

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

Luce Helena Kochem

**OBTENÇÃO DE FIBRAS-GEL A PARTIR DE ÁGAR E DE ALGINATO DE SÓDIO
PARA APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLD* EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia

Porto Alegre 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

Luce Helena Kochem
Engenheira Química

**OBTENÇÃO DE FIBRAS-GEL A PARTIR DE ÁGAR E DE ALGINATO DE SÓDIO
PARA APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLD* EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Trabalho realizado no Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas - Labiomat, pertencente ao Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia na área de concentração de Ciência dos Materiais**, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGEM.

Porto Alegre 2015

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia, na área de concentração em Ciência dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos

Aprovado em: / /

Banca Examinadora:

Vânia

Álvaro

Liciane Sabadin Bertuol – Labiomat/UFRGS

Porto Alegre, 2015

DEDICATÓRIA

Assim como um grão de areia contribui para a formação das dunas, dedico este trabalho aos colegas e pesquisadores da área no intuito de corroborar esforços para o desenvolvimento e compartilhamento do conhecimento, para a obtenção de novas tecnologias, a fim de que sejam aplicadas para o bem da humanidade e do meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela oportunidade de desenvolver este trabalho juntamente ao Laboratório Labiomat sob a orientação do Prof. Luis Alberto Loureiro dos Santos e pela oportunidade de curso no Programa de Pós Graduação desta Universidade;

Agradeço às colegas da Universidade Luterana de Canoas Michele, Camila e Professoras Melissa e Nance, pelos estudos de citotoxicidade e recepção no laboratório;

Agradeço aos colegas, que indiretamente auxiliaram com ideias, com seu tempo, com dicas, ou mesmo que fosse com seus sorrisos amigos nas rotinas de laboratório e estudo das disciplinas do Programa, especialmente aos colegas do Labiomat: Natália, Camila, Fernanda, Kétner, Carolina, Nayrim, Mônica, Teo, Tiago e Lúcio, pela simpatia, coleguismo e amizade;

Agradeço aos Professores Mariliz e Farenzena da Engenharia Química que na busca de auxílio e suporte, atenderam-me com sua simpatia na melhor das intenções em auxiliar;

Agradeço ao Prof Éder do Instituto de Química pela oportunidade de curso de sua disciplina sobre Biossorventes, que muito me foi esclarecedora; agradeço especialmente à colega Johana do Laboratório do Prof. Éder pela simpatia com que me recebeu, atenção e esclarecimentos;

Agradeço aos colegas de trabalho da Secretaria do Meio Ambiente de São Leopoldo, especialmente às colegas Maria do Carmo, Gabriela, Daniela, Angela, ao colega Uitã, e as estagiárias Jislaine e Maila, pelo incentivo e torcida;

Agradeço a minha família, e especialmente ao meu noivo, minha mãe, meu irmão, minha avó materna, e ao amigo Sá, que sempre me incentivaram principalmente quando a paciência faltou, o cansaço surgiu e o medo passou. Agradeço por terem torcido e vibrado com cada pequena conquista.

SUMÁRIO

RESUMO 8

ABSTRACT 9

1. INTRODUÇÃO 10

2. OBJETIVO 12

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

3.1. ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS 13

3.2. GÉIS NA ENGENHARIA DE TECIDOS 17

3.2.1. TIPOS DE GÉIS E SUAS CARACTERÍSTICAS 18

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS 22

3.3. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS 24

3.4. BIOPOLÍMEROS E ADITIVOS UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DAS FIBRAS-GEL 29

3.4.1. BIOPOLÍMEROS 29

3.4.2. ÁGAR 30

3.4.3. ALGINATO 32

3.4.4. CARACTERÍSTICAS E DIFERENÇAS ENTRE ÁGAR E ALGINATO 34

3.4.5. TANINO 39

3.5. POTENCIAL DA APLICAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE ÁGAR E DE ALGINATO E CARACTERÍSTICAS DE SEUS SCAFFOLDS 41

4. MATERIAIS E MÉTODOS 46

4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS 46

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES E DOS PRECURSORES 52

4.2.1. VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES 52

4.2.2. DENSIDADE REAL 52

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MICROESTRUTURAL 53

4.3.1. MEV 53

4.3.2. DENSIDADE APARENTE 53

4.3.3. POROSIDADE 54

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA 56

4.4.1. ANÁLISES TÉRMICAS 56

4.4.2. INCHAMENTO 56

4.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA 57

4.5.1. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS) 57

4.5.2. INFRAVERMELHO 57

4.6. CITOTOXICIDADE 58

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60

5.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MICROESTRUTURAIS 60

5.1.1. DENSIDADE REAL DO ÁGAR 67

5.1.2. DENSIDADE REAL DO ALGINATO DE SÓDIO 68

5.1.3. DENSIDADE APARENTE DAS FIBRAS 68

5.1.4. POROSIDADE 70

5.2. ESTABILIDADE FÍSICA 73

5.2.1	INCHAMENTO	73
5.2.2.	TERMOANÁLISES	75
5.3.	<i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA</i>	79
5.3.1.	EDS	79
5.3.2.	INFRAVERMELHO	83
5.4.	<i>VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES</i>	88
5.5.	<i>CITOTOXICIDADE</i>	96
6.	CONCLUSÃO	101
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	103
8.	BIBLIOGRAFIA	104

RESUMO

Com o desenvolvimento da pesquisa em biomateriais, a engenharia de tecidos atualmente tem se tornado área de grande interesse, uma vez que não visa obter estruturas que apenas restaurem funções mecânicas, como por exemplo as próteses fazem, mas sim, tem o propósito de auxiliar positivamente o crescimento e a diferenciação celular em seus arcabouços, denominados *scaffolds*. Dependendo dos constituintes destes biomateriais, os *scaffolds* poderão induzir a multiplicação celular no sentido de formar tecidos especificamente diferenciados.

Assim o objetivo deste trabalho foi obter um *scaffold* com certa porosidade constituído por dois polímeros naturais: o ágar e o alginato de sódio. Estes polissacarídeos naturais, conferem ao material obtido características maleáveis, higroscópicas e biocompatíveis, caracterizando-o como um biomaterial com promissor uso como *scaffold* em engenharia de tecidos de moles. As fibras obtidas foram avaliadas quanto à porosidade, inchamento, microestrutura por microscopia eletrônica de varredura, análise química pontual por dispersão de energia (EDS), grupamentos químicos por infravermelho (FTIR e ATR) e propriedades térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e por termogravimetria (TGA), enquanto que as soluções polissacarídicas tiveram medidas as suas viscosidades.

Os resultados da caracterização do *scaffold* apresentaram-se promissores, apesar da evidência de citotoxicidade para alguns corpos-de-prova em cultivo de fibroblastos murinos. Foi identificado por MEV que a estrutura fibrosa do *scaffold* trata-se de um aglomerado de fibras e de formas planas aleatoriamente dispostas entre si, formando a nível molecular, de acordo com os resultados de análises térmicas e de infravermelho, uma rede interpenetrante entre ágar e alginato. Assim, concluiu-se que a partir da blenda polissacarídica foi possível obter uma espécie de tecido fibroso, com porosidades acima de 80%, percentuais de inchamento acima de 900% e com degradação térmica acima de 100°C, evidenciando que estes *scaffolds* de fibras-gel tem requisitos que poderão contribuir para aplicações em engenharia de tecidos moles.

Palavras-chave: Fibras, tecidos moles, alginato de sódio, ágar, *scaffold*, Engenharia de Tecidos, biomaterial.

ABSTRACT

With developing of biomaterials' research, tissue engineering nowadays is becoming such a interesting area, since it doesn't try to obtain structures to restore just a mechanical function, like a prosthesis do, but it has the object to positively help growing and cellular differentiation in their structures, named scaffolds. Depending on the biomaterial's constitution, scaffolds can imply cellular multiplication in order to form specific differentiated tissues.

Therefore the objective of this work was to obtain a scaffold with certain porosity constituted by two natural polymers: the agar and the sodium alginate. These natural polysaccharides confer to the obtained material malleable, hygroscopic and biocompatible characteristics, characterizing it as a biomaterial with promised use as scaffold in soft tissue engineering. The obtained fibers were characterized by porosity, swelling, scanning electron microscopy, punctual chemical analyses by dispersion energy (EDS), chemical groups by infrared analysis (FTIR and ATR) and thermo analysis by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA), while the polysaccharidic solutions had analyzed their viscosity.

The results of scaffold characterizing were presented promising, nevertheless the evidence of cytotoxicity for some samples in murine fibroblasts cell culture. It was identified by MEV that the fibrous structure of the scaffold was like an agglomerated of fibers and geometry plans randomly dispersed between them, forming in a molecular level, according to thermal and infrared analyses, a interpenetrating network between agar and alginate. Hence, the conclusion was that it is possible to obtain a type of fibrous tissue from a polysaccharidic blend with porosities over 80%, swelling percentage over than 900% and with thermal degradation over 100°C, showing that these fiber-gel scaffolds have requisites, which can contribute for applications in soft engineering tissue.

Keywords: Fibers, soft tissues, sodium alginate, agar, scaffold, tissue engineering, biomaterial.

1. INTRODUÇÃO

Desde muito tempo, o desenvolvimento de materiais, como os biomateriais, para aplicação médica ou estética, têm contribuído para uma melhora na qualidade e na expectativa de vida das pessoas e de animais. Existem evidências milenares de que as próteses foram os primeiros biomateriais desenvolvidos para a adaptação de alguma função mecânica ou mesmo estética. A prótese mais antiga já encontrada foi descoberta por Finch et al. (2011); trata-se de um molde de polegar feito em couro e madeira adaptado ao pé de uma múmia egípcia de mais de 2.000 anos.

Conforme Soares (2006) as próteses são consideradas os biomateriais mais comumente utilizados, juntamente às órteses, curativos e equipamentos médicos. Outras aplicações não tão comuns são o encapsulamento de drogas para farmacologia ou tratamentos de saúde, encapsulamento de fatores de crescimento para terapia gênica (COVIELLO ET AL, 2007) e encapsulamento de células vivas para tratamento *in situ*, em que as cápsulas são consideradas biomateriais.

Além destas aplicações, atualmente destacam-se as pesquisas no campo dos biomateriais, no sentido de desenvolver propriedades que os tornem mais biocompatíveis de acordo com o seu uso, inclusive endógeno, e especialmente de fácil degradação através do próprio metabolismo celular, à medida que tecidos vivos se regenerem. Neste campo de atuação destaca-se a engenharia de tecidos e o desenvolvimento de arcabouços, denominados *scaffolds*, que proporcionem estrutura e propriedades especiais para o cultivo celular e a formação de tecidos. Os *scaffolds* atuam como substrato para a semeadura de células, que desenvolvem-se, proliferam-se e formam novos tecidos. Desta forma, estes tipos de biomateriais poderão atuar como se implante o fossem, existindo *in vivo* transitoriamente até a regeneração dos tecidos, ou poderão atuar na formação de tecidos *in vitro* para o implante de tecidos e/ou órgãos vivos, sem ou com mínimas respostas inflamatórias, uma vez que as células do próprio paciente seriam cultivadas nos arcabouços.

Assim sendo, as melhores expectativas de longevidade da vida humana estão debruçadas sobre esta área da ciência, em que a partir de um *scaffold* e da biotecnologia associada ao cultivo de células humanas organizadas cuja órgãos poderão ser fabricados através da engenharia de tecidos.

A estimativa do mercado global de biomateriais em geral para 2017 é de US\$88.4 bilhões de dólares (taxa de crescimento de até 15% ao ano, de 2012 a 2017), devido ao crescente

número de investimentos na área, de colaboradores, pesquisadores, eventos, conferências e suporte de instituições governamentais que cercam o tema (BIOSPECTRUM ASIA, 2013).

Dentre os diversos tipos de biomateriais possíveis para a confecção de um *scaffold*, os hidrogéis destacam-se, uma vez que conferem características maleáveis e altamente higroscópicas, já utilizados em aplicação ortopédica (GYAWALI ET AL, 2013; HUANG ET AL, 2015), dental (DINIZ ET AL, 2015), vaginal (ZHOU ET AL, 2013), como lentes de contato (LIN ET AL, 2015), veículos de drogas (COVIELLO ET AL, 2007), implantes de pele (VALENTA, 2004) e coluna. Os hidrogéis mimetizam as características dos tecidos moles (chamados de *soft tissues*), que não requerem grandes resistências mecânicas, como por exemplo tecidos cartilagosos, adiposos, dentre outros, e por isso o alginato e o ágar foram escolhidos para o desenvolvimento de um *scaffold* com características fibrosas apresentados neste trabalho.

O alginato de sódio é um hidrogel, que tem sido utilizado, separadamente ou incorporado a outros polímeros, como *scaffold* para regeneração de cartilagens em testes *in vitro* e *in vivo* em murinos (WANG ET AL, 2011, 2012; SUNG-WOOK ET AL, 2012; CHUANG ET AL, 2012; HUTMACHER ET AL, 2003) ou aplicado como gel carregador de células auxiliando na composição de matrizes cartilagosas, demonstrando influenciar de alguma forma a síntese de cartilagem (MARINJNISSEN ET AL, 2002). Contudo, existem evidências de que os alginatos tem limitadas aplicações com relação à biocompatibilidade e insuficiente imuno-proteção (KLÖCK ET AL, 1993; KORBUTT & MALLET, 2009). Devido a estas restrições, optou-se por desenvolver um *scaffold* a base de alginato de sódio juntamente com ágar em sua composição.

O ágar é um outro hidrogel, conhecido por ser totalmente inerte, e é muito utilizado em eletroforese e culturas de microorganismos. Atualmente tem sido aplicado juntamente a outros polímeros e materiais, como biomaterial (ROSSI ET AL, 2011; VERMA ET AL, 2006). A forma purificada do ágar, a agarose, é também utilizada como biomaterial nas atuais pesquisas (AWAD ET AL, 2003; CHOWDHURY ET AL, 2003; LEWITUS ET AL, 2011; PARK ET AL, 2009).

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi a obtenção e caracterização de fibras-gel de ágar e alginato de sódio, por meio de processo de injeção da solução polissacarídica em álcool sob movimento rotacional, denominado de método *Jet-spinning*, com potencial uso como *scaffold* para cultivo celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS

A Engenharia de Tecidos é uma área da ciência, que reúne conhecimentos multidisciplinares no intuito de desenvolver substitutos biológicos, que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou de um órgão de acordo com Langer e Vacanti (1993). Outros autores diferenciam a Engenharia de Tecidos (ou também chamada de Bioengenharia Tecidual) da Regeneração Tecidual *in situ*, onde na primeira há a utilização de biomateriais e células para a aplicação junto aos tecidos vivos, enquanto a segunda, procura mimetizar a matriz extracelular através da aplicação dos biomateriais, junto ou não a fatores, que possam gerar alguma resposta celular para produção *in vivo* de outras células (SOARES, G. DE ALMEIDA, 2006). De qualquer forma, nesta seara os biomateriais são fabricados com a intenção de interagir com os tecidos biológicos e por isso, busca-se que sejam o mais biocompatíveis o quanto isto seja possível.

Outra forma de aplicação dos biomateriais é fazendo-se o uso junto à terapia celular, que se baseia na injeção de células, aplicadas especificamente no local do tecido lesionado ou na circulação sanguínea, adicionadas ou não a fatores de crescimento, para regenerar tecidos. Assim percebe-se que a concepção da área de atuação da engenharia de tecidos amplia-se.

Nas terapias celulares não há o esqueleto de um biomaterial para a incorporação das células, há apenas a sua injeção no corpo; contudo, para algumas aplicações, o uso conjunto aos biomateriais pode oferecer maiores vantagens. Nos casos em que há um grande volume de tecido lesionado (ou órgão) a ser substituído, a terapia celular muito provavelmente não é a primeira escolha, já que a substituição do tecido lesionado, ou a completação de um vazio, por um biomaterial, parece ser mais rápida e eficiente, uma vez que o biomaterial implantado mimetiza as condições ambientais e mais facilmente poderá habilitar as funções que o tecido desempenhava. Ou seja, cada tipo de tratamento, se realizado por Engenharia de Tecidos, Regeneração *in situ* ou Terapia Celular, tem a sua faixa de aplicabilidade, que dependerá especificamente das condições necessárias e da solução que se procura desempenhar.

Independentemente do conceito e da forma de utilização dos biomateriais para sua aplicação junto aos tecidos, no sentido de restaurarem, manterem ou induzirem a função dos mesmos, entende-se que é necessário principalmente o conhecimento multidisciplinar de ciência dos materiais, química, engenharia e biologia para o desenvolvimento desses produtos. A avaliação, mesmo que breve, sobre a viabilidade da fabricação em larga escala

deve ser estudada, bem como a funcionalidade biológica do biomaterial, que tem o pré-requisito de compor as características biocompatíveis e biofuncionais, sem induzirem efeitos sistêmicos (imunológicos, carcinogênicos, mutagênicos ou bacteriológicos). Outras áreas do conhecimento também são necessariamente complementares no desenvolvimento destes produtos, como a medicina, quanto à forma de aplicação terapêutica, cirúrgica ou clínica destes materiais para diagnósticos, tratamentos ou curas de doenças, juntamente com a farmácia e a biomedicina que ao desenvolverem fármacos e fatores genéticos, possibilitam a adequação do biomaterial para aplicação específica.

