

ESCOLA POLITÉCNICA PUCRS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

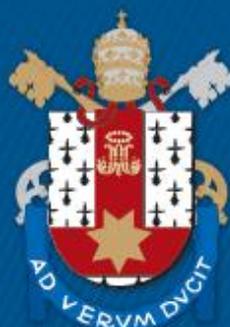
FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS

**PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS DE POLIURETANO A PARTIR DE TÉCNICAS DE
LIXIVIAÇÃO E CO₂ SUPERCRÍTICO**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

D722p dos Santos, Fabiana Gonçalves

Preparação de scaffolds de poliuretano a partir de técnicas de lixiviação e CO₂ supercrítico / Fabiana Gonçalves dos Santos . – 2019.

111 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Ligabue.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Einloft.

1. Biopolímero. 2. Engenharia de tecidos. 3. Estrutura tridimensional. I. Ligabue, Rosane. II. Einloft, Sandra. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363



**PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS DE POLIURETANO A PARTIR DE
TÉCNICAS DE LIXIVIAÇÃO E CO₂ SUPERCRÍTICO**

FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS

QUÍMICA INDUSTRIAL

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2019



PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS DE POLIURETANO A PARTIR DE TÉCNICAS DE LIXIVIAÇÃO E CO₂ SUPERCRÍTICO

FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS

QUÍMICA INDUSTRIAL

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). Rosane Ligabue

CO-ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). Sandra Einloft

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Agosto, 2019**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS DE POLIURETANO A PARTIR DE TÉCNICAS DE LIXIVIAÇÃO E CO₂ SUPERCRÍTICO

CANDIDATA: FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

**DRA. VANUSCA DALOSTO JAHNO - DO PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
MATERIAIS - UNIVERSIDADE FEEVALE**

DRA. FERNANDA BUENO MORRONE - ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - PUCRS

DRA. JEANE ESTELA AYRES DE LIMA - PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo completo publicado em periódico:

FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS, WESLEY FORMENTIN MONTEIRO, FERNANDO MENDONÇA DIZ, PATRÍCIA MORGADO, CHRISTIAN VIEZZER, SANDRA EINLOFT, ANA AGUIAR-RICARDO, ROSANE LIGABUE. Development of Porous Polyurethane Membranes by Green Technicals for Tissue Engineering Applications. J. Membr. of Science. (em preparação).

Trabalhos completos/resumos publicados em anais de congresso:

FABIANA GONÇALVES DOS SANTOS; JULIUS FEITOSA MAASS; LUISA ALBAN; FERNANDO MENDONÇA DIZ; WESLEY FORMENTIN MONTEIRO; GABRIELA M. MIRANDA; ANGÉLICA REGINA CAPPELLARI; FERNANDA BUENO MORRONE; ROSANE A. LIGABUE. Preparação de membranas a partir blendas de poliuretano- quitosana por lixiviação e eletrofição. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves, CBPOL.

ALBAN, L.; MIRANDA, G.M.; DOS SANTOS, F.G.; DE SOUZA, G.L.; DE FRAGA, F.S.; DE LIMA, J.E.A.; LIGABUE, R.A. Estudo de liberação controlada de Dexametasona incorporada em membranas de PU-Quitosana. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2018, Foz do Iguaçu, 23 CBECIMAT.

FABIANA G. DOS SANTOS; PATRÍCIA I. MORGADO; CLARINDA I. S. COSTA; VASCO D. B. BONIFÁCIO; SANDRA EINLOFT; ANA AGUIAR-RICARDO; ROSANE LIGABUE. Polyurethane porous *scaffolds* obtained by leaching and scCO₂ techniques. In: 2nd EuCheMS Congress on green and sustainable chemistry, 2015, Lisboa, 2nd EuGSC, 2015

FABIANA G. DOS SANTOS; RITA F PIRES; KOSTADIN V. PETROV; VASCO D. B. BONIFÁCIO; SANDRA EINLOFT; ANA AGUIAR-RICARDO; ROSANE LIGABUE.

Synthesis of green polyurethanes in scCO₂. In: 2nd EuCheMS Congress on green and sustainable chemistry, 2015, Lisboa, 2nd EuGSC, 2015

Participação em cursos:

Cuidados e manejo de animais de experimentação – módulos teóricos e práticos. 22-24 de setembro 2016 – duração 25h – Centro de modelos Biológicos experimentais da PUCRS - FIJO

Palestra:

Biopolímeros na medicina regenerativa, JAPEP – PUCRS, Junho/2019.

“Por trás de uma vitória há inúmeras dificuldades, esforços sinceros e lutas atroztes. Eis porque vencer é uma alegria. A vitória nos possibilita gerar felicidade para nós próprios e para os outros.”

(Daisaku Ikeda)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe Ana Terezinha pelo apoio, por seu coração e amor incondicional, meu exemplo de força e fé, a minha avó Ceny (*in memoriam*) pelo carinho e incentivos guardados no meu coração, e a todos meus amigos que estiveram ao meu lado durante esse percurso.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Ana Terezinha, minha eterna gratidão, minha fortaleza, que sozinha com todo o seu amor me transmitiu grandiosos valores de vida, e mesmo nas etapas difíceis durante esse percurso, os seus incansáveis incentivos me fortaleceram dia após dia. Agradeço a minha avó Ceny (*in memorian*) que sempre com seu jeito cativante de viver a vida esteve ao meu lado em todos os momentos e até hoje vive em meu coração, ao dindo Vitor Hugo no qual a ajuda para ir a Portugal foi primordial. Agradeço a tia Tânia, uma grande amiga, que com seu sorriso e disposição ofereceu grande apoio a mim e a minha mãe.

Em especial agradeço a orientação da professora Rosane Ligabue, que acreditou no meu potencial, mesmo nos momentos tensos e difíceis me incentivou com carinho e amizade, fostes fundamental para meu fortalecimento e desenvolvimento, a co-orientação da professora Sandra Einloft sempre disposta a me ajudar, me proporcionou apoio e incentivo a todo instante, juntas me acompanham desde a graduação foi através dos seus exemplos e incentivos que foi possível mais essa vitória, Obrigada por tudo!

Sinceros agradecimentos à professora Ana Aguiar-Ricardo, da Universidade Nova de Lisboa, que aceitou me receber com carinho e disposta a me ensinar, pude me desenvolver e aprender muito, agradeço a compreensão e apoio durante todo o trabalho. Agradeço aos professores Vasco Bonifácio do Instituto Técnico de Lisboa e Teresa Casimiro da Universidade Nova de Lisboa pelo carinho e acolhimento.

Agradeço com muito carinho ao PGTEMA, em especial o professor Cassel e a secretária (amigona) Claudinha, que fizeram o impossível para me ajudar a concluir o doutorado, a dedicação de vocês para os alunos é um exemplo para toda instituição que prezam pelo desenvolvimento e vitória dos alunos, muito obrigada!

Agradeço aos professores e funcionários da Faculdade de Química da PUCRS, o pessoal do almoxarifado Luciana, Beto, Marcus, Gil, Paulo, Fernando e Sr. Nelson. A professora Jeane Lima, por aceitar compor a banca de qualificação e

por sempre ao encontrá-la oferece um sorriso, abraço acolhedor, bom humor e amizade, obrigada prof.! Agradeço também o professor Dr. Luiz Carlos Bodanese que com disposição me proporcionou conhecimentos na área da medicina regenerativa.

Estendo os agradecimentos para as professoras Vanusca Jahno e Fernanda Morrone, que prontamente aceitaram participar da banca da minha qualificação, as suas contribuições e ensinamentos foram de grande ajuda para o aprimoramento desse trabalho.

Aos meus colegas e amigos brasileiros e portugueses, sem o companheirismo, incentivos e muito café com vocês não seria possível essa vitória, aos amigos do LOR: Cristiane, Emanuelli, Fernando, Franciele, Gabriela, Guilherme, Juliana, Julius, Leonardo, Luiza, Manuela, Rafael, Renata, Thuani, Wesley, por todo apoio e momentos de descontração e carinho, aos amigos da UNL: Carmem, Catarina, Gosha, Inês, Marta, Patrícia, Raquel, Ritinha, Sara, Sérgio, Telma, Vanessa, às senhoras do almoxarifado e a Maria João da secretaria, pela acolhida que proporcionou formar laços de amizade fortes e verdadeiros, muito obrigada!

Agradeço ao Wagner Menezes por me receber em Lisboa nos primeiros dias e ao Leandro, um grande amigo brasileiro-português, seu apoio e amizade foram fundamentais.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para elaboração desse trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

PRODUÇÃO CIENTÍFICA	6
DEDICATÓRIA	9
AGRADECIMENTOS.....	10
SUMÁRIO	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE QUADROS.....	18
LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	19
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos Específicos	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1. Engenharia de Tecidos	28
3.2. Biopolímeros usados em <i>scaffolds</i>	31
3.3. Técnicas de obtenção de <i>scaffolds</i> biopoliméricos.....	36
3.3.1. Lixiviação.....	37
3.3.2. Inversão de fase assistida com dióxido de carbono supercrítico – scCO ₂	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Materiais.....	49
4.2. Síntese do PU	50
4.3. Preparação dos <i>scaffolds</i> de poliuretano	51
4.3.1. Solução de PU	52
4.3.2. <i>Scaffold</i> preparado por técnica de lixiviação (PU_L).....	52
4.3.3. <i>Scaffold</i> preparado por técnica de inversão de fase assistida por CO ₂ supercrítico (PU_S)	53
4.4. Ensaio e Técnicas de Caracterização.....	55
4.4.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	55

4.4.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	56
4.4.3. Ressonância Magnética Nuclear – ^1H (^1H -RMN)	56
4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
4.4.5. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	57
4.4.6. Ensaio de Tração	57
4.4.7. Ângulo de contato.....	58
4.4.8. Análise Termogravimétrica (TGA)	58
4.4.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	58
4.4.10. Teste de inchamento	59
4.4.11. Teste de degradação hidrolítica	59
4.5. Ensaios <i>in vitro</i>	60
4.5.1. Protocolo de cultura celular.....	60
4.5.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT	61
4.5.3. Ensaio de viabilidade celular por alamar blue	62
4.5.4. Avaliação de vida/morte celular	63
4.5.5. Morfologia celular	64
4.5.6. Análise estatística.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Caracterização do poliuretano sintetizado	66
5.2. Caracterização dos <i>scaffolds</i> de poliuretano (PU).....	70
5.2.1. Morfologia e tamanho de poros.....	70
5.2.2. Propriedades térmicas e mecânicas	79
5.2.3. Inchamento e degradação hidrolítica.....	85
5.2.4. Propriedade de molhabilidade	88
5.2.5. Viabilidade celular.....	90
6. CONCLUSÕES	97
7. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Esquema da Engenharia de Tecidos. Figura adaptada (LANGER e VACANTI, 2016).....29
- Figura 3.2. Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando o crescimento das células de fibroblastos (coloração com calceína) ao longo do tempo (SILVA et al., 2013).30
- Figura 3.3. a) *Scaffolds* de compósitos de PU; b) Imagem obtida por microscopia confocal mostrando a proliferação celular (GONZÁLEZ TORRES, 2019).31
- Figura 3.4. Reação química da síntese do biopolímero poliuretano (GABRIEL et al., 2017a).34
- Figura 3.5. Etapas da técnica de lixiviação para obtenção de *scaffolds* (JANIK; MARZEC, 2015).37
- Figura 3.6. Micrografias dos *scaffolds* obtidos pela técnica de lixiviação, a) PMMA e b) PU, *scaffolds* com estrutura porosa e com interconectividade. (SOLA et al., 2019).38
- Figura 3.7. Imagens de células mesenquimais humanas, com indicador fluorescente DAPI, semeadas nos *scaffolds* de PU e PMMA obtidos por lixiviação (SOLA et al., 2019).....39
- Figura 3.8. Imagens de *scaffold* lixiviado implantado em ratos, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. As flechas indicam a direção da infiltração celular e a linha pontilhada indica a borda do *scaffold*. a) escala 500µm; b) escala 100µm - aproximação da imagem a (XIE et al., 2018).40
- Figura 3.10. Micrografias das partículas de sal: a) cloreto de sódio comercial; b) carbonato de sódio e c) sal marinho (SOLA et al., 2019).42
- Figura 3.11. Diagrama de fases para o CO₂.44
- Figura 3.12. Micrografia do *scaffold* (membrana) produzida pela técnica de inversão de fase assistida por scCO₂, que apresenta morfologia assimétrica (MORGADO et al., 2014).45
- Figura 3.13. Atividade celular medida pelo ensaio de resazurina após 24 e 72h. K+ células mortas; k- células vivas; 10min e 4 min de depressurização de CO₂ respectivamente (MORGADO et al., 2015).46

- Figura 3.14. Micrografias do *scaffold* de PCL por scCO₂ com fibroína da seda e dexametasona, Seta branca indica a aproximação apresentada na figura com seta preta que mostra a rugosidade, o asterisco indica a interconectividade dos poros (GOIMIL et al., 2019).47
- Figura 3.15. Análise histológica dos *scaffold* de PCL com fibroína da seda e dexametasona implantada em osso de rato, em 7 e 14 semanas, respectivamente. OF indica ósseo formação e M indica a matriz polimérica (GOIMIL et al., 2019)47
- Figura 3.16. Micrografia do *scaffold* de PCL/quitosana com BSA impregnado (KRAVANJA et al., 2019) *os números em verdes são referentes aos tamanhos dos poros já descritos no texto.48
- Figura 4.1. Esquema reacional da obtenção do poliuretano.51
- Figura 4.2. Esquema simples das etapas de obtenção do filme denso de PU por evaporação de solvente (método *casting*) (JANIK et al., 2015).....52
- Figura 4.3. Esquema simples das etapas de obtenção de *scaffolds* a partir da técnica de lixiviação (JANIK et al., 2015).....53
- Figura 4.4. a) sistema no interior da célula de alta pressão para formação de *scaffold* por scCO₂; b) Esquema do aparelho de alta pressão: (1) bomba Gilson 305 do pistão; (2) controlador de temperatura; (3) célula de alta pressão; (4) o transdutor de pressão; (5) regulador de pressão de retorno. (CASIMIRO et al., 2005; TEMTEM et al., 2009).54
- Figura 4.5. Viabilidade mitocondrial por MTT – redução sal tetrazólio.61
- Figura 4.6. Viabilidade celular por Alamar Blue – redução resazurina.62
- Figura 4.7. Ensaio de determinação de células vivas/mortas.....63
- Figura 5.2. Espectro de RMN ¹H do poliuretano dissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl₃).69
- Figura 5.3. Micrografias do filme de PU denso e dos *scaffolds* de PU_L (a) parte superior; b) parte inferior.71
- Figura 5.4. Imagens do filme de PU denso e dos *scaffolds* de PU_L (a) parte superior; b) parte inferior; c) transversal) e PU_S (d) parte superior; e) parte inferior; f) transversal).72
- Figura 5.5. Micrografias da parte superior e inferior dos *scaffolds* de PU_L: a) superior 100x e c) 1000x – b) inferior 100x e de PU_S: d) superior 100x e f) 1000x – e) inferior 100x.....73

- Figura 5.6. Micrografias da secção transversal dos *scaffolds* de: PU_L: a) 100x; b) 200x e PU_S: c) 100x; d) 200x..... 75
- Figura 5.7. Distribuição do tamanho dos poros dos *scaffolds* PU_L e PU_S..... 76
- Figura 5.8. Imagens obtidas por AFM dos *scaffolds* PU_L e PU_S. 78
- Figura 5.9. Perfil do comportamento térmico dos *scaffolds*. a) TGA; b) DTG. 80
- Figura 5.10. Propriedades mecânicas dos *scaffolds* PU_L e PU_S em diferentes condições ambientais (seco e úmido com PBS (pH 7.4))..... 82
- Figura 5.11. Ensaios de inchamento e degradação hidrolítica dos *scaffolds* PU_L e PU_S: a) Perfil de inchamento durante 500 h e b) Ampliação das primeiras 8h; c) perfil de perda de massa durante 500 h e d) Ampliação das primeiras 8 h..... 85
- Figura 5.13. Efeito na atividade mitocondrial de fibroblastos nos *scaffolds* a) PU_L e b) PU_S, cultivados por 24, 48 e 72 horas durante ensaio MTT. Os dados foram tratados estatisticamente por ANOVA. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05..... 90
- Figura 5.15. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência do ensaio de avaliação de células mortas e vivas nos *scaffolds* PU_L e PU_S em 24, 48 e 72h, respectivamente. 93
- Figura 5.16. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da morfologia celular (fibroblastos) nos *scaffolds* PU_L e PU_S. As imagens b e d) são aproximações de 20 x. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do poliuretano sintetizado.	66
Tabela 4.2. Faixas de tamanho de poros ideais e respectivos tipos de células ou tecidos.	77
Tabela 5.3. Temperatura inicial (T_i) e final de decomposição (T_f) das 1 ^a e 2 ^a etapas, temperatura de pico (T_{pico}), % de perda de massa e temperatura de transição vítrea (T_g) para os <i>scaffolds</i> e PU denso.	80
Tabela 5.4. Valores de Módulo de Young (MPa), Tensão na ruptura (MPa) e Deformação na ruptura (%) obtidos no ensaio de tração dos <i>scaffolds</i> PU_L e PU_S, em diferentes condições ambientais:	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Propriedades de um suporte (<i>scaffold</i>) em engenharia de tecidos.	32
Quadro 3.2. Técnicas de fabricação de <i>scaffolds</i> biopoliméricos.....	36
Quadro 4.1. Especificações dos reagentes e solventes utilizados.....	50
Quadro 4.2. Especificações dos <i>scaffolds</i> obtidas.....	52
Quadro 4.3. Tratamento, concentrações e linhagem celular utilizadas nos ensaios por MTT.....	61
Quadro 4.4. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios por Alamar Blue.....	63
Quadro 4.5. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios de células vivas/mortas.....	63
Quadro 4.6. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios de morfologia celular.....	64

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

3D	Estrutura Tridimensional
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopia de Força Atômica
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BSA	<i>Protein Bovine Serum Albumin</i> – Proteína Albumina do Soro Bovino
CAD	<i>Computer Aided Design</i> - Desenho Assistido por Computador
CaO	Óxido de Cálcio
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	<i>4,6-Diamidino-2-Phenylindole</i> – 4,6-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroclorato
DBTDL	<i>Dibutyl Tin Dilaurate</i> - Dilaurato de Dibutil Estanho
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	<i>Derivative Thermogravimetry</i> – Termogravimetria derivada
ET	Engenharia de Tecidos
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> - Cromatografia de Permeação em Gel
H ₁₂ MDI	<i>4,4-Methylenedicyclohexyl Diisocyanate</i> – 4,4-Diciclohexilmetileno Diisocianato
HDI	<i>1,6-Hexanethylene Diisocyanate</i> – 1,6-Hexametileno Diisocianato
hFB	<i>Human Fibroblast</i> – Células de Fibroblastos Humano
IPDI	<i>Isophorone Diisocyanate</i> – Diisocianato de Isoforona
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional para Padronização
IV	Espectroscopia no Infravermelho
MDI	<i>Diphenylmethane Diisocyanate</i> – Difenilmetano Diisocianato
MEC	Matriz Extracelular
MEK	<i>Metyletilketone</i> - Metiletilcetona
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M _n	Massa Molar Numérica Média
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> – Células-Tronco Mesenquimais

MTT	<i>Colorimetric Assay of the Tetrazolium Salt</i> – Ensaio de Captação do Corante Tetrazolium (Atividade Metabólica Mitocondrial)
M _w	Massa Molar Ponderal Média
NaCl	Cloreto de Sódio
P- LDLA	<i>Poly (D, L – Lactide Acid)</i> – Poli (L,D Ácido Láctico)
P ₂ O ₅	Pentóxido de Fósforo
PBS	Solução Tampão Fosfato
PC	Policarbonato Diol
PCL	Policaprolactona Diol
PDLA	<i>Poly(D-lactide)</i> - Poli (D-lactideo)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietileno Glicol
PGA	<i>Polyglutamic Acid</i> – Poli (ácido glicólico)
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	<i>Polylactic Acid</i> – Poli (ácido L-láctico)
PLGA	<i>Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)</i> – Poli (Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PU	Poliuretano
PU_L	<i>Scaffold</i> de Poliuretano obtido por Lixiviação
PU_S	<i>Scaffold</i> de Poliuretano obtido por scCO ₂
PVA	<i>Polyvinyl Alcohol</i> – Álcool Polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
SBF	<i>Simulate Body Fluid</i> – Fluido Corporal Simulado
scCO ₂	<i>Supercritical Carbon Dioxide</i> – Dióxido de Carbono Supercrítico
Sn	Estanho
TDI	Tolueno Diisocianato
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> – Análise Termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TMDI	<i>Trimethylhexamethylene Diisocyanate</i> - Trimetilhexametileno Diisocianato
TPU	<i>Thermoplastic Polyurethane</i> – Poliuretano Termoplástico
UATR	<i>Universal Attenuated Total Reflectance</i> - Refletância Total Atenuada Universal
UV	Ultravioleta

RESUMO

SANTOS, FABIANA GONÇALVES DOS. **Preparação de *scaffolds* de poliuretano a partir de técnicas de lixiviação e CO₂ supercrítico.** Porto Alegre. 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

A engenharia de tecidos tem adotado diferentes estratégias que possam mimetizar cada vez mais a regeneração de tecidos em condições *ex-vivo*. Uma das estratégias consiste no desenvolvimento de estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*), que servem como suporte para a fixação de células, permitindo a sua adesão, proliferação e produção de matriz extracelular, o que leva à formação de novo tecido. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a síntese de um biopoliuretano (PU) a partir de um policarbonato diol (PC) e do 4,4-diciclohexilmetileno diisocianato (H₁₂MDI), e sua utilização na preparação de *scaffolds* utilizando as técnicas de lixiviação (*scaffold* PU_L) e de inversão de fase em meio de CO₂ supercrítico (*scaffold* PU_S) (scCO₂). O PU sintetizado é amorfo e apresentou massa molar ponderal média de 200000 g/mol, massa molar numérica média de 115000 g/mol e índice de polidispersividade de 1.9. Os *scaffolds* preparados por ambas técnicas apresentaram caráter hidrofílico, superfícies com rugosidade e porosidade e poros interconectados internamente. Para o PU_L a distribuição do tamanho de poros foi de 19 - 200 µm com uma dispersão heterogênea e aleatória, enquanto para o PU_S a dispersão do tamanho de poros ficou entre 9 - 150 µm apresentando duas regiões distintas de tamanhos de poros (uma com tamanho médio de 9 - 48 µm e outra com tamanho médio de 101 - 151 µm). O comportamento mecânico de ambos *scaffolds*, em diferentes condições (secos e úmidos), mostrou-se típico de um material elastomérico. Os *scaffolds* não apresentaram citotoxicidade em ensaios *in vitro* com células fibroblásticas e, as células apresentaram uma atividade mitocondrial maior que 70%. Os resultados dos ensaios *in vitro*, juntamente com as propriedades mecânicas, sugerem que os *scaffolds* apresentam potencial para aplicações em engenharia de tecidos, em situações preferencialmente *ex-vivo*, como suportes temporários de células.

Palavras-Chaves: Biopolímero, Engenharia de tecidos, Estrutura tridimensional

ABSTRACT

SANTOS, FABIANA GONÇALVES DOS. **Preparation of polyurethane scaffolds from leaching and supercritical CO₂ techniques.** Porto Alegre. 2019. Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Tissue engineering has adopted different strategies that can increasingly mimic tissue regeneration in *ex vivo conditions*. One of the main trends is the development of three-dimensional porous structures (*scaffolds*), that serve as support for cell attachment, allowing their adhesion, proliferation and extracellular matrix production, which leads to the formation of new tissue. This work aimed to synthesize biopolyurethane (PU) from a polycarbonate diol (PC) and 4,4-dicyclohexylmethylenediisocyanate (H₁₂MDI), and to evaluate its use in the preparation of scaffolds using leaching techniques (PU_L) and phase inversion in supercritical CO₂ medium (PU_S) (scCO₂). The synthesized PU is amorphous and presented weight average molar mass of 200000 g/mol, numerical average molar mass of 115000 g/mol and polydispersity index of 1.9. The scaffolds prepared by both techniques have hydrophilic character, surfaces with roughness and porosity and internally interconnected pores. For PU_L the pore size distribution was of 19 - 200 μm with a heterogeneous and random dispersion, while for PU_S the pore size dispersion was between 9 - 150 μm presenting two distinct pore size regions (one with size between 9 - 48 μm and one with size between 101 - 151 μm). Both scaffolds under different conditions (dry and wet) showed typical mechanical behavior of an elastomeric material. The scaffold showed no cytotoxicity *in vitro* assay with fibroblastic cells and, the cells presented mitochondrial activity greater than 70%. The results of *in vitro* assays combined with mechanical properties suggest that scaffolding has potential for tissue engineering applications in preferably *ex vivo* situations as temporary cell support.

Key-words: Biopolymer, Three-dimensional Structure, Tissue Engineering

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais têm desempenhado um papel cada vez mais importante para o sucesso de dispositivos biomédicos e no desenvolvimento da engenharia de tecidos (ET), e representam uma grande fração dos produtos utilizados na área de saúde, estimados em cerca de 300 mil nos últimos 10 anos (PIRES et al., 2015). Estudos com biomateriais em regeneração tecidual e seu processo na formação de tecido novo são considerados uma nova fronteira no campo da medicina regenerativa (DAWSON et al., 2019; PIRES et al., 2015). Segundo o site *Global Health Intelligence*, o mercado brasileiro de biomateriais (utilizados em tratamentos cardiovasculares, ortopédicos, urológicos, feridas e em sistemas de liberação de fármacos) registrará crescimento entre 2017 e 2022 alcançando a marca de US\$ 5,1 bilhões em 2022, frente a US\$ 1,8 bilhão em 2016. Esses dados destacam a importância da pesquisa brasileira em novos dispositivos biomédicos (CORPART, 2018).

A engenharia de tecidos, ou medicina regenerativa, é um campo fundamental para o desenvolvimento de suportes funcionais que se assemelham à organização estrutural dos tecidos nativos para melhorar ou substituir as funções biológicas e, evitar desta forma o transplante de órgãos (DAWSON et al., 2019; GHOSAL et al., 2019). Na ET, as células são frequentemente semeadas em estruturas artificiais capazes de suportar a formação de tecido tridimensional (3D). Um suporte ideal, também conhecido como *scaffold*, para aplicações de engenharia de tecidos deve imitar as propriedades mecânicas e funcionais da matriz extracelular (*extracellular matrix* – ECM) dos tecidos a serem regenerados (KHORSHIDI et al., 2016).

Os avanços, até o momento, são promissores, mas permanecem desafiadores pela falta de biomateriais com estrutura e propriedades adequadas para regeneração de tecidos (GHOSAL et al., 2019). Pela perspectiva da ciência e

engenharia de materiais, a construção de novos biomateriais, com naturezas diferentes, tais como, compósitos, polímeros e nanopartículas, representam uma fronteira emergente no campo da engenharia de tecidos (GABRIEL et al., 2017b; KHORSHIDI et al., 2016; TURNBULL et al., 2018).

De modo geral, os *scaffolds* com maior interconexão de poros ordenados e alinhados mostram maior interação celular em comparação aos *scaffolds* sem interconexão (GABRIEL et al., 2017b; KHADEMHOSEINI; LANGER; VACANTI, 2016). Os trabalhos de Chen e colaboradores (2015) com *scaffold* de colágeno e de Wen e colaboradores (2019) com *scaffold* de poliuretano base água, mostraram que os *scaffolds* com poros ordenados e alinhados apresentaram a capacidade de melhorar a interação de células tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* - MSC), em comparação com os *scaffolds* não alinhados e ordenados (CHEN et al., 2015; WEN et al., 2019). Além do desenho geométrico e morfologia, as propriedades dos suportes como elasticidade e hidrofiliçidade também podem influenciar a fixação, proliferação e diferenciação das células nos *scaffolds* (WEN et al., 2019).

Atualmente, vários polímeros têm sido usados na preparação de *scaffolds* para ET, incluindo poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) (LANGER; VACANTI, 2016; SARTORE et al., 2018), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (YUAN et al., 2018), policaprolactona (PCL) (RAJZER et al., 2017) e poliuretano (PU) (GABRIEL et al., 2017a; MARZEC et al., 2017). As principais vantagens dos suportes poliméricos em comparação com outros (cerâmicos ou metálicos) incluem a facilidade de fabricação para produzir estruturas complexas e de formas variadas (partículas, filmes, membranas com tamanhos variados de poros, fios, entre outros), baixo custo e disponibilidade em encontrar polímeros com propriedades físico-químicas desejadas para aplicações específicas na medicina regenerativa (GABRIEL et al., 2017b; PIRES et al., 2015). Dentro deste contexto, os poliuretanos (PU) são de particular interesse devido às propriedades mecânicas, processabilidade, flexibilidade e biocompatibilidade, associados à sua versátil estrutura segmentada (GABRIEL et al., 2017a; MARZEC et al., 2017). O segmento flexível da estrutura do PU pode ser modificado para obter um menor atrito com o

tecido hospedeiro, melhorando a interação do tecido artificial e celular (GABRIEL et al., 2017a).

As propriedades finais dos *scaffolds* não são apenas uma função das características do polímero usado, mas também do processo de fabricação (GABRIEL et al., 2017a). Entre as várias técnicas de obtenção de *scaffolds*, destacam-se a lixiviação e a inversão de fase assistida por dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), pois ambas são capazes de produzir estruturas porosas, utilizando o mínimo de solvente ou livre de solvente, e ainda são técnicas simples e de baixo impacto ambiental (SAVARIS et al., 2019).

A lixiviação é uma técnica considerada simples e amplamente utilizada na obtenção de *scaffolds* (PATEL et al., 2011; SAVARIS et al., 2019), sendo que dentre os biopolímeros os mais explorados em pesquisas recentes são: a) PU revestido com colágeno no estudo da proliferação de células endoteliais da aorta humana (SIN et al., 2010), b) PLA para proliferação de fibroblastos (XIE et al., 2018), c) PU/polimetilmetacrilato (PMMA) que imitam morfologia da medula óssea (SOLA et al., 2019), e d) PU revestido com própolis para cicatrização de feridas (KHODABAKHSHI et al., 2019). A principal característica desses suportes foi a boa interação celular.

O uso da técnica de inversão de fase assistida por scCO₂ é relativamente recente na obtenção de *scaffolds* para aplicação em ET (SAVARIS et al., 2019). Na literatura, são relatados resultados significativos de *scaffolds* obtidos por scCO₂ utilizando biopolímeros, tais como: o PMMA e sua aplicação na liberação de anti-inflamatórios (CARDEA et al., 2014), o PCL e o uso em liberação controlada de fármacos (SALERNO; et al., 2015), o PLA/hidroxiapatita como matriz na regeneração de tecido ósseo (ROUHOLAMIN et al., 2016), o poli(álcool vinílico) (PVA) e quitosana no auxílio de cicatrização de feridas (MORGADO et al., 2017), entre outros. As principais características obtidas por estes suportes são a boa porosidade e morfologia semelhante à matriz extracelular.

