composições é possível observar uma diminuição na deformação dos hidrogéis, comportamento já esperado devido ao caráter rígido e sem deformação do biovidro. Além disso, é possível observar também que com o aumento do teor de biovidro aumentou-se a inclinação das curvas, estando esta relacionada ao módulo de compressão do material.

Figura 22 – Tensão compressiva máxima obtida pelo ensaio de resistência à compressão dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 – Módulo compressivo dos hidrogéis de dextrana padrão (P) e contendo 4% (m/m) (BG4), 8% (m/m) (BG8) e 12% (m/m) (BG12) de biovidro, obtidos a partir do ensaio de resistência à compressão.



Fonte: Elaboração própria.

A partir das imagens 22 e 23 foi possível constatar que a adição de 4% (m/m) de biovidro nos hidrogéis de dextrana não impactou no valor de tensão compressiva máxima, afetando levemente o módulo compressivo do material, que foi ligeiramente superior ao hidrogel padrão. Para a adição de 8% (m/m) observou-se um aumento tanto no valor da tensão máxima quanto do módulo compressivo. Para o teor de 12% (m/m) foi observado que a tensão máxima decresceu levemente em comparação ao teor de 8% (m/m) de biovidro, porém seu módulo elástico foi o maior encontrado dentre todos os hidrogéis. Assim como a introdução de partículas de biovidro afetou o grau de intumescimento dos hidrogéis, também afetou no comportamento mecânico destes. Com a adição das partículas de biovidro, a interação dos íons Ca^{2+} do biovidro com os grupos hidroxila presentes na dextrana e a formação de uma provável rede tridimensional, o grau de reticulação dos hidrogéis pode ter aumentado, elevando então suas propriedades mecânicas, mesmo mecanismo que ocasionou a diminuição do grau de intumescimento. A leve queda de tensão máxima observada para os hidrogéis com 12% (m/m) pode ter sido causada por uma aglomeração das partículas de biovidro, que estão em maior teor nesta composição. Além disso, outros fatores como tamanho, formato, distribuição das partículas na matrix e a interface entre o biovidro e a dextrana afetam o comportamento mecânico dos hidrogéis. De acordo com Nikour *et al* e Johnson e Herschler³⁶ apesar da introdução de biovidro ter melhorado as propriedades mecânicas dos hidrogéis de dextrana, os compósitos preparados apresentam módulo e tensão compressiva máxima muito inferiores aos encontrados para o osso natural, que variam aproximadamente entre 14 - 35 GPa e 167 – 213 MPa³⁷, respectivamente. Sendo assim, não são capazes de serem utilizados para aplicações onde estarão submetidos à elevadas cargas, apresentando então possível aplicação em regiões sob baixa carga, como para o tratamento de alguns defeitos maxilofaciais e orais³⁸.

6. Conclusões

A partir dos ensaios realizados foi possível observar a influência da adição de diferentes teores do biovidro 45S5 nos hidrogéis de dextrana. As propriedades morfológicas dos hidrogéis se modificaram com a adição das partículas de biovidro, como visto inicialmente pela diminuição do tamanho de poro para o teor de 4% (m/m), seguido de dois aumentos consecutivos para os teores de 8% (m/m) e 12% (m/m), sendo que o tamanho dos poros para todas as composições se encontra dentro da faixa de 100 – 300 μm , descrito na literatura como ideal para o uso na engenharia tecidual óssea. Além disso foi possível observar o aspecto das paredes dos hidrogéis, sendo que para o padrão e com 4% (m/m) de biovidro eram mais finas e

possuíam poros de tamanho muito inferior aos macroporos da estrutura geral, porém com o aumento do teor de biovidro essas paredes se tornaram mais espessas e a sua porosidade diminuiu intensamente. Esse comportamento afetou principalmente na porosidade geral dos hidrogéis, que apresentou também queda de acordo com o aumento do teor de biovidro nas composições.