Conforme o trabalho de Soares (2006), tanto o termo biomateriais, como outras referências (bioengenharia, engenharia biomédica, biotecnologia, biomecânica, liberação controlada de fármacos - *drug delivery*, engenharia de tecidos e medicina regenerativa) são especialidades do conhecimento relativamente novas, cuja definição nem sempre é clara, sendo praticamente impossível evitar a superposição entre essas áreas e temas. Assim sendo, citam-se abaixo algumas definições para biomateriais:

São empregados em componentes implantados no corpo humano para a substituição de partes do corpo doentes ou danificadas. Esses materiais não devem produzir substâncias tóxicas e devem ser compatíveis com os tecidos do corpo (isto é, eles não devem causar reações biológicas adversas). (Rethwish, C., 2012)

Biomateriais são materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos. (Ratner, B.D., 2004)

Biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (Tweden & Helmus, 1995)

Ainda existem outras formas de definições para o setor "produtos para saúde" (PS), segundo a ANVISA⁴. Quatro grupos de PS são denominados:

- *materiais de uso em saúde: luvas, cateteres, seringas, stents, próteses, etc.*
- *equipamentos de uso em saúde: marcapassos, bisturis eletrônicos, bombas de cobalto, etc.*
- *produtos para diagnóstico in vitro: meios de cultura, kits, etc.*
- *materiais para uso em educação física, embelezamento ou correção estética.*

Assim, nesta senda, apesar das variadas definições para o termo “biomaterial”, e das variadas funções que poderão desempenhar como PS, aquelas que mais são utilizadas atualmente, devido a sua repercussão em eventos científicos, são as seguintes:

Substância inerte farmacologicamente e sistemicamente, projetada para implantação dentro de, ou incorporado a, um sistema vivo. – Clemson Advisory Board

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, www.anvisa.gov.br

for Biomaterials, The 6th Annual International Biomaterial Symposium, 20-24 de abril de 1974;

Substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. - Mirtchi et al, 1989;

Material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos. - Williams, 1987;

Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais.- Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982;

Com relação as suas propriedades específicas, os biomateriais são ainda classificados como bioativos, bioinertes, biotoleráveis ou bioabsorvíveis, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Conceitos e explicações sobre as classificações dos biomateriais, conforme resposta *in vivo*.

Conceito:	Explicação:
Biotolerável	Biomaterial que ao ser implantado gera uma resposta inflamatória. Não há ligação química entre o material e o tecido vivo. Forma-se fibrose ao redor do implante.
Bioinerte	Devido a sua natureza inerte também não promove ligações químicas entre implante e tecido vivo; porém, não gera nenhuma ou pouca resposta inflamatória.
Bioativo	O Biomaterial produz uma resposta positiva ao implante de forma a conduzir ligações químicas ao tecido vivo.
Bioabsorvível	O Biomaterial é absorvido/degradado pelas células, sendo eliminado (fagocitado ou excretado) à medida que o tecido vivo consegue ser regenerado. Sendo, portanto, útil de forma transitória até a recomposição do tecido.

Fonte: Materiais de aula da disciplina de Biomateriais do PPGE3M – UFRGS ministrada pelo Prof. Dr. Luís Loureiro Alberto dos Santos, em 2014.

As características físico-químicas dos biomateriais implicarão em respostas biológicas diferentes dependendo da morfologia da célula e do meio que a circunda. Assim sendo, o entendimento das características do tecido vivo que se procura compatibilizar, é importante ao

desenvolvimento de um novo biomaterial, a fim de que as chances de sucesso sejam maiores do que se houvesse desenvolvido um material sem avaliação dos pré-requisitos de sua utilização.

Diversos estudos *in vitro* são realizados em poços de placas de cultura junto à células vivas para verificar a possibilidade de utilização *in vivo*. Neste campo de estudo é que a engenharia de tecidos se desenvolve. O biomaterial, chamado de *scaffold*, é posto em placas de cultivo celular, esterilizado, e então é semeado com meio de cultura e células vivas de acordo com procedimentos e normas descritos na literatura (ISO 10.993⁵, ASTM F2150⁶, ASTM F2739⁷, dentre outras).

As células mesenquimais (MSCs) geralmente são utilizadas para semeadura *in vitro*. Estas células são consideradas as precursoras de outras linhagens, como condrócitos, osteócitos, adipócitos e tenócitos (ver Tabela 2), devido ao seu grande potencial regenerativo e modulador de respostas imunológicas. Fatores químicos e inclusive a morfologia do *scaffold* induzirão a diferenciação das MSCs em algumas destas linhagens celulares, e por consequência poderão formar tecidos *in vitro*.

Tabela 2. Linhagens celulares.

Conceito:	Explicação:
Condrócito	Células presentes no tecido cartilaginoso. Condroblastos são células precursoras dos condrócitos.
Osteócito	Células presentes no tecido ósseo. Osteoblastos são células precursoras dos osteócitos.
Adipócito	Células presentes no tecido adiposo. Células armazenadoras de gorduras.
Tenócito	Células que formam os tendões. (Tolentino, F. T., 2010)

Um dos primeiros ensaios *in vitro* a serem realizados é o ensaio de adesão celular, a fim de verificar se as células mesenquimais irão reconhecer o biomaterial como matriz extracelular mais compatível do que os poços de cultura (especialmente tratados para receber células vivas) para o seu desenvolvimento *in vitro*. Outros ensaios de grande importância são

⁵ Avaliação biológica do dispositivo médico - *Biological Evaluation of Medical Device*

⁶ Guia para a caracterização e teste de biomateriais tipo *scaffold* utilizados em produtos médicos de engenharia de tecidos - *Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products*

⁷ Guia para quantificar a viabilidade celular junto aos biomateriais do tipo *scaffold* - *Guide for Quantitating Cell Viability Within Biomaterial Scaffolds*

os citotóxicos (ISO 10993-5), carcinogênicos e genotóxicos (ISO 10993-3), mutagênicos (diferenciação celular) e os de degradação em meio de cultura ou em meio simulado ao sangue humano (SBF – *Simulated Body Fluid*) (ISO 10993-9).

Um dos principais objetivos da validação e utilização de normas e procedimentos internacionalmente aceitos, se encontra na possibilidade da reunião de esforços para a comparação dos estudos, evolução das pesquisas e aceitação de padrões de qualidade. Em geral, para cada tipo de material utilizado como biomaterial, já existem normas amplamente utilizadas, como por exemplo, aquela utilizada para a caracterização de hidrogéis, a ASTM F2900-11, a ASTM F2450, que serve como guia para análise de microestrutura de biomateriais poliméricos, a ASTM F2064, que também serve como guia para caracterização e teste de alginatos para uso em biomateriais, a ASTM F2315, que guia as técnicas de imobilização e encapsulamento de células em géis de alginato, dentre outras.

3.2. GÉIS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Os géis têm sido extensivamente aplicados como veículos de drogas (COVIELLO, MATRICARDI, MARIANECCI, & ALHAIQUE, 2007) e para a mimetização dos tecidos moles - *soft tissues* (CHOI ET AL., 2012; MARIJNISSEN ET AL., 2002; WANG ET AL., 2012; WANG, YANG, LIN, LIU, & LIN, 2011; XU, WANG, YAN, YAO, & GE, 2010), ou seja, tecidos que não requerem grandes resistências mecânicas, como por exemplo, tecido epitelial, nervoso e conjuntivo (ou conectivo) do tipo cartilaginoso, adiposo e sangüíneo (ver Tabela 3).

Os tecidos conjuntivos têm a função de unir e manter ligadas as diversas partes do organismo, funcionando também como barreira aos agentes infecciosos, e diferenciando-se em consistência, de moles e gelatinosos, a fibrosos e duros, dependendo das exigências estruturais locais do organismo.

Segundo Guimarães & Adell (1995), de maneira geral, o tecido conjuntivo propriamente dito, é composto de células e fibras extracelulares envoltas em uma substância fundamental (amorfa), viscosa como um gel fino, constituída por mucopolissacarídeos, como o ácido hialurônico, que se encontra entre as articulações (como líquido sinovial) e entre as fibras extracelulares do próprio tecido. Dependendo do nível de compactação e organização das fibras extracelulares, se apresentadas compactamente entre si ou em rede frágil de tecido solto, o tecido se denominará como conjuntivo denso ou frouxo, respectivamente. No tecido denso, quando as fibras estão dispostas de forma desorganizada, classifica-se como tecido

denso irregular, e quando estão regularmente em paralelo, como nos tendões e aponeuroses, são chamados de denso regular.

Assim, dependendo dos tipos de géis, bem como do seu processo de fabricação e gelificação, diferentes morfologias de biomateriais poderão ser obtidas para determinadas e específicas aplicações mimetizando as características dos tecidos vivos.

Tabela 3. Tipos de Tecidos Vivos.

Tecido epitelial (revestir e proteger)	Tecido conjuntivo (preencher, unir e sustentar os órgãos)	Tecido muscular (propriedades contráteis)	Tecido nervoso (sistema nervoso central e periférico)
	Cartilaginoso		
	Adiposo		
	Ósseo		
	Sanguíneo		

Fonte: Guimarães & Adell (1995).

3.2.1. TIPOS DE GÉIS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Géis em geral são denominados como redes coloidais não fluidas, ou redes poliméricas (Figura 1), os quais têm seus volumes expandidos por um fluido (qualquer fluido, em que naturalmente não sejam solúveis) (nomenclatura da IUPAC⁸).

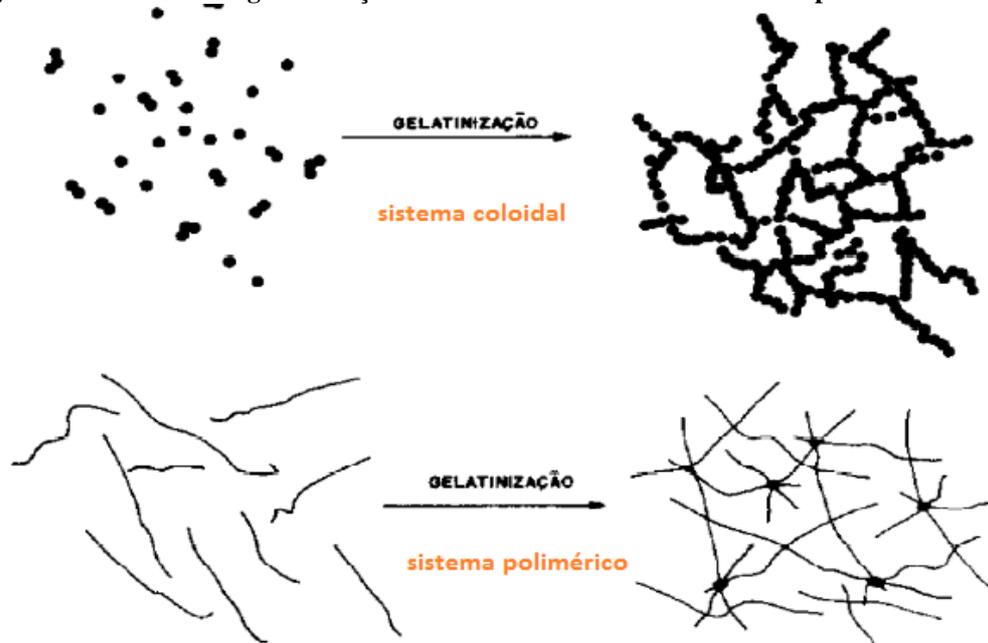
No caso de a água ser o agente de intumescimento da rede de gel, denomina-se o mesmo de hidrogel. Quando o solvente do gel ou hidrogel formado é removido por secagem à pressão ambiente chama-se o gel de xerogel (onde “xero” significa “secar”), e quando a secagem é realizada acima de uma pressão e de uma temperatura críticas, chama-se de aerogel. Contudo, mesmo que os géis sejam secos, independentemente do modo, ao entrar em contato com um fluido compatível, terão entumescida a sua estrutura.

Sistemas coloidais podem formar géis e são caracterizados quando moléculas ou partículas atraem-se formando uma dispersão num meio, no qual suas dimensões, ou os espaços entre elas, sejam da ordem de 1 a 1000 (1µm) nanômetros em uma dada direção. Os géis são um tipo de emulsão semi-sólida, de dispersão de um líquido em outro, nos quais ocorre a transição de fase de líquido para sólido, de acordo com a temperatura e forças moleculares. Diferentemente do sistema coloidal denominado de “sol” que é composto por

⁸ International Union of Pure and Applied Chemistry. Acesso: <http://goldbook.iupac.org/G02600.html>

uma suspensão de sólidos em um líquido (ATKINS, P. & JONES, L., 2001), e que não tem capacidade gelificante. Muitas vezes a partir da obtenção de um sol, é que um gel pode ser formado.

Figura 1. Mecanismo de gelatinização em sistemas coloidais e em sistemas poliméricos.

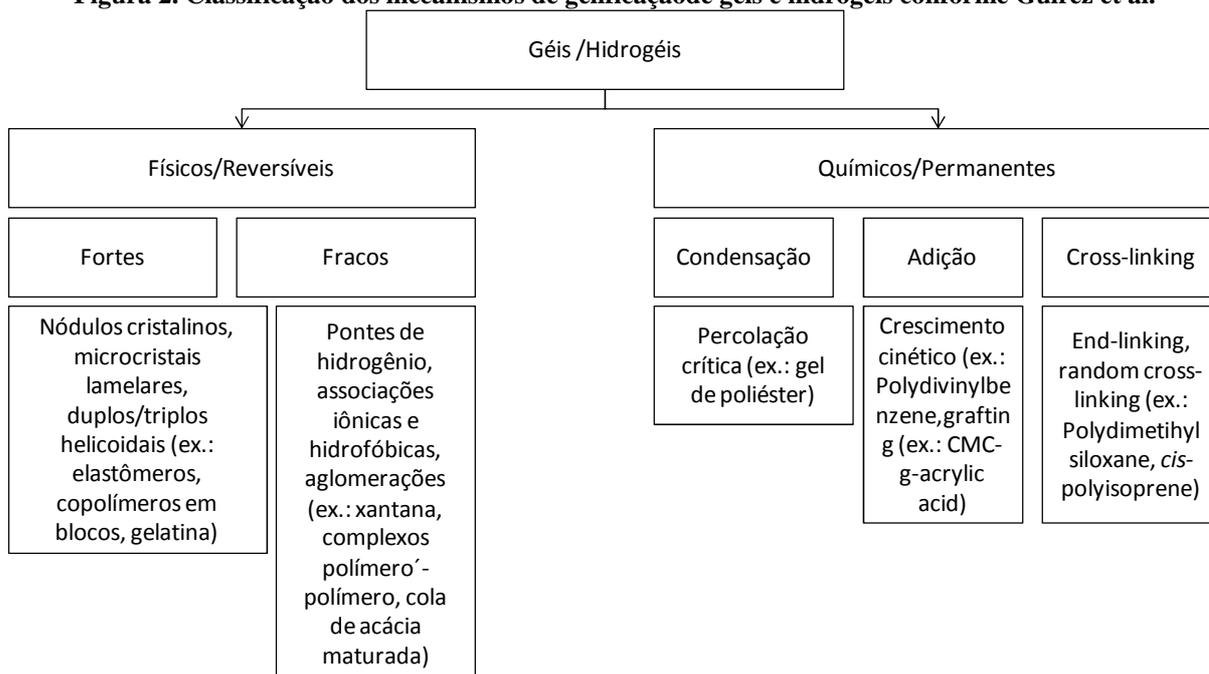


Fonte: Hiratsuka, Santilli e Pulcinelli, (1994, p. 171)

Nos sistemas poliméricos, a formação do gel se dá por ligações químicas covalentes entre cadeias de polímeros (*cross-linking*) conectadas tridimensionalmente em rede (*network*). As moléculas estão covalentemente ligadas de forma que suas redes de géis classificam-se como permanentes, em função da força de ligação e das características mecânicas, bem mais resistentes, que acabam sendo conferidas ao material polimérico delas formadas. Por se tratarem de estruturas supramoleculares, as propriedades físico-químicas dos géis estão intimamente relacionadas a sua estrutura e conformação de cadeia.

Já a formação dos géis por colóides se dá pela agregação de pequenas estruturas moleculares, através de forças secundárias, como forças de Van der Waals e de pontes de hidrogênio. As forças intermoleculares secundárias são de baixa atratividade, e por isso, formam géis mais fracos do que aqueles formados por estruturas poliméricas. Gulrez et al (2011) propõem a definição dos géis, quanto ao seu mecanismo de gelificação, em géis físicos ou géis químicos, conforme Figura 2.

Figura 2. Classificação dos mecanismos de gelificação de géis e hidrogéis conforme Gulrez et al.



Fonte: Gulrez, Syed K.H. et al (2011)

Tem sido aceito que, a maioria dos géis termorreversíveis consiste de regiões cristalinas, chamadas de *junction zones*, que são onde as ligações químicas ou as regiões de atratividade entre as moléculas ocorrem, e em regiões amorfas nas quais as moléculas estão aleatoriamente distribuídas e enoveladas.

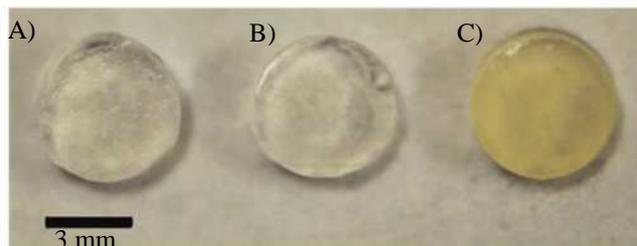
Também há de se supor que diferentes comportamentos poderão ser adotados por cada fração da molécula dependendo dos mecanismos de gelificação envolvidos, que caracterizarão o gel de acordo com a sua maior tendência de gelificação, ou seja, como reversível (físico) ou permanente (químico), dependendo das características do meio fluídico.