Diante da necessidade de desenvolver suportes porosos com propriedades adequadas para aplicação em engenharia de tecidos, por meio de técnicas simples,

de baixo custo e que não apresentem impacto ambiental, encontra-se a motivação do presente trabalho.

O estudo apresentado neste trabalho partiu do objetivo geral de desenvolver suportes em forma de membranas com estruturas tridimensionais (*scaffolds*), a partir de um biopolímero poliuretano segmentado utilizando técnicas de baixo impacto ambiental (lixiviação e scCO₂), e a avaliação das suas propriedades morfológicas, térmicas, mecânicas, citotóxica e de proliferação celular. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas na área de obtenção de *scaffolds* a partir de biopolímeros, no entanto, até o presente momento, não consta na literatura estudos de preparação de *scaffolds* de PU obtidos pelo sistema empregado de scCO₂. Além disso, PU obtidos a partir de policarbonato diol com aplicação em engenharia de tecidos tem sido pouco explorado. A partir desse cenário encontra-se a motivação desse trabalho para a obtenção de novos suportes a partir do mesmo polímero PU, mas com estruturas internas diferentes e com propriedades adequadas para a adesão e proliferação celular (*in vitro* e *ex vivo*).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a preparação de *scaffolds* de poliuretano bioabsorvível na forma de membranas tridimensionais obtidas através de diferentes técnicas para aplicação em engenharia de tecidos.

2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar poliuretanos a partir de diisocianato H₁₂MDI alifático, policarbonato diol, e 1-6 hexanodiol como extensor de cadeia;
- Preparar *scaffolds* em forma de membranas obtidos a partir destes poliuretanos usando duas técnicas diferentes:
 - Inversão de fase assistida por fluido supercrítico de dióxido de carbono (scCO₂),
 - Agente porogênico/ lixiviação;
- Avaliar as propriedades térmicas, mecânicas, estruturais e morfológicas dos *scaffolds*;
- Avaliar a potencialidade dos *scaffolds* na engenharia de tecidos *via* ensaios biológicos *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Engenharia de Tecidos

O corpo humano apresenta incrível capacidade de regeneração, porém limitada quando tecidos ou órgãos danificados podem causar problemas de saúde fatais (SORG, et al., 2017). Quando o reparo natural é impraticável, recorre-se ao transplante de tecidos ou órgãos para restaurar as estruturas e funções dos sistemas biológicos danificados (ZAROOG, et al., 2019).

A engenharia de tecidos (ET) ou medicina regenerativa, conhecida como um campo multidisciplinar procura abordar essa necessidade crítica desenvolvendo tecidos e órgãos a fim de substituir os tecidos danificados (JAMMALAMADAKA e TAPPA, 2018; KHADEMHOSEINI e LANGER, 2016).

Da perspectiva da ciência e engenharia de materiais, a construção de novos biomateriais, tais como, suportes nanoestruturados (ROUHOLAMIN et al., 2016; SUBHAPRADHA et al., 2018), hidrogéis (MAITRA; SHUKLA, 2014; PANDIT; MAZUMDAR; AHMAD, 2019), membranas (GRACIOLI, 2016; MORGADO et al., 2014), micro e nanopartículas (CORREIA et al., 2015; LUO et al., 2015), representam uma fronteira emergente no campo da engenharia de tecidos (GHOSAL, et al., 2019).

Os suportes poliméricos nanoestruturados tridimensionais (3D) conhecidos como *scaffolds*, produzidos essencialmente a partir de biopolímeros, são de interesse na engenharia de tecidos (GHOSAL et al., 2019; SAVARIS et al., 2019). Assim como os biomateriais, os suportes de biomateriais poliméricos também atuam como um molde/matriz para a formação de tecido onde são tipicamente semeados com células e, ocasionalmente, com fatores de crescimento e estímulos mecânicos

ou químicos, para proliferação e diferenciação celular (MARTIN, et al., 2004; O'BRIEN, et al., 2011).

Os *scaffolds* são semeados com células que são cultivadas *in vitro* para sintetizar tecidos que podem então ser implantados num local lesionado, ou são implantados diretamente no local da lesão, utilizando os sistemas do próprio corpo, onde a regeneração de tecidos ou órgãos é induzida *in vivo* (LANGER; VACANTI, 2016; O'BRIEN, 2011). Esta combinação de células, fatores de crescimento e *scaffold* é a base fundamental da engenharia de tecidos como mostra o esquema apresentado na Figura 3.1.

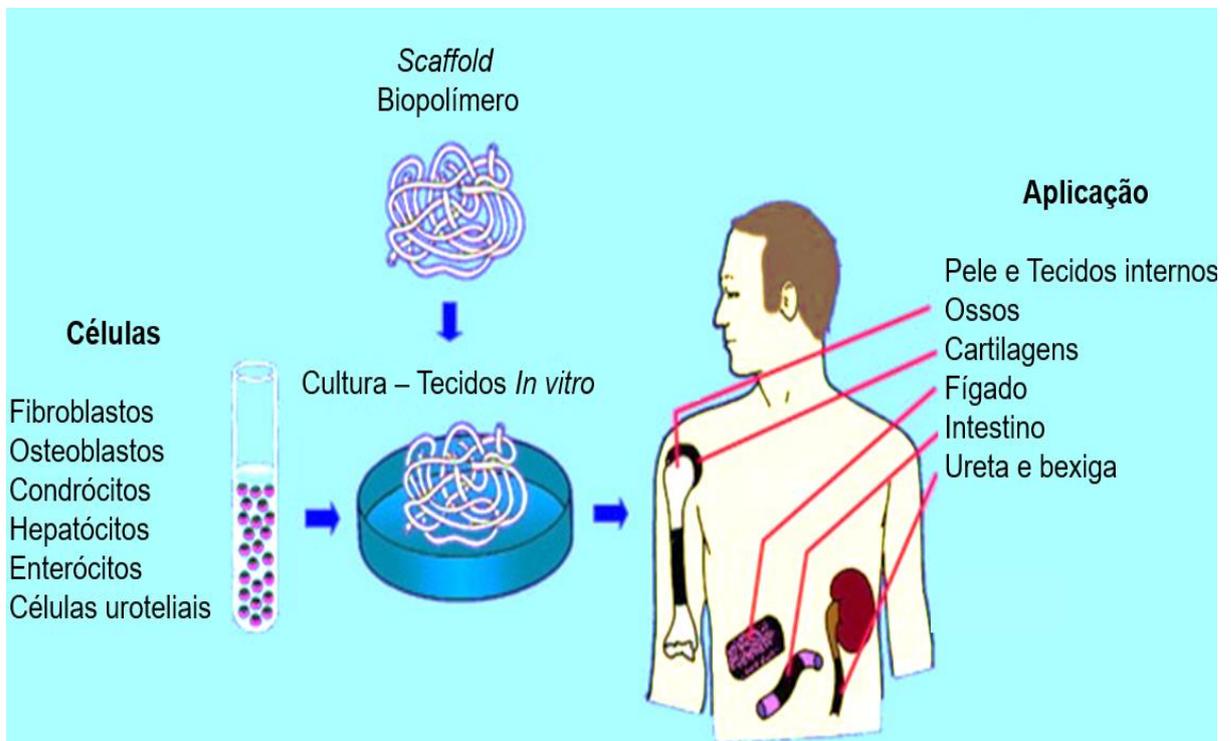


Figura 3.1. Esquema da Engenharia de Tecidos. Figura adaptada (LANGER e VACANTI, 2016).

Um exemplo da interação e proliferação celular nas matrizes poliméricas é relatado por Silva e colaboradores (2013). Como mostra as imagens obtidas por microscopia confocal do ensaio de viabilidade por fluorescência (indicador calseína) (Fig. 3.2), os *scaffolds* à base de *Aloe Vera* e quitosana foram semeados com células de fibroblastos. Entre o 1º e 7º dia, as células distribuíram-se uniformemente na superfície, sendo que no 7º dia as células proliferaram de forma aglomerada e exibiram uma morfologia circular, indicando a permeabilidade dessas células ao

longo das interconexões porosas o que sugere boa adesão e compatibilidade com a matriz porosa (SILVA et al., 2013).

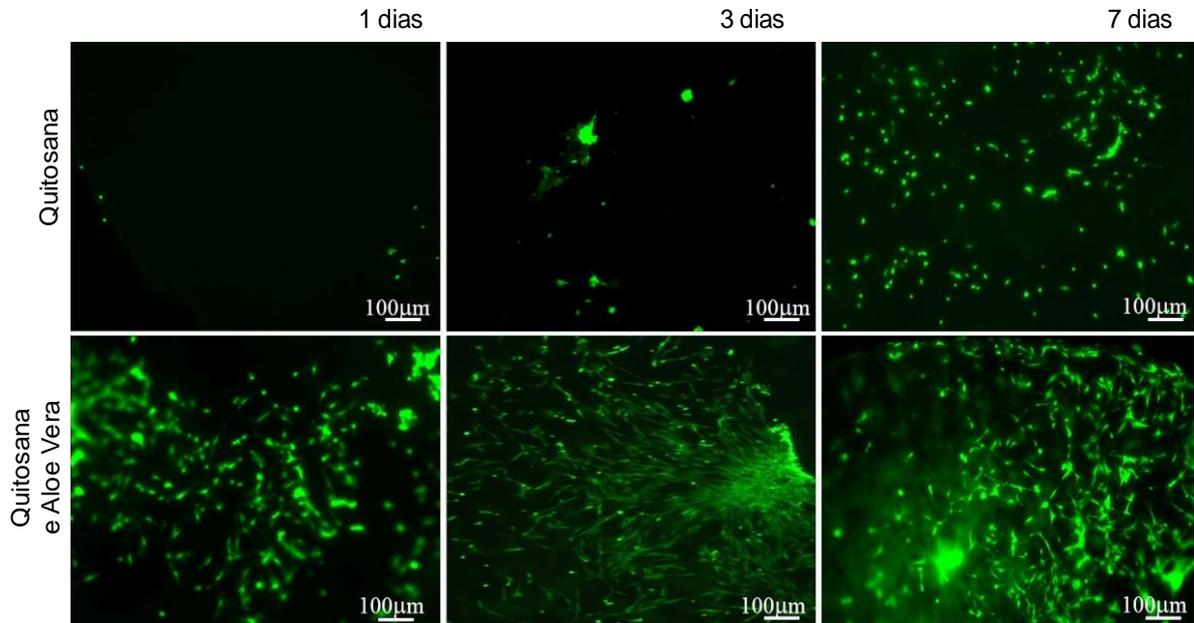


Figura 3.2. Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando o crescimento das células de fibroblastos (coloração com calceína) ao longo do tempo (SILVA et al., 2013).

González Torres (2019) desenvolveu *scaffolds* de compósito de poliuretano e poli(3-hidroxibutirato) (Fig. 3.3. a) a partir da técnica de lixiviação, para semear células renais de embrião mamífero. A imagem de microscopia confocal por epifluorescência (Fig. 3.3. b) mostra a proliferação das células distribuída de forma aglomerada e, segundo o autor as células cresceram principalmente na interconexão dos poros. A natureza química do material (PU) e a estrutura morfológica efetivamente auxiliaram no crescimento da linhagem celular (GONZÁLEZ TORRES, 2019).

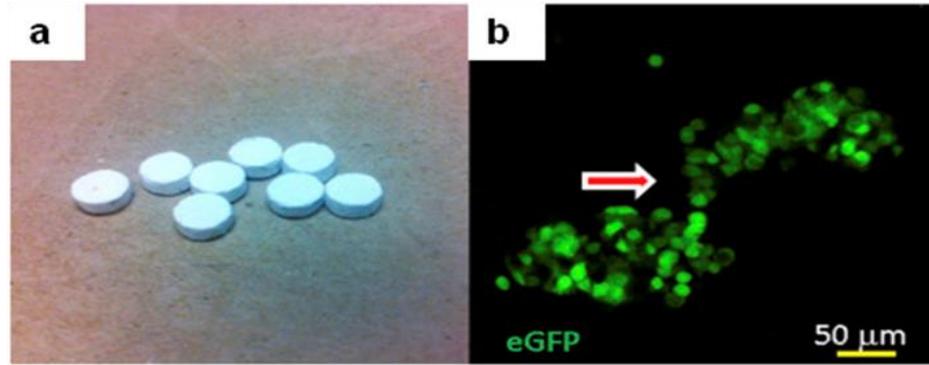


Figura 3.3. a) *Scaffolds* de compósitos de PU; b) Imagem obtida por microscopia confocal mostrando a proliferação celular (GONZÁLEZ TORRES, 2019).

Dentro desse contexto, destaca-se a importância do desenvolvimento de biomateriais com características específicas que promovam ambiente adequado para o processo de regeneração, com estrutura porosa e com interconexões que imitem a matriz extracelular (*extracellular matrix* - ECM), e que apresentem propriedades físico-químicas, mecânicas e de biocompatibilidade apropriadas para o crescimento celular e de tecidos (GABRIEL et al., 2017a; GONZÁLEZ TORRES, 2019; LEE, et al., 2014; SAVARIS et al., 2019).

3.2. Biopolímeros usados em *scaffolds*

Suportes biomiméticos tridimensionais (*scaffolds*) têm sido aplicados na ET devido à sua arquitetura de micro/nanoescala, similar à matriz extracelular (ECM) (ALTUN et al., 2019; JIANG et al., 2019). No entanto, a síntese de suportes adequados para uma cultura de células é um desafio a ser superado (GABRIEL et al., 2017a). Os *scaffolds* devem ter uma estrutura porosa, tamanho de poro adequado, interconectividade e devem ser biocompatíveis (GABRIEL et al., 2017; LI et al., 2014).

O Quadro 3.1 apresenta as propriedades que caracterizam um *scaffold* como ideal para aplicação em engenharia de tecidos (BAINO et al., 2015; BARBANTI et al., 2006; SAVARIS et al., 2019; SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016).

Vários tipos de biomateriais têm sido usados na preparação de diferentes *scaffolds*, alguns exemplos são: cerâmicas (FARZIN et al., 2019; RIBAS et al.,

2019), biopolímeros naturais (BARROSO et al., 2014; BOMBALDI DE SOUZA et al., 2019) e sintéticos (BARBANTI et al., 2008; DUEK, 2008; GABRIEL et al., 2017b; JAGANATHAN et al., 2019).

Quadro 3.1. Propriedades de um suporte (*scaffold*) em engenharia de tecidos.

Propriedades <i>Scaffolds</i> – ET	Descrição	Referências
Morfologia	Estrutura porosa tridimensional com conectividade, semelhantes à matriz celular, favorecendo a atividade celular e interação bioquímica.	BARBANTI et al., 2006; SAVARIS et al., 2019
Biocompatível	Capacidade de suportar atividade celular normal, incluindo sistemas de sinalização molecular, sem quaisquer efeitos tóxicos locais e/ou sistêmicos ao tecido hospedeiro.	BARBANTI et al., 2006; BAINO et al., 2015;
Biodegradável e Bioreabsorvível	O <i>scaffold</i> deve ser bioabsorvível, gradualmente, ao longo de um período de tempo definido diante da aplicação, sendo biocompatível e não tóxico às células.	BARBANTI et al., 2006;SIVASHANKARI et al., 2016; SAVARIS, et al., 2019
Resistência mecânica	Deve apresentar desempenho elástico e suficiente para manuseio, crescimento celular e suportar cargas e tensões.	BAINO et al., 2015; SAVARIS, et al., 2019
Fabricação	O <i>scaffold</i> deve ser facilmente adaptado em tamanho e forma à área doente ou ferida que o novo tecido irá substituir.	SIVASHANKARI et al., 2016; SAVARIS, et al., 2019
Potencial de comercialização	O <i>scaffold</i> deve ser produzido com uma técnica que não apresenta riscos de contaminações e que seja reprodutível facilmente e estar de acordo com os padrões internacionais de produção comercial e	BARBANTI et al., 2006; SIVASHANKARI et al., 2016; SAVARIS, et al., 2019

	uso clínico.	
--	--------------	--

Biomateriais como a hidroxiapatita e sílica mesoporosa (LUO et al., 2015; SUBHAPRADHA et al., 2018) são extensivamente utilizados para a construção de *scaffolds* porosos com aplicação em tecido ósseo. Por outro lado, biopolímeros naturais tem sido muito utilizado devido à biodisponibilidade desses materiais, como a quitosana (AHMED et al., 2018) e o colágeno (MONTALBANO et al., 2018). Estes biopolímeros encontram aplicações potenciais em vários campos de engenharia de tecidos: regeneração de tecidos, crescimento celular, curativos entre outros (AHMED et al., 2018; KENAR et al., 2019; SILVA et al., 2013). No entanto, a taxa de degradação é questionável no caso de biopolímeros, enquanto a menor flexibilidade e a natureza frágil dos materiais cerâmicos são inconvenientes para seu uso em várias aplicações de engenharia de tecidos (GAJENDIRAN et al., 2017). Diante desse impasse dos biopolímeros naturais, vários polímeros sintéticos, como ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL) (SARTORE et al., 2018), ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) (YUAN et al., 2018) e poliuretano (PU) (GABRIEL et al., 2017a), com resistência mecânica desejada e propriedades essenciais, tem sido desenvolvidos para uso como *scaffolds* em ET.

Potencialmente, os materiais candidatos para engenharia de tecidos são polímeros bioreabsorvíveis ou biodegradáveis e entre eles destacam-se os poliuretanos (PU). Os PUs são obtidos através da reação entre moléculas de polióis e diisocianatos (GABRIEL et al., 2017b), conforme mostra a Figura 3.4.

As propriedades dos PUs podem ser moldadas pelas várias composições químicas geradas pela combinação de diferentes diisocianatos e polióis (MARZEC et al., 2017).

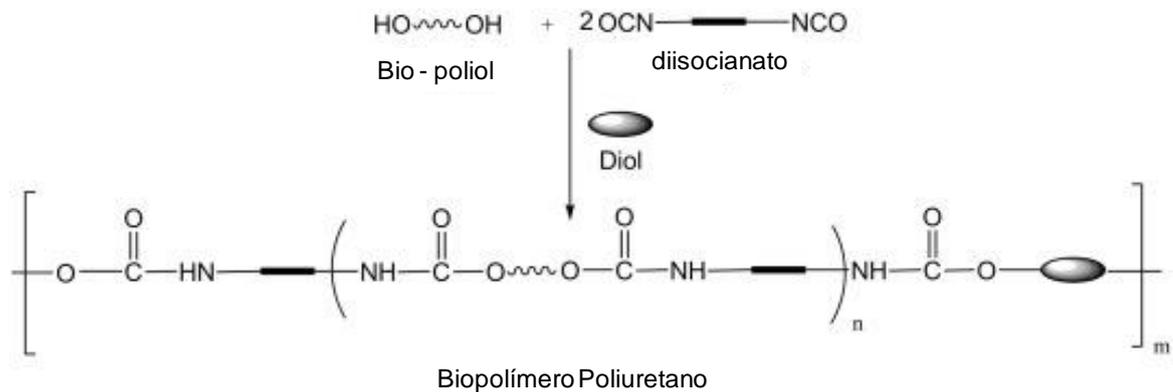


Figura 3.4. Reação química da síntese do biopolímero poliuretano (GABRIEL et al., 2017a).

O uso de diferentes polióis na síntese de PU, a fim de obter maior biocompatibilidade e hidrofiliabilidade tem sido amplamente investigado. Shahrousvand e colaboradores (2017) utilizaram uma mistura de poliol policaprolactona (PCL) e o poli (tetrametileno éter glicol) (PTMEG) com diferentes razões (em massa), onde foi possível obter diferenças nas propriedades mecânicas (maior elasticidade) e textural. Os PUs obtidos com as misturas de 2% PTMEG / 98% PCL e de 5% PTMEG / 95 % PCL apresentaram maior hidrofiliabilidade e melhor adesão e compatibilidade de células tronco mesenquimais humanas (SHAHROUSVAND et al., 2017). *Scaffold* fibrosos usando poliuretano elastomérico e poli (sebacato de glicerol) mostraram melhora significativa na hidrofiliabilidade e na biocompatibilidade do *scaffold* (JIANG et al., 2019). Em outro estudo, um poliuretano baseado em poli (3-hidroxi butirato) resultou em um material promissor para a proliferação de células renais de mamíferos *in vitro* (GONZÁLEZ TORRES, 2019). Meskinfam e colaboradores (2018) estudaram a estrutura de PU/hidroxiapatita, preparada por biomineralização e, a mesma mostrou-se adequada para melhorar a adesão de células tronco mesenquimais da medula óssea (MESKINFAM et al., 2018).

Poliuretanos sintetizados com policarbonato diol (PC) têm sido pouco relatado na literatura (FORD et al., 2018; WRIGHT et al., 2017). O uso do PC como poliól é interessante porque as interações entre os segmentos rígido (isocianato) e flexível (policarbonato diol) apresentam-se de forma ordenada na estrutura do poliuretano, criam a separação de fases, que permite aumento da ductilidade e mantém a resistência do (FORD et al., 2018; MATĚJKA et al., 2019). Nesse contexto, alguns

estudos avaliaram a síntese de PU baseada em PC e sua aplicação em *scaffolds* para engenharia de tecidos (WRIGHT et al., 2017; YEGANEGI et al., 2010).

A preparação de um *scaffold* de poliuretano baseado em hexametileno diisocianato (HDI), policarbonato diol (comercial) e lisina mostrou-se promissora na forma de uma estrutura fibrosa semelhante ao anel dos discos intervertebrais da coluna conforme o estudo de Yeganegi e colaboradores (2010). Os autores produziram *scaffolds* com fibras aleatórias e ordenadas, sendo a forma ordenada a que apresentou melhor resistência mecânica e proliferação celular (células de anel fibroso bovino) e, sobretudo adesão e biocompatibilidade celular (YEGANEGI, et al., 2010).

Em um estudo mais recente, Wright e colaboradores (2017) prepararam *scaffold* nanofibroso de PU (a partir de HDI e policarbonato hexametileno diol) impregnado com antibiótico a base de ciprofloxacino, com potencial na regeneração de tecido gengival. A estrutura poliuretânica apresentou afinidade com o antibiótico (em ambas formas, o antibiótico ligado na estrutura polimérica e na forma livre) (WRIGHT et al., 2017). Os ensaios de viabilidade de células fibroblastos gengivais humano mostraram aderência e proliferação no *scaffold* de PU, indicando principalmente a biocompatibilidade do poliuretano como *scaffold* (WRIGHT et al., 2017).

A natureza do diisocianato utilizado na síntese do PU é crucial para a biocompatibilidade. Portanto, apesar das propriedades mecânicas mais pobres, os PUs obtidos de diisocianatos alifáticos como HDI, 4'4 – diciclohexilmetileno diisocianato (H₁₂MDI) ou trimetilhexametileno diisocianato (TMDI) são mais favoráveis em aplicações biomédicas (KRÓL et al., 2018) comparado a PUs sintetizados a partir dos diisocianatos aromáticos, mais populares, como difenilmetano diisocianato (MDI) e tolueno diisocianato (TDI) (KARALUS et al., 2016).

Os PUs geralmente são suscetíveis à biodegradação, principalmente, devido à clivagem de ligações hidroliticamente sensíveis presentes em seus segmentos flexíveis e também pelos grupos uretanos (GABRIEL et al., 2017b, 2017a). Em geral,

os PUs alifáticos apresentam características como: não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (MARZEC et al., 2017; JAVAID et al., 2019). Dessa maneira, os PUs são um biomaterial polimérico sintético que apresenta grande importância na engenharia de tecidos (GABRIEL et al., 2017b; JAVAID et al., 2019; MARZEC et al., 2017).

3.3. Técnicas de obtenção de *scaffolds* biopoliméricos

As estruturas típicas que formam os *scaffolds* incluem espumas, esponjas, filmes e membranas são utilizados em diferentes aplicações, como: crescimento celular (NAZEER et al., 2019), pele artificial (WU et al., 2016), ataduras para ferimentos (MORGADO et al., 2015), entre outras aplicações.

O *scaffold* biopolimérico pode ser obtido por vários métodos, entre os quais estão eletrofiação, impressão 3D, por processo de CO₂ supercrítico (scCO₂) e a lixiviação com agente porogênico, como descrito no Quadro 3.2. As características dos *scaffolds*, incluindo tamanho de poro, interconectividade e porosidade total, dependem da técnica utilizada e das condições e solventes utilizados.

Quadro 3.2. Técnicas de fabricação de *scaffolds* biopoliméricos.

Técnica de Fabricação	Polímeros / utilização do <i>scaffold</i>	Referências
Eletrofiação	Poli L,D-ácido láctico (PLDL) e PCL /proliferação osteoblastos com osteogenon	(RAJZER et al., 2017)
	PCL e celulose bacteriana / sinapses de tecidos neurais	(ALTUN et al., 2019)
Impressão 3D	PLA / regeneração de tecidos fibroblastos	(KOWALCZYK et al., 2019)
	PCL / regeneração tecido ósseo	(YAN et al., 2019)
Lixiviação	PMMA e PU / cultura de células blásticas	(SOLA et al., 2019)
	PLA / proliferação de células fibroblastos	(XIE et al., 2018)

Inversão de fase por scCO_2	PVA e Quitosana / atadura para curativos	(MORGADO et al., 2014)
	PCL / liberação de fármacos	(SALERNO; SAURINA; DOMINGO, 2015)

Dentro da grande gama de técnicas utilizada na obtenção de *scaffolds*, ainda nenhuma possuem capacidade de produzir matrizes porosas com o controle completo dos parâmetros geométricos, como tamanho do poro, tamanho de interligação e números de poros (LI et al., 2014).

Para este trabalho, na intenção de utilizar técnicas fáceis, e de baixo impacto ambiental, optou-se pelas técnicas de lixiviação com agente porogênico e de inversão de fase por scCO_2 , nas quais foram realizados a revisão bibliográfica conforme descrito nos itens 3.3.1. e 3.3.2., respectivamente.

3.3.1. Lixiviação

A lixiviação do agente porogênico é uma técnica de produção de *scaffold* atraente devido à simplicidade de seu processo (Fig. 3.5) (JANIK; MARZEC, 2015).

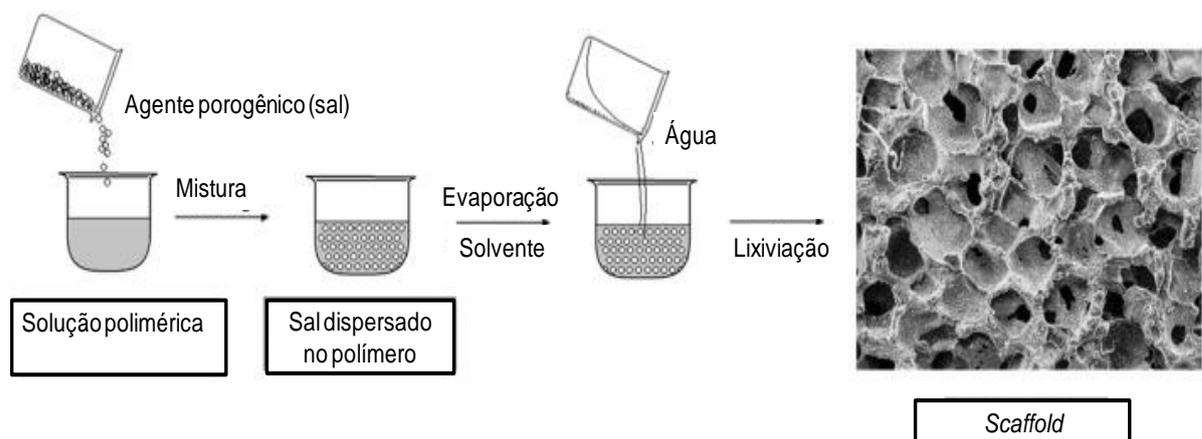


Figura 3.5. Etapas da técnica de lixiviação para obtenção de *scaffolds* (JANIK; MARZEC, 2015).

A técnica utiliza agentes porogênicos, geralmente, cloreto de sódio (NaCl), adicionados à solução polimérica para criar uma rede de polímero-sal. Após a evaporação do solvente, o filme de polímero/sal é submetido a banho de água

purificada para dissolver o sal dando origem aos poros na matriz polimérica. Após a eliminação do sal, a matriz polimérica é submetida a um processo de secagem e um *scaffold* polimérico é obtido (SAVARIS et al., 2019; TURNBULL et al., 2018).

A técnica de lixiviação foi usada por Sola e colaboradores (2019) para obtenção de *scaffold* que imitava a morfologia da medula óssea, a fim de fornecer condições *in vitro* para ação de fármacos contra câncer malignos e outras patologias. Os *scaffolds* obtidos a partir de poli(metil metacrilato), PMMA, e de PU comercial (Biomer Technology Ltd.) apresentaram porosidade acima de 84 % e módulo elástico de 1283 kPa (SOLA et al., 2019). A relação mássica do polímero e sal (1:4), bem como, o tamanho dos grãos do sal (menor que 1000 μ m para o PMMA e para PU entre 1000 – 2000 μ m) permitiram o maior controle sobre a porosidade e tamanho dos poros (Fig. 3.6) (SOLA et al., 2019).

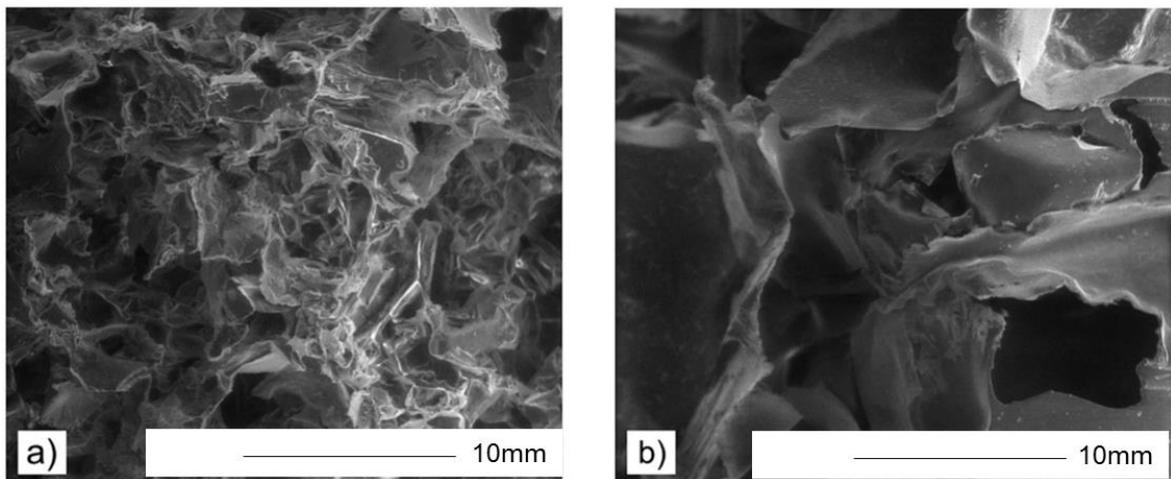


Figura 3.6. Micrografias dos *scaffolds* obtidos pela técnica de lixiviação, a) PMMA e b) PU, *scaffolds* com estrutura porosa e com interconectividade. (SOLA et al., 2019).