A cinética de intumescimento dos hidrogéis até a sua estabilização também foi afetada pela introdução dessas partículas visto que com o aumento do teor de biovidro aumentou-se a taxa de intumescimento dos hidrogéis. Todavia, o grau de intumescimento apresentou pouca alteração para o teor de 4% (m/m), caindo de aproximadamente 700% no hidrogel padrão para 690%. Para o teor de 8% (m/m) houve uma queda significativa, chegando a aproximadamente 545%, comportamento que pode ser devido a interação dos íons Ca^{2+} presentes nas partículas de biovidro com os grupos hidroxila da dextrana, resultando num maior grau de reticulação e menor intumescimento. Para o teor de 12% (m/m) observou-se um leve aumento, chegando a 570%, podendo ser resultado da aglomeração das partículas de biovidro e diminuição da sua área superficial, o que reduz sua interação com a dextrana e resulta num menor grau de reticulação, sendo capaz então de reter uma maior quantidade de fluidos.

O comportamento mecânico dos hidrogéis também foi afetado com a adição das partículas de biovidro. A tensão compressiva máxima obtidos pelos hidrogéis não foi afetada significativamente com a adição de 4% (m/m) de biovidro, apresentando aumento somente para os teores de 8% (m/m) e 12% (m/m), os quais ficaram muito próximos entre si, o que pode ter sido causado também pela aglomeração das partículas de biovidro e menor interface com a matrix. O módulo elástico por outro lado apresentou comportamento crescente de acordo com o aumento do teor de biovidro adicionado aos hidrogéis.

O estudo da adição de maiores teores de biovidro nos hidrogéis de dextrana faz-se de grande interesse para se observar o comportamento destes hidrogéis. Espera-se também utilizar as composições que obtiverem as melhores propriedades de intumescimento e de porosidade para realização do ensaio de biomineralização *in vitro*, que é de grande importância para o estudo da interação destes hidrogéis com partículas de biovidro com o organismo humano e tecido ósseo, possibilitando sua utilização na engenharia tecidual óssea.

7. Referências

- [1] HOLZAPFEL, B.M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2012. DOI:10.1016/j.addr.2012.07.009.
- [2] PARK, J.B., BRONZINO, J.D. Biomaterials: Principles and Applications. Boca Raton: CRC, 2002.
- [3] PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, Â.M. Biomaterial: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>>. Acesso em: 01 mar. 2019.
- [4] RATNER, B. D. et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 2. ed. Academic Press: Oxford, 2013.
- [5] Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2024. **Markets and Markets**. Disponível em: <<https://bit.ly/2UnXXXo>>. Acesso em: 24 set. 2019.
- [6] OLIVEIRA, R.L.M.S. Otimização da injetabilidade de cimento de fosfato de cálcio. 2018. 58 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais). **Universidade Federal de São Paulo**, São José dos Campos.
- [7] KUTZ, M.; HE, W.; BENSON, R. Polymeric Biomaterials. **Applied Plastics Engineering Handbook, Processing, Materials and Applications, 2nd Edition**, v. 1, p. 145, 2016. Disponível em < <https://goo.gl/m8oMWd>>. Acesso em: 02 mar. 2019.
- [8] CHEN, Y. et al. Review of Polyhydroxyalkanoates Materials and other Biopolymers for Medical Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.15, n. 2, p. 105-121, 2017. DOI: 10.2174/1570193X146661707211503036
- [9] RABELO, R.; FERNANDES, M.; FANGUEIRO, R. Biopolymers in Medical Implants: A

Brief Review. **Procedia Engineering**, v. 200, p. 236-243, 2017. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.07.034

[10] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>>. Acesso em: 03 mar. 2019.

[11] CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>>. Acesso em: 03 mar. 2019.

[12] KRSKO, P. et al. Length-scale mediated adhesion and directed growth of neural cells by surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 721-729, 2009. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.011

[13] AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N. M. Methods of synthesis of hydrogels...A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 554–559, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>>. Acesso em: 05 mar. 2019

[14] EL-SHERBINY, I.M.; YACOUB, M.H. Hydrogel *scaffolds* for tissue engineering: Progress and challenges. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 44, Abril 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>>. Acesso em: 05 mar. 2019.