A gelificação física, que ocorre na sua maioria por forças secundárias, onde não há troca ou partilha de elétrons, em geral são afetadas pela variação da temperatura. Já a gelificação química, nas quais as forças primárias são as responsáveis pela agregação das fibrilas (estruturas supramoleculares), não são afetadas pelas variações da temperatura ou mesmo pela troca e partilha de elétrons, já que se tratam de ligações covalentes, iônicas e metálicas.

Além das formações das redes de géis a partir de apenas um constituinte, independentemente do seu modo de gelificação, poderá haver a formação de redes interpenetrantes de géis e hidrogéis. Ocorre quando duas redes formam-se independentemente como uma blenda, com ou sem interferências sobre uma ou outra rede. DeKosky et al. (2010) obteve a formação de uma rede interpenetrante (*interpenetrating network – IPN*) de hidrogel a partir de 2-hidróxi-etil agarose e polietileno glicol diacrilato (PEG-DA), conforme Figura 3. A

rede de PEG-DA manteve a estrutura flexível e forte para agüentar as solicitações de um tecido cartilaginoso de joelhos, enquanto que a rede de agarose manteve a consistência fluídica do meio. Este comportamento retrata exatamente o funcionamento dos tecidos conjuntivos cartilagosos, conforme Guimarães (1995).

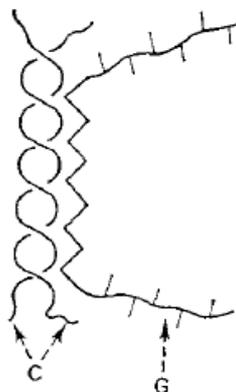
Figura 3. (A) Gel de agarose acelular; (B) Acelular IPN Gel; (C) IPN Gel encapsulado com condrócitos.



Fonte: DeKosky et al (2010).

Conforme Dea et al (1972) algumas misturas de polissacarídeos, principalmente com residuais de galactose, poderão formar associações não covalentes, como uma rede tridimensional (*network*) conectada (*cross-linked*) através de transições cooperativas entre as moléculas⁹. Os autores (Dea et al, 2011) exemplificam este mecanismo de associação molecular, observando uma mistura de cadeias de galactomanas e estruturas helicoidais de carragenas ou agarose, através de medições de rotação óptica, de espectroscopia de ultravioleta e de dicroísmo circular (FASMAN, 1996). Galactomanas, carragenas e agarose são tipos de polissacarídeos encontrados em algas e leguminosas, que quando misturados formam géis de transição cooperativa, conforme Figura 4.

Figura 4. Modelo proposto por Dea et al (2011) para a interação entre as cadeias de carragenas ou agarose (C) e galactomanas (G).



⁹ Dea et al utiliza o termo *crosslinking* para referir-se às associações entre as moléculas; contudo, de forma diferente da denominação empregada pela IUPAC, que define o termo *crosslinking* como a ocorrência de uma reação química da qual emanem quadro cadeias, a partir de um sítio ou de grupos existentes na macromolécula.

Além da estrutura, a característica hidrofílica dos hidrogéis, ou seja, a sua afinidade com a água pode ser regulada por grupamentos tais como -OH, -COOH, -CONH₂, -NH₂ e SO₃H, de forma a gerar hidrogéis neutros ou iônicos.

Dependendo das características do meio extracelular e das células do tecido que irão aderir ao *scaffold* de hidrogel, certa afinidade polar ou apolar será necessária ao biomaterial para que este seja o mais biocompatível possível. Da mesma forma, a insolubilidade do hidrogel, e dos géis em geral, deverá ser adequada para o tempo de implante do biomaterial, até que as células tenham se desenvolvido o suficiente para recompor e regenerar os tecidos adjacentes. Assim, o controle sobre a solubilidade do gel deve ser previamente avaliado de acordo com a aplicabilidade no organismo, e será maior ou menor de acordo com o grau de entrelaçamento das moléculas poliméricas ou ao número de reticulações existentes na rede e/ou devido ao grau das interações físicas.

As características mais citadas referentes aos hidrogéis, principalmente quanto a sua aplicação na Engenharia de Tecidos, são as seguintes: são atóxicos, têm capacidade de intumescimento em fluidos biológicos e em água, têm consistência elastomérica, de forma a minimizar os efeitos do atrito sobre os tecidos vivos, têm alta permeabilidade aos fluidos corpóreos devido à alta porosidade e permitem a incorporação de fármacos de diferentes polaridades para liberação controlada de drogas (MOURA, 2005). Além destas, outras características são citadas como por exemplo que são biocompatíveis, biodegradáveis, e que boa parte deles são reconhecidos por moléculas biológicas (LIN & METTERS, 2006) e naturalmente tem macroestrutura tridimensional (COVIELLO ET AL, 2007).

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS

De acordo com a norma ASTM F2900-11 (2011), que versa sobre os métodos padrões para a caracterização de hidrogéis utilizados em medicina regenerativa, alguns fatores podem ser destacados como necessários ao desenvolvimento de um tecido, são eles: a habilidade do biomaterial em suportar a permeabilidade de gases dissolvidos, de nutrientes e de materiais bioativos, o manutenção do crescimento e das migrações celulares concomitantemente à integridade da forma e das propriedades do biomaterial durante o período de sua utilização, e no caso de *drug delivery*, manter certa taxa de veiculação de drogas, além de outros fatores.

De forma específica, a norma indica alguns estudos importantes para a caracterização de hidrogéis, como ilustra a Tabela 4. Além disso, relaciona cada um dos testes específicos para cada condição de biomaterial (se é um hidrogel frágil ou sensível a modificações de

geometria), caracteriza o método quanto à obtenção de resultados quantitativos ou qualitativos, se é facilmente aplicado (se é invasivo ou não) e se é um método sensível ao equipamento e ao operador (Tabela 2 da norma ASTM F2900-11).

Tabela 4. Exemplos de métodos com significativo conteúdo indicado para a caracterização de hidrogéis.

Atributos para cada fator chave de caracterização de hidrogéis			
Propriedades Biológicas	Cinética	Estabilidade físico-química	Transporte de massa
Biocompatibilidade (ISO 10993, F895)	Tempo de gelificação (F2315)	Estabilidade ambiental (D4516)	Migração celular (F2315)
Agentes estranhos (F2383, ST72, ISO 22442, 21 CFR 210, 21 CFR 221, 21 CFR 610, 21 CFR 820)	Taxa de inchamento (ISO 10993, F2214 p/ UHWPE)	Propriedades mecânicas (F2150)	Transporte de nutrientes e resíduos (F2450)
...	Degradação da matriz (F2150)	Encapsulação celular (F2315)	Taxa de veiculação de agentes bioativos (F2450)

Fonte: ASTM F2900-11 (2011)

De acordo com a norma ASTM F 2900 – 11 (2011), a caracterização das propriedades mecânicas dos hidrogéis frágeis é de difícil medição devido a sua sensibilidade e comportamento não estacionário (ou fora do equilíbrio). Ensaio de tração e mesmo compressão poderão não ser totalmente representativos de acordo com a norma.

Convenientemente, as propriedades mecânicas de hidrogéis são apenas obtidas através de métodos ultrasônicos, como a sonoelastografia. Este método se baseia no efeito Doppler, ou seja, na propagação e na atenuação do som dentro do material, com espessura e densidades conhecidas, tendo como resposta as vibrações do material, das quais podem ser determinadas as propriedades mecânicas, principalmente o módulo elástico do material.

Uma das dificuldades da realização dos ensaios de tração ou compressão para as fibras obtidas neste trabalho, está relacionada à obtenção de corpos de prova cilíndricos e homogêneos de acordo com a norma ASTM D 5024 (2012) (para ensaio de compressão) e parâmetros geralmente utilizados (diâmetro: altura na razão 1:2) (VOLKMER, 2006). Seria necessário que fossem analisadas as microestruturas das fibras-gel, a fim de garantir que as mesmas fossem homogêneas e com semelhante densidade de reticulações por todo o volume

da amostra (com a mesma densidade de *junction zones*) para que não houvessem interferências nos resultados obtidos, e fosse assegurada a reprodutibilidade. Apesar desta dificuldade, a estabilidade física e química dos biomateriais de fibras-gel puderam ser inferidas com base nos experimentos de porosidade e inchamento, bem como através das culturas com células.

Os experimentos de porosidade, propriedade crítica para a migração, crescimento e proliferação celular, podem ser seguidos de acordo com a norma ASTM F2450-10, sobre dimensionamento e caracterização de microestruturas de *scaffolds* poliméricos para uso como produtos em Engenharia de Tecidos. Nesta norma, alguns cuidados são descritos no que tange a caracterização de materiais moles. Por exemplo, cita-se que não é aconselhável a utilização de porosímetro de mercúrio para realização de medidas de porosidade, já que a amostra analisada tende a deformar-se ao longo do teste. Da mesma forma, como não é apropriada a utilização da técnica de embutimento para análise de hidrogéis por MEV, mesmo que liofilizados, pois há que se garantir que nenhuma umidade deforme a amostra dentro do arcabouço, que é higroscópica naturalmente.

Entretanto, a MEV é um dentre os primeiros métodos que a norma ASTM F 2450-10 cita para análise microestrutural dos materiais, juntamente com a microscopia de transmissão, e softwares de imagem, que auxiliam nas coletas de dados de tamanhos de poros, distribuição dos mesmos, estimativas de permeabilidade e tortuosidade. Contudo, mesmo sem a utilização de softwares, pode ser possível que se percebam algumas características, que o material poderá performar, como servir de material aderente devido à alta rugosidade, ou indicar certa capacidade de absorção ou permeabilidade devido à visualização de reentrâncias e poros através da análise das imagens.

Outros fatores, que também influenciam as caracterizações de *scaffolds* para utilização em engenharia de tecidos são a variabilidade físico-química entre as matérias-primas disponíveis para confecção dos materiais, as condições de processamento variáveis, o tipo de célula cultivada em certo tempo, as condições do meio de cultivo, possíveis modificações de rota metabólica celular, dentre outros.

3.3. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Elencar o processo de fabricação mais conveniente ao biomaterial ou *scaffold* que se pretende obter é uma importante escolha no desenvolvimento de um produto de Engenharia de Tecidos, já que dependendo das propriedades que se deseja, e dependendo dos

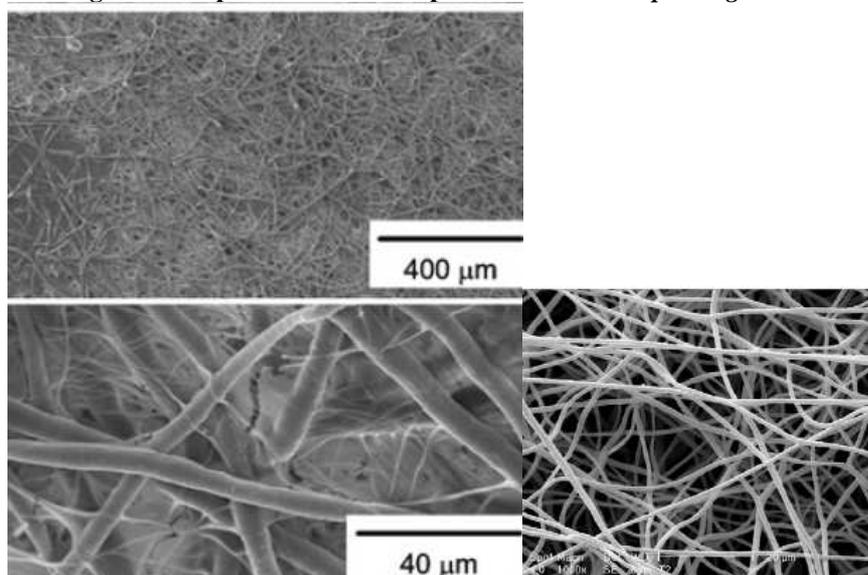
constituintes utilizados, um ou outro processo de fabricação se adequará melhor aos requisitos biológicos de sua aplicação.

Uma variedade de tecidos tem propriedades anisotrópicas, ou seja, não reproduzem a mesma morfologia ou estrutura em todas as direções, como por exemplo, os tendões, os músculos, os ligamentos e os ossos, de tal forma que durante o processo de fabricação dos biomateriais, algumas características podem ser mimetizadas, variando alguns parâmetros como tipo e/ou concentração do polímero ou do solvente utilizado, variáveis de fabricação, como pressão, vazão, umidade ou temperatura, ou mesmo fabricando o material por camadas de diferentes composições e com diferentes geometrias.

Para a fabricação de *scaffolds* de origem polimérica, seguem abaixo alguns dos mais importantes processos, largamente utilizados na literatura.

Eletrospinning (Figura 5) – trata-se de tecnologia em que há a injeção de solução polimérica entre um ânodo (agulha) e um cátodo (prato coletor), de forma que a distância entre estes dispositivos, o diferencial de voltagem aplicado e o diâmetro da agulha para a injeção da solução são parâmetros de controle para a reprodutibilidade das propriedades dos biomateriais formados como: porosidade e tamanho de fibras.

Figura 5. Biopolímero formado pelo método *Eletrospinning*.



Fontes: Lee et al. (2013) e Shabani et al (2012).

As soluções utilizadas na técnica de eletrospinning devem ser condutoras e poderão conter partículas dispersas como reforço estrutural, agente de carga elétrica ou de biocompatibilidade. Vechietti ET AL (2014), do laboratório Labiomta (UFRGS, Porto Alegre,RS) produziu fibras em PLGA (Poli (Ácido Lático-co-Glicólico) e Poli-isopreno contendo hidroxapatita utilizando o método eletrospinning.

Solution Casting – solução polimérica dissolvida em solvente orgânico, a fim de após a evaporação do solvente, restarem apenas os poros da ocupação das moléculas orgânicas.

Precipitation Casting/Particulate (Salt) -Leaching Techniques– dissolução de partículas em solução polimérica, com ajuda ou não de solventes, de forma que após formada a matriz polimérica, a mesma seja apenas constituída de polímero e partículas dispersas. Estas partículas podem ser extraídas dissolvendo-as em um não solvente do polímero para formação de uma estrutura porosa. Exemplo: sais solúveis dissolvidos em matriz polimérica, que depois de curada passa por lavagem com água deionizada para a dissolução dos sais.

Gel Casting – formação de um gel a partir da dissolução de um polímero em um solvente, e consequente evaporação do solvente sobre um molde, utilizando baixas temperaturas (<45°C). Parecido ao método *Solution Casting* com a diferença de que trata-se da formação de um gel.

Foaming/ Gas foaming/ High-pressure Gas-Foaming - trata-se de um método simples e econômico de obtenção de um material com poros devido à agitação e consequente formação de espuma na solução polimérica que irá solidificar. Podem ser adicionados surfactantes, bolhas de ar ou agentes formadores de gases, para a obtenção da espuma (SHARMA ET AL, 2013), além de altas pressões de gás.

Prototipagem – o material é fabricado de acordo com um design planejado para atender as necessidades de aplicação da peça. Os protótipos podem ser fabricados através de moldes especificamente desenhados, em que ocorra a deposição, injeção, extrusão ou qualquer outra técnica que possibilite a confecção do material dentro de especificações projetadas. Atualmente a impressão 3D é uma tecnologia que está sendo largamente utilizada devido à facilidade de projeto em software, e utilização de polímeros, que atingindo seu ponto de fusão, conseguem ser injetados através de um cabeçote de impressora (XU ET AL, 2010; WANG, C. ET AL, 2011, WANG, F.. ET AL, 2004).

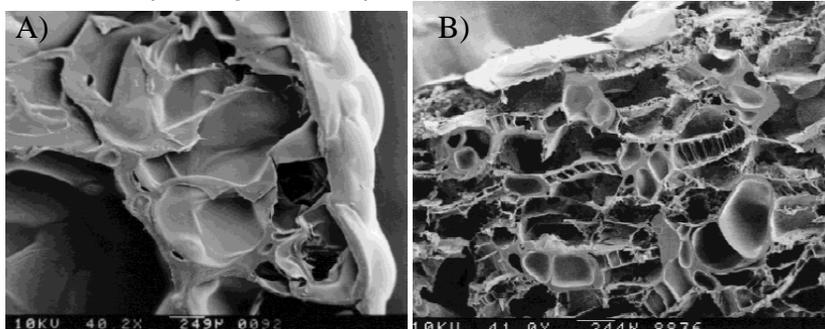
Microesferas – as microesferas são obtidas por gotejamento de uma solução polissacarídica que gelifica na forma de cápsulas, densas ou ocas, de acordo com a aplicação e necessidade. Na literatura existem muitos artigos utilizando o alginato de sódio como encapsulante de fatores de crescimento, fármacos e até mesmo células para tratamento de regeneração de tecidos (WANG ET AL, 2011, 2012).

Algumas tecnologias quando associadas são fontes de criação de novos processos de fabricação, como por exemplo, a utilização do processo de *Gas Foaming* juntamente com *Salt/Particulate Leaching* (HARRIS ET AL, 1998). Harris et al (1998) fabricou um material

de alta porosidade, conforme ilustrado na Figura 6, utilizando-se de uma matriz polimérica, na forma de disco, em que partículas de cloreto de sódio estavam dissolvidas nela. Após longo período de exposição à elevada pressão e saturação de gás carbônico (CO₂), a pressão foi reduzida até que se atingisse a pressão atmosférica. O gás adsorvido no material tendeu a escapar da matriz, formando poros, e assim que foi atingido o equilíbrio termodinâmico, as matrizes foram mergulhadas em água destilada por até 48 horas. Assim, as partículas de sal foram dissolvidas, formando ainda mais poros, depois da adsorção e dessorção do CO₂, sem o uso de solventes orgânicos, que comprometem a biocompatibilidade dos biomateriais formados.