As células mesenquimais humanas aderiram com facilidade e também apresentaram retenção celular prevenindo o efeito citotóxico da droga quando adicionada às células leucêmicas (SOLA et al., 2019). A Figura 3.7 apresenta imagens de microscópio fluorescente por coloração nuclear de dihidrocloreto de 4,6 - diamidino-2-fenilindole (DAPI) das células mesenquimais humanas semeadas nos *scaffolds* de PU e de PMMA (SOLA et al., 2019).

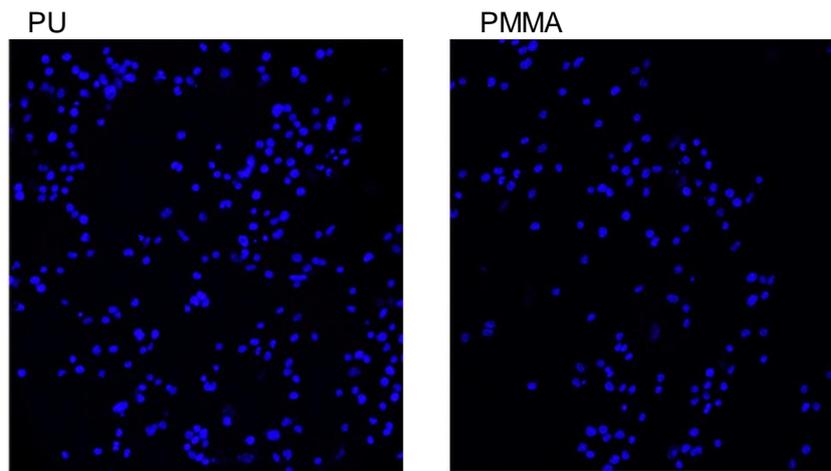


Figura 3.7. Imagens de células mesenquimais humanas, com indicador fluorescente DAPI, semeadas nos *scaffolds* de PU e PMMA obtidos por lixiviação (SOLA et al., 2019).

A estrutura do suporte permitiu que as células proliferassem de forma normal e regular características de células saudáveis, sugerindo que o polímero do *scaffold* não afetou a adesão e a proliferação celular (SOLA et al., 2019).

Scaffolds obtidos a partir de misturas de poli L-lactideo (PLLA) e diferentes quantidades de poli D-lactideo (PDLA), utilizando a técnica de lixiviação, mostraram resultados promissores na engenharia de tecidos. Conforme relatado por Xie e colaboradores (2018). O *scaffold* com 50% de PDLA, com a finalidade de implante, apresentou módulo elástico de 323 MPa a 121 °C (temperatura de esterilização) maior que o *scaffold* com 0% de PDLA, e ainda manteve a morfologia dos poros em temperatura alta (XIE et al., 2018). Os tamanhos de poros destes *scaffolds* ficaram entre 100 a 180 μm induzindo uma boa migração das células nos ensaios subcutâneos em ratos (XIE et al., 2018). Os polímeros formados a partir da mistura de PLLA e PDLA geralmente apresentam característica cristalina o que torna o polímero final frágil, porém a técnica de lixiviação não tornou o *scaffold* frágil e quebradiço (XIE et al., 2018). A Figura 3.8 mostra o ensaio *in vivo* em ratos, onde o *scaffold* foi usado como implante subdérmicos. A migração e infiltração das células de fibroblastos nas margens da estrutura do *scaffold* foram observadas, indicando a direção do crescimento das células, devido à interconectividade dos poros que permitiu a infiltração celular e boa compatibilidade (XIE et al., 2018).

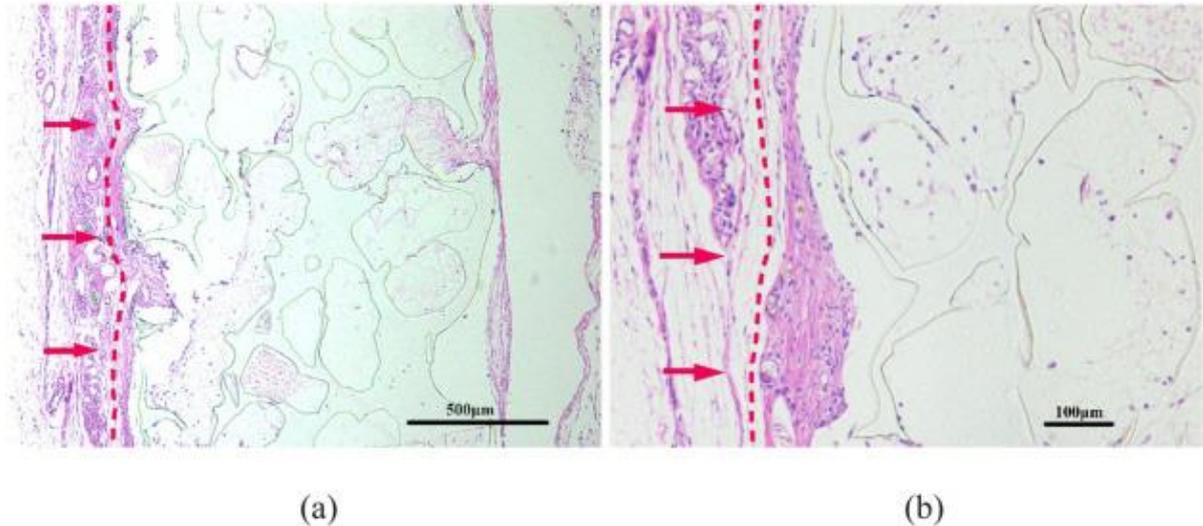


Figura 3.8. Imagens de *scaffold* lixiviado implantado em ratos, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. As flechas indicam a direção da infiltração celular e a linha pontilhada indica a borda do *scaffold*. a) escala 500µm; b) escala 100µm - aproximação da imagem a (XIE et al., 2018).

A técnica de lixiviação promove uma melhora da porosidade e interconexão de poros quando utilizada com conjunto com outras técnicas, um exemplo é descrito por Mi e colaboradores (2015). Os autores preparam um *scaffold* de poliuretano termoplástico (TPU) combinando a técnica de lixiviação de partículas com o processo de modelagem por injeção e foi investigada a eficácia de produção de poros interconectados no *scaffold* com potencial aplicabilidade em engenharia de tecidos (MI et al., 2015). A técnica de lixiviação influenciou principalmente na interconexão dos poros do *scaffold* quando combinada com a modelagem por injeção (MI et al., 2015). A Figura 3.9 mostra a morfologia do *scaffold* antes da lixiviação e depois com combinação das técnicas de lixiviação e modelagem por injeção. A combinação de técnicas levou a um aumento na densidade de poros e uma dispersão de poros uniforme e com interconexão, com tamanhos entre 55 a 100µm (MI et al., 2015).

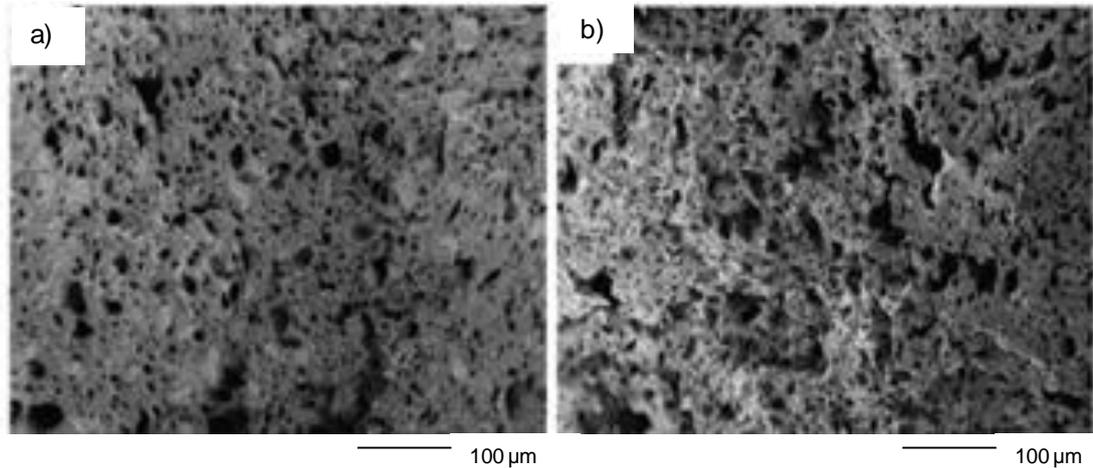


Figura 3.9. Micrografias de a) scaffold não lixiviado b) scaffold lixiviado e moldagem por injeção (MI et al., 2015).

A técnica de lixiviação é considerada simples e direta, sem a necessidade de equipamentos específicos e caros (SOLA et al., 2019). O maior desafio na técnica de lixiviação com agente porogênico é, geralmente, o controle de tamanho de poros, e conforme mostra a literatura a melhor forma de reverter esse problema está no controle do tamanho dos grãos do agente porogênico (SAVARIS et al., 2019; SOLA et al., 2019; TURNBULL et al., 2018).

Independentemente da matriz polimérica, a concentração do agente porogênico deve ser alta para criar uma rede bem definida e poros interconectados, contudo o excesso do agente porogênico provoca perda estrutural, pois a solução polimérica não é suficiente para preencher os espaços entre as partículas de sal (BOSE et al., 2012; SOLA et al., 2019; TURNBULL et al., 2018).

Os sais em geral costumam higroscópicos e devido a umidade se aglomeram, o tratamento térmico, secagem em estufa e peneiramento é de suma importância para um controle maior de poro no *scaffold* (SAVARIS et al., 2019; TURNBULL et al., 2018). O peneiramento depende do tamanho do poro desejável, porém os cuidados com a umidade devem ser considerados (SOLA et al., 2019; TURNBULL et al., 2018).

A avaliação da morfologia e tamanho das partículas de diferentes sais foram estudados por Sola e colaboradores (2019) como estudo prévio na obtenção de

scaffold de PU e PMMA, cloreto de sódio, carbonato de sódio e cloreto de sódio marinho, todos foram secos e termicamente tratados.

O cloreto de sódio comercial apresenta tamanho do grão de 146 a 446 μm e formato de partícula cúbicas, o sal carbonato de sódio é o sal de menor tamanho de grão 80 a 157 μm e grãos com formato irregular e alongado, já o cloreto de sódio marinho apresenta tamanho de grão entre 797-2000 μm e formato do grão irregular, porém mais esférico quando comparado ao cloreto de sódio comercial, como apresentado na Figura 3.10 (SOLA et al., 2019)

Com este estudo é possível constatar a importância da escolha do sal quanto ao tamanho e formato do grão, a fim de promover tamanho de poros para a aplicação específica do *scaffold* na engenharia de tecidos (SOLA et al., 2019).

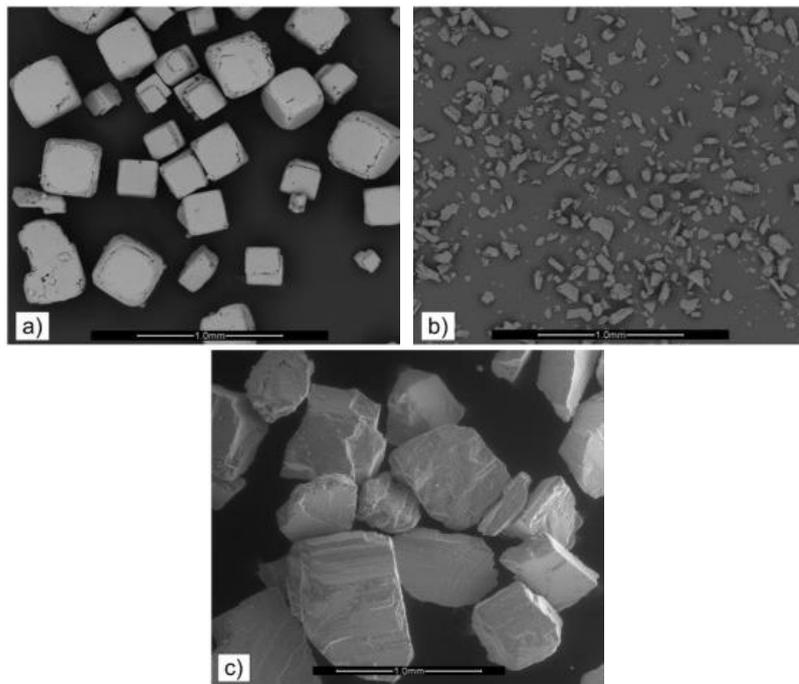


Figura 3.10. Micrografias das partículas de sal: a) cloreto de sódio comercial; b) carbonato de sódio e c) sal marinho (SOLA et al., 2019).

Segundo a literatura, para estudo *ex vivo* (cultura e proliferação celular) os *scaffolds* devem apresentar na sua estrutura alguns poros com aproximadamente 100 μm de diâmetro a fim de facilitar a difusão de nutrientes e permeabilidade do oxigênio para células (BOSE et al., 2012; SOLA et al., 2019; TURNBULL et al., 2018).

3.3.2. Inversão de fase assistida com dióxido de carbono supercrítico – scCO₂

Nas últimas décadas, os fluidos supercríticos têm sido aplicados com sucesso na síntese e processamento de biomateriais (BARROSO et al., 2014; YE et al., 2018). Uma substância pura entra no estado supercrítico quando a temperatura e a pressão estão acima de valores críticos de pressão e temperatura (BARROSO et al., 2014; TEMTEM et al., 2009). Nesta região, o fluido supercrítico existe em uma fase intermediária entre as fases líquida e gasosa (BARROSO et al., 2014; CASIMIRO et al., 2005). A aparência macroscópica do fluido supercrítico é homogênea e apresenta sistema opalescente sem separação de fase (monofásica), uma vez que, neste ponto, a densidade do gás e líquido é o mesmo (BARROSO et al., 2014; COOPER, 2000; YE et al., 2018).

Os fluidos supercríticos apresentam uma combinação particular de propriedades de líquido e gás, que são a densidade e o poder de solubilização de líquidos e com propriedades de transporte e compressão de gases (BARROSO et al., 2014; SOARES DA SILVA et al., 2012; TEMTEM et al., 2009). O fluido supercrítico é denso, mas altamente compressível, particularmente perto da região supercrítica (BARROSO et al., 2014; SOARES DA SILVA et al., 2012). Assim, qualquer mudança de pressão altera sua densidade e, conseqüentemente, o poder de solvente, no entanto essas propriedades podem ser ajustadas com variação de pressão e temperatura (BARROSO et al., 2014; GONZÁLEZ TORRES, 2019).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado em condições críticas, pois possui um ponto crítico relativamente moderado (31,1 °C e 7,38 MPa), é inerte, o que o torna uma alternativa ecologicamente correta aos solventes convencionais e prontamente disponível em alta pureza, pode ser usado, no estado supercrítico, para preparar materiais com alto grau de pureza e proporciona controle formação de poros (KEMMERE; MEYER, 2005; TEMTEM et al., 2009).

A Figura 3.11 mostra o diagrama de fases para o CO₂. Para uma substância pura, o ponto crítico marca o fim da curva de coexistência líquido-vapor.

A produção de *scaffolds* por inversão de fase usando dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) é uma das técnicas mais atuais empregadas para produzir *scaffolds* (MORGADO et al., 2015; YE et al., 2018; SAVARIS et al., 2019). Esta técnica permite a produção de poros com uma distribuição de tamanho estreita, alta difusividade do gás em um processo limpo e com o mínimo de solvente (SAVARIS et al., 2019).

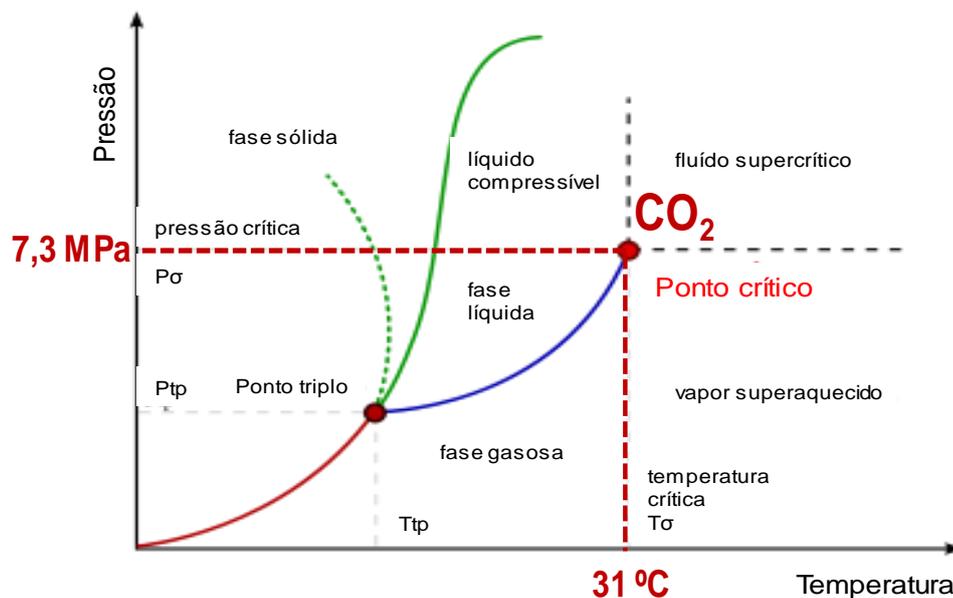


Figura 3.11. Diagrama de fases para o CO₂.

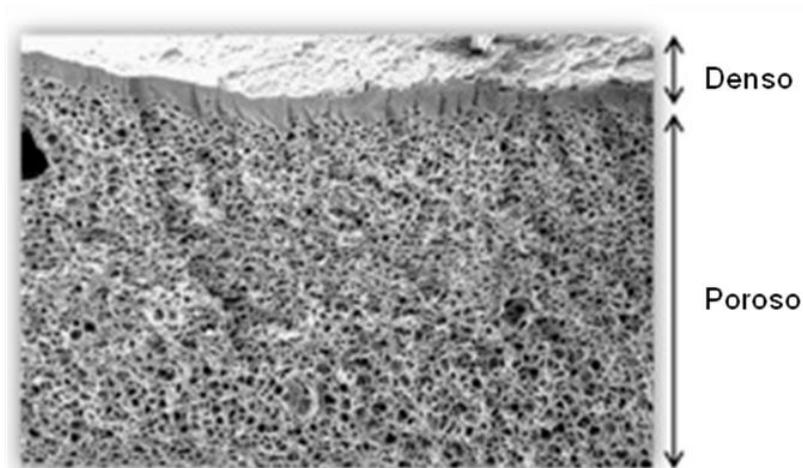
Por exposição ao fluido supercrítico, a solução polimérica fica saturada com CO₂ dissolvido e quando submetido à pressão reduzida, uma estrutura de morfologia porosa é formada. Essa estrutura é formada como resultado da redução da pressão que diminui a solubilidade do CO₂ no polímero, o CO₂ saturado cresce como bolhas na matriz polimérica formando uma rede porosa (SAUCEAU et al., 2011).

Diferentes processos com fluido supercrítico, especialmente envolvendo CO₂, foram relatados na obtenção de *scaffolds*: formação de blendas e compósitos (BAKER et al., 2015), impregnação de fármacos em polímeros (SILVA et al., 2016), formação de espuma e aerogel (GOIMIL et al., 2019) e inversão de fases (MORGADO et al., 2015). Basicamente, em cada processo, o scCO₂ assume papéis diferentes (por exemplo, como solvente, anti-solvente ou agente porogênico) e age

em diferentes estágios dos processos (no início ou no meio da formação de processos de estrutura porosa) (BARROSO et al., 2014).

Além disso, a inversão de fase assistida por scCO_2 permite a produção de *scaffolds* secos, limpos e prontos para uso, com morfologia altamente controlada (alterando a pressão, temperatura e/ou tempo de despressurização) e redução de custos de recuperação de solvente (MORGADO et al., 2015). O processo não requer pós-tratamentos adicionais e qualquer solvente orgânico potencial usado pode ser facilmente removido (TEMTEM et al., 2009).

Morgado e colaboradores (2014) aplicaram o método de inversão de fase assistida por dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) para preparar *scaffolds* assimétricos de poli (álcool vinílico) (PVA)/quitosana com potencial aplicação como ataduras em ferimentos. O uso de parâmetros adequados, tais como, concentração da solução, tempo de despressurização, relação mássica entre os polímeros, levou a obtenção de *scaffolds* assimétricos (tal como as características da pele) (Fig. 3.12).



Membrana PVA/ quitosana, morfologia assimétrica

Figura 3.12. Micrografia do *scaffold* (membrana) produzida pela técnica de inversão de fase assistida por scCO_2 , que apresenta morfologia assimétrica (MORGADO et al., 2014).

Os *scaffolds* obtidos apresentaram as características exigidas para aplicação como um curativo ideal (MORGADO et al., 2014). Os *scaffolds* assimétricos revelaram ser altamente biocompatíveis, capazes de proteger a ferida contra danos físicos, fornecer uma umidade adequada (minimizando o risco de desidratação da

ferida) eram flexíveis e fortes o suficiente para serem manuseados durante a cobertura da ferida. Porém, o estudo mostrou que esta estrutura apresentou rápida liberação do fármaco anti-inflamatório impregnado (MORGADO et al., 2014). A citocompatibilidade e viabilidade das membranas foi avaliada através de estudos *in vitro* com células de fibroblastos humanas em contato com a membrana por 24 e 72 horas. Como mostra o gráfico de atividade metabólica (Figura 3.13), observou-se uma significativa proliferação de fibroblastos nas membranas indicando claramente que são biocompatíveis (MORGADO et al., 2014).

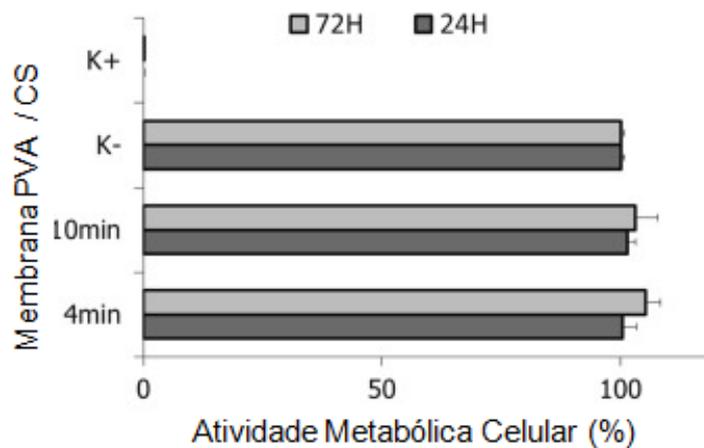


Figura 3.13. Atividade celular medida pelo ensaio de resazurina após 24 e 72h. K+ células mortas; k- células vivas; 10min e 4 min de depressurização de CO₂ respectivamente (MORGADO et al., 2015).

Recentemente, Goimil e colaboradores (2019) prepararam um *scaffold* de policaprolactona (PCL) e fibroína da seda com dexametasona através da combinação de aerogel e espuma por técnica de inversão de fase assistida por scCO₂. A técnica de scCO₂ permitiu a formação da estrutura porosa com dexametasona impregnada (Figura 3.14), sem alterar a atividade da fibroína e da dexametasona. As micropartículas de fibroína melhoraram a estrutura porosa facilitando a permeação celular e o perfil de liberação de dexametasona, mostrando-se adequada para o tratamento na regeneração óssea (GOIMIL et al., 2019).

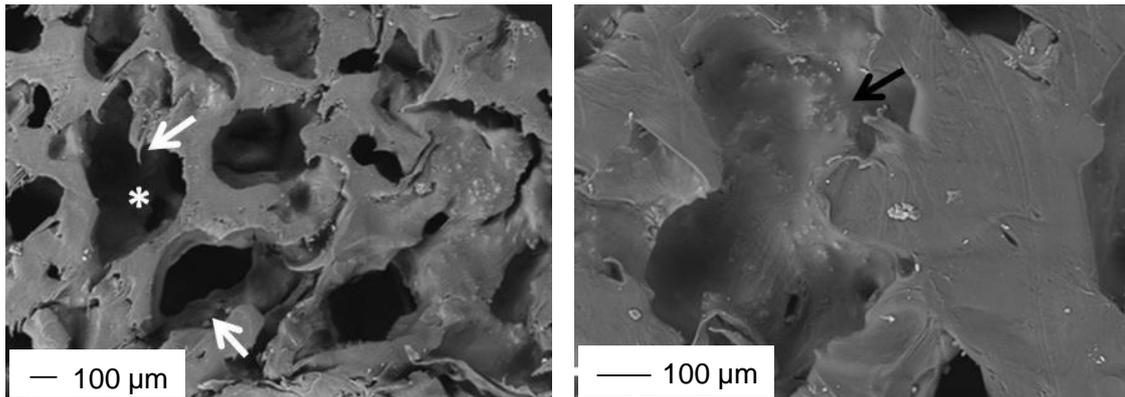


Figura 3.14. Micrografias do *scaffold* de PCL por $scCO_2$ com fibroína da seda e dexametasona, Seta branca indica a aproximação apresentada na figura com seta preta que mostra a rugosidade, o asterisco indica a interconectividade dos poros (GOIMIL et al., 2019).

A compatibilidade do *scaffold* como enxerto e a capacidade de promover a proliferação e formação de células e tecido ósseo foi avaliada em teste com ratos, as imagens dos resultados histológicos em 7 e 14 semanas são apresentados na Figura 3.15 (GOIMIL et al., 2019). É possível observar boa compatibilidade do material com as células do osso, foco de ossificação na estrutura do *scaffold* indicados pela sigla OF, enquanto que a letra M indica a estrutura do *scaffold* ainda não permeada na Figura 3.14 (GOIMIL et al., 2019).

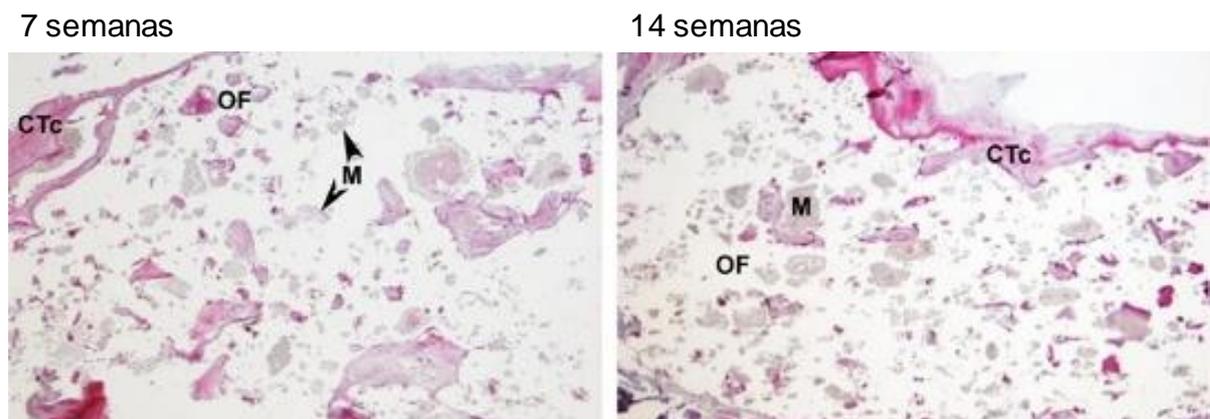


Figura 3.15. Análise histológica dos *scaffold* de PCL com fibroína da seda e dexametasona implantada em osso de rato, em 7 e 14 semanas, respectivamente. OF indica ósseo formação e M indica a matriz polimérica (GOIMIL et al., 2019)

Outro estudo que mostra a eficiência da técnica de produção de *scaffold* por $scCO_2$ é relatado por Kravanja e colaboradores (2019). Este estudo avaliou o perfil

de liberação de proteína de soro bovino (BSA) retida em *scaffold* de policaprolactona (PCL) e quitosana produzida pela técnica de $scCO_2$ (KRAVANJA et al., 2019). Os resultados mostraram que a técnica usada para a preparação do *scaffold* permitiu maior miscibilidade da mistura PCL/Quitosana com o BSA e, também a incorporação encapsulada de BSA nas paredes do *scaffold* poroso favoreceu perfil de liberação controlado da proteína. O *scaffold* apresentou tamanho de poros entre 50 a 140 μm (Fig 3.16), esta faixa favorece a vascularização e o crescimento do tecido (KRAVANJA et al., 2019)

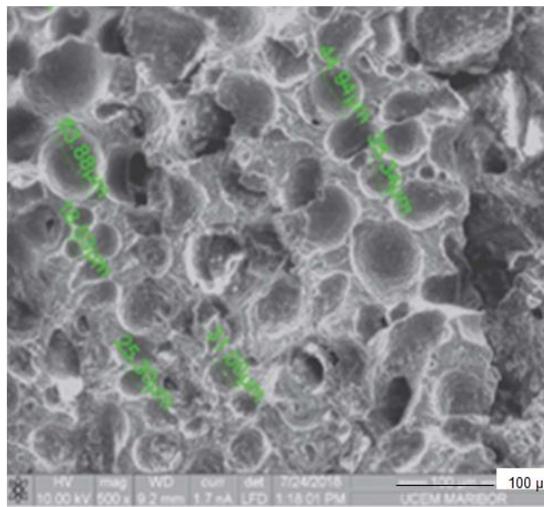


Figura 3.16. Micrografia do *scaffold* de PCL/quitosana com BSA impregnado (KRAVANJA et al., 2019)

*os números em verdes são referentes aos tamanhos dos poros já descritos no texto.

Diante do cenário atual no campo da engenharia de tecidos e obtenção de *scaffolds*, destaca-se a necessidade de pesquisas e estudos com biopolímeros e diferentes métodos de produção de poros. As pesquisas na obtenção de *scaffolds* mostram uma grande gama de técnicas para formação de poros em estrutura poliméricas. Contudo, destaca-se a necessidade de produção de *scaffolds* através de técnicas simples com mínimo impacto ambiental e com baixo custo, associada ao uso de biopolímeros resistentes e biocompatíveis, nesse contexto encontra-se a motivação do desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos descritos nesse trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do poliuretano e a obtenção do *scaffold* por lixiviação foram realizadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Escola Politécnica da PUCRS. A obtenção do *scaffold* por inversão de fase assistida por dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) foi realizada no Laboratório Associado para Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia da Europa (REQUIMTE) da Universidade Nova de Lisboa (UNL).