[15] HEINZE et al. Funcional polymers based on dextran. **Advances in Polymer Science**, v. 205, n. 1, p. 199-291, 2006. DOI: 10.1007/12_100

[16] CAMPOS, F.S. Desenvolvimento de hidrogéis de dextrano contendo praziquantel. 2009, 70f. Dissertação (Mestrado). **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

[17] DE CARVALHO, C.H.C. Desenvolvimento de uma metodologia para produção de hidrogéis de dextrana utilizando o agente reticulante N, N' – metilenobisacrilamida. 2018. 49 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais). **Universidade Federal de São Paulo**,

São José dos Campos.

[18] LÉVESQUE, S. G.; LIM, R. M.; SHOICHET, M. S. Macroporous interconnected dextran *scaffolds* of controlled porosity for tissue-engineering applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7436–7446, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.054

[19] IMREN, D.; GUMUSDERELIOGLU, M.; GÜNER, A. Synthesis and characterization of dextran hydrogels prepared with chlor- And nitrogen-containing crosslinkers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 5, p. 4213–4221, 2006. DOI: 10.1002/app.24670

[20] SUN, G. et al. Dextran hydrogel *scaffolds* enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 20976–20981, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1115973108/-/DCSupplemental.

[21] FRICAIN, J. et al. A nano-hydroxyapatite - Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 34, n. 12, p. 2947-2959, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.049>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

[22] LIU, Y.; CHAN-PARK, M. Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 196-207, 2009. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.041

[23] NIKPOUR, P. et al. Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite *scaffolds* for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 281-294, September 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.083>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

[24] CHAN, C. et al. Evaluation of bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 1, p. 73-77, 2002. DOI:10.1054/ijom.2001.0143.

- [25] KAUR, G. et al. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research – Part A**, v. 102, n. 1, p. 254-274, 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.34690
- [25] LI, W. et al. 45S5 bioactive glass-based *scaffolds* coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering. **RSC Advances**, v. 4, n. 99, p. 56156-56164, 2014. DOI: 10.1039/c4ra07740g.
- [26] MAÇON, L.B.A. et al. A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 1-10, 2015. DOI: 10.1007/s10856-015-5403-9
- [27] HENCH, L.L.; ROKI, N.; FENN, M.B. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. **Journal of Molecular Structure**, v. 1073, n. C, p. 24-30, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.066>>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- [28] JONES, J.R. et al. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 4, n. 7, p. 423-434, 2016. DOI: 10.1111/ijag.12252.
- [29] KILLION, J.A. et al. Hydrogel/bioactive glass composites for bone regeneration applications: Synthesis and characterisation. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 7, p. 4203-4212, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.06.013>>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- [30] LIANG, S. et al. The mechanical characteristics and in vitro biocompatibility of poly(glycerol sebacate)-Bioglass® elastomeric composites. **Biomaterials**, v. 31, p. 8516-8529, 2010. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.07.105
- [31] SARKER, B. et al. Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: A review. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 2, p. 176-194, 2015. DOI: 10.1002/adhm.201400302

- [32] ZENG, Q. et al. Self-Healing Elastin-Bioglass Hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 8, p. 2619-2625, 2016. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00621.
- [33] ANGULO, D. E. L., SOBRAL, P. J.d. A. The effect of processing parameters and solid concentration on the microstructure and pore architecture of gelatin-chitosan *scaffolds* produced by freeze-drying. **Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 839–845, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0793>> Acesso em: 01 nov. 2019.
- [34] PETER, M. et al. Nanocomposite *scaffolds* of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 284–289, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.001>> Acesso em: 02 nov. 2019.
- [35] LIVNEY, Y. D. et al. Swelling of dextran gel and osmotic pressure of soluble dextran in the presence of salts. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 39, n. 22, p. 2740–2750, 2001. DOI: 10.1002/polb.10038
- [36] JOHNSON, A. J. W., HERSCHLER, B. A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 16–30, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.012
- [37] CAEIRO, J.R., GONZÁLEZ, P., GUEDE, D. Biomechanics and bone (& II): Trials in different hierarchical levels of bone and alternative tools for the determination of bone strength. **Rev Osteoporos Metab Miner**, v. 5. n. 2, p. 99-108, 2013. Disponível em: <shorturl.at/mNORY> Acesso em: 03 nov. 2019.
- [38] BASHA, R. Y., DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering**, v. C, n. 57, p. 452–463, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>> Acesso em: 03 nov. 2019.