A utilização mais comum é a união dos processos *Solution Casting* e *Particulate Leaching*, em que primeiramente há a evaporação do solvente dissolvido na solução polímero-particulado (sais solúveis), e depois a lavagem dos sais. Teng, Y. D et al (2001) utilizou este processo para a confecção de *scaffolds* de uma blenda polimérica composta de poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) e um copolímero: poly-lactic-co-glycolic acid - polylysine dissolvida em clorofórmio e partículas de sais com diâmetros entre 250–500 µm para aplicação em medula espinhal.

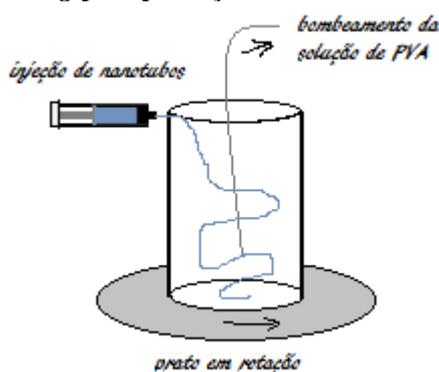
Figura 6. (A) *Gas-foaming* e (B) *Gas-foaming* juntamente com *Particulate Leaching*.



Fonte: HARRIS, L. D. ET AL (1998).

Wet spinning (VIGOLO ET AL, 2000) - este método é muito parecido ao que está sendo utilizado nesta dissertação, processo no qual uma solução é injetada diretamente sobre uma solução não-solvente. Lewitus et al (2011) e Vigolo et al (2000) fabricaram através do método *wet spinning*, fibras de nanotubos de carbono embebidas em hidrogéis que apresentaram alta condutividade e por isso, são consideradas promissoras para regeneração de tecidos nervosos. A Figura 7 demonstra de maneira simples o processo adotado por Vigolo et al (2000), em que o béquer encontra-se em rotação e há a injeção da solução com dispersão de nanotubos e a formação das fibras.

Figura 7. Processo *Wet spinning* para produção de fibras de tubos de carbono e hidrogéis.



Fonte: Figura adaptada de Vigolo et al (2000).

Fukae et al (2005) também utilizaram processo semelhante, que denominou como *Gel-spinning* para a fabricação de fibras de gelatina, a partir de uma solução 10% gelatina – dimetilsulfóxido. A solução foi extrusada através de seringa com canal interno para saída do ar, e canal externo para saída da solução, movimentando a seringa circularmente sobre uma solução de metanol, que se encontrava parada. Ou seja, o termo *spinning* para este método refere-se à movimentação da injeção, de forma circular, como se “desenhassem as fibras” (comparação realizada pelo próprio autor no artigo) assim que fossem injetadas e mergulhadas na solução de metanol, onde ficaram por até uma semana.

O método de fabricação adotado nesta dissertação, chamado e patenteado pelos autores como *Dripping* (VASCONCELLOS & DOS SANTOS, 2013), em muito se parece com os métodos apresentados acima; porém, se diferenciam na prática. Neste trabalho procurou-se adequar o termo *Dripping* para *Jet-spinning*, devido à injeção (*jet*, que em inglês significa jato) da solução, sob vazão constante, em um não solvente, e não utilizar o termo gotejamento (*Dripping*), já que é a partir da injeção da solução polissacarídica que há o estiramento e a desidratação do injetado em forma de longas e enoveladas fibras.

De certa forma também este método se diferencia do método *Wet-spinning* (VIGOLO, 2000) e do *Gel-Spinning* (FUKAE, 2005) apresentados anteriormente, já que no primeiro é o recipiente da solução que está girando sobre um prato, enquanto há retirada de solução por bombeamento, e no segundo método, a solução de não solvente encontra-se parada, e é a injeção da solução polissacarídica que se movimenta.

No método *Jet-spinning* a própria solução de não solvente é colocada sob agitação com o auxílio de um agitador mecânico, de forma que a solução forme um vórtex, como será explicado em Materiais e Métodos. Ou seja, trata-se de uma movimentação controlada, em que as rotações por minuto da solução de não solvente permanecem constantes até o final da injeção da solução polissacarídica, em que se dá o fim da batelada.

Também quanto ao método de *Gel-spinning*, o que diferencia é a forma de injeção, que é composta por injeção de ar e de solução por dois canais da seringa. Assim sendo, o que surge como inovador neste trabalho é a proposição da injeção da solução polissacarídica, ao invés do gotejamento, da aplicação de um agitador mecânico para controle da variável de agitação do não-solvente e formação do vórtex, além da utilização dos constituintes, ágar e alginato de sódio conjuntamente, para a obtenção das fibras desenvolvidas.

3.4. BIOPOLÍMEROS E ADITIVOS UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DAS FIBRAS-GEL

3.4.1. BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros são polímeros de origem biológica, poderão ser biodegradáveis de origem microorgânica (ex.: PLA: poli ácido láctico; PHB: poli 3-hidroxi-butirato), vegetal (ex.: derivados de amidos, celulósico, etc), animal (ex.: quitina, gelatina, etc) ou fóssil (ex.: poliésteres, etc).

A grande vantagem da utilização de biopolímeros é que são fontes renováveis, encontram-se abundantemente disponíveis e não necessitam do uso de solventes tóxicos para a sua extração. Os polissacarídeos são exemplos de biopolímeros extensivamente utilizados nas áreas alimentícia, têxtil, cosmética e atualmente muito estudados para as aplicações em Engenharia de Tecidos. A desvantagem da utilização destes materiais encontra-se na variabilidade das propriedades como peso molecular, viscosidade, carga elétrica e presença de contaminantes ou outras substâncias indesejadas, dependendo da origem das matérias-primas e das condições de produção e processamento das mesmas. Enquanto que materiais sintéticos podem ter suas propriedades controladas e reprodutíveis uma vez que são obtidos através de reações químicas, já conhecidas (DRURY & MONEY, 2003).

Tanto o ágar como o alginato de sódio são biopolímeros, polissacarídeos de origem algácea (Reino Protista); contudo, o primeiro é extraído de algas vermelhas do filo Rhodophyta, enquanto que o segundo é extraído de algas marrons, do filo Phaeophyta/Phaeophyceae ou de bactérias (*Pseudomonas spp.* e *Azotobacter vinelandii*) (RHIM, 2004; GARCIA-CRUZ, 2008).

As espécies mais comuns para extração de ágar são as *Gelidium spp.*, *Gelidiella spp.* (pertencentes à ordem Gelidiales) e também as *Gracilaria spp.* (pertencentes à ordem

Gracilaries). Inclusive no Brasil as espécies mais cultivadas para obtenção de ágar são as *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria caudata*, *Gracilaria domingensis* e *Hydropuntia córnea*, tanto para o comércio interno quanto externo (SANTOS, P. J, 2011). Já para a extração de alginato, principalmente no Brasil, a espécie predominante é a *Sargassum* (SZECHI & PAULA, 2000).

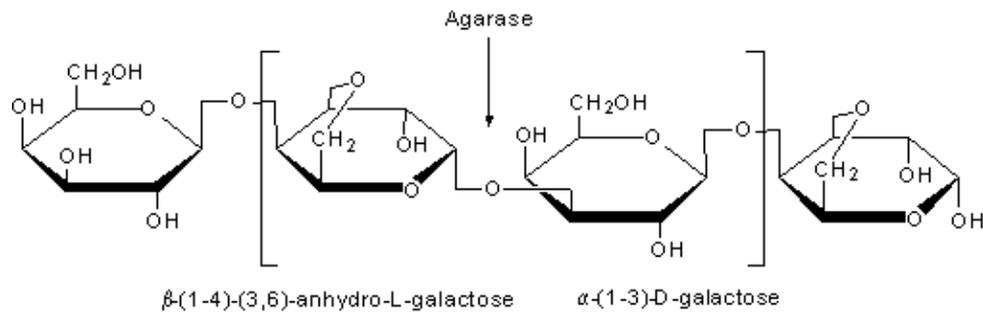
3.4.2. ÁGAR

O ágar é constituinte, como carboidrato estrutural, das paredes celulares das algas e sua concentração varia de acordo com as condições do mar: concentração de CO₂ no meio, tensão de oxigênio, temperatura da água e radiação solar, influenciando também diretamente sobre os grupamentos químicos deste polissacarídeo.

A estrutura molecular do ágar é complexa e heterogeneamente linear formada por unidades de 3,6-anidro-L-galactose (ou L-galactose-6-sulfatos), D-galactoses e L-galactoses conectadas por ligações β -(1,4) e α -(1,3) alternadamente. Destas ligações pode-se formar a unidade polissacarídica principal e básica de todos os ágares: a agarobiose, através da enzima agarase, conforme Figura 8 (LABROPOULOS ET AL, 2002). A regularidade e a composição destes dissacarídeos na estrutura molecular regulam a habilidade da gelificação.

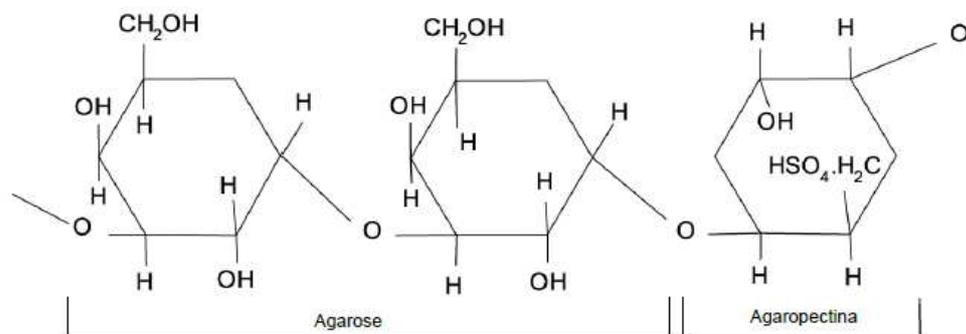
Além disso, o ágar pode fracionar-se majoritariamente em dois outros constituintes: a agarose e a agarpectina (Figura 13), ou em outros dissacarídeos, como por exemplo o Phorphyran, que é identificado também como um tipo de ágar (originário da alga *Phorphyran spp.*) (CHI ET AL, 2012) e pode ser obtido pela ação da enzima agarase, produzidas por alguns microorganismos (HEHEMANN ET AL, 2010). A agarose é a fração gelificante, essencialmente livre de cargas sulfatadas; enquanto que, a agarpectina é a fração não-gelificante do ágar, formada por agarose e porcentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurônico, além de pequenas quantidades de ácido pirúvico, que dependendo do tipo de algas marinhas, são encontrados em diferentes proporções na constituição da agarpectina (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

Figura 8. Estrutura básica molecular do ágar, ação da enzima agarase.



Fonte: site de fornecedores da substância: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html>

Figura 9. Formas da Ágarose e Ágaropectina.



Fonte: SANTOS, 2011.

O conteúdo de sulfato na fração da agaropectina ou da porfirina decresce com a maturidade da alga, repercutindo em géis mais resistentes (SUZUKI ET AL, 2001). A partir da completa hidrólise do ágar podem-se obter os monômeros de açúcares tais como D-galactose, 3,6-anidro-L-galactose, e L-galactose-6-sulfato, que são estruturas de armazenamento de energia e passíveis de serem degradadas enzimaticamente por bactérias ou quimicamente.

Além da sua capacidade energética, o ágar é um material com grande potencial para utilização como *scaffold* para Engenharia de Tecidos, já que se trata de um polissacarídeo hidrofílico, que possibilita a transferência de massa (nutrientes e metabólitos) através de seu meio, é biocompatível, é utilizado extensivamente na indústria alimentícia, farmacêutica, em cultivos celulares, em análises de eletroforese, possui baixa taxa de degradação em meios aquosos (BAO ET AL, 2008), é inerte a células mamíferas (NISBET ET AL, 2008 APUD LEWITUS ET AL, 2011), é não aderente celular (RAGO ET AL, 2008 APUD LEWITUS ET AL, 2011), pode ser “funcionalizado”, pois contém hidroxilas em sua cadeia possibilitando a incorporação de grupamentos, como proteínas, peptídeos e glicogênio ao longo dela, além de formar géis porosos (PERNODET ET AL, 1997 APUD LEWITUS ET AL, 2011), e pode ser

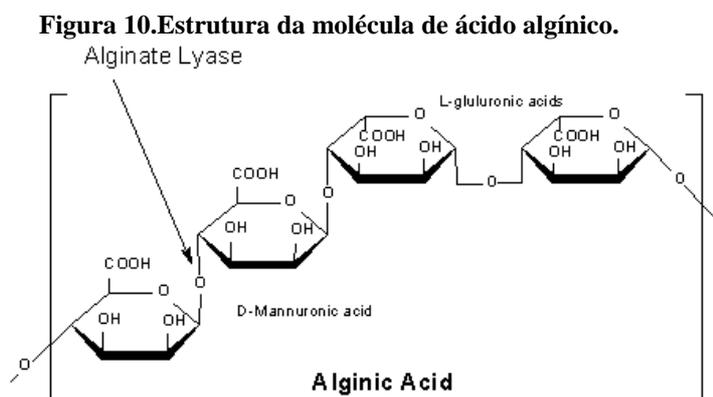
degradado por ação de enzimas.

As hidroxilas presentes no meio a que os géis de ágar estão submetidos, asseguram a estabilidade dos mesmos e cooperam para a sua resistência mecânica, uma vez que estes grupos estão diretamente associados à orientação helicoidal das moléculas de ágar (ARNOTT ET AL, 1974A), que ainda é discutida por autores (LAHAYE, 2000).

Sabe-se que a influência das hidroxilas do meio aquoso, em que os géis estiverem, é muito significativa, de forma que não é tolerado meios com pHs abaixo de 6,0, já que com poucas hidroxilas as conformações moleculares helicoidais não são possíveis e conseqüentemente a integridade dos géis estará prejudicada (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

3.4.3. ALGINATO

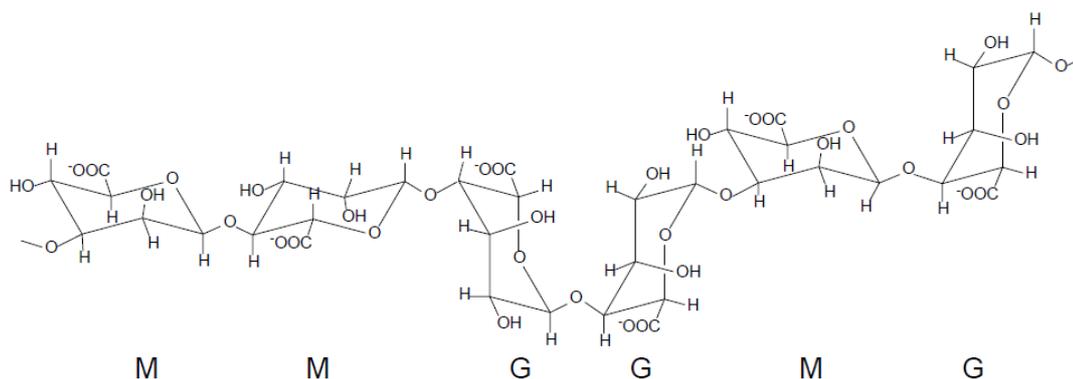
O alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) é um polissacarídeo linear, derivado do ácido algínico, que é composto por resíduos de ácido D-manurônico, que se alterna com resíduos de ácido L-gulurônico. O ácido algínico compõe as paredes celulares das algas, constituindo de 30 a 60% da composição de suas paredes, podendo constituir de 20 a 60% da massa seca da alga, dependendo da sua espécie (DAVIS ET AL, 2003).



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html#Alginic Acid>

A transformação do ácido algínico em sal (alginato de sódio) permite a solubilidade do composto em água e sua conformação pode ser relacionada de acordo com blocos de ácido manurônico (M) ou ácido gulurônico (G) (Figura 11).

Figura 11. Estrutura do alginato: blocos-M, blocos-G e blocos-MG.



Fonte: SEGATO, 2007.

As unidades de M, geralmente de estrutura planar do tipo fita mimosa, transformam-se em G, estrutura com reentrâncias e saliências, ao longo do tempo de vida das algas do filo Rhodophyta, através de uma reação enzimática (CALVO, 1995).

As formações alternadas de manurônico e gulurônico perfazem geralmente até $1/3$ da constituição do ácido alginico independente do tipo de alga. Os blocos de G tendem a unir mais as cadeias entre si, gerando géis mais firmes e quebradiços, enquanto que os blocos de M estabelecem maior interação com as moléculas de água e; portanto, geram géis menos firmes e mais elásticos. O módulo elástico também dependerá da densidade de *crosslinking* de associações físicas entre as cadeias, de acordo com a presença de cátions (BANERJEE ET AL, 2009).

Os cátions que gelificam as cadeias de alginato, pela troca do íon sódio por espécies preferencialmente divalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2}), formam géis com diferentes características térmicas (SEGATO, 2007), diferenças quanto à resistência dos géis e tempos de gelificação (KLAKAMANI ET AL, 2014), além de servirem como adsorventes de metais (Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} e Cr^{+3}), conforme estudos de Huang et al (1995), Singh et al (2012) e Díaz de Apodaca et al (2007).