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: 1^o) foi sintetizado o biopolímero poliuretano (PU) a partir do diciclohexilmetileno diisocianato, poliol policarbonato e hexanodiol e a partir dele foram preparados os *scaffolds* por duas técnicas diferentes, por lixiviação (PU_L) e por inversão de fase assistida por dióxido de carbono supercrítico (PU_S); 2^o) foram avaliadas características estruturais e morfológicas, propriedades térmicas e mecânicas, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, além de ensaios *in vitro* com os *scaffolds* obtidos.

A seguir são descritos os materiais e métodos utilizados na preparação dos *scaffolds* de PU, bem como, as técnicas de caracterização dos mesmos e os ensaios *in vitro*.

4.1. Materiais

Os reagentes e solventes comerciais (solventes foram submetidos à secagem) utilizados nas diversas etapas deste trabalho estão listados no Quadro 4.1.

Quadro 4.1. Especificações dos reagentes e solventes utilizados.

Reagente / solução	Origem	Secagem
1,6-Hexanodiol	Sigma	Á vácuo por 10 horas
Alamar blue	Sigma	-
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec	125 °C 48h - estufa
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃)	Sigma	Vácuo e peneira molecular 3Å
Clorofórmio	Sigma	Agente secante - pentóxido de fósforo (P ₂ O ₅)
Células de fibroblastos (hFB)	Cell systems	-
Diciclohexilmetileno diisocianato (H ₁₂ MDI)	Bayer	-
Dihidrocloro de 4',6 – diamidino – 2 – fenilindole (DAPI)	Sigma	-
Dilaurato de dibutil-estanho (DBTDL)	Sigma	-
Etanol	Sigma	Agente secante óxido de cálcio (CaO)
Estreptomicina / penicilina	LGC biotecnologia	-
Kit células vivas e mortas	Thermofisher	-
Meio Dulbecco MEM (DMEM)	Sigma	-
Meio Eagle Modificado por dulbeco	Sigma	-
Metil-etil-cetona (MEC)	Sigma	Agente secante P ₂ O ₅
Phalloidin FITC	Sigma	-
Policarbonato diol (PC)	UBE Eternacool PH 100*	Á vácuo por 10 horas
Solução Tampão fosfato (PBS) pH 6.4	Sigma e LGCBio	-
Solução Tampão fosfato (PBS) pH 7.4	Sigma e LGCBio	-
Soro fetal bovino (SBF)	Sigma	-
Triton TM – X 100	Sigma	-

4.2. Síntese do PU

A síntese do poliuretano (PU) utilizado neste trabalho foi realizada conforme método já descrito pelo nosso grupo de pesquisa (GRACIOLI et al., 2013; GRACIOLI, 2016). Em uma síntese típica, uma mistura do poliól PC e do 1,6-

hexanodiol (razão molar PC/1,6-hexanodiol = 2:1) foi adicionado em um balão de 500 mL, sob atmosfera de nitrogênio, mantendo-se a temperatura do sistema em 75°C. Após estabilização da temperatura, foi adicionado diisocianato H₁₂MDI numa relação molar NCO/OH=1,15 e 0,1% m/m de dibutil dilaureato de estanho (DBTDL), como catalisador. A reação foi realizada através da técnica de polimerização em solução, onde foi utilizada pequena quantidade (≈ 80 mL) de metil-etil-cetona (*Metil Etil Ketone* - MEK) como solvente, distribuído durante toda a síntese. A conversão do diisocianato foi monitorada através da diminuição do teor de NCO livre quantificado por titulometria com n-dibutilamina (ASTM D2572, 2010).

A Figura 4.1 apresenta um esquema reacional da obtenção do PU. O PU obtido por este método de síntese apresenta Mw de 195.170 g/mol, Mn de 115.109 g/mol e polidispersividade de 1,9.

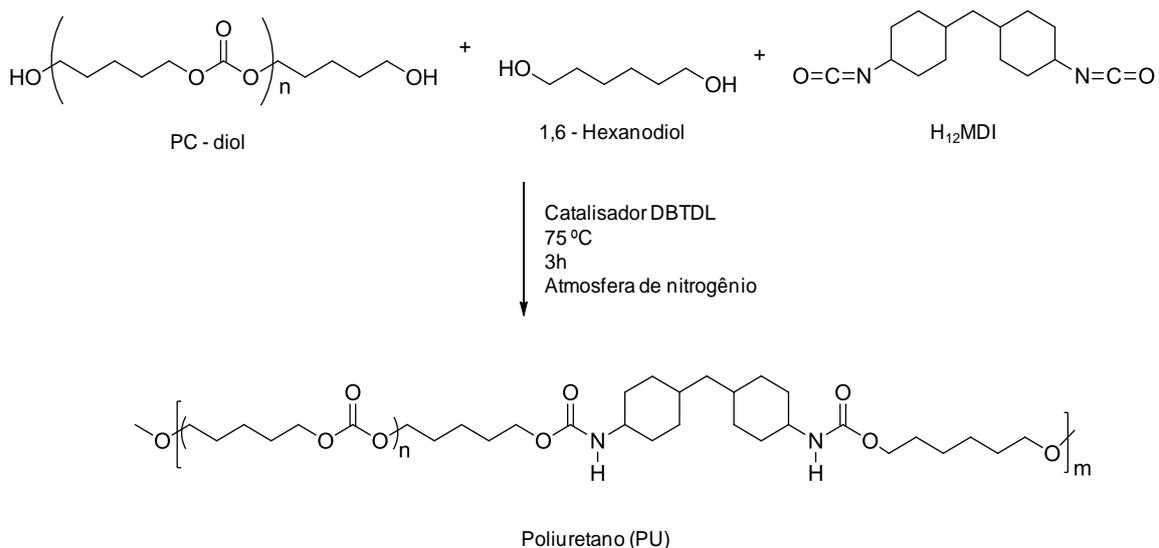


Figura 4.1. Esquema reacional da obtenção do poliuretano.

4.3. Preparação dos *scaffolds* de poliuretano

O filme de PU denso foi obtido pelo método de evaporação de solvente (método *casting*) (Fig. 4.2). Uma solução do polímero (25% (m/v) em clorofórmio) foi vertida sobre uma placa de vidro, e colocada em uma câmara de evaporação de solvente com passagem de nitrogênio durante 24 horas.

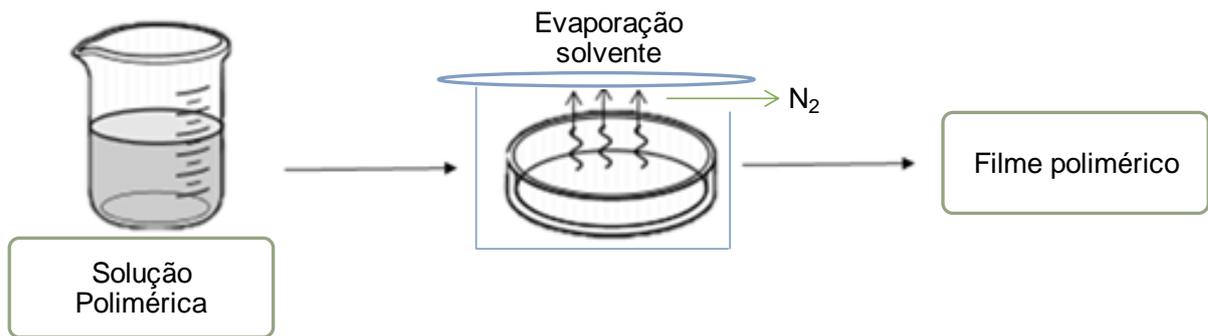


Figura 4.2. Esquema simples das etapas de obtenção do filme denso de PU por evaporação de solvente (método *casting*) (JANIK et al., 2015).

4.3.1. Solução de PU

Para a obtenção dos *scaffolds* de PU pelas técnicas de lixiviação e inversão de fase assistida por $scCO_2$, primeiramente, foram preparadas soluções de 25% m/v de PU em clorofórmio. A nomenclatura adotada para as amostras de *scaffolds* é apresentada no quadro 4.2.

Quadro 4.2. Especificações dos *scaffolds* obtidas.

Identificação	Técnica obtenção do <i>scaffold</i>
PU_L	<i>Scaffold</i> - Lixiviação
PU_S	<i>Scaffold</i> - Fluido $scCO_2$

4.3.2. *Scaffold* preparado por técnica de lixiviação (PU_L)

O *scaffold* preparado pela técnica de lixiviação de agente porogênico foi produzido a partir de uma solução 25% m/v de PU a temperatura ambiente. O sal cloreto de sódio foi utilizado como agente porogênico. Antes de sua utilização, foi feita uma secagem ($100^\circ C$ por 48 h) das partículas de sal, desta forma pode-se obter maior controle na porosidade do *scaffold* (SOLA et al., 2019). Na solução polimérica foi adicionado o agente porogênico (NaCl), previamente peneirado (partículas com granulometria entre $74-35\mu m$), na proporção mássica 1:4 (polímero/sal). Essa mistura foi vertida sobre uma placa de vidro e colocada dentro de câmara de evaporação de solvente, com arraste de gás de nitrogênio (N_2) por 48 horas. Após este tempo, o filme obtido de poliuretano com a presença de cloreto

de sódio foi submetido à lixiviação das partículas para retirada do sal e obtenção de uma estrutura porosa (*scaffold*). Nessa etapa, a matriz de PU/sal foi imersa em água deionizada e o sistema foi sonificado por um período de 2 horas. Após, a matriz foi seca, sob pressão reduzida durante 8 horas obtendo-se assim o *scaffold* de PU_L. As principais etapas da técnica de preparação de *scaffold* por lixiviação estão representadas na Figura 4.3.



Figura 4.3. Esquema simples das etapas de obtenção de *scaffolds* a partir da técnica de lixiviação (JANIK et al., 2015).

4.3.3. Scaffold preparado por técnica de inversão de fase assistida por CO₂ supercrítico (PU_S)

Esta etapa foi realizada no período de um ano (05/2015 - 04/2016) do doutorado sanduiche, realizado no Laboratório Associado para Química Verde – REQUIMTE – do Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa (UNL) sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Ana Isabel Nobre Martins Aguiar de Oliveira Ricardo, em Portugal.

Esta técnica baseia-se no uso de solução polimérica que em contato com um meio não solvente (nesse caso CO₂ supercrítico) leva a precipitação do polímero na forma de *scaffold* nanoestruturado, conforme mostra a Figura 4.4. a. (CASIMIRO et al., 2005; TEMTEM et al., 2009). A Figura 4.4. b. apresenta um esquema do sistema usado na técnica de inversão de fase assistida por scCO₂.

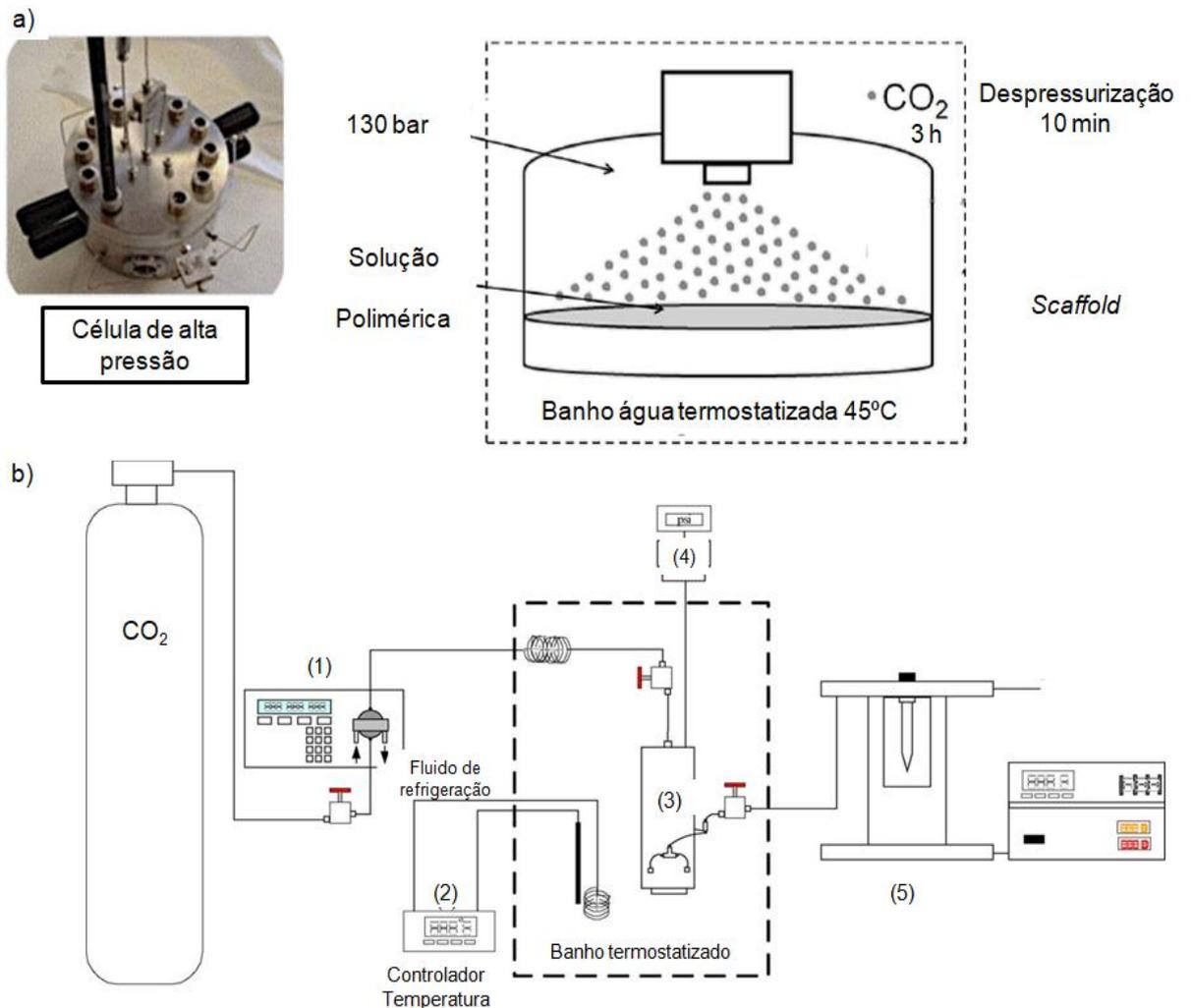


Figura 4.4. a) sistema no interior da célula de alta pressão para formação de *scaffold* por scCO₂; b) Esquema do aparelho de alta pressão: (1) bomba Gilson 305 do pistão; (2) controlador de temperatura; (3) célula de alta pressão; (4) o transdutor de pressão; (5) regulador de pressão de retorno. (CASIMIRO et al., 2005; TEMTEM et al., 2009).

O *scaffold* de PU_S foi produzido seguindo procedimento já descrito em detalhes na literatura (BARROSO et al., 2014; MORGADO et al., 2014; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015; TEMTEM et al., 2009).

Em um procedimento típico, a solução polimérica foi vertida em uma placa de aço inoxidável porosa (com diâmetro de 68mm x1,5mm de altura, tamanho de poros aproximadamente 0,5 μm) e colocado dentro da célula de alta pressão (Fig. 4.4 a. e b-3). A célula foi fechada e imersa em um banho termostatzado e aquecido por meio de um controlador (Hart Scientific, modelo 2200) que mantém a temperatura dentro de $\pm 0,01^\circ\text{C}$ (Fig. 4.4. b). O fluxo de CO₂ foi adicionado usando uma bomba de pistão

Gilson (modelos 305 e 306), Figura 4.4. b-1, até a pressão alcançada e a operação foi realizada em modo contínuo com vazão de 5 mL/min.

Depois de atingida à pressão operacional de 130 bar, o fluido supercrítico passa por um regulador de pressão de retorno (Jasco 880-81), Figura 4.4. b-5, que separa o CO₂ do solvente clorofórmio. A pressão foi monitorada com um transdutor de pressão (Setra Systems Inc. Modelo 204) com uma precisão de ± 10 bar (Fig. 4.4 b-4).

As condições operacionais do sistema de scCO₂ foram de 130 bar, 45 °C, fluxo de CO₂ de 5 ml/min de por 3 horas. Ao final do processo, o sistema foi despressurizado de forma rápida (4 min) ou lenta (10 min). A despressurização lenta de 4 min formou bolhas com películas finas disperso em todo o *scaffold*, enquanto a despressurização lenta de 10min foi possível obter um *scaffold* uniforme na espessura e sem bolhas. Dessa forma, o *scaffold* obtido pela despressurização em 10 min foi escolhido para ser utilizados nas etapas posteriores deste trabalho e, como comparativo ao *scaffold* obtido por lixiviação.

4.4. Ensaio e Técnicas de Caracterização

4.4.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A determinação das massas molares numérica média (M_n) e ponderal média (M_w) (e) e a polidispersividade do PU sintetizado foi determinada pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). As análises foram realizadas (em duplicata) em um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com uma bomba isocrática -1515, utilizando detector de índice de refração Waters Instruments 2414 e THF como eluente (fluxo: 1 mL/min), com set de colunas Styragel e padrões de calibração de poliestireno. As amostras foram preparadas através de uma solução do PU em tetrahidrofurano (THF) com uma concentração de 5 mg/mL. Esta caracterização foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Escola Politécnica da PUCRS.

4.4.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização da estrutura química do poliuretano obtido foi feita com a técnica de espectroscopia no infravermelho usando um equipamento Perkin Elmer Spectrum 100, localizado no Laboratório de Espectroscopia da Escola Politécnica da PUCRS. As análises foram realizadas no intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , com o acessório de amostras UATR (refletância total atenuada universal). A amostra de PU foi analisada sob a forma de filme em quatro leituras de diferentes partes do filme.

4.4.3. Ressonância Magnética Nuclear – ^1H (^1H -RMN)

A análise foi realizada em um espectrômetro Bruker Avance III 300 MHz, com sonda *broadband* (BBO 400 S1 BBF-HD-05 Z PLUS), localizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia na Universidade Nova de Lisboa (UNL). Aproximadamente 10 mg de PU foi dissolvido em 500 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3), sendo que a análise foi feita duplicata.

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação da morfologia superficial e no interior dos *scaffolds* de PU foi realizada utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. As análises foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico da marca PHILIPS, modelo XL30 com resolução de 3,5 nm (no modo elétron secundário) e faixa de aumentos de 100 a 4000 vezes, tensão de aceleração de 20 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS, utilizando ouro para metalização das amostras. Foram submetidas às análises de MEV o lado superior (lado dos *scaffolds* sem contato com a placa, com a passagem apenas de gás), do lado inferior (lado dos *scaffolds* em contato com a placa) e seção transversal (quebra por fratura criogênica) dos *scaffolds*. As medidas dos diâmetros dos poros (180 a 210 medições) foram realizadas com o uso do *software Image J* através das micrografias eletrônicas.

4.4.5. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise por AFM foi realizada a fim de avaliar a organização e interação dos segmentos flexíveis e rígidos do polímero através de imagens de topografia, adesão e deformação. O equipamento utilizado foi um microscópio de força atômica da Bruker, modelo Dimension Icon PT, no modo Peak Force utilizando uma sonda com ponta triangular de nitreto de silício modelo Scanasyst-Air com constante elástica nominal de 4 nN e frequência de ressonância de aproximadamente 70 kHz, localizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS. Foram submetidas às análises de AFM o lado superior (lado dos *scaffolds* sem contato com a placa, com a passagem apenas de gás), do lado inferior (lado dos *scaffolds* em contato com a placa)

4.4.6. Ensaio de Tração

O ensaio de tração dos *scaffolds* foi realizado em uma máquina de ensaio de tração (MINIMAT firm-ware v.3.1), localizado na Universidade Nova de Lisboa. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, conforme norma padronizada utilizada no laboratório de pesquisa LQV – REQUIMTE (BARROSO et al., 2014; MORGADO et al., 2014; MORGADO et al., 2015; SOARES DA SILVA et al., 2012; TEMTEM et al., 2009). Os corpos de prova ($n = 5$) com dimensões de 15 mm x 5 mm foram preparados com *scaffold* seco e após a imersão por 8 h em solução simulado corpóreo (solução tampão fosfato - PBS). O comprimento entre os grampos foi definido como 5 mm e a velocidade do teste ajustada para 0,1 mm/min. Uma carga completa de 20 N e extensão máxima de 20 mm foram utilizados. Os dados de extensão de carga foram obtidos durante o teste e convertidos em curvas de tensão x deformação, aplicando as equações 4.1 e 4.2:

$$Tensão = \sigma = \frac{F}{A} \quad (4.1)$$

$$Deformação = \varepsilon = \frac{\Delta l}{L} \quad (4.2)$$

Onde F é a força aplicada; A é a área da seção transversal; Δl é a mudança de comprimento; e L é o comprimento entre os grampos.

4.4.7. Ângulo de contato

O comportamento hidrofílico dos *scaffolds* foi avaliado através da medida do ângulo de contato produzido entre uma gota de solução de meio simulado corpóreo (PBS) sobre a superfície dos *scaffolds* ($n=3$), usando um goniômetro KSV Modelo CAM 100, localizado no Departamento de Química da UNL em Lisboa.

4.4.8. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (em triplicata) foi feita para avaliar a estabilidade térmica dos *scaffolds*. As curvas de TG e DTG foram obtidas utilizando um equipamento SDT da TA Instruments, modelo Q600 localizado no Laboratório de Caracterização de Materiais da Escola Politécnica da PUCRS. As condições de análise usadas foram aquecimento dada temperatura ambiente até 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio e utilizando porta amostra de platina.

4.4.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (em triplicata) foi feita para determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos *scaffolds* poliméricos. As curvas de DSC foram obtidas utilizando um equipamento de DSC da TA Instruments modelo Q20, localizado no Laboratório de Caracterização de Materiais da Escola Politécnica da PUCRS. As condições de análise usadas foram: intervalo de temperatura de -90 a 200 °C, com uma taxa de 10 °C/min na etapa de aquecimento e de resfriamento, sob atmosfera de nitrogênio, cerca de 8mg de amostra em porta amostra de alumínio. Foi realizado ciclo de aquecimento – resfriamento – aquecimento, a temperatura de transição vítrea (T_g) foi obtida através do declínio observado no segundo ciclo de aquecimento.

4.4.10. Teste de inchamento

O teste de inchamento (quadruplicata) foi realizado para determinar a capacidade de absorção de água dos *scaffolds* de PU. O ensaio foi realizado no Laboratório de Química Verde da UNL em Lisboa. Para este teste, amostras dos *scaffolds* de PU (PU_L e PU_S) com 1 cm² de área foram preparados. Os *scaffolds* secos foram pesados e, em seguida, ambos os *scaffolds* foram imersos em 10 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4) para fins comparativos, simulando o comportamento de interação entre *scaffolds* e fluido corporal normal. A absorção de água (28 dias) foi calculada utilizando o peso úmido (após o período de imersão) (W_w) e peso inicial (antes do período de imersão) (W_0), como mostra a Equação 4.3:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \left(\frac{W_w - W_0}{W_0} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

4.4.11. Teste de degradação hidrolítica

O ensaio foi realizado no Laboratório de Química Verde da UNL em Lisboa. Em um tubo de ensaio, os *scaffolds* de PU foram imersos em solução PBS (pH 7,4). Em seguida, os tubos foram expostos em banho termostático (37 °C) durante tempo determinado (5 min a 60 dias). No final de cada período, as amostras (quadruplicata) foram removidas do banho, lavadas com água destilada e secas por pressão reduzida (24 h) em dessecador até obterem massa constante. As amostras foram pesadas no início e no final do teste, a partir da diferença de massa foi realizado o estudo do perfil de degradação. O ensaio foi realizado conforme a norma ASTM F1635 (2010). Mediu-se a massa antes da imersão na solução tampão fosfato (m_1) e após o processo de secagem depois de completar o tempo de ensaio (m_2) a porcentagem de perda de massa foi determinada através da Equação 4.4.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (4.4)$$

4.5. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS.

4.5.1. Protocolo de cultura celular

A linhagem celular de fibroblastos humanos (hFB), e vero para o ensaio de alamar blue, foram utilizadas para a realização dos experimentos. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), contendo fungizona (0,025 g/L) e penicilina/estreptomicina (0,1 g/L), mantido em temperatura de 37 °C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO₂. As membranas de PU (PU_L e PU_S) foram cortadas em discos de 32 mm² e esterilizados com etanol 70% por 5 minutos, lavados com solução salina de fosfato (PBS) e exposto em luz UV (entre 320 a 210 nm) por 15 minutos cada lado. As células foram plaqueadas na parte superior de cada *scaffold* de PU.

Dentre os métodos de esterilização, estabelecidos para dispositivos médicos implantáveis, esterilização por UV é comumente utilizada (Tipnis et al., 2018). A esterilização por luz UV utiliza raios ultravioletas com comprimento de onda variando de 328 a 210 nm para esterilização de microrganismos e para efeito bactericida utilizam-se os comprimentos de onda de 240 e 280nm (Tipnis et al., 2018). A esterilização por UV para poliuretano com aplicação na medicina regenerativa e dispositivos médicos tem sido relatada na literatura, o tempo máximo de exposição do poliuretano na luz UV é de aproximadamente 30 min, sem degradar o material (Urbina et al., 2019; Wu et al., 2018). Contudo, para avaliar provável degradação do poliuretano decorrente da exposição por luz UV (210 - 320 nm), os *scaffolds* de PU após a esterilização foram submetidos a análise de infravermelho sendo constatado que o material apresentou espectro de IV idêntico ao obtido antes da exposição por UV. Além disso, o material também manteve-se com a coloração branca, o que indica que não houve degradação do polímero durante a esterilização por luz UV.

4.5.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a norma ISO 10993-5 ensaio MTT – 3-(4,5-dimetirilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – ensaio colorimétrico quantitativo que mensura a viabilidade mitocondrial pela redução do sal de tetrazólio, como indicativo de viabilidade celular. O princípio deste método consiste em medir a viabilidade celular pela atividade metabólica mitocondrial das células vivas, no qual é quantificada pela reação de redução do MTT (coloração amarela) em cristais de Formazan (coloração roxa). O esquema do ensaio está apresentado na Figura 4.5, onde mostra que a redução do MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

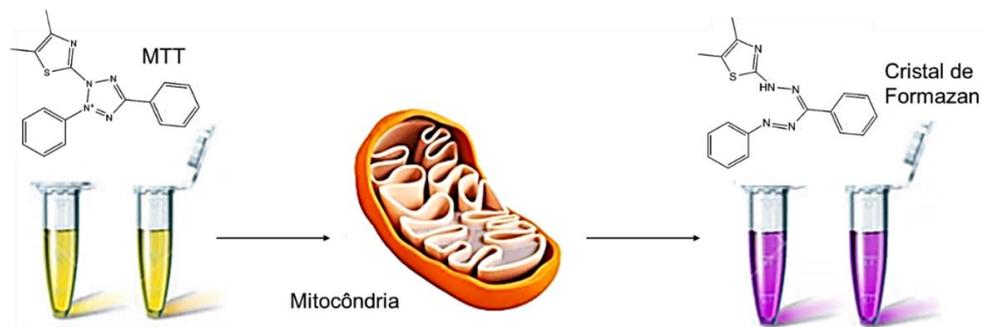


Figura 4.5. Viabilidade mitocondrial por MTT – redução sal tetrazólio.

As células hFB foram incubadas com discos estéreis de *scaffold* PU_L e PU_S por 24, 48 e 72 horas em placas de cultura, numa densidade de 10×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Neste ensaio, foi utilizado meio DMEM como controle negativo e sulfato de cobre (0,1 g/mL) em meio DMEM como controle positivo (Quadro 4.3).

Quadro 4.3. Tratamento, concentrações e linhagem celular utilizadas nos ensaios por MTT.

Linhagem Celular	Tratamento	Tempo
hBF	Controle Positivo- Sem <i>scaffold</i>	24, 48, 72 h
	Controle Negativo- Sulfato de Cobre	
	Disco – PU_L <i>scaffold</i>	
	Disco – PU_S <i>scaffold</i>	

Os resultados foram determinados em porcentagem da absorbância dos *scaffolds* em relação ao grupo que não recebeu *scaffolds* (controle positivo).

4.5.3. Ensaio de viabilidade celular por alamar blue

A citotoxicidade dos *scaffolds* de PU (PU_L e PU_S) foi reavaliada por um segundo teste, o ensaio de alamar blue (Figura 4.6) durante 72 horas. Neste ensaio, o sal de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é usado como indicador de oxirredução e da função mitocondrial, onde as células viáveis reduzem a resazurina (azul não-fluorescente) à resorufina (rosa fluorescente).

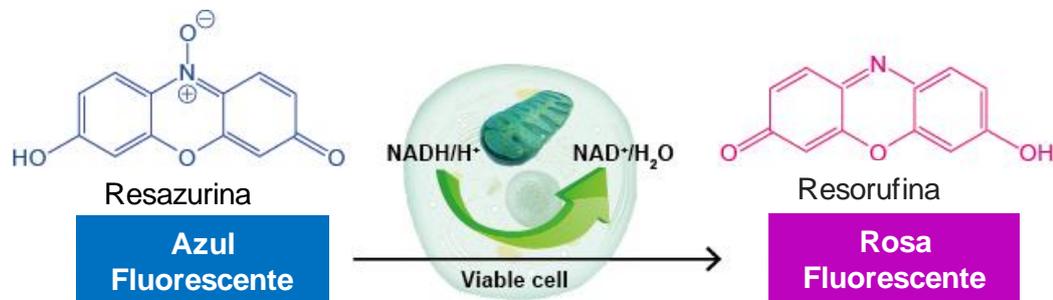


Figura 4.6. Viabilidade celular por Alamar Blue – redução resazurina.

Para este ensaio, já relatado na literatura (Gabriel et al., 2017; Luo et al., 2019), foram utilizadas as células Vero. Previamente ao plaqueamento das células, discos dos *scaffolds* lixiviado e scCO₂ (32 mm²) foram esterilizados (álcool 70% + UV por 20 min) e adicionados no fundo dos poços em placas de 96 poços (Quadro 4.4). Após este procedimento, as células foram plaqueadas na densidade de 5 x 10³ células por poço sob os discos de *scaffolds* contendo 100 µL de meio de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo 0,5 U/mL dos antibióticos penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em temperatura de 37°C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO₂ por 72 horas. Após incubação de 72h a 37°C, 5% de CO₂, adicionou-se 10 µL de solução 10% de azul de alamar em cada poço. Após 4 h procedeu-se a leitura de absorbância em 540 nm (estado oxidado) e 630 nm (estado reduzido) em leitor de microplaca. Células em meio de cultura foram usadas como controle negativo.

Quadro 4.4. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios por Alamar Blue.