Além disso, quanto menor é a taxa de gelificação empregada na cura dos hidrogéis de alginato, maior é a tendência de apresentarem grande homogeneidade estrutural e altos módulos de elasticidade, quando comparados com hidrogéis gelificados rapidamente (KUO E MA, 2001). Contudo, mesmo assim as propriedades mecânicas dos hidrogéis de alginato podem variar de acordo com o número e a seqüência dos monômeros M e G, bem como de acordo com a concentração da solução polimérica (DRURY & MONEY 2003). A determinação da porcentagem entre blocos M e G pode ser obtida por análises de ressonância magnética nuclear (NMR) (HEYRAUD ET AL, 1996; FORMO ET AL, 2014) e também

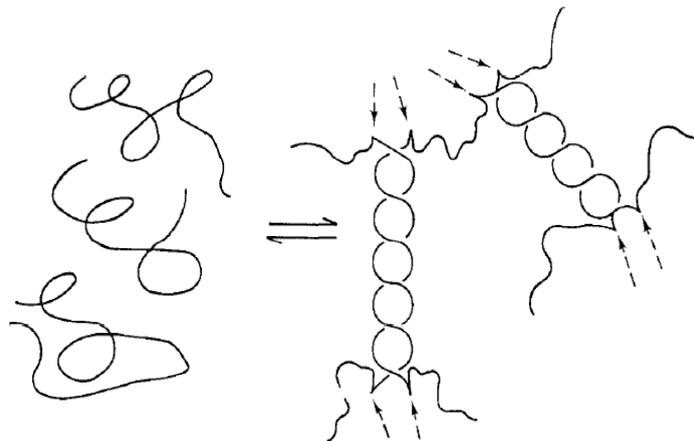
através da análise da viscosidade intrínseca em cloreto de sódio a 0,1M (PAVLATH ET AL, 1999).

3.4.4. CARACTERÍSTICAS E DIFERENÇAS ENTRE ÁGAR E ALGINATO

A característica principal que difere os hidrogéis formados a partir de ágar daqueles a partir de alginato de sódio, é que os primeiros são termorreversíveis, ou seja, a transformação solução ↔ gel ocorre nos dois sentidos e é dependente da temperatura; contudo os hidrogéis de alginato, dependendo da concentração e da densidade de reticulações entre as cadeias poliméricas, poderão não ser termo-reversíveis (McLACHLAN, 1985).

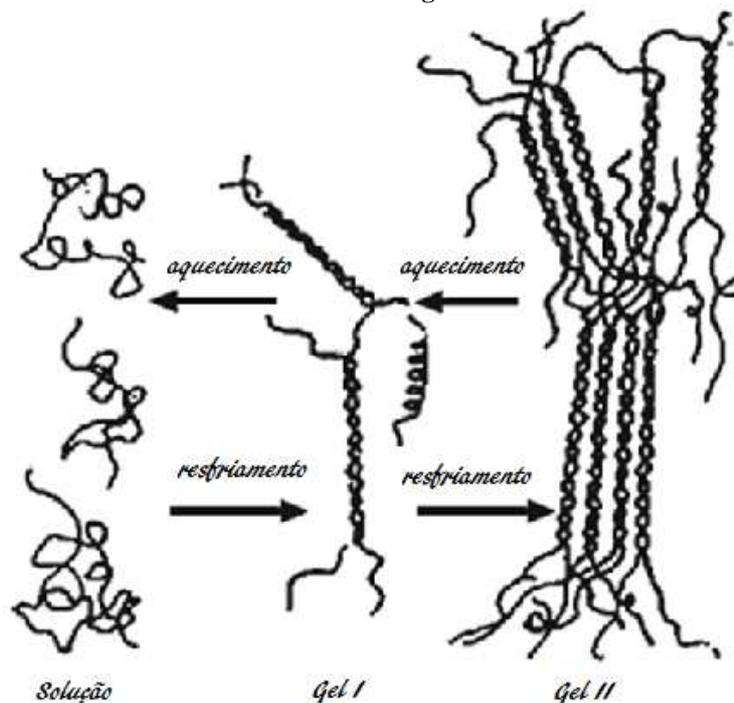
De acordo com diversos artigos (ZIMM-BRAGG, 1959; HIGGS AND BALL, 1989 APUD VIEBKE ET AL, 1994; WATASE, 1981; POLAND & SCHERAGA, 1970; DJABOUROV ET AL, 1989; WATASE ET AL, 1989 APUD ROSS ET AL 2006; MEDINA-ESQUEVIEL, 2008) o mecanismo de formação dos géis de ágar, bem como de outros polissacarídeos, pode ser explicado pela formação de estruturas helicoidais e pontos de conexão (nós/terminações) destas moléculas entre si, conforme anteriormente ilustrado na Figura 4, e agora detalhado na Figura 12 e Figura 13.

Figura 12. Estruturas helicoidais, na transição coloide-helicoidal, em Biopolímeros, e formação das terminações destas estruturas.



Fonte: POLAND & SCHERAGA, 1970.

Figura 13. Mecanismo de gelificação e formação das estruturas helicoidais dos sistemas super-fibrosos das moléculas de ágar.



Fonte: MEDINA-ESQUEVIEL, 2008.

Apesar de ainda não ser uma hipótese aceita entre todos os pesquisadores, diversos ensaios já evidenciaram a formação de estruturas helicoidais durante a geleificação do ágar e outros polissacarídeos, como por exemplo, durante ensaio de rotação óptica (SCHAFER & STEVENS, 1996), espectro circular dicróico de UV (ARNDT & STEVENS, 1994), modelos moleculares propostos por Jimenez-Barbero et al. (1989), medições de neutron *scattering* (GUENET ET AL., 1993) compatíveis com as descritas por Foord & Atkins (1989). Ainda assim, resultados definitivos sobre a detecção da conformação helicoidal por Raio X e por outros ensaios físicos, ainda parecem ser necessários, no intuito de confirmar esta teoria.

Muitas macromoléculas biológicas assumem estruturas helicoidais no estado sólido ou em solução, como é o caso dos biopolímeros como proteínas globulares, polipeptídeos e ácidos nucleicos (WYPYCH, G, 2000), ou em determinados solventes e condições específicas.

Figura 14. Exemplos de conformações em hélice de moléculas de DNA.

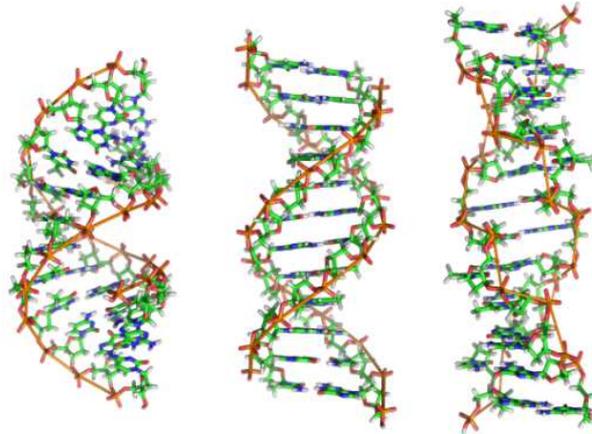
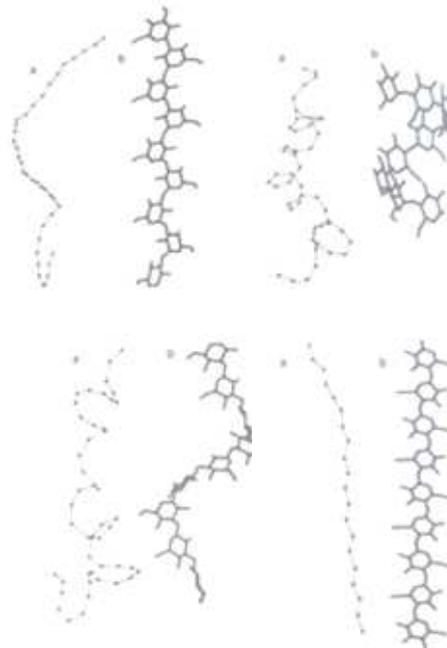


Figura 15. Representações de macromoléculas de um mesmo polissacarídeo, orientadas em diversas conformações, inclusive helicoidal, conforme seu estado de energia. a) representação obtida através de cálculo estatístico, b) representação obtida por difração de Raio



Fonte: HANDBOOK OF SOLVENTS, 2001.

As propriedades gelificantes do ágar e das carragenas podem ser controladas pela concentração de polissacarídeo, bem como taxas de aquecimento e refrigeração (LAHRECH, ET AL, 2005; AYMARD, ET AL, 2001). É relatado que o aquecimento e o resfriamento cíclicos modificam as propriedades do gel, como temperaturas de gelificação, que podem variar de 25° a 45°C, e de fusão: entre 90° e 120°C, fenômeno conhecido como histerese. O decréscimo da histerese está associado à inibição das estruturas helicoidais através da substituição de grupamentos na molécula de ágar; contudo, é necessário um número mínimo de agregações a fim de formar a rede gelificante (LAHAYE, 2000).

Além deste fenômeno, existe outro denominado como sinerese, que ocorre em géis de ágar; porém, não ocorre em géis de alginato, que é quando há a exudação de água em condições padrão, ao longo do tempo, e o conseqüente encolhimento dos géis. Durante o resfriamento da solução para a formação do gel, as moléculas de água ficam enclausuradas nos interstícios das estruturas helicoidais das moléculas de ágar, atraídas por pontes de hidrogênio, resultando no inchamento da rede polimérica. Este mecanismo foi verificado em ensaios de relaxação por H-NMR (GABRIELSON & EDIRISINGHE, 1996, APUD LABROPOULUS, 2002) e verificado por ensaios de rotação óptica (SCHAFER & STEVENS, 1995 APUD LAHAYE, 2000), que mediram um diâmetro de até 0.45nm no interior das estruturas helicoidais para conter as moléculas de água. Estas forças, alinhadas à conformação das moléculas, são as principais responsáveis pela reticulação nos hidrogéis.

Ao fornecer energia térmica à rede polimérica, a água intersticial acaba vibrando juntamente com as moléculas adjacentes, e abrindo espaços para que as moléculas e grupos funcionais assumam diferentes conformações, até assumir a forma livre, e novamente líquida.

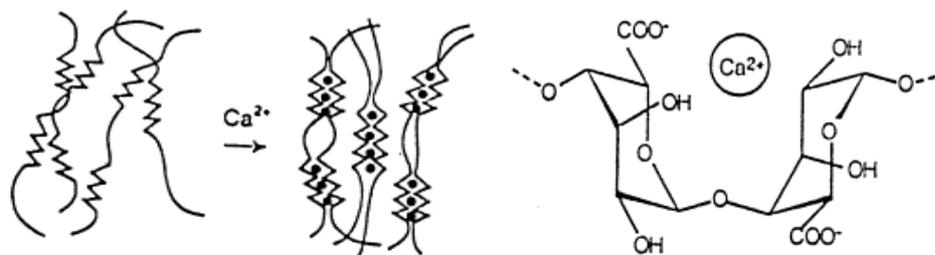
A sinerese ocorrerá mais fracamente em cadeias de ágar que estejam carregadas, por exemplo com adições de grupos sulfatados, de caráter aniônico, uma vez que tenderão a manter a água intersticial através de pontes de hidrogênio.

Também foi constatado que altas temperaturas de gel (temperatura de gelificação) de ágares estão associadas aos grupos metilados (GUISELEY, 1970), uma vez que a fração 3,6-anidrogálatose nos polissacarídeos tem papel importante na conformação helicoidal que promove a geleificação (REES ET AL., 1982).

Já para a promoção do mecanismo de geleificação de géis de alginato, sais de cátions, principalmente divalentes, como o cloreto de cálcio, são utilizados como agentes reticulantes de géis de alta resistência mecânica, conforme Grant et al (1973) e King (1983). O íon de sódio do alginato de sódio se dissocia em meio aquoso, e os vazios na molécula são equilibrados pelos íons divalentes de cálcio (ou outros), conforme a Figura 16, fazendo surgir o modelo chamado “caixa de ovo” (MORRIS ET AL, 1978 APUD SCHUSTER ET AL, 2014). Estes íons servem como aglutinadores das moléculas de alginato, fazendo com que as forças iônicas agrupem as moléculas entre si. Íons monovalentes (sódio, potássio, amônio) não têm um poder aglutinante tão intenso para formar géis de alginato que sejam insolúveis em água, como os íons multivalentes (cálcio, cromo, bário, alumínio). Entretanto, íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem um uso limitado por apresentarem uma certa toxicidade (DÍAZ ET AL, 2007). Este efeito aglutinador dos cátions também é visualizado no

mecanismo de formação dos géis de ágar; contudo, ele não é o predominante e essencial como nos géis de alginato para formação de polímeros até mesmo insolúveis, após a reticulação física.

Figura 16. Mecanismo de geleificação de géis de alginato, onde os blocos-G unem-se ao redor do cátion divalente, formando a estrutura conhecida como “caixa de ovo”.



Fonte: MORRIS ET AL, 1978 APUD SCHUSTER ET AL, 2014.

O efeito da diminuição do pH da solução de ácido algínico também é referenciado na literatura como agente gelificante, conforme Coviello et al (2007). Este efeito é contrário daquele verificado para os géis de ágar, em que quanto maior o pH, mais estáveis as estruturas helicoidais e mais resistentes são os géis (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

Modificações químicas por esterificação das cadeias álcalis por grupos carboxílicos poderão tornar alguns sítios do alginato de sódio hidrofóbicos, reforçando este comportamento também através dos íons cálcio, conforme Coviello et al (2007). Dessa forma aplicações diferentes, em que as taxas de administração devam ser gradualmente veiculadas através da sensibilidade de enzimas e outras substâncias capazes de quebrar as ligações ésteres, podem ser desenvolvidas.

Na Tabela 5 foram reunidas as considerações que pareceram mais relevantes e importantes destes dois polissacarídeos, quanto as suas características e aplicações, a fim de facilitar a compreensão das justificativas do uso destes biomateriais para a obtenção do *scaffold* desenvolvido nesta dissertação.

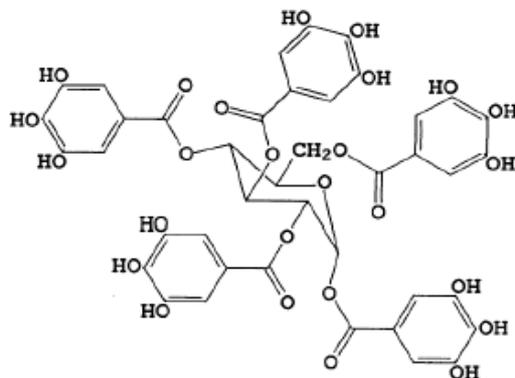
Tabela 5. Características entre Ágar e Alginato de sódio

Ágar	Alginato de Sódio
Termorreversível.	Dependendo da reticulação e concentrações pode se tornar não-termorreversível.
É não aderente celular , por isso é utilizado como substrato não aderente no cultivo de células. Rago et al apud Lewitus et al, 2011.	Alginato é usualmente utilizado como hidrogel para cultivo celular devido a sua similar estrutura às proteínas estruturais (GAG), sua permeabilidade e habilidade reticulante . Ishaung et al, 1997; Guo et al, 1989.
É inerte às células mamíferas , pois não se parece aos polímeros, específicas proteínas ou DNA presentes na matriz extracelular , de forma a bloquear ligantes nativos. Nisbet et al 2008 apud Lewitus et al 2011.	Pode conter traços de metais (Braga, A. S. et al, 2007), proteínas que induzam alguma resposta imune, bem como polifenóis e endotoxinas, consideradas citotóxicas aos cultivos celulares e por isso necessitam de purificação. Prokop & Wang; Leinfelder et al, 2003; Dusseault et al, 2005.
Baixa taxa de degradação . Bao, 2008.	Processo de degradação pode envolver radicais livres e talvez também ocorra por freeze-drying Wedlock <i>et al</i> , 1987.
Dependendo das concentrações de piruvato e sulfatos pode ser aniônico . Rochas <i>et al</i> , 1908.	Pode impedir a difusão de nutrientes e enzimas metabolizadas com cargas negativas para dentro do scaffold . Awad et al, 2004.
Diferenças no peso molecular podem alterar a maciez e o brilho dos géis . McLachlan, 1985.	Concentrações de cálcio regulam a síntese da matriz extracelular , induzindo a formação de condrócitos e a expressão de osteonectina, osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo X. Wang et al, 2011.

3.4.5. TANINO

O tanino também é um biopolímero, e pode ser extraído de muitas espécies de plantas, principalmente de espécies de madeiras, como por exemplo, do quebracho (*Schinopsis spp.*), da acácia negra (*Mimosa sp.*), do angico (*Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan*) e do carvalho (*Quercus spp.*). São obtidos pela desidratação de carboidratos simples e pela condensação em outras várias moléculas a partir das hidroxilas e das carbonilas em sua cadeia.

Figura 17. Um tipo de tanino hidrolisável.



Fonte: PERES, 2010.

Acredita-se que os taninos (polifenóis) têm ação antimicrobiana, de inibição da ação de enzimas, da modificação do metabolismo celular, além de complexarem íons metálicos (MELLO & SANTOS, 2002 APUD MONTEIRO ET AL, 2005).