Linhagem Celular	Tratamento	Tempo
vero	Controle - Sem <i>scaffold</i>	72 h
	Disco – PU_L <i>scaffold</i>	
	Disco – PU_S <i>scaffold</i>	

4.5.4. Avaliação de vida/morte celular

Determinação da viabilidade celular *in vitro* pelo ensaio de células vivas/mortas foi utilizada para avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade dos *scaffolds* PU lixiviado (PU_L) e scCO₂ (PU_S) (Figura 4.7).

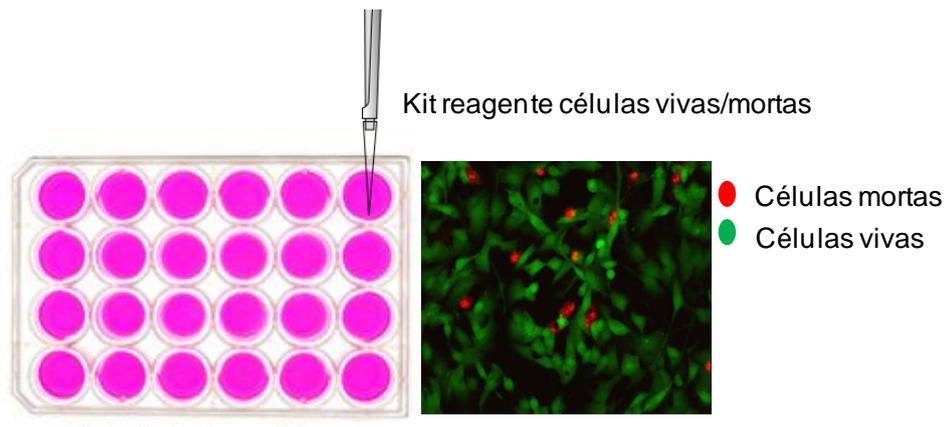


Figura 4.7. Ensaio de determinação de células vivas/mortas.

As células hFB, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, foram plaqueadas sob os *scaffolds* adicionados previamente nas placas de 24 poços e mantidas por 24, 48 e 72 horas (Quadro 4.5).

Quadro 4.5. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios de células vivas/mortas.

Linhagem Celular	Tratamento	Tempo
hFB	Controle - Sem <i>scaffold</i>	24, 48, 72 h
	Disco – PU_L <i>scaffold</i>	
	Disco – PU_S <i>scaffold</i>	

Após a utilização do kit de reagente células vivas/mortas e após os tempos específicos as células foram lavadas com PBS e coradas com calceína. A análise da viabilidade celular foi avaliada por microscópio invertido fluorescência com ensaio de viabilidade celular (Thermo Fischer Scientific). Esse procedimento também empregado por Gabriel e colaboradores (2017).

4.5.5. Morfologia celular

As células hFB foram plaqueadas, com densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, no meio dos discos de *scaffolds* adicionadas previamente em placas de 24 poços e incubadas por 14 dias (Quadro 4.6).

Quadro 4.6. Linhagem celular, tratamento e tempo utilizadas nos ensaios de morfologia celular.

Linhagem Celular	Tratamento	Tempo
hFB	Controle - Sem <i>scaffold</i>	14 dias
	Disco – PU_L <i>scaffold</i>	
	Disco – PU_S <i>scaffold</i>	

Depois deste período (14 dias), as células foram lavadas com PBS e fixadas por 30 minutos com formaldeído 4%, para em seguida serem permeabilizadas com 0,1% de Triton™-X-100 por 10 minutos. Na sequência, as células foram coradas com solução contendo 5 µg/mL Phalloidin-FITC (Sigma-Aldrich®) e 10 µg/mL de solução de 4,6 -diamidino-2-fenilindol dihidroclorato (DAPI, Sigma-Aldrich). As análises da morfologia celular foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX43.

4.5.6. Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média ± erro padrão da média e as análises estatísticas dos ensaios *in vitro* foram realizadas através do teste t de *Student* ou por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo post-hoc de Tukey (Prims GraphPAD® 7.0) este último também

utilizado nos dados de ensaio mecânico. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo estão apresentados os resultados de caracterização do poliuretano sintetizado a partir de policarbonato diol e do diisocianato H₁₂MDI, bem como caracterizações e ensaios *in vitro* dos *scaffolds* obtidos pela técnica de lixiviação (PU_L) e por inversão de fase de CO₂ supercrítico (PU_S).

5.1. Caracterização do poliuretano sintetizado

O poliuretano sintetizado apresentou M_w= 195.170 g/mol e Mn=115.109 g/mol e polidispersividade de 1.9. O PU foi inicialmente caracterizado pela técnica de espectroscopia de infravermelho, a qual possibilitou a identificação e determinação dos grupos funcionais confirmando a síntese do poliuretano. A Figura 5.1 apresenta um espectro típico do PU, onde observa-se as bandas de absorção vibracional características dos PU. A Tabela 5.1 apresenta as atribuições correspondentes a estas bandas características.

Tabela 5.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do poliuretano sintetizado.

	Nº onda (cm ⁻¹)	Atribuições	
Poliuretano	3373	vs N-H	Uretano
	2936-2859	vs,as C-H	CH ₂
	1716-1738	v C=O	Uret./Poliol
	1403-1520	v CO-O	Poliol
	1100-1035	vC-O	Poliol

Legenda: v- deformação axial, as- assimétrico, s- simétrico, δ- deformação angular no plano.

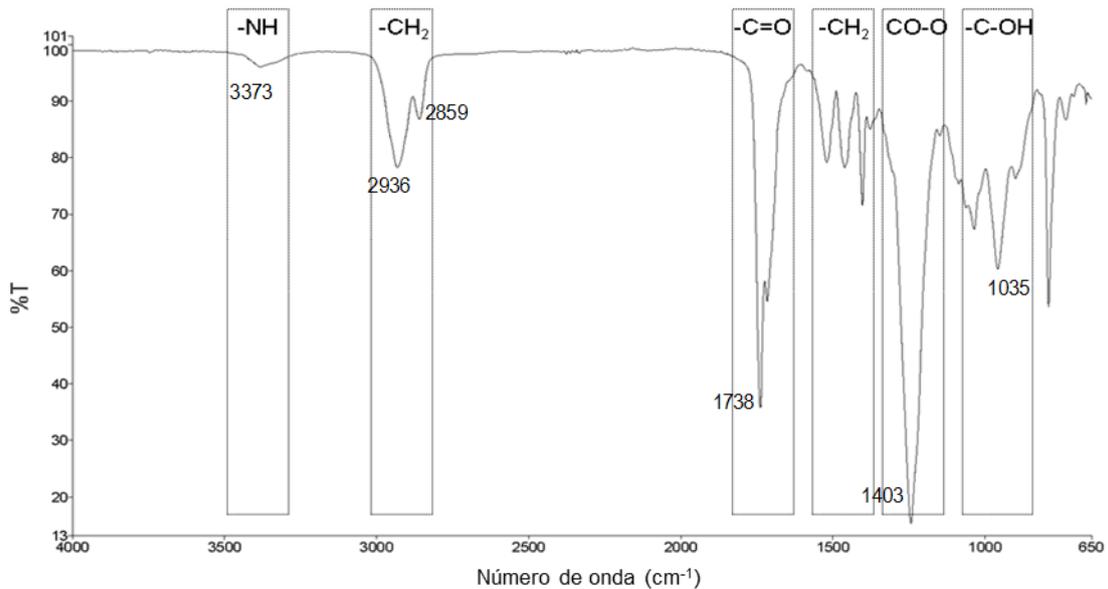


Figura 5.1. Espectros de infravermelho da amostra de PU e suas atribuições respectivamente.

As bandas de absorção observadas em torno de $3373\text{-}3470\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao grupo NH. As ligações de hidrogênio pertencentes ao grupo uretano foram observadas bandas entre $2936\text{-}2859\text{ cm}^{-1}$, característica, respectivamente, do estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 do policarbonato diol e do hexanodiol (ZHU et al., 2016). É possível notar uma forte banda em torno de $1716\text{-}1738\text{ cm}^{-1}$ atribuída ao grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) presente no grupo uretano do PU formado (NHCOO) e no grupo carbonato do polioliol, conforme já descrito na literatura (GUBANSKA; SKWARSKA, 2017). A banda entre $1403\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ é característica da deformação assimétrica da ligação CH_2 , a banda em torno de $1240\text{-}1246\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento assimétrico do grupo CO-O observada na estrutura do policarbonato, como também, a banda entre $1100\text{-}1035\text{ cm}^{-1}$ característica da ligação C-OH (GRACIOLI, 2016; JAVAID et al., 2019).

O estudo do espectro de infravermelho foi realizado por Javaid e colaboradores (2019) a fim de identificar os sinais correspondentes à formação de poliuretano sintetizado a partir de diferentes diisocianatos e butanodiol, revestido com quitosana para possível aplicação em engenharia de tecidos, o trabalho destaca que a região de 3356 cm^{-1} no espectro de infravermelho do poliuretano é atribuída à formação da ligação uretânica, enquanto que o pico em torno de 1730 cm^{-1} indica o grupo carbonila da região uretânica (JAVAID et al., 2019), no

espectro apresentado na Figura 5.1 o pico referente à carbonila é mais acentuado devido à sobreposição da carbonila derivada do policarbonato diol.

Zhu e colaboradores 2016 sintetizaram *scaffold* de poliuretano sintetizado a partir do poliol policarbonato combinado com outros dióis, os resultados de infravermelho do PU com policarbonato diol apresentaram bandas semelhantes aos apresentados na Figura 5.1 (ZHU et al., 2016).

Vale a pena ressaltar que, durante a síntese foram realizadas análise de IV, a fim de acompanhar a banda em torno de 2260 cm^{-1} correspondente ao NCO livre (diisocianato), Javaid e colaboradores (2019), mostraram claramente o desaparecimento da banda em torno de 2250 cm^{-1} referente ao NCO livre do isocianato e o aparecimento do pico na região de 3340 cm^{-1} atribuído à ligação uretânica (JAVAID et al., 2019). No espectro final do poliuretano sintetizado neste trabalho, este pico correspondente ao NCO livre não é mais observado confirmando claramente a completude da reação de polimerização.

O espectro de RMN- ^1H do poliuretano sintetizado está representado na Figura 5.2.

O espectro de RMN- ^1H do PU representado na Figura 5.2 apresenta com os sinais característicos do polímero. Isto indica que o polímero foi obtido com significativo grau de pureza, pois não são observados sinais relativos aos monômeros de partida ou contaminantes.

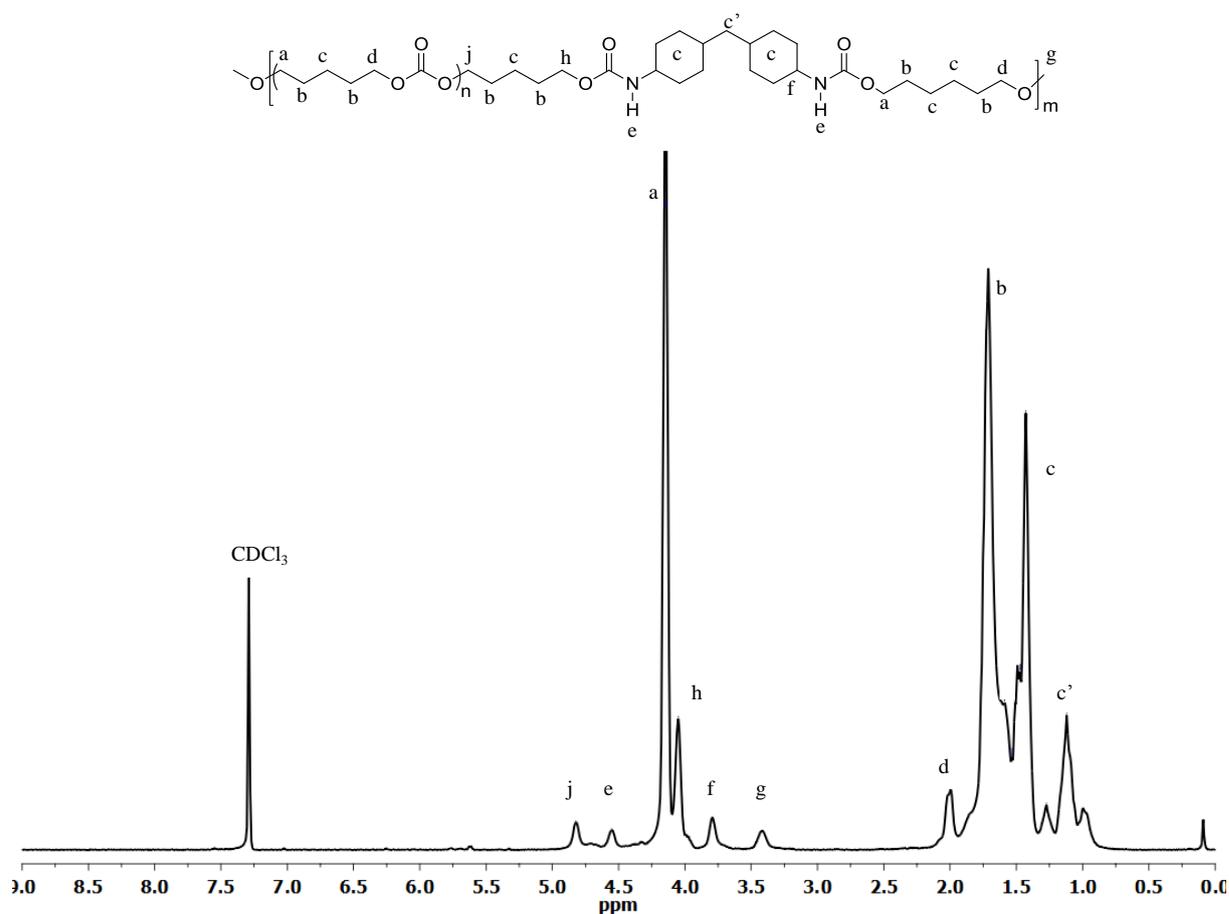


Figura 5.2. Espectro de RMN ^1H do poliuretano dissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

A estrutura química do polímero apresenta grupos metilenos, $-\text{CH}_2-$ (indicado pelas letras b, c, c' e d no espectro da Fig. 5.2.) do diisocianato, poliálcool e do extensor de cadeia (hexanodiol), cujos hidrogênios geram sinais entre 1.24 e 1.49 ppm. O hidrogênio do grupo metino, $-\text{CH}-$ (letra f do espectro da Fig. 5.2.) apresenta um sinal em 3.54 ppm referente ao diisocianato, como descrito na literatura (CHAN-CHAN et al., 2010; GRACIOLI, 2016; HU et al., 2009). Além disso, o hidrogênio do grupo uretano, $-\text{NHCO}-$ (letra e no espectro da Fig. 5.2) apresenta um sinal em 4.55 ppm, também evidenciado por Chan-Chan e colaboradores (2010).

As atribuições descritas para o PU sintetizado neste trabalho estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura. Oh e colaboradores (2015) sintetizaram um poliuretano de baixa massa molar partindo de hexametileno diisocianato (HDI) e combinação de policarbonato diol e isossorbida, os deslocamentos químicos dos

hidrogênios dos grupos metilenos($-\text{CH}_2-$) da estrutura do policarbonato diol foram observadas a 1.65, 1.55, 4.70 ppm (OH et al., 2015). No espectro da Figura 5.2 observa-se o deslocamento químicos dos grupos metilenos (da estrutura do policarbonato diol e hexano diol no PU) destaca-se o hidrogênio da ligação $\text{O}-\text{CH}_2$ (policarbonato diol) indicado na letra “j” com deslocamento químico 4.70 ppm, semelhante ao relatado por OH e colaboradores (2015).

Os hidrogênios do grupo $\text{H}_2\text{C}-\text{O}-$ (letras “h” e “a” do espectro da Fig. 5.2), vizinhos aos grupamentos uretânicos foram observados em 4.05 e 4.15 ppm, o que confirma a formação de ligações de uretano conforme já relatado na literatura (BASTERRETXEA et al., 2016; GRACIOLI, 2016; JAVAID et al., 2019).

5.2. Caracterização dos *scaffolds* de poliuretano (PU)

5.2.1. Morfologia e tamanho de poros

As características morfológicas do filme de PU denso e dos *scaffolds* de PU preparados pelos processos de lixiviação (PU_L) e por scCO_2 (PU_S) foram comparados, bem como a avaliação das propriedades mecânicas, térmicas, e de biocompatibilidade dos *scaffolds*.

O filme denso de PU, é um filme transparente e não apresenta poros como é possível observar nas imagens obtidas por microscopia eletrônica na Figura 5.3. O filme de PU denso foi utilizado apenas para fins comparativos com os *scaffolds* obtidos por lixiviação (PU_L) e por scCO_2 (PU_S) quanto a aparência. Como mostra a Figura 5.4, os *scaffolds* PU_L e PU_S possuem aparências bem diferentes, no *scaffold* PU_L, os poros na superfície estão mais visíveis quando comparado ao *scaffold* no PU_L mostrando um perfil esponjoso, enquanto o PU_S apresenta-se como uma membrana com superfície mais uniforme. Estas diferenças estão associadas ao tipo de técnica utilizada para obtenção *scaffold* mesmo partindo-se do mesmo polímero.

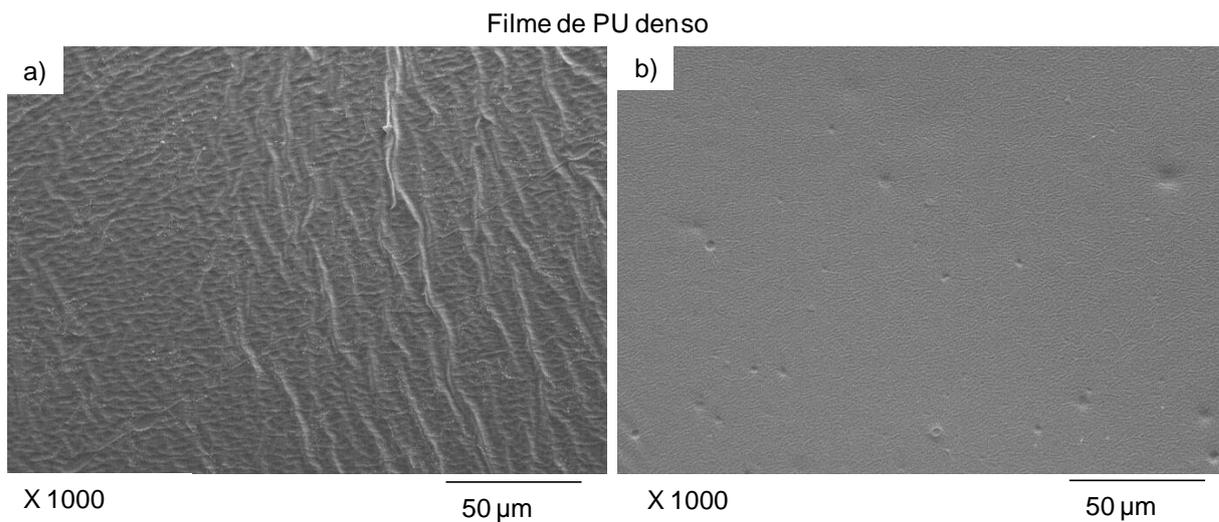


Figura 5.3. Micrografias do filme de PU denso e dos *scaffolds* de PU_L (a) parte superior; b) parte inferior.

Os fatores que influenciam diretamente a formação de poros na técnica de lixiviação para obtenção de *scaffold* são a secagem e tratamento térmico (quando feito), tamanho e formato do grão do agente porogênico (SOLA et al., 2019; TURNBULL et al., 2018). Contudo, mesmo com a secagem, tratamento térmico e peneiramento das partículas do sal, a formação de aglomerados dos grãos resulta na formação de poros com tamanhos maiores do que aqueles, característicos do grão do sal (SAVARIS et al., 2019; SOLA et al., 2019). Como mostram Sola e colaboradores (2019) para obtenção de *scaffolds* de PU e PMMA que imitam o microambiente da medula óssea, foi utilizado o sal NaCl depois de secos e com tamanho de grão abaixo de 1000 μ m, como resultado o tamanho dos poros dos *scaffolds* variou de 354 a 1250 μ m, os poros maiores que 1000 μ m são atribuídos a provável aglomeração de grãos do sal (SOLA et al., 2019).

Enquanto que na técnica de inversão de fase por dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) o tempo de despressurização da célula de alta pressão exerce influência direta no tamanho e produção dos poros. A despressurização mais lenta (acima de 10 min) produz *scaffolds* com poros mais ordenados e de tamanho uniforme. O tempo e tamanho do poro dependem diretamente do tipo de matriz polimérica utilizada na obtenção do *scaffold* (GOIMIL et al., 2019; MORGADO et al., 2014; TEMTEM et al., 2009).

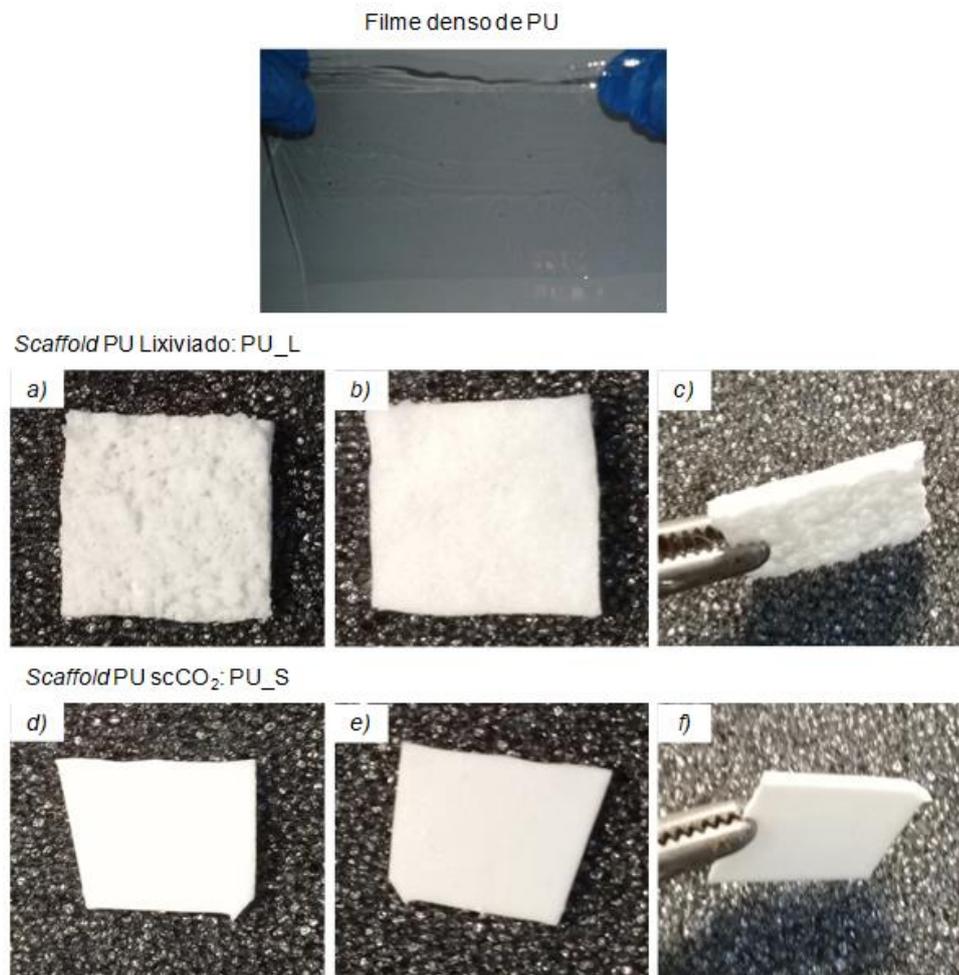


Figura 5.4. Imagens do filme de PU denso e dos scaffolds de PU_L (a) parte superior; b) parte inferior; c) transversal) e PU_S (d) parte superior; e) parte inferior; f) transversal).

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das superfícies superior e inferior dos *scaffolds* PU_L e PU_S são apresentadas na Figura 5.5. Os *scaffolds* sofreram fraturas criogênicas para análise da região interna, poros e interconexões dos *scaffolds* (Figura 5.6).

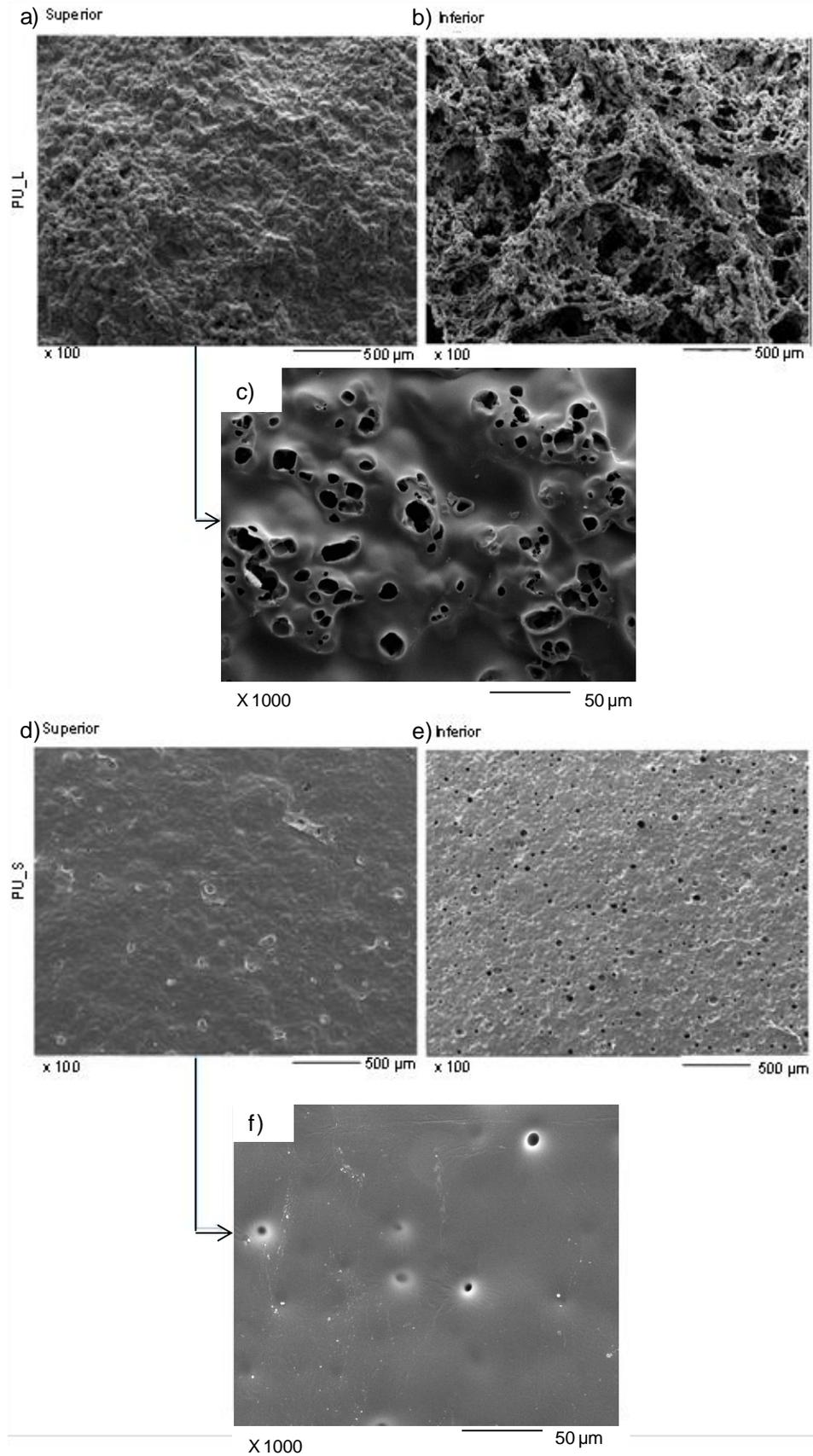


Figura 5.5. Micrografias da parte superior e inferior dos *scaffolds* de PU_L: a) superior 100x e c) 1000x – b) inferior 100x e de PU_S: d) superior 100x e f) 1000x – e) inferior 100x.

O tamanho dos poros na superfície superior dos *scaffolds* ficou entre 9 – 58 μm para o PU_L e entre 20 – 44 μm para o *scaffold* PU_S. Enquanto na superfície inferior dos *scaffolds* o tamanho dos poros ficou entre de 20 – 276 μm para PU_L e entre 10 -70 μm para PU_S. Os poros obtidos na parte superior dos *scaffolds* foram menores daqueles obtidos na parte inferior para ambos *scaffolds*, devido ao pouco contato de passagem de gás nessa superfície que fica em contato com a placa. Na Figura 5.5. b e e. é possível observar esse perfil com maior porosidade e poros maiores na face inferior dos *scaffold*, devido à forte aderência da mistura seca da matriz polimérica com o sal na placa de Petri durante a técnica de lixiviação e pela passagem do fluido supercrítico através da placa porosa no processo de scCO₂. Ambos *scaffolds*, PU_L e PU_S, apresentaram na superfície superior (parte sem contato com a placa) porosidade reduzida (Fig. 5.5 a; c. e d; f.).

Nas Figuras 5.5d.e 5.5.e observa-se os poros maiores produzidos na lixiviação do sal no *scaffold* PU_L, este comportamento ocorre possivelmente devido ao empilhamento dos cristais de sal, característica já relatada na literatura no processo de lixiviação com uso de NaCl (BARBANTI et al., 2008; JANIK et al., 2015; MI et al., 2015). Este aspecto também é observado na Figura 5.6 onde o *scaffold* apresenta uma aparência altamente porosa similar a formação de espuma.

As micrografias do corte transversal dos *scaffolds* estão apresentadas na Figura 5.6, onde é possível observar que há maior concentração de poros interconectados ao longo da cavidade interna do *scaffold* PU_S, enquanto no PU_L os poros estão dispersos por todo o *scaffold*.

A interconectividade e dispersão de poros obtidos nos *scaffolds* PU_L e PU_S são fundamentais para que ocorra uma efetiva e eficiente interação celular e passagem de fluidos e nutrientes no processo de adesão e crescimento celular. A estrutura dos *scaffolds* poliméricos para engenharia de tecidos deve ser dotada de uma arquitetura interna complexa e com porosidade, o que favorece locais para fixação das células e a diferenciação, sem impedir a proliferação (HOSSEINKHANI et al., 2014).

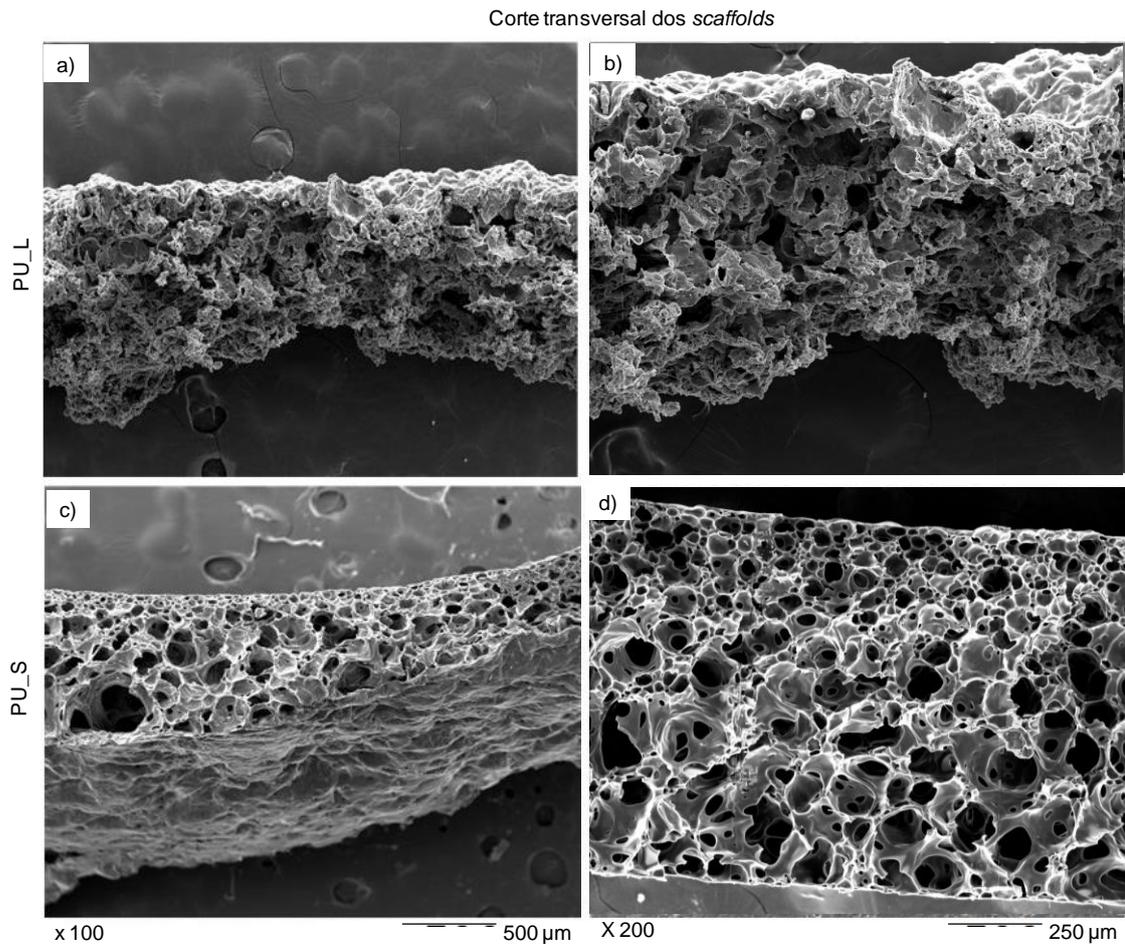


Figura 5.6. Micrografias da secção transversal dos *scaffolds* de: PU_L: a) 100x; b) 200x e PU_S: c)100x; d) 200x.

O *scaffold* PU_L possui uma espessura média de 1,11 mm e poros interno com tamanho entre 10-276 μm dispersos de forma heterogênea em todo o interior da matriz (Figura 5.6 a e b). Enquanto, o *scaffold* PU_S apresentou uma espessura média de 1,09 mm, similar ao apresentado PU_L e, poros na região interna do *scaffold* dispersos de maneira assimétrica, uma região com poros de menor tamanho (entre 9-48 μm) que estão mais aglomerados acima de uma região com poros maiores (101-151 μm) e dispersos (Figura 5.6 c e d). Essa organização dos poros no interior da matriz (poros menores na parte superior e maiores na parte inferior) observada no *scaffold* PU_S obtido por inversão de fase assistida por CO_2 supercrítico. Morgado e colaboradores (2014) também observaram esse mesmo comportamento na preparação de membranas a partir de poli(álcool vinílico), PVA, com a técnica de scCO_2 para uso como curativos de pele (LOH e CHOONG, 2013; MORGADO et al., 2014).

A Figura 5.7 apresenta a distribuição de tamanho dos poros da secção transversal (Fig. 5.6) dos *scaffolds* produzidos por lixiviação e por scCO₂.

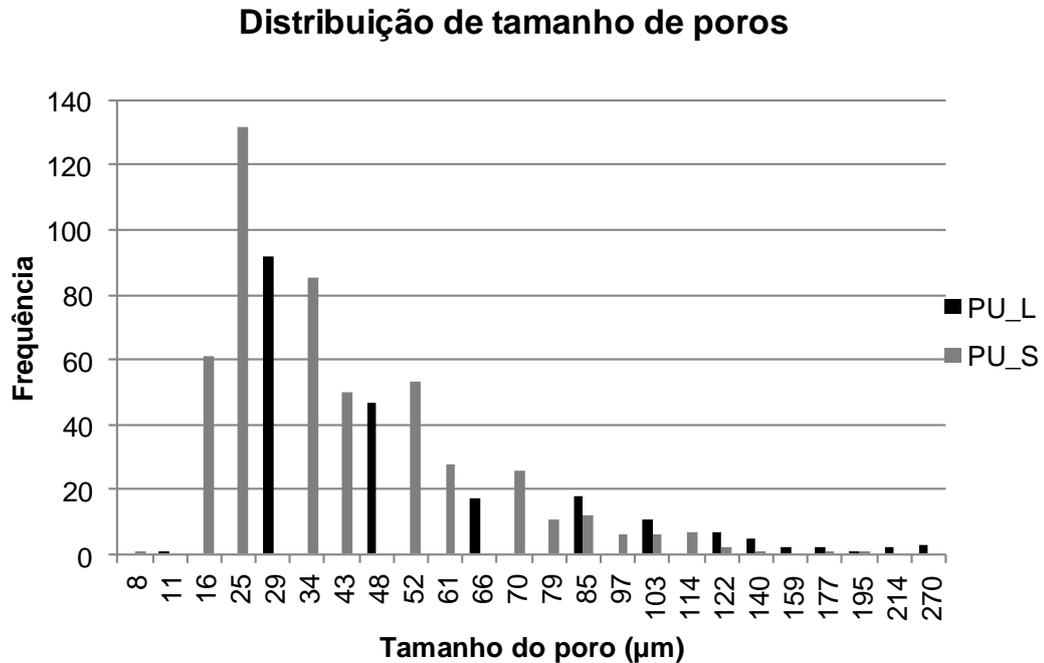


Figura 5.7. Distribuição do tamanho dos poros dos *scaffolds* PU_L e PU_S.

É possível observar que para ambos *scaffolds* (PU_L e PU_S) o maior percentual de poros encontra-se na faixa de 16 – 60 µm. Esta faixa é citada na literatura como ótima para o crescimento de fibroblastos e osteoblastos em estágio inicial (CUNNINGHAM; DUNNE, 2012; TRAUTMANN et al., 2018; ZULKIFLI et al., 2019). Zulkifli e colaboradores (2019) prepararam *scaffolds* a partir de compósito de celulose e PVA com tamanho de poros entre 20 a 40 µm para uso na proliferação celular de fibroblastos, os resultados do estudo *in vitro* mostraram significativa interação celular e excelente proliferação (ZULKIFLI et al., 2019).

A Tabela 5.2 apresenta as faixas de tamanho de poros ideais em relação a diferentes tipos de células ou tecidos.

Tabela 4.2. Faixas de tamanho de poros ideais e respectivos tipos de células ou tecidos.

Células ou tecidos	Faixa de tamanho de poros (µm)	Referências
Fibroblastos	5-15 / 10-60 / 20- 125	(CUNNINGHAM; DUNNE, 2012; ZULKIFLI et al., 2019)
Regeneração celular	40 - 200	(SAVARIS et al., 2019)
Osteoblastos	5 – 50 (em crescimento) 100-350	(BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006; CUNNINGHAM; DUNNE, 2012)
Neovascularização	5-50	(BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006; SAVARIS et al., 2019)
Capilar	200-300	BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006; SAVARIS et al., 2019)
Hepatócitos	Aprox. 20	BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006; SAVARIS et al., 2019)

O tamanho médio dos poros foi de 64 µm para o *scaffolds* PU_L e 42 µm para o PU_S, indicando que ambos *scaffolds* podem ser empregados como suporte de proliferação de fibroblastos, regeneração celular, e o início do estágio de crescimento de osteoblastos (Tab. 5.2). No entanto, ambos *scaffolds* também possuem poros acima de 100 µm o que permite a utilização para proliferação de osteoblastos e células capilares (Tab. 5.2).

No trabalho desenvolvido por Sin e colaboradores (2010) foi obtido *scaffold* de poliuretano (PU), advindo de fonte comercial não informada, a partir de evaporação de solvente e lixiviação de partículas. As matrizes lixiviadas apresentaram uma morfologia porosa, com maior tamanho de poros (7 – 30 µm). Segundo os autores essa é uma característica adequada para fixação celular e para matrizes extracelulares, promovendo o crescimento celular de forma orientada (SIN et al., 2010). Similarmente, é possível sugerir que ambos *scaffolds* obtidos PU_L e PU_S apresentaram porosidade e tamanho de poros adequados para aplicação em engenharia de tecidos.

A microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para estudar as características topográficas da superfície, bem como a rugosidade dos *scaffolds* de PU desenvolvidos neste trabalho, investigando a influência das técnicas de lixiviação

e por dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) nas nessas características. As micrografias de AFM estão apresentadas na Figura 5.8.

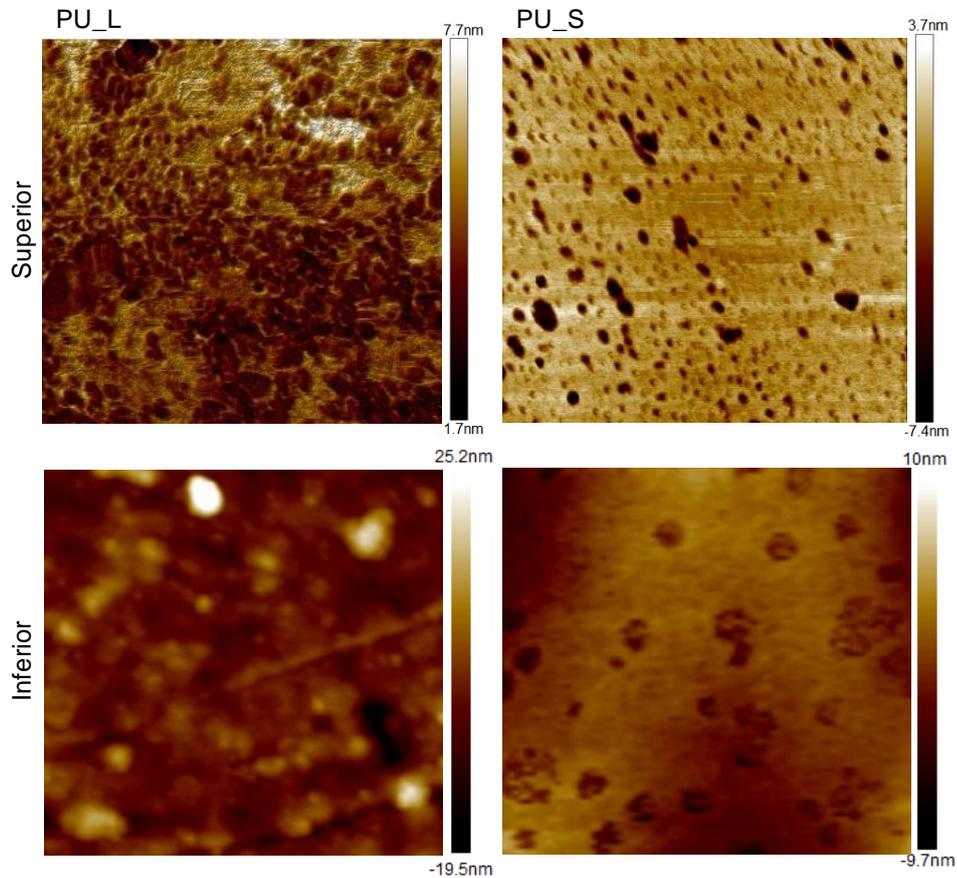


Figura 5.8. Imagens obtidas por AFM dos *scaffolds* PU_L e PU_S.

As imagens obtidas por AFM (Figura 5.8) indicam menor porosidade em ambos *scaffolds* na parte superior (sem contato com a placa durante a preparação) quando comparado com a parte inferior. No entanto, a parte inferior dos *scaffolds* apresentam características diferentes, enquanto a PU_L apresenta rugosidade e distribuição de poros heterogêneos, a ponto de não haver imagens nítidas e o PU_S apresenta morfologia mais homogênea.

A rugosidade do PU_L foi consideravelmente maior do que a rugosidade do PU_S. Para o *scaffolds* PU_L a rugosidade da parte superior foi de $5,26 \mu\text{m}$ (σ : 0,65) e da parte inferior $7,81 \mu\text{m}$ (σ : 0,65). Já para o PU_S, ambas as partes superior e inferior, apresentaram rugosidades semelhantes (superior $0,37 \mu\text{m}$ (σ : 0,02); inferior $0,45 \mu\text{m}$ (σ : 0,08)).

No trabalho de Toloue e colaboradores (2019), *scaffolds* produzidos a partir de poli(hidroxibutirato), PHB, pela técnica de eletrofição, apresentaram rugosidade média acima de 346 nm. Estudos anteriores revelaram que osteoblastos, fibroblastos, células musculares lisas e endoteliais parecem responder melhor à rugosidade superficial em escala nanométrica (PRICE; HABERSTROH; WEBSTER, 2003; TOLOUE et al., 2019).

Torres e colaboradores (2014) preparam membranas com policaprolactona (por lixiviação/jateamento de areia) e estudaram o efeito da rugosidade na diferenciação e proliferação de células tronco mesenquimais osteogênica. As membranas que apresentaram boa compatibilidade e proliferação, bem como diferenciação celular, tiveram rugosidades superficiais entre 2,1 a 5 µm (FAIA-TORRES et al., 2014).

Segundo Zhu e colaboradores (2016) as propriedades das superfícies dos *scaffolds*, em especial a rugosidade, influenciam diretamente a interação entre o *scaffold* e fluido corpóreo (ZHU et al., 2016). Os *scaffolds* PU_L e PU_S apresentam rugosidades adequadas para aplicação na engenharia de tecidos, no qual o perfil de rugosidade do PU_L mostrou-se próprio para cultivo de células tronco mesenquimais, enquanto *scaffold* PU-S mostrou-se interessante para o cultivo de células de tecidos macios.

5.2.2. Propriedades térmicas e mecânicas

A estabilidade térmica dos *scaffolds* e a determinação do valor da temperatura de transição vítrea (T_g) foram avaliadas pelas técnicas de TGA e DSC (Figura 5.9 e Tabela 5.3). Para identificar possíveis influências das técnicas empregadas para obtenção dos *scaffolds* (lixiviação e $scCO_2$) foi realizado a análise do filme de PU denso (PU) para comparação dos eventos térmicos com os *scaffolds* de PU_L e PU_S.

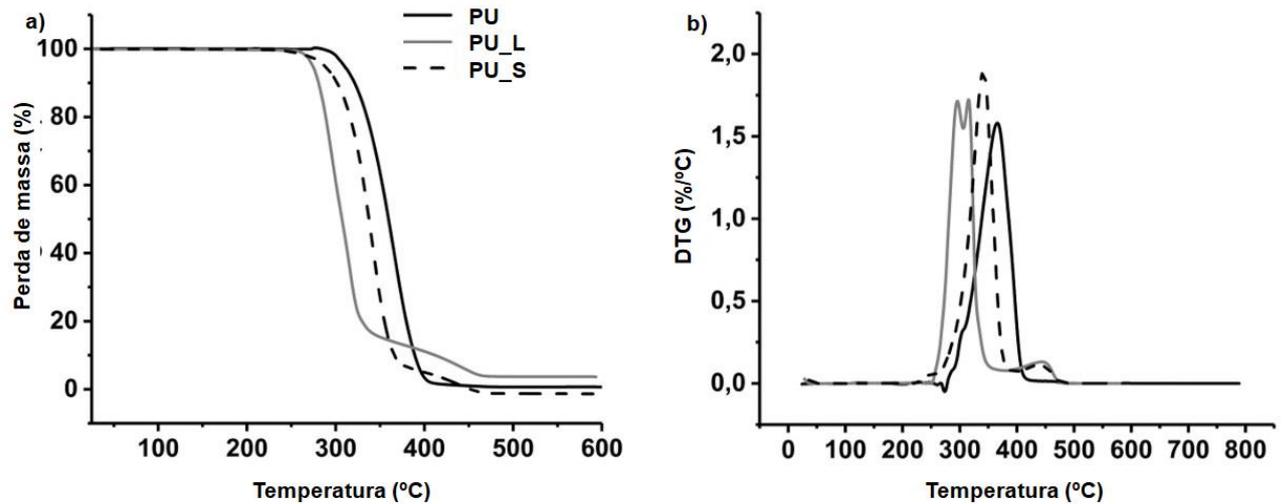


Figura 5.9. Perfil do comportamento térmico dos *scaffolds*. a) TGA; b) DTG.

Tabela 5.3. Temperatura inicial (T_i) e final de decomposição (T_f) das 1ª e 2ª etapas, temperatura de pico (T_{pico}), % de perda de massa e temperatura de transição vítrea (T_g) para os *scaffolds* e PU denso.

Material	1ª etapa			2ª etapa			Perda de massa (%)	T_g (°C)
	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_f (°C)	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_f (°C)		
PU denso	324	390	437	-	-	-	96,5	3,9
PU_L	277	307	355	355	451	480	95,3	- 4,8
PU_S	315	341	390	390	443	477	97,7	-1,9

Os poliuretanos apresentam, em geral, degradação térmica, em duas etapas onde o primeiro evento está relacionado aos segmentos rígidos derivados dos grupos uretano e o segundo evento resultante da decomposição dos segmentos flexíveis atribuídos ao poliól, que exibe maior estabilidade térmica (KRÓL et al., 2018; SAVARIS et al., 2019). Pela análise dos resultados da Figura 5.9 verificou-se que para o filme de PU (PU denso) a degradação apresentou um mecanismo em uma etapa, com temperatura inicial de 324 °C e final de 437 °C. Enquanto que para os *scaffolds* PU_L e PU_S, a degradação ocorreu basicamente em duas etapas verificadas na curva termogravimétrica derivada (DTG), em que a primeira etapa ocorreu entre 277 - 355 °C e, a segunda entre 355 - 380 °C para o PU_L e, para PU_S o primeiro evento ocorreu entre 315 - 390 °C e a segunda entre 390 - 477 °C. Esses eventos correspondem à decomposição dos segmentos rígidos e flexíveis, respectivamente (GRACIOLI et al., 2013; KRÓL et al., 2018; SAVARIS et al., 2019). O perfil de decomposição do PU_L mostra uma pequena divisão no primeiro pico da

DTG, resultando em 3 picos na curva, segundo a literatura quando a taxa de aquecimento é baixa, podem ser observados mais de dois picos na curva de DTG, indicativo da complexidade da degradação do polímero (SAVARIS et al., 2019).

O perfil das temperaturas dos eventos térmicos dos *scaffolds* PU_L e PU_S está de acordo com a literatura (GRACIOLI, 2016; JIANG et al., 2019; SAVARIS et al., 2019). A análise dos eventos térmicos do *scaffold* de PU/PDLLA desenvolvido por Savaris e colaboradores (2019) apresentaram três eventos térmicos entre 332 - 406 °C, representando 95% de massa total (SAVARIS et al., 2019). Gracioli (2016) sintetizou um PU (baseado em policaprolactona diol e mistura de H₁₂MDI/HDI) que apresentou eventos térmicos de decomposição em duas etapas entre 221 – 374 °C com perda de massa de 93% (GRACIOLI, 2016).

Esse comportamento de decomposição em mais de uma etapa, indica que os segmentos rígidos são mais suscetíveis à clivagem *via* térmica do que as ligações éster nos segmentos flexíveis (JIANG et al., 2019).

Quando comparados com PU denso, ambos os *scaffolds*, PU_L e PU_S, apresentaram bons resultados, ambos apresentam temperatura inicial de degradação menor que o PU denso. Além disso, o PU_L apresenta a temperatura inicial de degradação mais baixa. A diferença de temperaturas de degradação inicial pode estar relacionada à dispersão dos poros na matriz. No *scaffold* PU_S os poros maiores estão concentrados na parte inferior e os menores aglomerados na parte superior, enquanto no *scaffold* PU_L os poros estão dispersos por toda a matriz. É possível sugerir que a condução da energia térmica é facilitada nos *scaffolds* com poros maiores e distribuídos por toda matriz.

Gabriel e colaboradores (2017) desenvolveram *scaffold* de poliuretano (comercial), geralmente utilizado para engenharia de tecidos (preparado a partir de poli(tetrametilenoglicol, hexametileno diisocianato e butanodiol), a análise de TGA/DTG do poliuretano mostram duas etapas de perda de massa, onde o primeiro evento ocorreu de 254 a 403 °C e o segundo de 403 a 487 °C, os autores destacam que a faixa de temperatura de degradação é ideal para processos como a esterilização (GABRIEL et al., 2017a). Nesse contexto, é possível afirmar que os

scaffolds PU_L e PU_S, ainda com perfis diferentes de temperaturas, estão dentro do ideal para processos de esterilização sob altas temperaturas.

O polímero PU utilizado neste trabalho é amorfo, possuindo apenas a temperatura da transição vítrea (T_g) (Tabela 5.3). Um poliuretano com estrutura amorfa apresenta melhor perfil de degradação, são mais suscetíveis ao fluido corpóreo, para aplicações em engenharia de tecidos do que um poliuretano semicristalino. (GUBANSKA; SKWARSKA, 2017; RUIZ et al., 2014).

Mesmo que os *scaffolds* não sejam destinados a suportar grandes cargas, suas propriedades mecânicas são relevantes, porque os *scaffolds* devem ser fáceis de manusear. Além disso, a literatura destaca que as propriedades mecânicas influenciam a interação inter e intracelular, o crescimento e a mobilidade celular e a resposta a estímulos ou inibidores (RIJAL; LI, 2016; SOLA et al., 2019). Os *scaffolds* foram submetidos ao ensaio de tração quando secos e depois de 8 horas imersos em solução tampão fosfato pH 7.4 (Figura 5.10 e Tabela 5.4).

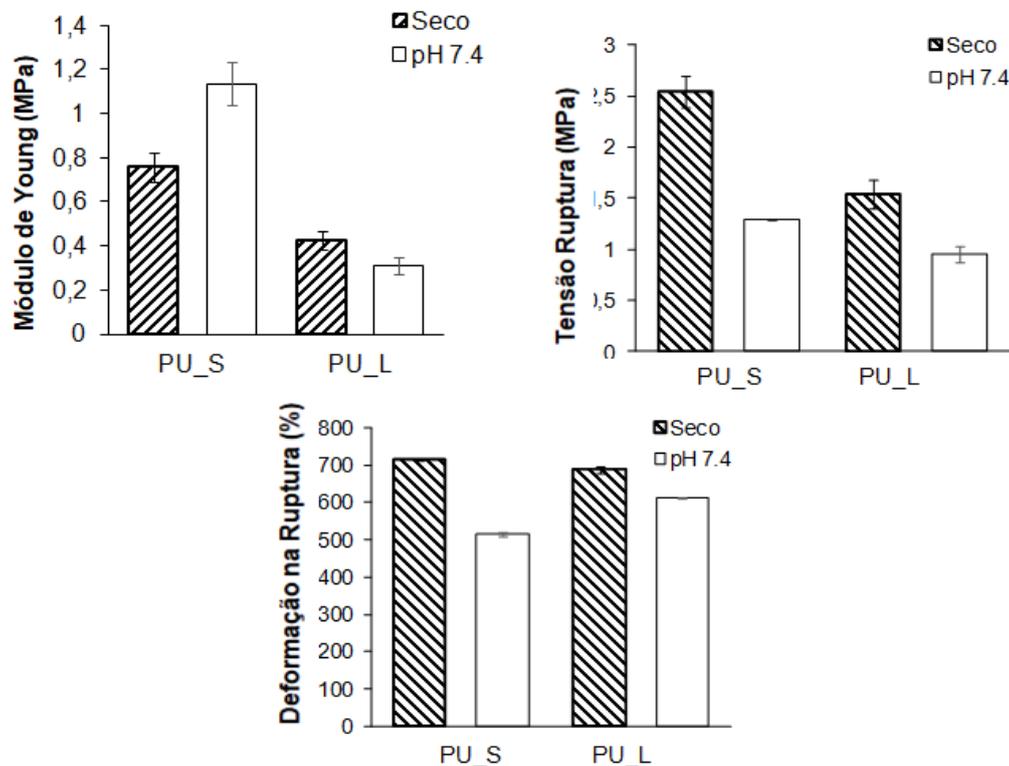


Figura 5.10. Propriedades mecânicas dos *scaffolds* PU_L e PU_S em diferentes condições ambientais (seco e úmido com PBS (pH 7.4)).

Tabela 5.4. Valores de Módulo de Young (MPa), Tensão na ruptura (MPa) e Deformação na ruptura (%) obtidos no ensaio de tração dos *scaffolds* PU_L e PU_S, em diferentes condições ambientais:

<i>Scaffold</i>	Módulo de Young (MPa)		Tensão na Ruptura (MPa)		Deformação na Ruptura (%)	
	Seco	pH 7.4	Seco	pH 7.4	Seco	pH 7.4
PU_L	0,42	0,31	1,53	0,95	687	612
PU_S	0,75	1,13	2,54	1,29	715	515

Observou-se que, em condições de seco, o *scaffold* PU_S (módulo de Young de $0,75 \pm 0,06$ MPa) apresentou melhor resistência mecânica comparado ao PU_L ($0,42 \pm 0,04$ MPa). Após 8h em contato com PBS, os mesmos tiveram comportamento distinto dos módulos de Young, houve um aumento no módulo para o PU_S ($1,13 \pm 0,09$ MPa), enquanto que para o PU_L ocorreu uma pequena diminuição ($0,31 \pm 0,03$ MPa). Contudo o módulo de Young do *scaffold* PU_S mostra um aumento, na condição de úmido, em relação ao ensaio quando seco. Não há relatos sobre esse comportamento na literatura, porém uma provável explicação é que a amostra selecionada para esse ensaio poderia conter menos poros distribuídos na matriz do que a amostra usada no ensaio à seco, uma vez que o módulo de Young é inversamente proporcional à porosidade, além disso a diferença entre os módulos é de 0,38 MPa considerada pequena.

A tensão na ruptura dos *scaffolds*, quando secos, foi maior para o PU_S (2,54 Mpa) comparado ao PU_L (1,53 MPa), entretanto quando úmidos, os *scaffolds* apresentaram tensões próximas (1,19 MPa para o PU_S e 1,01 MPa para o PU_L). A deformação na ruptura foi semelhante para ambos *scaffolds* quando secos ($715 \pm 2\%$ e $687 \pm 9\%$ para PU_S e PU_L, respectivamente). Quando úmidos, o *scaffold* PU_L apresentou maior deformação ($612 \pm 2\%$) comparado ao PU_S ($515 \pm 4\%$).

Os resultados do ensaio de tração mostraram que ambos os *scaffolds* tem potencial de uso para diferentes aplicações na regeneração celular, como relatado por Mi e colaboradores (2018). Os autores descreveram a preparação de um *scaffold*, por lixiviação de sal, de PU (a partir de policaprolactona diol e hexametileno diisocianato – NCO/OH= 1,2) para regeneração de tecidos que sofram cargas e

tensões como vasos sanguíneos. O PU com propriedades de maior semelhança e melhor que os vasos sanguíneos nativos, apresentou módulo de Young de 0,350 MPa, tensão na ruptura de 0,290 MPa e deformação na ruptura de 79 % (MI et al., 2018). Os resultados dos *scaffolds* PU_S e, em especial, PU_L (obtido pela mesma técnica de lixiviação de Mi et al., 2018) apresentam maior resistência estando de acordo para um possível uso regeneração vascular. Wu e colaboradores (2019) produziram *scaffold* de policaprolactona e Pluronic (F17) para semear células fibroblásticas do tecido do esôfago humano, no qual apresentou valor de módulo de Young entre 1,31 – 2,30 MPa e tensão na ruptura de 1,08 – 2,9 MPa (WU et al., 2019). Estes valores são semelhantes aos obtidos pelos *scaffolds* de PU_L e PU_S, em ambas condições ambientais seco e úmido, o que indica que os *scaffolds* apresentam propriedades mecânicas adequadas para proliferação de fibroblastos.

Os *scaffolds* não apresentaram diferença considerável em suas propriedades mecânicas quando em meio pH=7.4. A resistência à tração dos *scaffolds* tendeu a diminuir quando em contato com solução PBS, ao passo que a elasticidade aumentou para PU_S, enquanto que para PU_L a variação não foi significativa. Este comportamento pode ser atribuído às diferenças no processamento e capacidade de inchamento (valores elevados para o PU_L) que pode causar aumento da perda na integridade estrutural e, conseqüentemente, diminuição da resistência mecânica (CHAPEKAR, 2000; LI et al., 2016).

Zhang (2006) sintetizou poliuretano a partir de policaprolactona (PCL) e difenilmetano diisocianato (MDI) para avaliar a capacidade do poliuretano como biomaterial na engenharia de tecidos nas condições seco e úmido em meio simulado corpóreo. O PU apresentou 500% de alongamento, em ambas condições, indicando que a alta elasticidade é importante para o uso do material na medicina regenerativa de, tanto para o crescimento celular como também para implantes e enxertos (ZHANG, 2006).

Os resultados de deformação na ruptura obtidos para ambos *scaffolds*, PU_L e PU_S, foram maiores (secos) ou semelhantes (úmidos) quando comparados ao trabalho de Zhang (2006), mostrando que estes *scaffolds* tem características mecânicas adequadas para uso como suportes na engenharia de tecidos.

5.2.3. Inchamento e degradação hidrolítica

A capacidade de inchamento e perfil de degradação hidrolítica dos *scaffolds* foi realizada por imersão em meio simulado corpóreo PBS (pH 7,4), como mostrado na Figura 5.11.