Algumas das ações farmacológicas derivam da capacidade de os polifenóis complexarem-se com proteínas e polissacarídeos de maneira a contribuírem como membranas na cura de feridas e queimaduras. Por conta disso, que os taninos foram, e ainda são, utilizados na indústria do couro, já que além de complexarem-se com proteínas, fixam-se muito efetivamente ao colágeno da pele, proporcionando dureza ao couro curtido com taninos. Na antiguidade as cascas do carvalho eram utilizadas como emplastos em peles de animais, a fim de evitar que o tecido vivo necrosasse. Sabe-se que um mol de taninos pode se ligar a 12 moles de proteínas (MONTEIRO ET AL, 2005), e devido também a sua capacidade nucleofílica, formam pontes de hidrogênio intra- e intermoleculares.

O estudo de Cass & Burg (2010) mostrou o potencial da utilização de taninos como reticulante de *scaffolds* de colágeno para utilização em Engenharia de Tecidos, induzindo apoptose (morte) em células cancerosas e conferindo mínimo efeito tóxico sobre células saudáveis. É sabido que existe uma ação inibidora dos taninos na diferenciação adipogênica e a ocorrência de lipólise, e justamente por isso, poderiam ser utilizados para modular a diferenciação das células.

O efeito tóxico dos taninos para sistemas biológicos pode também estar relacionado ao poder quelante de íons metálicos a sua estrutura. Uma vez que íons metálicos são importantes para alguns metabolismos enzimáticos, como a absorção de ferro, a sua utilização deve ser tópica e específica. Existem estudos que demonstram que contraditoriamente o consumo de taninos a partir de nozes, pode ter significado um aumento de casos de câncer de esôfago, enquanto que o consumo a partir de chá verde mostrou ter diminuído consideravelmente o

risco de câncer gástrico. Estes estudos foram realizados pelos mesmos pesquisadores (CHUNG ET AL, 1998 APUD MONTEIRO ET AL, 2005) e mostram que ainda há muito que se desvendar sobre os diferentes tipos de taninos e suas implicações.

3.5. POTENCIAL DA APLICAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE ÁGAR E DE ALGINATO E CARACTERÍSTICAS DE SEUS SCAFFOLDS

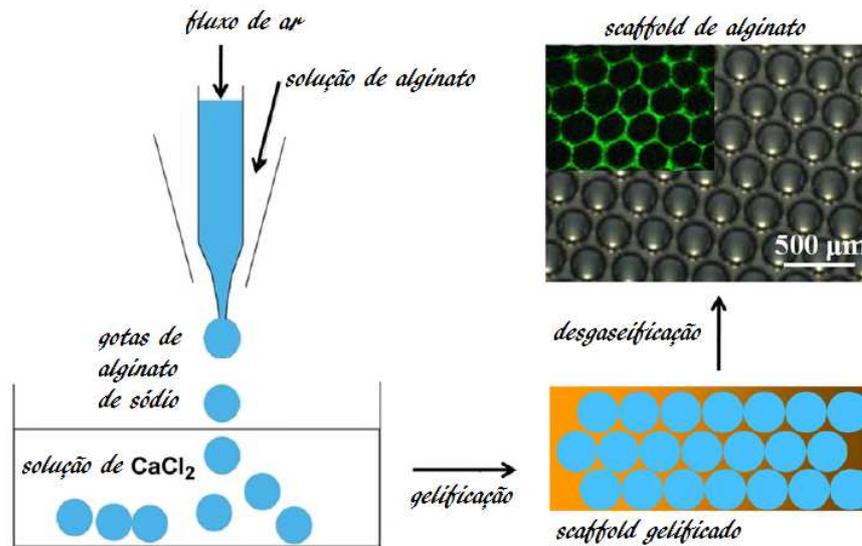
Na Engenharia de Tecidos foi verificado que espessuras de *scaffolds* de alginato maiores do que 2 mm impedem a condrogênese, que é o processo de formação de tipos específicos de células cartilaginosas (SAIM ET AL, 2000 APUD WANG ET AL, 2012). Contudo, outras variáveis podem contribuir para esta conclusão, uma vez que os fatores porosidade e fluxo do suprimento de nutrientes para o *scaffold* podem ser determinantes.

Além da possível influência que a dimensão do *scaffold* possa significar para o desenvolvimento de tecidos a base de alginato, há relatos que este constituinte possa provocar reações adversas quando implantados em animais devido a possibilidade de serem citotóxicos (PROKOP & WANG; LEINFELDER ET AL, 2003; DUSSEAUT ET AL, 2005).

Entretanto, quando utilizadas microesferas (em forma de casca) de alginato, baixas doses de imunossupressores são necessárias. Desta forma, Wang et al (2012) propuseram um processo que forma microesferas a partir de desgaseificação, para a formação de um *scaffold* a base de alginato, apresentando um ambiente favorável à condrogênese após implantados. Segundo os autores, certa solução aquosa a 2% de alginato de sódio, com surfactante a 1%, foi gotejada através de uma seringa com dois canais. Através do canal interno de uma seringa, gás nitrogênio era injetado, e pelo canal externo a solução polissacarídica era gotejada. Assim, formaram-se gotas ocas, em que o gás nitrogênio ficou retido no interior de cada microesfera de alginato de sódio, que após ter contato com a solução aquosa de cloreto de cálcio a 2%, gelificou. As esferas ficaram 2 horas em solução gelificante, depois foram coletadas e colocadas em outro recipiente para serem desgaseificadas (em câmara a vácuo) durante uma noite. Ao desgaseificar, as esferas de alginato romperam-se, liberando o nitrogênio e formando poros interconectados, conforme pode ser observado na micrografia da Figura 18.

Células condrócitas de porco foram semeadas no *scaffold* e depois implantadas em um rato. Após seis semanas de implante, foi realizada a autópsia, e percebeu-se que o *scaffold* havia ficado mais resistente e com coloração branca, como um bloco de cartilagem, e não induziu respostas adversas aos tecidos lindeiros.

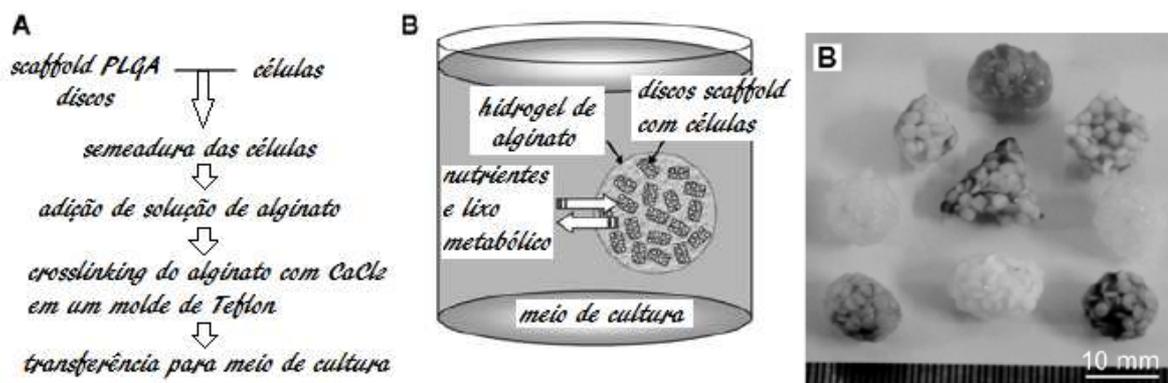
Figura 18. Processo de fabricação dos scaffolds a partir de injeção de alginato de sódio.



Fonte: Wang et al (2012).

Outra forma encontrada para a aplicação de alginato de sódio para recomposição de cartilagem foi associar uma matriz de polímero derivado ácido lático e ácido glicólico (PLGA), obtida por *Gas-foaming* e métodos de precipitação, embebida em aproximadamente 1 cm de hidrogel de alginato de sódio com cultura celular (CHOI ET AL., 2012). Após 21 dias de cultura *in vitro* observou-se um aumento de DNA e glicosaminoglicanos no hidrogel, sugerindo a proliferação de condrócitos.

Figura 19. A) Procedimento de obtenção de scaffolds de PLGA embebidos em alginato de sódio, semeados com células. B) Sistema, e scaffolds de alginato de sódio.



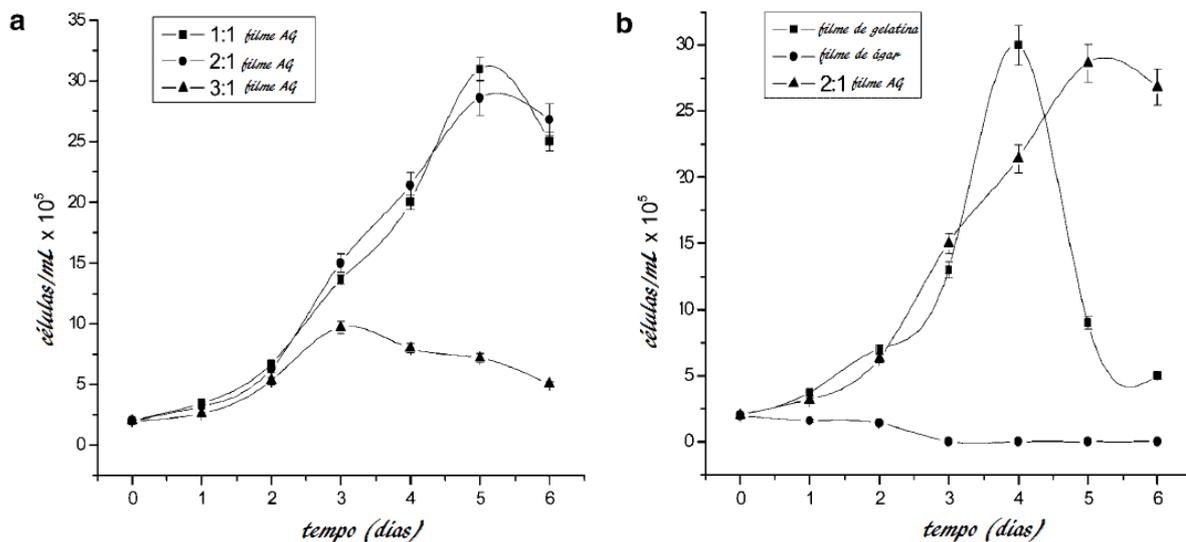
Fonte: CHOI ET AL (2012).

Scaffolds de ágar e gelatina, reticulados com glutaraldeído (0.15%), foram desenvolvidos por Verma et al (2006) e mostraram resultados promissores para a proporção 2:1 (ágar e gelatina) para cultivo de fibroblastos de murinos (NIH 3T3). Entretanto, foi evidenciado que as amostras que continham maior proporção de ágar do que gelatina não

ofereceram um ambiente favorável à aderência e ao crescimento celular, evidenciando que a fase aderente era a gelatina, enquanto que o ágar era a fase moduladora e necessariamente porosa para o equilíbrio dos nutrientes e excreções da célula, que compõe a matriz extracelular.

Na Figura 20. encontra-se graficamente o acompanhamento da cinética celular dos ensaios de Verma et al (2006), em que é possível perceber que o *scaffold* que conseguiu por mais tempo, atingir um alto nível de contagem celular, da ordem de 30×10^5 células por mililitro, foi o de proporção 2:1 (ágar e gelatina).

Figura 20. Acompanhamento da cinética de crescimento celular em dias, teste *in vitro* com scaffolds de ágar (A) e gelatina(G), e suas proporções: 1:1, 2:1 e 3:1, de ágar e gelatina, respectivamente.



Fonte: Verma et al (2006).

Sabe-se que o alginato de sódio tem sido ingrediente muito utilizado na confecção de *scaffolds* para tecidos cartilagosos (WANG ET AL, 2011 E 2012; CHOI ET AL, 2012; LEE, 2009; MARIJNISSEN, 2002, dentre outros) e com resultados promissores, contribuindo com resistência mecânica dos seus géis formados para este tipo celular, integridade do formato dos *scaffolds*, e permeabilidade à nutrientes e metabólitos (DUSSEALUT ET AL, 2005).

Assim sendo, supõe-se que as fibras-gel constituídas de ágar e alginato de sódio poderão a princípio auxiliar muito como *scaffolds* para o desenvolvimento de tecidos moles, uma vez que na literatura muito são os exemplos de sua utilização separadamente.

A Tabela 6 resume alguns importantes artigos que evidenciam as qualidades dos constituintes utilizados na invenção, que conjuntamente poderão oferecer um grande potencial de aplicações tecnológicas.

Tabela 6. Artigos que descrevem aplicações utilizando ágar e alginato de sódio.

Artigo	Autores	Invenção
Ágar/Collagen membrane as skin dressing for wounds	Lei Bao, Wei Yang, Xuan Mao, Shansong Mou e Shunqing Tang (2008)	Compósito gel liofilizado utilizado como membrana para queimados
Green fabrication of ágar-conjugated Fe ₃ O ₄ magnetic nanoparticles	S Hsieh, B Y Huang, S L Hsieh, C C Wu, C H Wu, P Y Lin, Y S Huang, C W Chang (2010)	Nanopartículas adsorvidas no gel de ágar para potenciais aplicações no campo da biomedicina, como ressonância magnética, drug delivery, sensores, identificação gênica, tratamentos para cânceres, etc.
Synthesis and characterization of ágar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications	Mahendra K. Shukla, Ravindra Pal Singh, C. R. K. Reddy, Bhavanath Jha (2011)	Gel de ágar adsorvido com nanopartículas de prata para aplicações em biomedicina como biosensores, drug delivery, identificação celular, como ferramenta de prevenção às infecções bacterianas, antifúngicas, anti-cancer, etc.
Biohybrid Carbon Nanotube/Ágarose fibers for neural tissue engineering	Dan Y. Lewitus , John Landers , Jonathan R. Branch , Karen L. Smith , Gerardo Callegari , Joachim Kohn, Alexander V. Neimark (2011)	Nanotubos de carbono encapsulados por gel de agarose obtido por wet spinning e por moldagem para utilização em tecido neural
Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds	Hani A. Awada, M. Quinn Wickhama, Holly A. Leddy, Jeffrey M. Gimpleb, Farshid Guilaka	Géis como scaffolds
Removal of airborne hexavalent chromium using alginate as a Biosorbent	Tirgar, A.; Golbabaie, F.; Hamedi, J.; Nourjelyani, K., (2011).	Partículas de alginato utilizadas como sistema de controle adsorvente de emissões atmosféricas de galvanoplastia contendo cromo hexavalente.
Decolorization of the metal textile dye Lanaset grey G by immobilized white-rot fungi	Dalel Daâssi, Tahar Mechichi, Moncef Nasri, Susana Rodriguez-couto (2013)	Imobilização de um tipo de fungo em partículas de alginato para utilização como adsorvente de corante a base de metais

Continua na próxima página...

Continuação da página anterior...

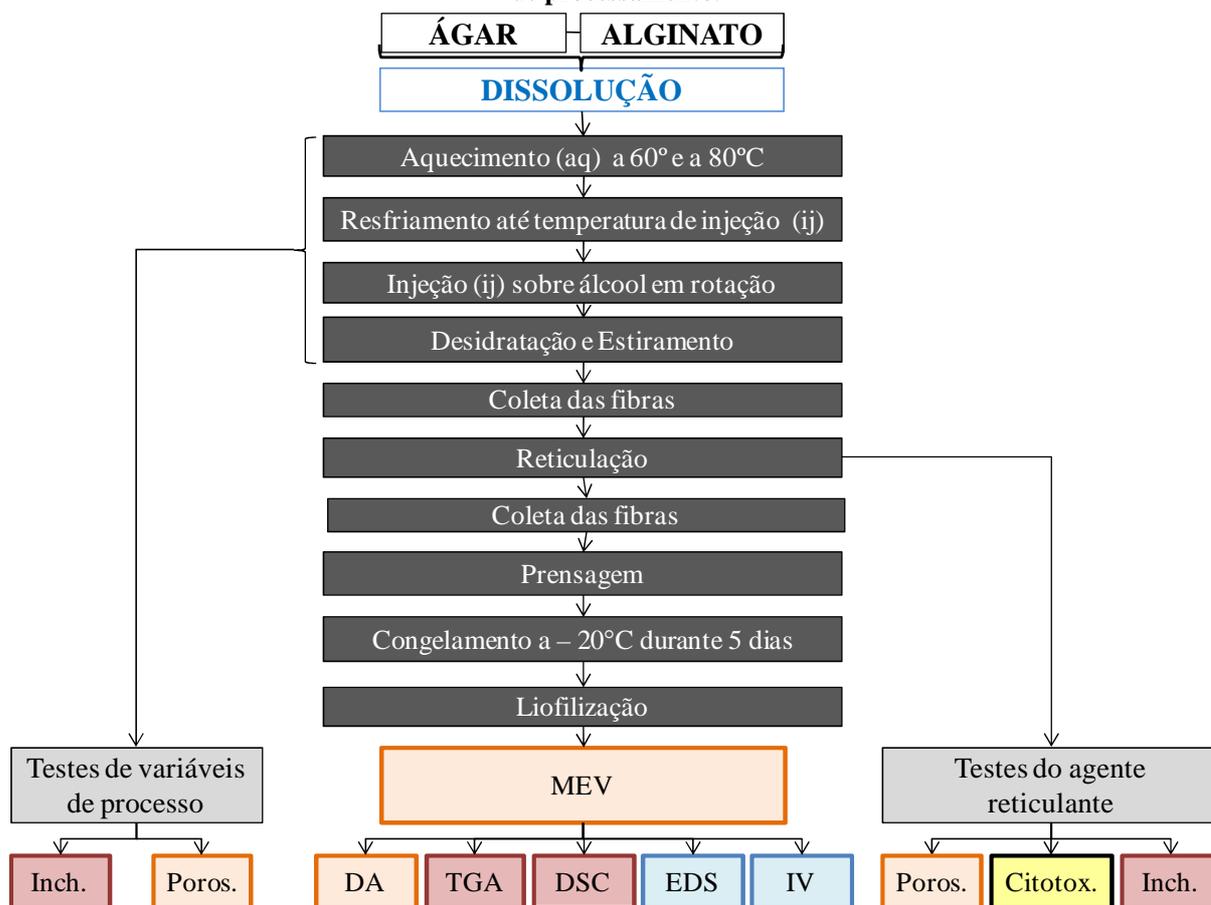
Equilibrium and kinetic studies for the adsorption of Mn(II) and Co(II) from Aqueous Medium Using Ágar-Ágar as sorbent	Bina Gupta, Zareena Begum I, and Garima Rajput (2008)	Estudos de equilíbrio e cinética de adsorção de manganês e cobalto utilizando biomassa de algas que contém ágar.
Adsorption of Cu(II) and Ni(II) by pelletized biopolymer	Chihpin Huang, Ying-Chien Chung, Ming-Ren Liou (1996)	Utilização de partículas de alginato, quitosana e alginato com quitosana para adsorção de cobre e níquel de soluções aquosas.
Selective Adsorbent for the Removal of Immunoglobulin E in Bronchial Asthma	Yaoting Yu, Hongmei Zhang, Weichao Wang, and Shenqi Wang (2008)	Utilização de partículas de géis de ágar como adsorvente de imunoglobulina E em pacientes com asma brônquica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS

De forma geral a Figura 21 sintetiza a obtenção das fibras descrevendo as etapas do processo e os métodos e testes envolvidos na caracterização das mesmas. Inclusive indica os testes que foram realizados nas fibras obtidas, a partir de variações de parâmetros de processamento (“Teste de variáveis de processo” e “Teste do agente reticulante”), como por exemplo: temperaturas de aquecimento (aq) da solução, temperaturas de injeção (ij) da solução, temperatura de desidratação do álcool e variações de concentração e tempos de reticulação, que serão detalhadamente descritos adiante.