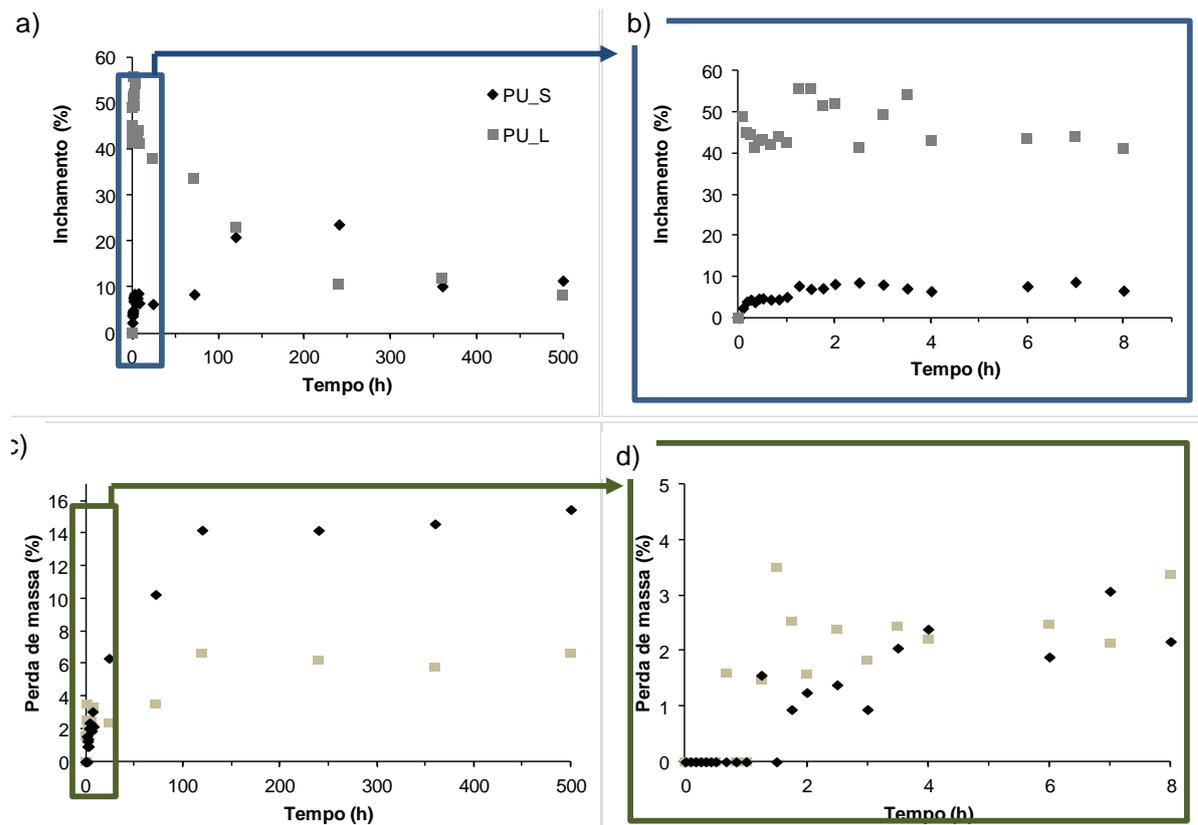


Figura 5.11. Ensaio de inchamento e degradação hidrolítica dos *scaffolds* PU_L e PU_S: a) Perfil de inchamento durante 500 h e b) Ampliação das primeiras 8h; c) perfil de perda de massa durante 500 h e d) Ampliação das primeiras 8 h.

O perfil de inchamento (Figura 5.11. a e b) foi constante no início do ensaio (até 8 h) para ambos os *scaffolds*. Porém o *scaffold* PU_L alcançou um inchamento de aproximadamente 50% neste tempo, enquanto o *scaffold* PU_S apresentou um inchamento de até 10% neste mesmo tempo (Figura 5.11. b). Por outro lado, o perfil de degradação, nas primeiras horas (Figura 5.11. d), foi semelhante em ambos os *scaffolds*, com pequena perda de massa (1 – 4%).

Estes resultados indicam que a técnica de obtenção dos *scaffolds* influencia significativamente no perfil de inchamento e degradação. Inicialmente, o *scaffold* de PU_L apresentou maior inchamento em comparação ao perfil de inchamento do *scaffold* do PU_S (Figura 5.11. b). Segundo a literatura, o perfil de inchamento de *scaffolds* poliméricos pode ser influenciado pela propriedade hidrofílica e pelo tamanho dos poros do material (HUYNH et al., 2019; MORONI, et al., 2005). Zulkifli e colaboradores (2019) realizaram ensaio de inchamento em *scaffolds* de hidroxietilcelulose e PVA para proliferação de fibroblastos. As amostras que apresentaram forma irregular e com maior grau de interconectividade de poros absorveram água mais rapidamente quando comparado aos outros *scaffolds* (ZULKIFLI et al., 2019).

Além disso, o PU_S exibiu um valor máximo de inchamento em torno de 25% (250 h), enquanto que o PU_L atingiu valor máximo de inchamento (59 %) nas primeiras 8 horas. Ao observar ao longo das 500 horas o poder de inchamento do PU_L é nitidamente maior que o PU_S provavelmente associado à sua rica morfologia em poros e galerias, uma vez que PU_L apresenta maiores interconexões que PU_S. No entanto, ao longo do tempo, observa-se que o fluxo do fluido simulado corpóreo para o interior dos *scaffolds* leva a um inchamento semelhante. O fluxo de fluidos pode causar alterações na estrutura do *scaffold*, indicando que o decaimento percentual de inchamento sugere que o material atingiu a capacidade máxima de inchamento, ocorrendo apenas degradação do material (CORREIA et al., 2015; LEBARON; ATHANASIOU, 2000; LI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

O perfil de degradação, representado em percentual de perda de massa (Figura 5.11. c e d), mostrou que o *scaffold* obtido pelo método supercrítico (PU_S) apresentou maior perda de massa (\cong 15%) quando comparada ao *scaffold* obtido pelo método de lixiviação (PU_L) (\cong 7%). Em 3 dias, o PU_L apresentou máxima degradação de 4% e PU_S de 11%. Após 5 dias, a degradação hidrolítica máxima foi de 7% para o PU_L e 15% para o PU_S. Nas primeiras horas de degradação o *scaffold* PU_S manteve-se mais estável quando comparado ao PU_L, comportamento que pode ser relacionado ao tamanho dos poros e dispersão dos poros na matriz, o PU_L mostra ter maior porosidade e interconectividade e assim a

taxa de difusão da água é facilitada. Por outro lado, o baixo percentual inicial de degradação do PU_S está relacionado ao perfil de inchamento que no mesmo período manteve-se com percentual abaixo de 5%. A estrutura porosa do *scaffold* PU_L ajudou na permanência da solução de PBS em sua superfície devido maior rugosidade e poros na superfície, fazendo com que o fluido simulado corpóreo permeasse através dos poros, o que explica o maior inchamento e degradação hidrolítica do PU_L. Por outro lado, o *scaffold* PU_S apresenta menos poros e menor rugosidade na superfície levando a um percentual de inchamento baixo. No entanto, a sorção do fluido simulado corpóreo por toda a estrutura é observada em ambos *scaffolds* (inchamento mais rápido para o PU_L e lento para PU_S), o que indica a permeação do meio celular nos *scaffolds* (ASSIS, 2005; SANTOS, 2010; WU et al., 2019).

Este comportamento dos perfis da degradação hidrolítica e inchamento já foram relatados na literatura de forma semelhante, as membranas e *scaffolds* de poliuretano tiveram uma rápida perda de peso inicial nos primeiros dias (GRACIOLI, 2016; WEN et al., 2019).

Gracioli (2016) preparou duas membranas de poliuretano (a partir de PCL diol e mistura de H₁₂MDI/HDI) impregnada com rapamicina para aplicação como enxertos na área cardiovascular. Uma membrana porosa (MP-1) por método *casting* em câmara de evaporação de solvente e outra membrana porosa obtida pelo processo de lixiviação com cloreto de sódio (NaCl) (MP-2). No ensaio de inchamento em 30 dias, a membrana lixiviada (MP-2) apresentou maior inchamento de 65% nos primeiros 3 dias atingindo o ponto máximo de 75% em 20 dias. Enquanto que a membrana porosa MP-1 atingiu o máximo de inchamento de 6% em 15 dias, o alto grau de inchamento da MP-2 foi atribuído à alta rugosidade e a presença dos poros na superfície (GRACIOLI, 2016).

Wen e colaboradores (2019) produziram *scaffold* por impressão 3D de PU (a partir de PCL diol e isoforona diisocianato, IPDI) impregnado com quimiocina, para aplicação em engenharia de tecidos e ação terapêutica em doenças ortopédicas. Nos ensaios *in vitro*, por imersão em PBS por 28 dias, os *scaffolds* apresentaram rápida perda de massa inicial nos primeiros 3 dias em torno de 20%, porém o perfil

de degradação hidrolítica foi mais lento após 7 dias (25% degradação máxima), segundo os autores esse perfil de degradação hidrolítica apresenta um tempo adequado de degradação para aplicação em engenharia de tecidos (WEN et al., 2019).

O perfil ideal de inchamento e de degradação hidrolítica de um *scaffold* como suporte de ensaios *in vitro* e *ex vivo* depende do tempo necessário para adesão, interação e proliferação celular., Geralmente os ensaios *in vitro* relatados na literatura são de no mínimo 8 a aproximadamente 40 dias, sem a total degradação dos *scaffolds*, bem como observado nos *scaffolds* de PU_L e PU_S (GRACIOLI, 2016; MORGADO et al., 2014; WEN; DAI; HSU, 2019; WU et al., 2019).

5.2.4. Propriedade de molhabilidade

Um biomaterial poderá ser considerado hidrofílico com um ângulo de contato de 10° , hidrofóbico com um ângulo de contato entre 90° e 150° e altamente hidrofóbico quando o ângulo de contato for maior que 150° (GRACIOLI, 2016; KHODABAKHSHI et al., 2019; PEGORETTI et al., 2008).

Análises de ângulo de contato foram realizadas com soluções de pH diferentes (pH= 6,4, simulando o meio ácido do fluido corpóreo quando há algum tipo de infecção ou outra patologia, pH= 7,4 simulando fluido corpóreo em condições normais). Avaliou-se a sensibilidade ao meio e a influência do tempo no comportamento de molhabilidade nas duas faces dos *scaffolds* (superior e inferior), o perfil do comportamento do ensaio do ângulo de contato é mostrado na Figura 5.12.

De acordo com a Figura 5.12, pode-se observar que todos os *scaffolds* apresentaram ângulos de contato menores que 95° , sendo consideradas predominantemente molhantes, ou seja, propensas à hidrofiliicidade (GRACIOLI, 2016; PEGORETTI et al., 2008).

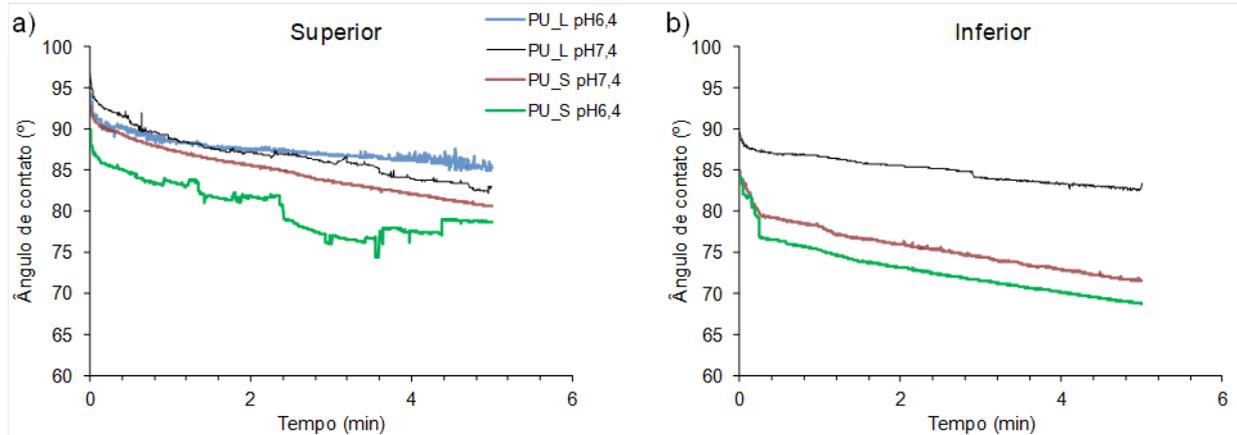


Figura 5.12. Comportamento do ângulo de contato, das superfícies dos *scaffolds* : com pH 6.4 e pH 7.4. a) parte superior; b) parte inferior, usando PBS com diferentes pHs.

De forma geral, para ambos os *scaffolds*, com soluções com diferentes pH, em ambas as superfícies houve uma diminuição do ângulo de contato com tempo. No primeiro contato da gota na superfície superior dos *scaffolds* (Figura 5.12. a), os valores de ângulo de contato para o PU_L foram 94° (pH= 6,4) e 89°(pH= 7,4); enquanto para o PU_S em pH 6.4 e 7.4 foram 95° (pH= 6,4) e 92° (pH= 7,4). Ambos os *scaffolds* apresentam comportamento similar no instante em que a gota toca na superfície. Quando foi avaliada a superfície inferior (Figura 5.12. b) dos *scaffolds*, observou-se uma diminuição dos ângulos de contato, para o PU_L foi de 86° (pH= 6,4) e 89° (pH= 7,4), enquanto que para o PU_S o valor foi de 84° para ambos as soluções. Esta diminuição do ângulo de contato indica um aumento na molhabilidade da superfície pelos fluidos corpóreos simulados. Com o passar do tempo de contato com a gota, observou-se uma diminuição no ângulo nos *scaffolds* associado à presença de poros. Como a dispersão dos poros na superfície inferior (Figura 5.12. b) dos *scaffolds* é maior que na superfície superior (como visto nos resultados do MEV, Figura 5.5. b), é visível a diminuição no ângulo de contato em ambos *scaffolds*, que apresentam maior tamanho de poros nas faces inferior.

Segundo a literatura, os grupos amina e carboxila possuem afinidade ao CO₂, dessa forma, provavelmente, esses grupamentos presentes na estrutura química do poliuretano podem estar direcionados nas faces do *scaffold* PU_S devido à passagem do fluido supercrítico CO₂ durante a obtenção do *scaffold* e esses grupamentos dão caráter hidrofílico ao material (ASSIS et al., 2005; TAO et al.,

2019; ZOU et al., 2019). Este comportamento pode ser uma explicação para a maior molhabilidade do PU_S quando comparado ao PU_L.

Para o PU_L, a alta porosidade apresenta irregularidade na face inferior do *scaffold*, esta característica impossibilitou manter a linha de base durante a leitura do ângulo de contato em função do tempo.

5.2.5. Viabilidade celular

A funcionalidade mitocondrial das células de fibroblastos e o efeito citotóxico dos *scaffolds* foram avaliados com o teste de MTT, conforme apresentado na Figura 5.13.

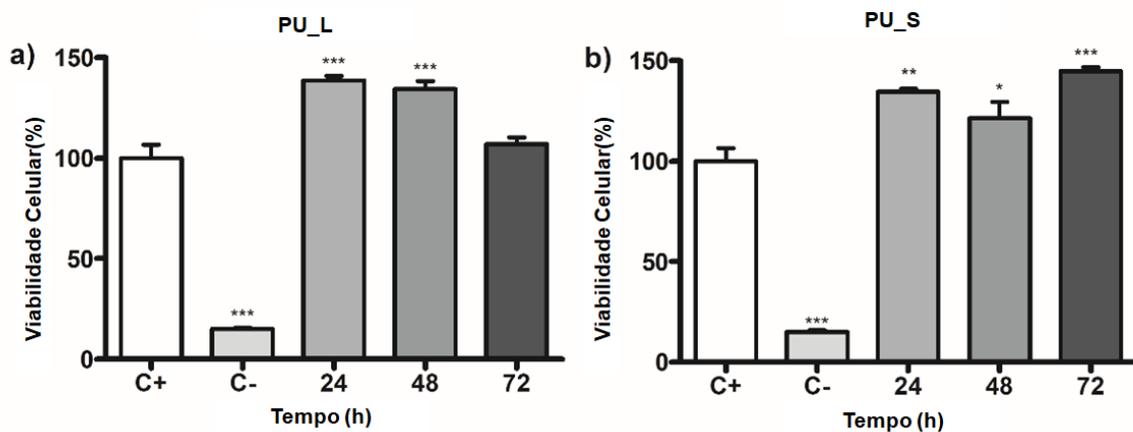


Figura 5.13. Efeito na atividade mitocondrial de fibroblastos nos *scaffolds* a) PU_L e b) PU_S, cultivados por 24, 48 e 72 horas durante ensaio MTT. Os dados foram tratados estatisticamente por ANOVA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

De acordo com os gráficos do ensaio de MTT (Fig. 5.13. a e b) a viabilidade celular em ambos *scaffolds* apresentaram valores acima de 70%. Segundo a literatura, esse resultado indica efeito não citotóxico e que não houve influência na funcionalidade mitocondrial (USP 23, 1995; GRACIOLI, 2016).

Além disso, a Figura 5.13 a e b. mostram a porcentagem de viabilidade celular versus tempo, em relação ao controle positivo e negativo. Os resultados obtidos (Figura 5.13. a) mostram um decréscimo progressivo da porcentagem de viabilidade de fibroblastos em contato com o *scaffold* PU_L nos diferentes tempos testados. Por outro lado, a porcentagem de células viáveis aumenta em 72 horas em contato com o *scaffold* PU_S (Figura 5.13 b).

De forma geral, a análise de viabilidade mostrou que os *scaffolds* PU_S e PU_L não exibiram um efeito citotóxico estatisticamente significativo, indicando um perfil de biocompatibilidade de ambos os *scaffolds* de PU avaliados neste estudo.

Os resultados do ensaio de MTT dos *scaffolds* PU_L e PU_S reproduzem uma das características principais do poliuretano, a biocompatibilidade como relatado na literatura (BASTERRETXEIA et al., 2016; GABRIEL et al., 2017a; GRACIOLI, 2016). Este perfil não tóxico é de suma importância para indicar os *scaffolds* para aplicação em engenharia de tecidos (KUCINSKA-LIPKA et al., 2015, MARZEC et al., 2017).

A citotoxicidade dos *scaffolds* PU_L e PU_S foi avaliada por um segundo teste, o ensaio de alamar blue (Figura 5.14) durante 72 horas.

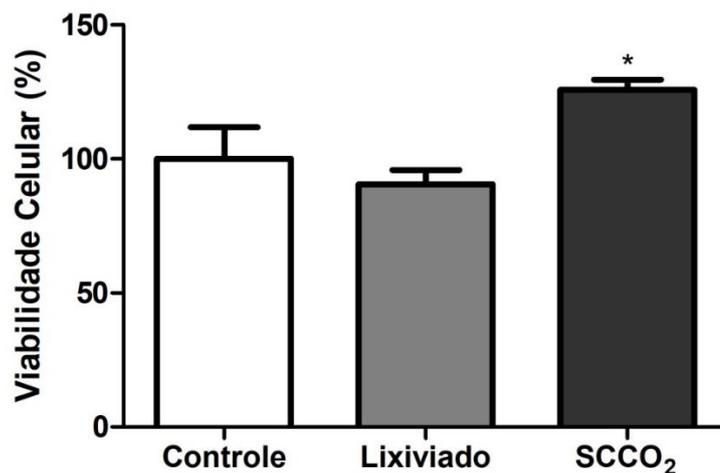


Figura 5.14. Avaliação da citotoxicidade dos *scaffolds* de PU (scCO₂ e lixiviado) por 72 horas pelo ensaio de Alamar Blue.

De acordo com a Figura 5.14 foi possível observar que os *scaffolds* apresentaram perfil de resposta semelhante ao perfil exibido no ensaio de MTT no mesmo tempo avaliado. O *scaffold* PU_L apresentou mesmo perfil de resposta ao controle neste experimento, indicando que este *scaffold* não promoveu redução da viabilidade celular, como também exibiu perfil de biocompatibilidade após 72 horas. Este mesmo perfil foi apresentado pelo *scaffold* PU_S, contudo foi possível observar um aumento da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. Estes resultados corroboram com a biocompatibilidade do PU descrito na literatura (GABRIEL et al., 2017a), além de reiterar o perfil atóxico dos *scaffolds* de PU como característica chave para o sucesso da engenharia tecidual (KUCINSKA-LIPKA et al., 2015; MARZEC et al., 2017).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de vida/morte de células de fibroblastos (Fig. 5.15). Os resultados mostraram que células predominantemente vivas foram encontradas dentro dos *scaffolds* de PU_L e PU_S. As células de fibroblastos (hFB) aderiram adequadamente sobre os dois *scaffolds* de PU indicando uma boa citocompatibilidade, quando comparadas ao grupo controle (sem *scaffold*).

Na Figura 5.15 é possível observar a distribuição uniforme das células em ambos *scaffolds*, onde as células hFB vivas (verde-claro) nos *scaffolds* PU_L e PU_S apresentaram a mesma distribuição em relação ao grupo controle.

O grande número de células viáveis nas 24, 48 e 72 horas sugere que os *scaffolds* não comprometem a viabilidade celular e o transporte de nutrientes e oxigênio para as células. Após 72 horas, o número de células mortas (pontos em vermelho) nos *scaffolds* mostrou-se abaixo do número de células mortas obtidas por outros estudos de *scaffold* de PU (GABRIEL et al., 2017).

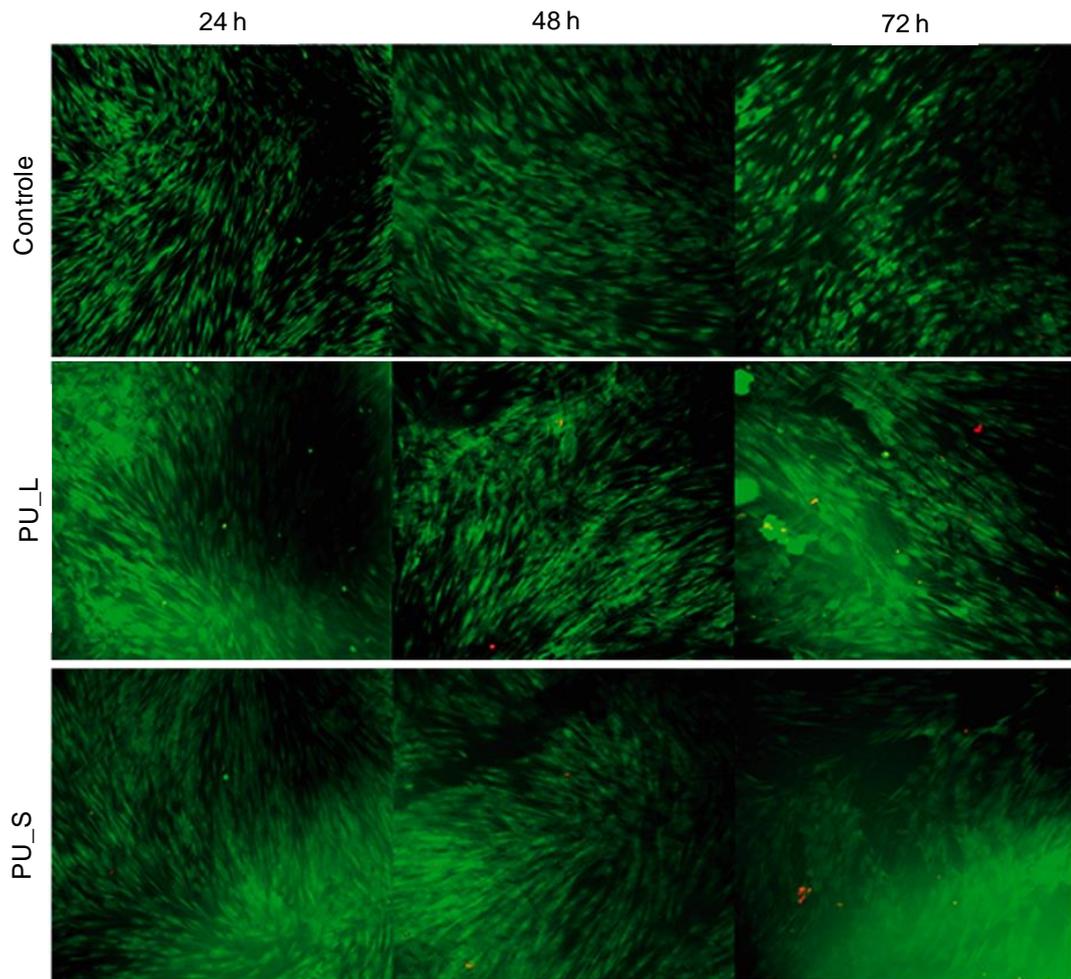


Figura 5.15. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência do ensaio de avaliação de células mortas e vivas nos *scaffolds* PU_L e PU_S em 24, 48 e 72h, respectivamente.

O comportamento das células de fibroblastos também foi avaliado por Silva e colaboradores (2013). Os *scaffolds* à base de *Aloe Vera* e quitosana foram semeados com fibroblastos. Entre os 1^o e 7^o dia, as células distribuíram-se uniformemente na superfície, no 7^o dia as células proliferaram de forma aglomerada e exibiram uma morfologia circular, indicando a permeabilidade dessas células ao longo das interconexões porosas o que sugere boa adesão e compatibilidade com a matriz porosa (SILVA et al., 2013).

Gabriel e colaboradores (2017) desenvolveram *scaffold* de poliuretano (comercial), geralmente utilizado para engenharia de tecidos (preparado a partir de poli(tetrametilenoglicol, hexametileno diisocianato e butanodiol) com a técnica de eletrofiação para uso como dispositivo de regeneração tecidual. Foi realizado o

ensaio da viabilidade de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) celular de fibroblastos de rim de macaco em 24, 48 e 72 horas de ensaio. As células mantiveram em sua maioria vivas dentro do *scaffold* e aderiram nas interconexões porosas apresentando citocompatibilidade. Segundo os autores, esses resultados sugerem que *scaffold* não compromete a viabilidade celular e o transporte de nutrientes e oxigênio para células. Em 48 e 72 horas é possível identificar um aumento de células vermelhas (mortas) decorrente de efeito tóxico do poliuretano (GABRIEL et al., 2017a).

O perfil de viabilidade de células vivas e mortas apresentada na Figura 5.15 para ambos *scaffolds* proposto neste trabalho mostraram maior densidade de células vivas (verdes) quando comparado a literatura em 48 e 72 horas, indicando citocompatibilidade e sem efeito tóxico considerável proveniente da degradação dos *scaffolds* de poliuretano estudados.

A morfologia das células de fibroblastos foi avaliada após 14 dias de cultura das células nos *scaffolds* (Figura 5.16), o que permitiu observar uma diferença morfológica das células entre os *scaffolds*. As células foram coradas com uma solução de corante contendo Phalloidin e dihidrocloro de 4',6 – diamidino – 2 – fenilindole (DAPI).

Uma característica interessante observada no comportamento das células nos *scaffolds* de PU é que há uma permeabilidade celular, preenchendo os espaços interconectados nos *scaffolds* e são moldadas de acordo com suas estruturas. Além disso, as células de fibroblastos aderiram à superfície de ambos *scaffolds* após 14 dias (Fig. 5.16).

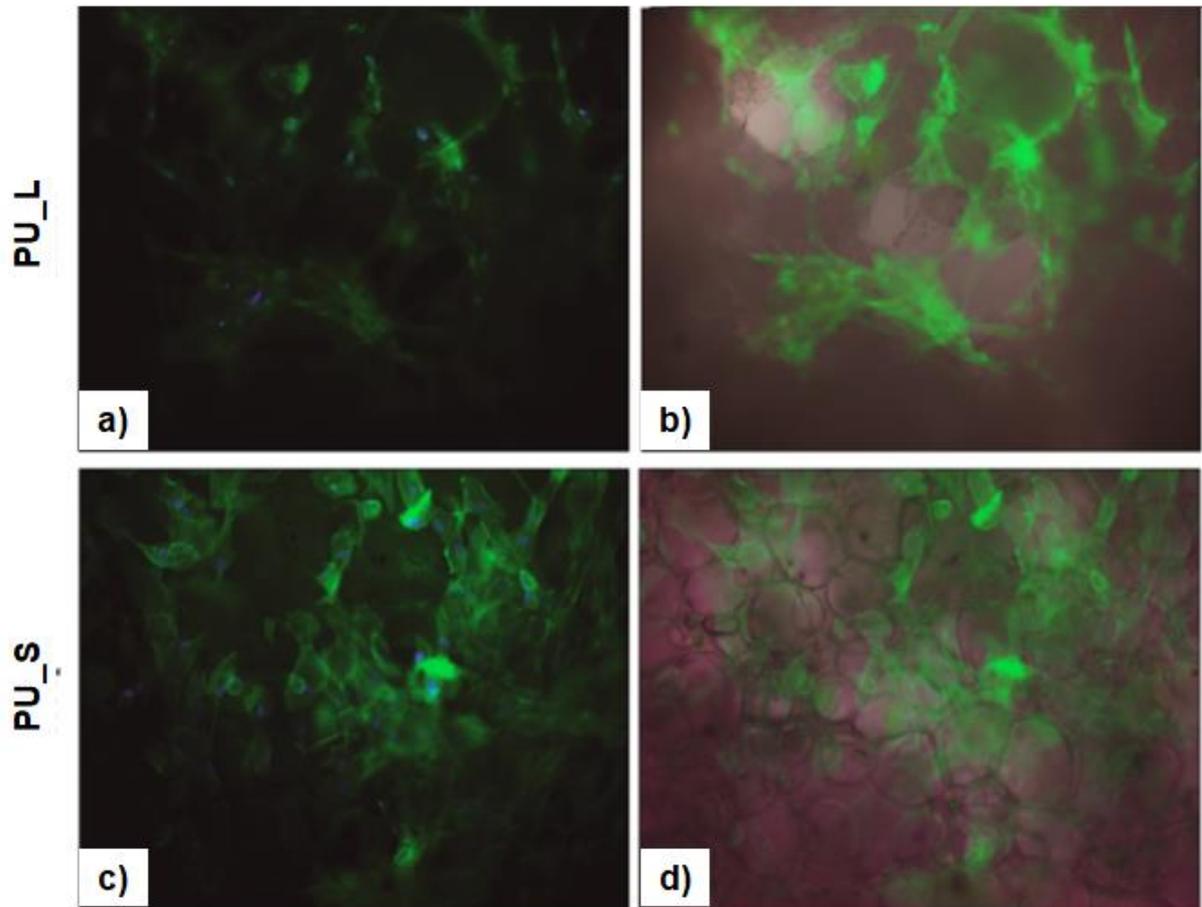


Figura 5.16. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da morfologia celular (fibroblastos) nos *scaffolds* PU_L e PU_S. As imagens b e d) são aproximações de 20 x.

A morfologia dos fibroblastos mostrou diferenças aparentes em relação aos *scaffolds* de PU_L e PU_S. As células de fibroblastos *no scaffold* PU_L apresentaram um citoesqueleto mais fino (Fig. 5.16. a), enquanto as células *no scaffold* PU_S são arredondadas (Fig. 5.16. c). Observou-se que no *scaffold* PU_L as células crescem no contorno dos poros proporcionando essa fina morfologia que as circunda (Fig. 5.16. b). A morfologia esticada e fina de fibroblastos de ratos em *scaffold* de policarbonato e polietilenoglicol foi relatada por Sit e Kohn (2009), o qual estudaram a integridade estrutural celular em superfícies poliméricas. Segundo os autores as células apresentaram aderência no contorno dos poros, permearam e proliferaram para o interior do *scaffold* (SIT; KOHN, 2009). Por outro lado, as células de fibroblastos no *scaffold* PU_S apresentam uma morfologia arredondada, não típica dos fibroblastos, parecendo aglomeradas na superfície do *scaffold* (Fig. 5.16. d). Silva e colaboradores (2013) prepararam *scaffold* à base de *Aloe Vera* e quitosana semeados com células de fibroblastos para ensaios *in vitro* (Fig. 3.2 –

capítulo revisão bibliográfica), a proliferação de fibroblastos nos *scaffolds* mostrou morfologia circular e uniforme por toda a superfície, semelhante à morfologia celular observada no *scaffold* PU_S.

Os resultados apresentados neste trabalho com os *scaffolds* PU_L e PU_S indicaram que os mesmos apresentam propriedades mecânicas e térmicas adequadas para o uso na engenharia de tecidos. O ensaio de inchamento mostrou que há permeação do fluido simulado corpóreo no interior dos *scaffolds*, o que indica a facilidade da passagem de nutrientes do meio para as células. os *scaffolds* promoveram a adesão celular, bem como a proliferação, o que sugere fortemente que os *scaffolds* não comprometem a viabilidade celular indicando uma biocompatibilidade das estruturas porosas que se mostraram eficientes no transporte de nutrientes e oxigênio para as células (GABRIEL et al., 2017a; SAVARIS et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

A partir dos objetivos proposto neste trabalho conclui-se que a síntese de poliuretano à base de policarbonato diol com propriedades atrativas para o desenvolvimento de suportes tridimensionais para o uso em engenharia de tecidos foi alcançada. Em especial, destaca-se a eficiência das técnicas de lixiviação e inversão de fase assistida por CO₂ supercrítico (scCO₂) na formação de *scaffolds* de PU com poros dispersos de formas diferentes em cada *scaffolds*. O processo de lixiviação produziu poros aleatórios com maior grau de interconectividade entre a superfície do *scaffold* e a matriz interna, enquanto o *scaffold* obtido por CO₂ supercrítico apresentou poros organizados de forma assimétrica com poros maiores na parte inferior e poros menores na parte superior do *scaffold*.

As interfaces do *scaffold* de PU_L são diferentes, devido à interação da placa e da passagem do gás (N₂) na evaporação de solvente na face superior e o contato da matriz polímero/sal na placa resultado na estrutura esponjosa da face inferior. Por outro lado, as interfaces do *scaffold* PU_S são semelhantes, pois durante o processo a passagem do fluido permeia por ambos lados da placa. Nesse caso é possível obter estruturas tridimensionais diferentes a partir do mesmo PU, essa característica versátil é importante para aplicação na medicina regenerativa, pois existem necessidades de regeneração teciduais com diferentes perfis e morfologias (dispersão dos poros e rugosidade).

Em relação aos ensaios de molhabilidade, degradação hidrolítica e inchamento, o *scaffold* PU_L mostrou maior molhabilidade capacidade de inchamento e, portanto, degradação hidrolítica mais rápida devido à dispersão dos poros na matriz e alta conectividade com a superfície do *scaffold*, permitindo maior permeação da água. Ambos *scaffolds* são considerados hidrofílicos, as células apresentam maior afinidade com materiais hidrofílicos contribuindo para a proliferação e adesão celular, uma característica importante para a engenharia de tecidos.

O comportamento mecânico de ambos *scaffolds* mostrou-se típico de um material elastômero, e mesmo com poros dispersos nos *scaffolds* PU_L apresentou elasticidade e resistência mecânica.

O estudo de citotoxicidade e viabilidade *in vitro* dos *scaffolds* com células fibroblásticas indicaram que os *scaffolds* não apresentam citotoxicidade com uma atividade mitocondrial maior que 70%, esses resultados indicam que os *scaffolds* podem ser utilizados como suporte para crescimento celular. A morfologia celular ficou bem definida em ambos *scaffolds*, em especial PU_L no qual as células de fibroblastos mantiveram uniformes e permearam para dentro do *scaffold*.

Por fim, é possível sugerir que ambos *scaffolds* PU_L e PU_S apresentam potencialidade de utilização como suporte para proliferação celular *ex-vivo*, sobretudo por apresentar rugosidade e poros necessários para engenharia de tecidos, e por não apresentarem citotoxicidade. As aplicações desses *scaffolds* podem ser, de forma mais específica, de acordo com a morfologia uma vez que a estrutura desses *scaffolds* é diferente. O PU_L pode ser indicado para ensaios com células de neurônios, de tecido adiposo e com possível aplicação como enxerto e implantes para tecidos cartilaginoso e ósseo, pois apresenta poros dispersos aleatoriamente e com uma das superfícies com característica de espuma, por outro lado o PU_S com morfologia assimétrica possui potencialidade para proliferação de células epiteliais e de como enxerto e curativos de ferimentos de pele.

7. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar como a característica (sistema e processo) de cada técnica interfere na formação dos poros;
- Avaliar a eficiência de proliferação celular durante um período mais longo e com diferentes células;
- Avaliar a incorporação de fármacos padrão para testes (dexametasona, ibuprofeno, ciprofloxacino) e perfil de liberação para estudos com células patogênicas;
- Avaliar a eficiência da biocompatibilidade e biodegradabilidade com outros ensaios *in vitro*;
- Avaliar o comportamento dos *scaffolds* em estudos *in vivo* (pré – clínicos).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; Annu; Ali, A.; Sheikh, J. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 849–862, 2018.

ALTUN, E.; Aydogdu, M. O.; Togay, S. O.; Sengil, A. Z.; Ekren, N.; Haskoylu, M. E.; Oner, E. T.; Altuncu, N. A.; Ozturk, G.; Crabbe-Mann, M.; Ahmed, J.; Gunduz, O.; Edirisinghe, M. Bioinspired scaffold induced regeneration of neural tissue. **European Polymer Journal**, v. 114, p. 98–108, 2019.

ASSIS, O. B. G.; Valmir, L. S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2005.

BAINO, F.; Novajra, G.; Vitale-Brovarone, C.. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. December, p. 1–17, 2015.

BAKER, K.; Maerz, T.; Sad, H.; Shaheen, P.; Kannan, R. M. In vivo bone formation by and inflammatory response to resorbable polymer-nanoclay constructs. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 1871–1881, 2015.

BARBANTI, H.; Zavaglia, C.; Duek, E. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2006.

BARBANTI, H.; Zavaglia, C.; Duek, E. Effect of salt leaching on PCL and PLGA(50/50) resorbable scaffolds. **Materials Research**, v. 11, n. 1, p. 75–80, 2008.

BARROSO, T.; Viveiros, R.; Casimiro, T.; Aguiar-Ricardo, A. Development of dual-responsive chitosan-collagen scaffolds for pulsatile release of bioactive molecules. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 102–112, 2014.

BASTERRETXEA, A.; Haga, Y.; Sanchez, A.; Isik, A.; Irusta, L.; Tanaka, M.; Fukushima, K.; Sardon, H. Biocompatibility and hemocompatibility evaluation of polyether urethanes synthesized using DBU organocatalyst. **European Polymer Journal**, v. 84, p. 750–758, 2016.

BOMBALDI, R.; Bombaldi, C.; Rodrigues, C.; Drouin, B.; Popat, K.; Mantovani, D.; Moraes, A. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. **Materials Science and Engineering C**, 2019.

BOSE, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012.

CARDEA, S.; Baldino, L.; Marco, I.; Reverchon, E. Generation of loaded pmma scaffolds using supercritical CO₂ assisted phase separation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, n. 2003, p. 241–246, 2014.

CASIMIRO, T.; Banet-Osuma, A.; Ramos, A.; Ponte, M.; Aguiar-Ricardo, A. Synthesis of highly cross-linked poly(diethylene glycol dimethacrylate) microparticles in supercritical carbon dioxide. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 9, p. 1947–1953, 2005.

CHAN-CHAN, L. H. Correa, R.; Coronado, R.; Cervantes, J.; Rodríguez, J.; Quintana, P.; Pérez, P. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2035–2044, 2010.

CHAPEKAR, Mrunal S. Tissue Engineering : Challenges and Opportunities. [s. l.], v. 20899, n. June, p. 617–620, 2000.

CHEN, P.; Luiu, L.; Pan, J.; Mei, J.; Li, C.; Zheng, Y. Biomimetic composite scaffold of hydroxyapatite/gelatin-chitosan core-shell nanofibers for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. December 2018, p. 325–335, 2019.

CHEN, P.; Tao, J.; Zhu, S.; Cai, Y.; Mao, Q.; Yu, D.; Daí, J.; Ouyang, H. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. **Biomaterials**, v. 39, p. 114–123, 2015.

COOPER, A. Polymer synthesis and processing using liquid and supercritical CO₂. The synthetic techniques discussed include. **J.Mater.Chem**, [s. l.], v. 10, n. 0, p. 207–234, 2000.

CORPART, Guillaume. **Perspectiva para o mercado brasileiro de saúde em 2018**. 2018. Disponível em: <<https://globalhealthintelligence.com/pt-br/analise-de-ghi-pt-br/perspectiva-para-o-mercado-brasileiro-de-saude-em-2018/>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

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

CUNNINGHAM, E.; Dunne, N. Comparative Characterisation of 3-D Hydroxyapatite Scaffolds Developed Via Replication of Synthetic Polymer Foams and Natural Marine Sponges. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. s1, n. 1, p. 1–9, 2012.

DAWSON, D.; Ghannam, A.; Sickels, J.; Naung, N. Tissue Engineering. **Dental Clinics of North America**, 2019.

DIAS, G.; Prado, M.; Ligabue, R.; Porier, M.; Roux, C.; Martin, F.; Forgues, S.; Einloft, S. Synthetic talc as a new platform for producing fluorescent clay

polyurethane nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 158, n. November 2017, p. 37–45, 2018.

FAIA-TORRES, A.; Guimond-Lischer, S.; Rottmar, M.; Charnley, M.; Goren, T.; Weber, K.; Spencer, N.; Reis, R.; Textor, M.; Neves, N. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. **Biomaterials**, v. 35, n. 33, p. 9023–9032, 2014.

FARZIN, A.; Hassan, S.; Barough, S.; Ai, A.; Hasanzadeh, E.; Goodarzi, A.; Ai, J. A facile two step heat treatment strategy for development of bioceramic scaffolds for hard tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, p. 110009, 2019.

FORD, A.; Gramling, H.; Li, S.; Sob, J.; Srinivasan, A.; Pruitt, L. Micromechanisms of fatigue crack growth in polycarbonate polyurethane: Time dependent and hydration effects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 79, n. January, p. 324–331, 2018.

GABRIEL, L.; Santos, M.; Jardini, A.; Bastos, G.; Dias, C.; Webster, T.; Filho, R. Bio-based polyurethane for tissue engineering applications: How hydroxyapatite nanoparticles influence the structure, thermal and biological behavior of polyurethane composites. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 201–208, 2017. a.

GABRIEL, L.; Rodrigues, A.; Macedo, M.; Jardini, A.; Filho, R. Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 72, p. 113–117, 2017. b.

GAJENDIRAN, M.; Choi, J.; Kim, S.; Kim, K.; Shin, H.; Koo, H.; Kim, K. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 51, p. 12–26, 2017.

GHOSAL, K.; Agatemor, C.; Spítálský, Z.; Thomas, S.; Kny, E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. **Chemical Engineering Journal**, v. 358, n. September 2018, p. 1262–1278, 2019.

GOIMIL, L.; Rosales, V.; Delgado, A.; Évora, C.; Reyes, R.; Pérez, A.; Cervantes, S.; Cenis, J.; Amoza, J.; Concheiro, A.; Lorenzo, C.; González, C. Dexamethasone for bone regeneration. **Journal of CO2 Utilization**. v. 31, n. July 2018, p. 51–64, 2019.

GONZÁLEZ TORRES, Maykel. Polyurethane/urea composite scaffolds based on poly(3-hydroxybutyrate-g-2-amino-ethyl methacrylate). **Composites Part B: Engineering**, v. 160, n. August 2018, p. 362–368, 2019.

GRACIOLI, E.; Winter, P.; Ziulkoski, A.; Spilki, F.; Dullius, J.; Einloft, S.; Perini, S.; Bodanese, L.; Jahno, V.; Ligabue, R. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular TT - Cardiovascular polymeric devices: thermomechanical behavior and cell viability. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 18, n. 2, p. 1313–1322, 2013.

GRACIOLI, EMANUELLI LOURENÇO CABRAL. **Desenvolvimento de membranas de poliuretano com rapamicina e seu potencial uso em regeneração vascular**. Porto Alegre, 2016. 112p. Tese de doutorado, Programa de Pós graduação em engenharia e tecnologia de materiais, PUCRS, Brasil.

GUBANSKA, I.; Skwarska, A. Microporous Polyurethane Thin Layer as a Promising Scaffold for Tissue Engineering. [s. l.], p. 1–16, 2017.

HOSSEINKHANI, M.; Mehrabani, D.; Karimfar, M. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. [s. l.], v. 3, n. 1, p. 6–8, 2014.

HU, C.; Zhang, X.; Zhang, L.; Xu, X.; Zhuo, R. Temperature- and pH-sensitive hydrogels to immobilize heparin-modified PEI/DNA complexes for sustained gene delivery. **J. Mater. Chem.**, v. 19, n. 47, p. 8982–8989, 2009.

HUYNH, V.; Jesmer, A.; Shoaib, M.; Wylie, R. Influence of Hydrophobic Cross-Linkers on Carboxybetaine Copolymer Stimuli Response and Hydrogel Biological Properties. **Langmuir**, v. 35, n. 5, p. 1631–1641, 2019.

INTERNATIONAL, ASTM. ASTM D2572-97(2010), Standard Test Method for Isocyanate Groups in Urethane Materials or Prepolymers, West Conshohocken, PA, 2010.

JAGANATHAN, S.; Mani, M.; Ayyar, M.; Rathanasamy, R. Biomimetic electrospun polyurethane matrix composites with tailor made properties for bone tissue engineering scaffolds. **Polymer Testing**, v. 78, n. May, p. 105955, 2019.

JAMMALAMADAKA, U.; Tappa, K. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

JANIK, H.; MARZEC, M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 586–591, 2015.

JAVAID, M.; Zia, K.; Khera, R.; Jabeen, S.; Mumtaz, I.; Younis, M.; Shoaib, M.; Bhatti, I. Evaluation of cytotoxicity, hemocompatibility and spectral studies of chitosan assisted polyurethanes prepared with various diisocyanates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 116–126, 2019.

JIANG, L.; Jiang, Y.; Stiadle, J.; Wang, X.; Wang, L.; Li, Q.; Shen, C.; Thibeault, S.; Turng, L. Electrospun nanofibrous thermoplastic polyurethane/poly(glycerol sebacate) hybrid scaffolds for vocal fold tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. August 2018, p. 740–749, 2019.

KARALUS, W.; Dabrowski, J.; Auguscik, M.; Ryszkowska, J. Właściwości tribologiczne biodegradowalnych poliuretanów o różnej budowie i zawartości segmentów sztywnych. **Polimery/Polymers**, v. 61, n. 7–8, p. 509–518, 2016.

KEMMERE, M.; Meyer, T. Supercritical Carbon Dioxide in Polymer Reaction Engineering. [s. l.], 2005.

KENAR, H.; Ozdogan, C.; Dumlu, C.; Doger, E.; Kose, G.; Hasirci, V. Microfibrous scaffolds from poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) blended with xeno-free collagen/hyaluronic acid for improvement of vascularization in tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 31–44, 2019.

KHADEMHOSEINI, A.; Langer, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nature protocols**, v. 11, n. 10, p. 1775–1781, 2016.

KHODABAKHSHI, D.; Eskandarinia, A.; Kefayart, A.; Rafienia, M.; Navid, S.; Karbasi, S.; Moshtaghian. In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. October 2018, p. 177–184, 2019.

KHORSHIDI, S.; Solouk, A.; Mirzadeh, H.; Mazinani, S.; Lagaron, J.; Sharifi, S.; Ramakrishna, S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. January 2015, p. 715–738, 2016.

KIM, M.; Park, S.; Hwang, S.; Kim, E.; Jegal, J.; Im, C.; Jeon, H.; Oh, D.; Park, J. Environmentally-friendly synthesis of carbonate-type macrodiols and preparation of transparent self-healable thermoplastic polyurethanes. **Polymers**, v. 9, n. 12, 2017.

KOWALCZYK, P.; Trazskawska, P.; Lojszezyk, I.; Podgórski, R.; Ciach, T. Production of 3D printed polylactide scaffolds with surface grafted hydrogel coatings. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, n. March, p. 136–142, 2019.

KRAVANJA, G.; Globocnik, M.; Primožic, M.; Knez, Z.; Leitgeb, M. Protein Release from Biodegradable Poly (ϵ -Caprolactone) -Chitosan Scaffolds Prepared in scCO₂. [s. l.], p. 337–343, 2019.

KRÓL, P.; Uran, L.; Król, B.; Pielichowska, K.; Walczak. Study of chemical, physico-mechanical and biological properties of 4,4'-methylenebis(cyclohexyl isocyanate)-based polyurethane films. **Materials Science and Engineering C**, v. 93, n. August, p. 483–494, 2018.

LANGER, R.; Vacanti, J. Advances in tissue engineering. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 51, n. 1, p. 8–12, 2016.

LEBARON, R.; Athanasiou, A. Ex vivo synthesis of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2575–2587, 2000.

LEE, E.; Kasper, F.; Mikos, A. Biomaterials for Tissue Engineering Esther. **Ann Biomed Eng.**, v. 2, n. 1, p. 323–337, 2014.

LI, J.; Kaplan, D.; Zreiqat, H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. **Materials Chemistry B**, v. 2, p. 7272–7306, 2014.

LI, Z.; Lang, G.; Chen, X.; Sacks, H.; Mantzur, C.; Tropp, U.; Mader, K.; Smalwood, T.; Sammon, C.; Richards, R.; Alini, M.; Grad, S. Polyurethane scaffold with in situ swelling capacity for nucleus pulposus replacement. **Biomaterials**, v. 84, p. 196–

209, 2016.

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

LUO, Z.; Deng, Y., Zhang, R.; Wang, M.; Bai, Y.; Zhao, Q.; Lyu, Y.; Wei, J.; Wie, S. Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 73–82, 2015.

MAITRA, J.; Shukla, V. Cross-linking in Hydrogels - A Review. **American Journal of Polymer Science**, v. 4, n. 2, p. 25–31, 2014.

MARTIN, I.; Wendt, D.; Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80–86, 2004.

MARZEC, M.; Lipka, J.; Kajaszczynska, I.; Janik, H. Development of polyurethanes for bone repair. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, n. June 2016, p. 736–747, 2017.

MATĚJKA, L.; Spirková, M.; Dybal, J.; Kredatusová, J.; Hodan, J.; Zhigunov, A.; Slouf, M. Structure evolution during order–disorder transitions in aliphatic polycarbonate based polyurethanes. Self-healing polymer. **Chemical Engineering Journal**, v. 357, n. July 2018, p. 611–624, 2019.

MESKINFAM, M.; Bertoldi, S.; Albanese, N.; Cerri, A.; Tanzi, M.; Imani, R.; Bahairaei, N.; Farokhi, M.; Fare, S. Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, n. July 2017, p. 130–140, 2018.

MI, H.; Jing, X.; Turng, L.; Peng, X. Microcellular injection molding and particulate leaching of thermoplastic polyurethane (TPU) scaffolds. **AIP Conference Proceedings**. [s. l.], v. 392, n. February, 2015.

MI, H.; Jing, X.; Yilmaz, G.; Hagerty, B.; Enriquez, E.; Turng, L. In situ synthesis of polyurethane scaffolds with tunable properties by controlled crosslinking of tri-block copolymer and polycaprolactone triol for tissue regeneration. **Chemical Engineering Journal**, v. 348, n. April, p. 786–798, 2018.

MONTALBANO, G.; Toumpaniari, S.; Popov, A.; Duan, P.; Chen, J.; Dalgarno, k.; Scott, W.; Ferreira, A. Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, n. September 2017, p. 236–246, 2018.

MORGADO, P.; Lisboa, P.; Ribeiro, M.; Miguel, S.; Simões, P.; Correia, I.; Aguiar-Ricardo, A. Poly(vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 262–271, 2014.

MORGADO, P. Miguel, S.; Correia, I.; Aguiar-Ricardo, A. Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 136–145, 2017.

MORGADO, P.; Aguiar-Ricardo, A.; Correia, I. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. **Journal of Membrane Science**, v. 490, p. 139–151, 2015.

MORONI, L.; De Wijn, J.; Van B. Three-dimensional fiber-deposited PEOT/PBT copolymer scaffolds for tissue engineering: Influence of porosity, molecular network mesh size, and swelling in aqueous media on dynamic mechanical properties. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 75, n. 4, p. 957–965, 2005.

NAZEER, M.; Yilgor, E.; Yilgor, I. Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. **Polymer**, v. 168, n. December 2018, p. 86–94, 2019.

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

OH, S.; Kang, M.; Knowles, J.; Gong, M.. Synthesis of bio-based thermoplastic polyurethane elastomers containing isosorbide and polycarbonate diol and their biocompatible properties. **Journal of biomaterials applications**, v. 3, p. 324-327, 2015.

OLIVEIRA, W.; Arruda, I.; Silva, G.; Machado, G.; Coelho, L.; Correia, M. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, n. August, p. 597–606, 2017.

PANDIT, A, Mazumdar, N.; Ahmad, S. Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 853–869, 2019.

PATEL, H.; Bonde, M.; Srinivasan, G. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 25, p. 20–29, 2011.

PEGORETTI, A. Dorigato, A.; Brugnara, M.; Penati, A. Contact angle measurements as a tool to investigate the filler-matrix interactions in polyurethane-clay nanocomposites from blocked prepolymer. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 6, p. 1662–1672, 2008.

PIRES, A.; Bierhalz, A.; Moraes, Â.. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRICE, R.; Haberstroh, K.; Webster, T. Enhanced functions of cells on polymers with nanostructured surfaces. [s. l.], v. 41, p. 755–756, 2003.

RAJZER, I.; Menaszek, E.; Castano, O. Electrospun polymer scaffolds modified with drugs for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 493–

499, 2017.

RIBAS, R.; Schatkoski, V.; Montanheiro, T.; Menezes, B.; Stegemann, C.; Leite, D.; Thin, G. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. **Ceramics International**, n. May, p. 0–1, 2019. 3

RIJAL, G.; Li, W. 3D scaffolds in breast cancer research. **Biomaterials**, v. 81, p. 135–156, 2016.

ROUHOLAMIN, D.; Grunsven, W.; Reilly, G.; Smith, P. Morphological effects of porous PDLLA/HA scaffolds produced by supercritical CO₂ foaming on their mechanical performance. **Journal of Engineering in Medicine**, v. 8, p. 761–774, 2016.

RUIZ, A.; Rathnam, K.; Masters, K. Effect of hyaluronic acid incorporation method on the stability and biological properties of polyurethane – hyaluronic acid biomaterials. **J Mater Sci: Mater Med (2014)**, v. 25, p. 487–498, 2014.

SALERNO, A.; Saurina, J.; Domingo, C.. Supercritical CO₂ foamed polycaprolactone scaffolds for controlled delivery of 5-fluorouracil, nicotinamide and triflusal. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 654–663, 2015.

SARTORE, L.; Inverardi, N.; Pandini, S.; Bignotti, F.; Chiellini, F. PLA-based foams as scaffolds for tissue engineering applications. **AIP Conference Proceedings**, v. 1981, p. 410–417, 2018.

SAUCEAU, M.; Fages, J.; Common, A.; Nikitine, C.; Rodier, E. New challenges in polymer foaming: A review of extrusion processes assisted by supercritical carbon dioxide. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 6, p. 749–766, 2011.

SAVARIS, M.; Garcia, C.; Ely, M.; Henriques, J.; Santos, V.; Brandalise, R. Polyurethane/poly(D,L-lactic acid) scaffolds based on supercritical fluid technology for biomedical applications: Studies with L929 cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. October 2018, p. 539–551, 2019.

SHAHROUSVAND, M.; Sadeghi, Shahrousvand, E.; Ghollasi, M.; Salimi, A. Superficial physicochemical properties of polyurethane biomaterials as osteogenic regulators in human mesenchymal stem cells fates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 292–304, 2017.

SILVA, S.; Popa, E.; Gomes, M.; Cerqueira, M.; Marques, A.; Caridade, S.; Teixeira, P.; Sousa, C.; Mano, J.; Reis, R. An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 6, p. 6790–6797, 2013.

SILVA, C.; Pereira, V.; Rosa, P.; Cabral, E.; Melo, S.; Vieira, C.; Dias, A.; Sousa, H. Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation / deposition into a polyurethane-based wound dressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 115, p. 1–9, 2016.

SIN, D.; Miao, X.; Wei, G.; Chadwick, G.; Yan, C.; Friss, T. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 1, p. 78–85, 2010.

SIT, P.; Kohn, J. Interrelationship of micromechanics and morphology of fibroblasts adhered on different polymeric surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 2823–2831, 2009.

SIVASHANKARI, P.; Prabakaran, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1382–1389, 2016.

SOARES, M.; Viveiros, R.; Coelho, M.; Aguiar-Ricardo, A.; Casimiro, T. Supercritical CO₂-assisted preparation of a PMMA composite membrane for bisphenol A recognition in aqueous environment. **Chemical Engineering Science**, v. 68, n. 1, p. 94–100, 2012.

SOLA, A.; Bertacchini, J.; D'Avella, D.; Anselmi, L.; Maraldi, T.; Marmioli, S.; Messori, M. Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. July 2018, p. 153–165, 2019.

SORG, H.; Tilkorn, D.; Hager, S.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SUBHAPRADHA, N.; Abudhahir, M.; Aathira, A.; Sriniasan, N.; Moorthi, A. Polymer coated mesoporous ceramic for drug delivery in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 65–73, 2018.

TAO, J.; Wang, Y.; Tang, J.; Xiong, S.; Javaid, M.; Li, G.; Sun, Q.; Lui, C.; Pan, C.; Yu, G. Engineering pore surface and morphology of microporous organic polymers for improved affinity towards CO₂. **Chemical Engineering Journal**, v. 373, n. May, p. 338–344, 2019.

TEMTEM, M.; Silva, L.; Andrade, P.; Santos, F.; Silva, C.; Cabral, J.; Abecasis, M.; Aguiar-Ricardo, A.. Supercritical CO₂ generating chitosan devices with controlled morphology. Potential application for drug delivery and mesenchymal stem cell culture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 3, p. 269–277, 2009.

TIPNIS, Namita, P., BURGESS, Diane J. Sterilization of implantable polymer-based medical devices: A review. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 544, p. 455–460, 2018.

TOLOUE, E.; Karbasi, S.; Salehi, H ; Rafienia, M. Potential of an electrospun composite scaffold of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, n. July 2018, p. 1075–1091, 2019.

TRAUTMANN, A.; Ruth, M.; Lemke, H.; Walther, T.; Hellmann, R. Two-photon

polymerization based large scaffolds for adhesion and proliferation studies of human primary fibroblasts. **Optics and Laser Technology**, v. 106, p. 474–480, 2018.

TURNBULL, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278–314, 2018.

URBINA, L.; Alonso-Varona, A.; Saralegi, A.; Palomares, T.; Eceiza, A.; Corcuera, M.; Retegi, A. Hybrid and biocompatible cellulose/polyurethane nanocomposites with water-activated shape memory properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, p. 86–96, 2019.

WEN, Y.; Dai, N.; Hsu, S. Biodegradable water-based polyurethane scaffolds with a sequential release function for cell-free cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 88, p. 301–313, 2019.

WRIGHT, M.; Parrag, I.; Yang, M.; Santerre, J. Electrospun polyurethane nanofiber scaffolds with ciprofloxacin oligomer versus free ciprofloxacin: Effect on drug release and cell attachment. **Journal of Controlled Release**, v. 250, p. 107–115, 2017.

WU, B.; Yang, Y.; Shi, J.; Chang, S.; Li, S.; Lu, W.; Trau, D.; Fuh, J. A biologically inspired hierarchical PCL/F127 scaffold for esophagus tissue repair. **Materials Letters**, v. 243, p. 132–135, 2019.

WU, C.; Chen, T.; Xin, Y.; Zhang, Z.; Ren, Z.; Lei, J.; Chu, B.; Wang, Y.; Tang, S. Nanofibrous asymmetric membranes self-organized from chemically heterogeneous electrospun mats for skin tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 3, p. 35019, 2016.

WU, G.; Zhou, M.; Ke, Y. Polyurethane tethering natural antibacterial substances for catheter applications. **Materials Letters**, v. 223, p. 239–242, 2018.

XIE, Y.; Lan, X.; Bao, R.; Lei, Y.; Cao, Z.; Yang, M.; Yang, W.; Wang, Y. High-performance porous polylactide stereocomplex crystallite scaffolds prepared by solution blending and salt leaching. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, n. September 2017, p. 602–609, 2018.

YAN, Y.; Chen, H.; Zhang, H.; Guo, C.; Yang, K.; Chen, K.; Cheng, R.; Qian, N.; Sndler, N.; Zhang, Y.; Shen, H.; Qi, J.; Cui, W.; Deng, L. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. **Biomaterials**, v. 190–191, n. August 2018, p. 97–110, 2019.

YE, J.; Liao, X.; Xiao, W.; Li, S.; Yang, Q.; Li, G. The effects of molecular weight and supercritical CO₂ on the phase morphology of organic solvent free porous scaffolds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, n. June, p. 279–289, 2018.

YEGANEHI, M.; Kandel, R.; Santerre, J. Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3847–3855, 2010.

YUAN, Y.; Shi, X.; Gan, Z.; Wang, F. Modification of porous PLGA microspheres by poly-L-lysine for use as tissue engineering scaffolds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 162–168, 2018.

ZAROOG, O.; Satgunam, M.; Wei, L. Biomaterials for Bone Tissue Engineering: Properties and Applications. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, 2019.

ZHANG, C. **ELASTIC DEGRADABLE POLYURETHANES**. Clemson University 2006. p. 100. EUA.

ZHU, R.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Ma, D.; Wang, X. Synthesis of polycarbonate urethane elastomers and effects of the chemical structures on their thermal , mechanical and biocompatibility properties. **HLY**, n. April, 2016.

ZOU, L.; Zhang, Y.; Liu, X.; Chen, J.; Zhang, Q. Biomimetic mineralization on natural and synthetic polymers to prepare hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. 523, p. 222–229, 2019.

ZULKIFLI, F.; Hussain, F.; Harun, W.; Yusoff, M. Highly porous of hydroxyethyl cellulose biocomposite scaffolds for tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 562–571, 2019.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br