Figura 21. Fluxograma de Obtenção e Caracterização das fibras, inclusive a partir de testes com variáveis de processamento.



Quanto à descrição detalhada da obtenção das fibras segue-se o seguinte: foram dissolvidos ácido algínico sal sódico (al, alginato de sódio) (Sigma Aldrich, UK), CAS nº 9005-38-3, e ágar (ag) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ), CAS nº 9005-32-7, em água destilada para diferentes concentrações e proporções conforme Tabela 7.

A solução permaneceu sob agitação magnética (ARE Velp Scientifica), a aproximadamente 300 rpm, por 1 hora sob aquecimento para completa dissolução e mistura dos constituintes.

Tabela 7. Concentrações das fibras-gel (fb) formadas.

Solução	Concentração alginato (al)	Concentração ágar (ag)
1%	0%	100%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
	40%	60%
2%	0%	100%
	100%	0%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
4%	40%	60%
	0%	100%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
	40%	60%

Figura 22. Solução de alginato de sódio e ágar em agitação e sob aquecimento.



Para as primeiras dissoluções, a solução foi aquecida até os 60°C, pois se pensava ser suficiente. Posteriormente, depois de testes e verificação da literatura, elevou-se a temperatura até os 80°C. De acordo com Prasad et al (2007), a partir de 80°C, ocorre a fusão das moléculas de ágar, que não adotam conformação alguma, ficando aleatoriamente dispersas em solução. Assim, após a agitação até 80°C, a solução foi sendo resfriada, desligando-se o aquecedor do agitador magnético e manualmente imergindo o béquer em banho-maria a 20°C, retornando ao agitador seguidamente, resfriando algo em torno de 2° a 4°C.min⁻¹ até atingir a temperatura identificada como ideal para a injeção (ij). Segundo Labropoulos et al (2002), géis de ágar gelificam abaixo de 40°C, assim esta temperatura foi escolhida para que a solução fosse inserida em uma seringa plástica, com capacidade de 60 mL e diâmetro de 1 mm, e em seguida injetada sob uma solução alcoólica em movimento rotacional, para a produção das fibras-gel.

Foram utilizados 800 mL de álcool etílico_(aq) 95%, como solvente, à temperatura ambiente (em torno de 20°C) ou resfriado (entre -5° e 10°C), sob rotação mecânica a 400 rpm (DLH Velp Científica) com o auxílio de haste com 12 pás plásticas, inclinadas a 45° uma em relação a outra (Figura 23), a fim de criar um vórtex homogêneo e estável para o estiramento das fibras.

Figura 23. Haste agitadora de 12 pás (45°) adaptado ao agitador mecânico.



A solução polissacarídica foi injetada manualmente a uma vazão média de 4,70 mL/s, a cerca de 20 cm em relação às pás do agitador mecânico (Figura 24). Conforme foi sendo injetada à solução alcoólica, as fibras formaram-se por desidratação e estiramento.

Figura 24. Injeção da solução polissacarídica em solvente alcoólico.



Para a determinação da vazão média de injeção da solução foi cronometrado o tempo para injetar toda a solução contida em uma seringa com capacidade de 10mL (e diâmetro de 1mm) para seis medidas.

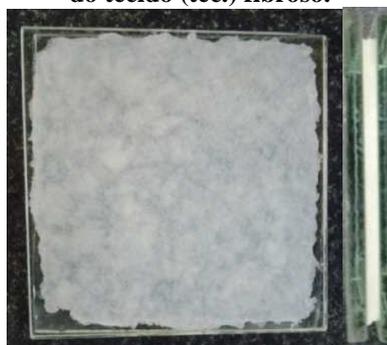
Obtidas as fibras em álcool (Figura 25), estas foram coletadas através de uma peneira e lavadas rapidamente (aprox. 1 min) em uma solução aquosa reticulante a 2% de cloreto de cálcio.

Figura 25. Fibras (fb) obtidas após *jet-spinning* em álcool.



Após a reticulação, as fibras (fb) foram novamente coletadas, a fim de que todo o líquido escorre-se, para serem moldadas (prensadas entre dois vidros) na forma de “tecido” (tec.) (Figura 26), a uma espessura média de 1,66cm +/- 0,35cm.

Figura 26. Prensagem das fibras de ágar e alginato de sódio (fb) entre duas placas de vidro e a formação do tecido (tec.) fibroso.



Depois da conformação das fibras, um dos vidros foi retirado para facilitar o congelamento das mesmas, a aproximadamente -20°C, durante pelo menos 05 dias até a

liofilização/secagem. O tecido depois de seco foi cortado através com um estilete e auxílio de um molde circular em polipropileno com diâmetro de 1.5cm para as caracterizações seguintes, exceto a caracterização por citotoxicidade, que necessitou de um tamanho muito menor de tecido fibroso (tamanho de poço de placa de 96 poços de cultura).

Figura 27. Placa de cultivo de 24 poços e recorte do tamanho do poço para posteriores testes.

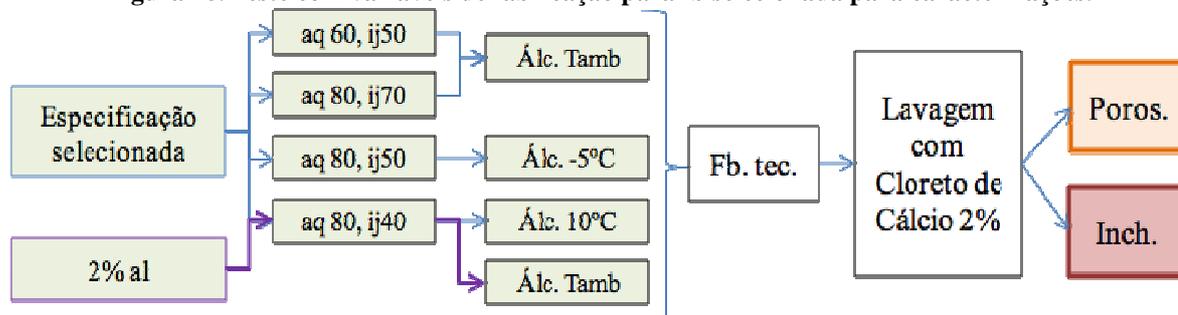


Os métodos e os testes utilizados para a caracterização das fibras, descritos na Figura 21, referem-se a apenas uma composição da Tabela 7, selecionada a partir da análise por MEV e da verificação física da integridade das fibras.

Teste da Influência dos variáveis de processo

Para a especificação da fibra selecionada, conforme citado anteriormente, testaram-se diferentes temperaturas de aquecimento (aq) e injeção (ij), bem como temperaturas da solução alcoólica (Álc.) para comparação dos resultados de porosidade e capacidade de inchamento àqueles obtidos por fibras com apenas alginato de sódio (2% al) em sua composição, conforme Figura 28. Os testes de porosidade e inchamento foram realizados em duplicata.

Figura 28. Teste com variáveis de fabricação para fb selecionada para caracterizações.

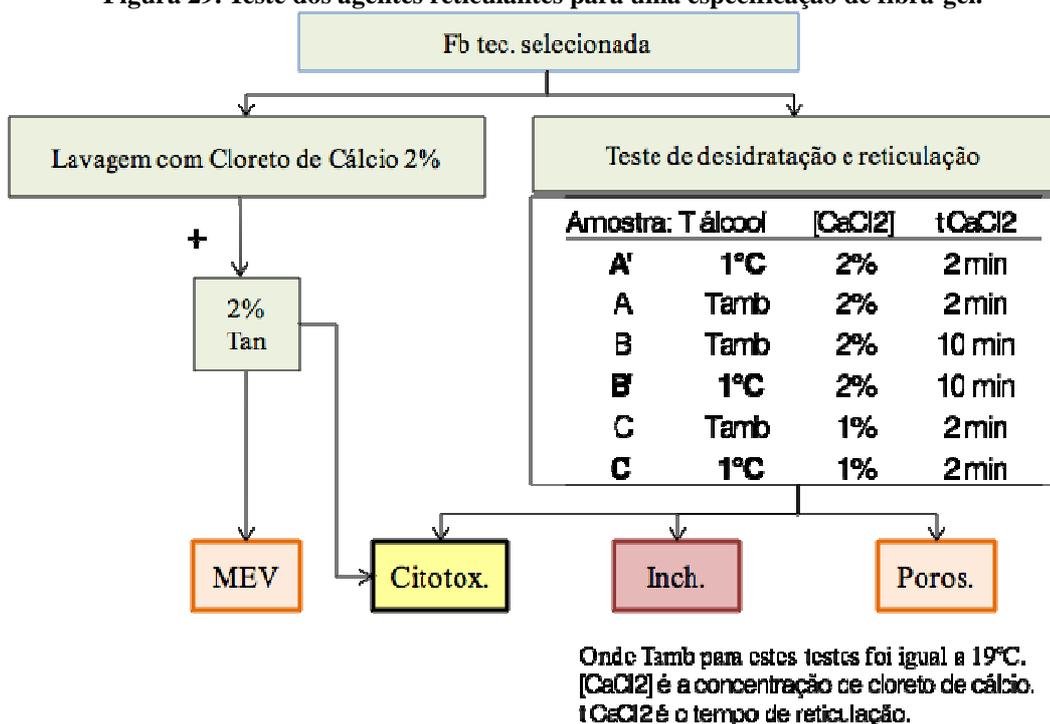


Teste da Influência dos Agentes Reticulantes

O teste dos agentes reticulantes foi realizado para a fibra tecido selecionada e consiste em duas análises: uma testa se a adição de tanino como agente reticulador (solução aquosa a

2%), além do cloreto de cálcio, impacta em citotoxicidade no cultivo *in vitro*, enquanto a outra análise procura verificar se há impacto da concentração e do tempo do reticulante cloreto de cálcio, bem como da temperatura de desidratação da fibra (T álcool) sobre a citotoxicidade, o inchamento e a porosidade, conforme ilustra a Figura 29. Os testes de inchamento e porosidade foram realizados em triplicata, enquanto que os de citotoxicidade em sextuplicatas.

Figura 29. Teste dos agentes reticulantes para uma especificação de fibra-gel.



Vale ressaltar que devido ao uso do tanino como eficiente reticulante no curtimento do couro (ligando-se a proteínas) e devido as suas propriedades antisépticas, anteriormente já descritas nesta dissertação, foi testada a sua utilização como agente reticulador. Contudo, durante a fabricação foi observado que este biopolímero não pode ser utilizado sozinho para a reticulação das fibras, e sim juntamente com o cloreto de cálcio, uma vez que este sal é o responsável pela gelificação do alginato. Assim, após a lavagem com cloreto de cálcio, as fibras foram submersas em uma solução aquosa de tanino a 2%, a 40°C, durante no máximo 1 min.

Além disso, é importante salientar que tanto o ágar, quanto o alginato de sódio, individualmente, também foram caracterizados por infravermelho, por análises térmicas (DSC e TGA), por viscosímetro (utilizando solução aquosa a 2%) e por picnometria (para estimar a

densidade real). Assim sendo, a seguir serão apresentados os equipamentos e as condições de análise para cada um dos métodos utilizados para as caracterizações.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES E DOS PRECURSORES

Para a caracterização dos constituintes das fibras, uma vez que o fabricante não forneceu informações relevantes, como viscosidade, massa molar ou densidade, procurou-se medir, conforme a disponibilidade de equipamentos, de uma forma fácil e prática, as viscosidades dinâmicas através do viscosímetro *Brookfield* (Figura 30) com jaqueta de arrefecimento como parâmetro de partida, bem como foram medidas as densidades reais dos constituintes através de picnometria.

4.2.1. VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES

Foram preparadas três soluções aquosas: a 2% de alginato (al), a 2% de ágar (ag) e na concentração e proporção entre alginato e ágar de acordo com a especificação da fibra selecionada; sendo avaliadas as suas viscosidades para três temperaturas: 40°, 60° e 80° Celsius, nesta ordem de aquecimento. Para cada temperatura de análise procurou-se determinar a viscosidade para uma mesma ou muito próxima agitação (rotação do cilindro *Brookfield*), a fim de compararmos as viscosidades das soluções entre si. As medidas foram realizadas no laboratório LAPOL da Escola de Engenharia da UFRGS (Porto Alegre, Brasil).

Figura 30. Viscosímetro Brookfield LV DV-E + UL Adapter (jaqueta térmica).



4.2.2. DENSIDADE REAL

Conforme a norma ASTM D792-08, para obtenção da densidade real (ρ) de um material utiliza-se o picnômetro e aplica-se a Equação 1, onde W é a massa do picnômetro vazio e

seco, W_a é a massa do picnômetro seco com certa quantidade de amostra, do constituinte que se deseja medir a densidade, W_{as} é a massa do picnômetro com amostra e preenchido com um não-solvente do constituinte e W_s é a massa do picnômetro preenchido com o não-solvente.

$$\rho = \frac{(W_a - W)}{[(W_a - W) - W_{as} + W_s]} \quad \text{Equação 1.}$$

O não-solvente utilizado foi o álcool etílico 99% ($\rho_{20^\circ\text{C}} = 0,79\text{g/mL}$). As pesagens do picnômetro, para obtenção da densidade do ágar e do alginato de sódio, individualmente, foram realizadas em triplicata, obtendo assim três valores de densidade real (ρ) para cada constituinte, onde ρ_{AG} é a densidade real do ágar e ρ_{AL} é a densidade real do alginato de sódio.

Assim, para o cálculo da densidade real da fibra ou seja da blenda (ρ_s), necessário para a estimativa da porosidade (conforme ASTM F 2450-10), aplicou-se a Equação 2, levando em conta a proporção entre os constituintes e a densidade real de cada um deles.

$$\rho_s = (X_{AG}/\rho_{AG}) + (X_{AL}/\rho_{AL}) \quad \text{Equação 2.}$$

Onde X_{AG} é a proporção de ágar na blenda e X_{AL} é a proporção de alginato na blenda.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MICROESTRUTURAL

4.3.1. MEV

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL, modelo JSM-6060. As amostras que puderam ser analisadas por MEV a uma tensão de 10 kV foram recobertas com uma dupla fina camada de ouro via *sputtering*.

4.3.2. DENSIDADE APARENTE

As densidades aparentes foram calculadas para três grupos de fibras obtidas em diferentes dias de produção, identificadas como bateladas: 1 (com 16 corpos-de-prova), 2 (com 24 corpos-de-prova) e 3 (com 16 corpos-de-prova), com a mesma especificação daquela fibra selecionada através de MEV. Foram medidas as suas dimensões (espessura e diâmetro),

para o cálculo do volume de cada uma das amostras, e as mesmas foram pesadas em balança de quatro casas.

Para o cálculo da densidade aparente, que é aquela na qual o volume total da amostra é considerado, inclusive os espaços vazios, utilizou-se a Equação 3.

$$\rho = m/v \quad \text{Equação 3.}$$

Onde ρ é a densidade (g/cm^3), m é a massa seca (g) e v é o volume (cm^3).

4.3.3. POROSIDADE

Foi utilizado o método descrito na norma ASTM F 2450-10 em que se pode estimar o percentual da porosidade, a partir do volume do *scaffold* e do volume de poros calculados conforme as Equações 4 e 6.

$$P(\%) = (V_P/V_T) \cdot 100 \quad \text{Equação 4.}$$

Onde V_P é obtido conforme Equação 3, e indica o volume de poros no *scaffold*, enquanto V_T é o volume total do *scaffold*, ou seja, referente as suas dimensões.

$$V_P = V_T - (m_s/\rho_s) \quad \text{Equação 5.}$$

Onde, m_s é a massa da amostra e ρ_s é a densidade do material utilizado para construir o *scaffold*, ou seja, a densidade real que o constitui.

Este método necessita que ocorra a secagem completa do material, a fim de evitar contribuições de umidade nas medidas. É um método utilizado principalmente para os géis e materiais que sejam muito higroscópicos, de forma a prevenir a influência do inchamento do próprio gel nas massas úmidas, como por exemplo, nas medidas realizadas por Arquimedes (WANG, C. ET AL 2011 APUD RAMASWAMY ET AL 2010), conforme Equação 6.

O método de Archimedes (WANG, C. ET AL 2011 APUD RAMASWAMY ET AL 2010), também utilizado nesta dissertação, utiliza um líquido não-solvente ao biomaterial menos denso que o material a ser pesado. Assim, utilizou-se álcool etílico 95%, e as fibras submetidas ao método foram produzidas em duplicata e tiveram por duas vezes medidas os seus percentuais de porosidade por Arquimedes, a fim de verificar o impacto da liofilização na segunda medida de porosidade. Ou seja, as fibras umedecidas em álcool etílico durante a primeira medida foram novamente congeladas e liofilizadas para uma segunda medição, conforme Equação 6.

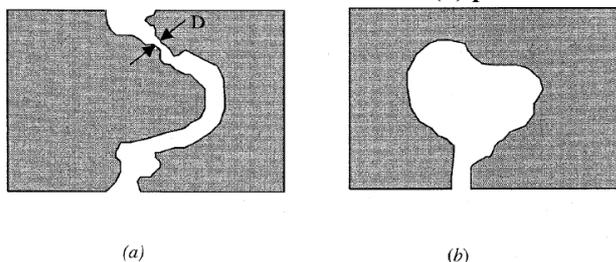
$$P(\%) = \frac{(W-D)}{(W-S)} \times 100\% \quad \text{Equação 6.}$$

Onde W é a massa da amostra umedecida em um líquido, D é a massa seca e S é a massa submersa em um líquido.

A porosidade é considerada por alguns autores como uma das mais importantes características dos *scaffolds* (TOMLINS ET AL, 2004), uma vez que as células cultivadas nos biomateriais requerem espaço para movimentarem-se, capturarem nutrientes e excretarem resíduos. Entretanto, ao interpretar os resultados deve se ter em mente que o aumento da porosidade nem sempre equivale a um aumento da permeabilidade, já que apenas quando os poros são altamente interconectados, estes parâmetros podem equivaler-se (ver Figura 31).

A propriedade de permeabilidade pode também estar intimamente ligada às características muitas vezes químicas que o biomaterial possa ter, que o faz atuar como membrana permeável ou semi-permeável a certas substâncias, nutrientes e células (aí estão envolvidos os processos de adsorção). Agrawal et al (2000) demonstram isto em seu artigo ao evidenciarem que, apesar de haver uma diminuição da porosidade dos seus *scaffolds*, depois de duas semanas em condições de teste, não houve variação da permeabilidade.

Figura 31. (a) poro interconectado e variabilidade de diâmetro. (b) poro fechado, sem interconecção.



Fonte: ASTM F2450 – 10 (2010).

De acordo com a referida norma, a avaliação da performance com relação à permeabilidade e à porosidade também pode ser estimada pela medida de difusão de marcadores biológicos através dos arcabouços poliméricos, principalmente quando se trata de hidrogéis. Tanto pequenas moléculas (abaixo de 1kDa) quanto macromoléculas como proteínas (de 10 a 200 kDa) podem ser utilizadas para o teste. A difusão de substâncias marcadoras biológicas pode auxiliar na obtenção de um parâmetro qualitativo sobre a porosidade de um material ou à permeabilidade de fluidos.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA

4.4.1. ANÁLISES TÉRMICAS

Os ensaios de Termogravimetria (TGA) dinâmica foram realizados no laboratório LAPOL (UFRGS, Porto Alegre, Brasil), utilizando o equipamento TGA Q50 do fabricante TA Instruments, sob atmosfera de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 25°C a 400°C, com taxa constante de aquecimento de 10°C min⁻¹. E a por Calorimetria Diferencial de Varredura, *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) também foi realizada no mesmo local, utilizando o equipamento DSC Q20 do fabricante TA Instruments, sob atmosfera de nitrogênio, em intervalos de temperatura distintos para cada amostra: de -75° até 125°C para uma amostra contendo apenas ágar, e de -75° a 150°C e de -25° a 225°C para a fibra selecionada, todas sob taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹.

4.4.2. INCHAMENTO

Foi medida a absorção de água destilada das amostras, em triplicata, utilizando a metodologia mais utilizada na literatura (SHARMA ET AL, 2013; VERMA ET AL, 2006; FARRIS ET AL, 2010), que é a do Percentual ou Índice de Inchamento (*Swelling*), conforme Equação 10. Há outro método de cálculo, conforme a Equação 7 (WANG, ET AL, 2011); porém este não é o mais usual, e por isso, não foi utilizado na dissertação. Na prática a diferença entre as duas é de 100% a mais para a Equação 7.

As amostras secas foram primeiramente pesadas, e depois foram mergulhadas em água destilada a 20°C por períodos registrados para a pesagem das massas úmidas.

$$(W_s - W_u) / W_u \times 100\%$$

Equação 7.

$$W_u/W_s$$

Equação 8.

Onde W_s é o valor da massa seca da amostra e W_u é o valor da massa úmida da amostra.

É comum que se faça o acompanhamento ao longo do tempo das pesagens das massas úmidas dos materiais para verificação da capacidade máxima de absorção de água.

4.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A caracterização química foi realizada por infravermelho para os dois constituintes e para a fibra selecionada, conforme citado anteriormente. Para esta também foi realizada a análise por EDS.

4.5.1. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

As análises de microscopia eletrônica de varredura com microanálise química elementar por dispersão de Raio-X (EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy*) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL, modelo JSM-5800 adaptado com espectrômetro. A fibra selecionada foi analisada semi-quantitativamente, no intuito de verificar a presença de elementos tóxicos, como metais pesados.

4.5.2. INFRAVERMELHO

Foram realizadas as análises de infravermelho (IV) por FTIR das amostras de pó (de ágar e de alginato, separadamente) e por ATR das amostras da fibra selecionada, de acordo com a disponibilidade dos equipamentos dos laboratórios LAPOL (Laboratório de Materiais Poliméricos), pertencente à Escola de Engenharia da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), e do Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), pertencente ao Instituto de Química da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), respectivamente.

O espectrofotômetro utilizado no LAPOL foi o FTIR Spectrum 1000 da Perkim Elmer, na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} e as amostras foram conformadas em pastilhas com KBr (1,0%), de acordo com o método. Enquanto que o equipamento utilizado no LAMAT foi o espectrofotômetro Alpha-E da Bruker (com cristal de ZnSe), na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} e 32 scans.

O objetivo das análises por infravermelho era identificar grupamentos característicos dos constituintes do *scaffold* obtido, e compará-los com os espectrogramas de ágar e de alginato de sódio separadamente, com o intuito de identificar os grupos expressivos como sulfatos no ágar e os grupamentos manurônicos e galurônicos dos alginatos, inclusive a presença de novos grupamentos no espectrograma da blenda, significando a formação ou não de novas ligações químicas ou apenas a mistura entre os constituintes.

4.6. CITOTOXICIDADE

Foram realizadas as análises de citotoxicidade conforme norma a ISO 10.993-6:2009 utilizando-se tanto o método indireto, quanto o direto para as amostras da Tabela 8 e aquelas da Figura 29, que foram submetidas ao teste de concentração e tempo de reticulação com cloreto de cálcio, inclusive variando a temperatura de desidratação do álcool.

Tabela 8. Amostras testadas quanto a citotoxicidade com variação de concentração entre as fibras.

Especificação das fibras:	Nomenclatura utilizada para os testes de citotoxicidade
Fb 2%, 50% ag – 50% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (2:50:50) (W)
Fb 2%, 50% ag – 50% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂ e 2% Tan	Agar – Alg (2:50:50) – Tan (W)
Fb 1%, 50% ag – 50% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (1:50:50)
Fb 2%, 60% ag – 40% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (2:60:40)
Fb 1%, 60% ag – 40% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (1:60:40)
Fb 2% al, alc 20°C, Lav 2% CaCl ₂	Alg

O objetivo da análise das amostras descritas na Tabela 8 foi verificar a influência da proporção de alginato sobre a citotoxicidade das fibras formadas, uma vez que possivelmente o alginato possa ser citotóxico.

O método indireto da análise de citotoxicidade consiste em manter o biomaterial em contato com o meio de cultura (DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco + 20% de soro fetal bovino), a 37°C, sem agitação, por 24 horas, para depois extrair todo o líquido em que o biomaterial ficou imerso, e adicioná-lo a células vivas para o acompanhamento da citotoxicidade. Já o método direto consiste em adicionar as células e o meio de cultura juntamente com o biomaterial, e incubar por 24h para o acompanhamento da citotoxicidade.

Os ensaios foram realizados por pesquisadores do laboratório de Células Tronco e Engenharia de Tecidos da Universidade Luterana do Brasil (Canoas, Brasil), utilizando células do tipo fibroblastos da linhagem L929 de murinos. Para cada tipo de fibra e de método utilizado foram realizadas as análises de citotoxicidade em sextuplicatas. Cada especificação de fibras foi cortada em tamanhos menores que 0.5 mm x 0.5 mm e colocadas em placas de cultivo de 96 poços com 10⁴ células por poço (e volume médio de meio e células de 100 µL). Duas horas antes de alcançar às 24 horas de incubação das células com o líquido coletado do método indireto, ou das células e do meio junto ao biomaterial, o meio de cultura foi removido e foi adicionado 50 µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide) (1 mg/mL) para leituras de absorvância em ultravioleta em $\lambda = 570$ nm. Os resultados de citotoxicidade foram expressos em percentual com relação ao controle negativo (células em contato com DMSO – dimetil-sulfóxido), e relacionados com o controle positivo: células L929 cultivadas sem biomaterial em meio de cultura DMEM, 20% soro fetal bovino.

Os fibroblastos foram utilizados, pois são células derivadas do tecido conjuntivo, grandes, jovens, muito resistentes, e que se multiplicam rapidamente (MONTANARI, T., 2015) por isso, geralmente são utilizadas para os primeiros testes *in vitro*.

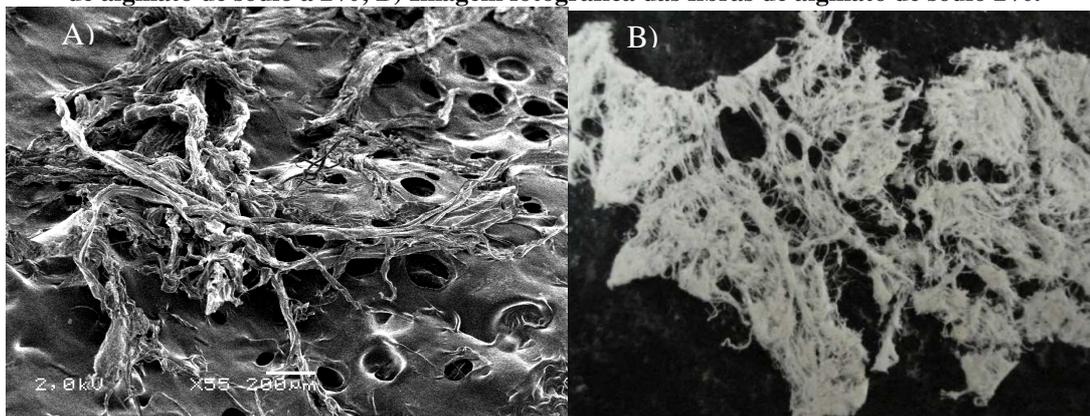
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MICROESTRUTURAIS

Conforme o fluxograma de Obtenção e Caracterização (Figura 21), a primeira análise realizada, conforme as fibras iam sendo obtidas, foi a análise por MEV. Através da microscopia eletrônica de varredura, ou mesmo algumas vezes utilizando-se do microscópio óptico e da fotografia digital, foi possível perceber, inclusive algumas vezes a olho nu, quais fibras apresentaram condições mínimas de serem caracterizadas em outros testes, visando sua utilização como *scaffold* em placas de cultivo celular. Conforme as fibras foram sendo produzidas e liofilizadas, aquelas que se apresentaram íntegras após a liofilização, e com características visivelmente fibrosas e minimamente flexíveis ao toque, foram encaminhadas a outras análises. Contudo, aquelas fibras que não tinham visivelmente as características mínimas para que pudessem ser cortadas como *scaffolds* para semeadura em placas de cultura, apresentando-se quebradiças, particuladas e sem características absorventes quando colocadas em água destilada, foram descartadas.

Como pode ser visto na Figura 32, as fibras formadas apenas a partir da solução aquosa de alginato de sódio entrelaçam-se facilmente, formando um tecido fibroso, resistente e possivelmente muito permeável e visivelmente muito poroso.

Figura 32. A) Micrografia obtida por MEV fibras obtidas através por *jet-spinning* a partir de solução(aq) de alginato de sódio a 2%; B) Imagem fotográfica das fibras de alginato de sódio 2%.



Em contrapartida, utilizando-se apenas ágar na composição das fibras, percebe-se que não há possibilidade alguma de formação das mesmas (ver Figura 33) nas condições de processamento estudadas, inclusive quando aumentada a sua concentração na solução (ver Figura 34). Também não foi detectada a formação de fibras, utilizando-se baixas proporções de alginato: 10% e 20% na mistura. Para 10% de alginato foram obtidas micropartículas sem formato específico com tamanho aproximado entre 100 e 200 microns, independentemente de

aumentada a concentração da mistura. E para 20% de alginato na composição houve a formação de um aglomerado de micropartículas, uma espécie de placa, sem formação fibrosa, como pode ser observado na Figura 38.

Figura 33. Imagem fotográfica das partículas de ágar, em vidro-relógio, formadas por *jet-spinning* de solução(aq) a 2% e liofilizadas.



Figura 34. A) Micrografia obtida por MEV das partículas formadas por *jet-spinning* de solução(aq) a 4% de ágar; B) Imagem fotográfica das partículas de mesma composição de A).

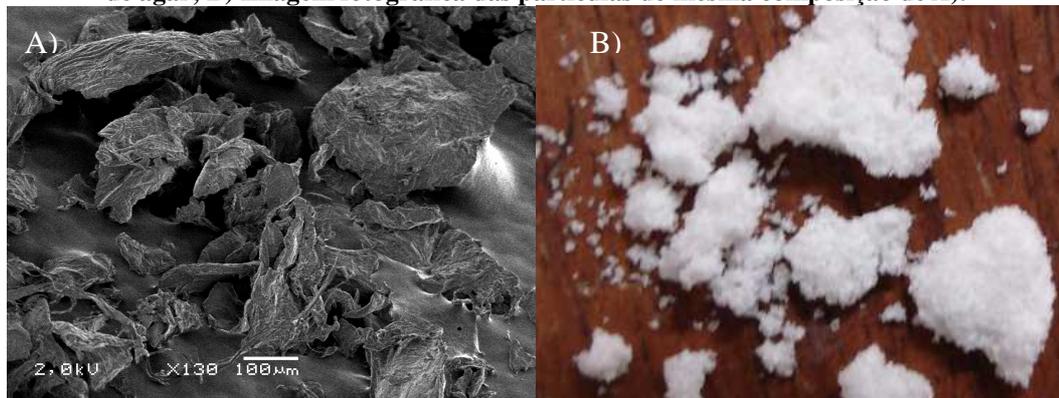


Figura 35A) Micrografia obtida por MEV de partículas formadas por *jet-spinning* de solução(aq) 1%, 10% al e 90% ag. B) Micrografia ampliada do detalhe de um agregado de partículas.

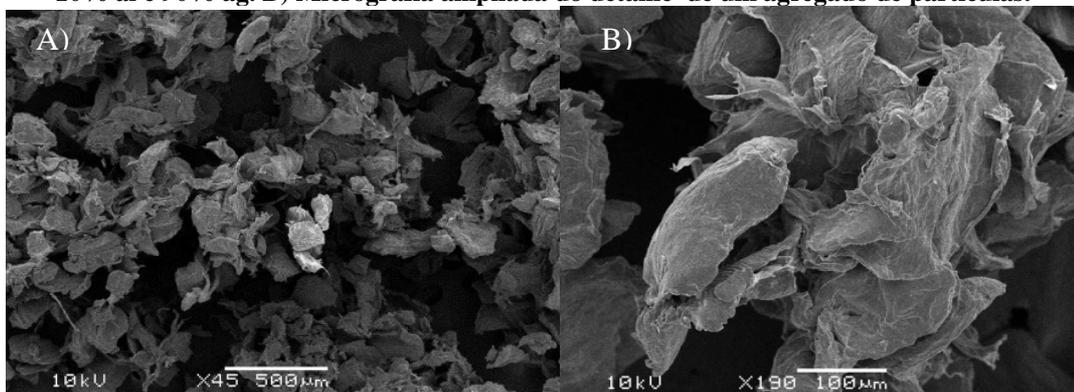


Figura 36. A) Micrografia obtida por MEV de aglomerado de partículas formadas por *jet-spinning* de solução(aq) a 2%, 10% al e 90% ag. B) Micrografia ampliada da imagem de A).

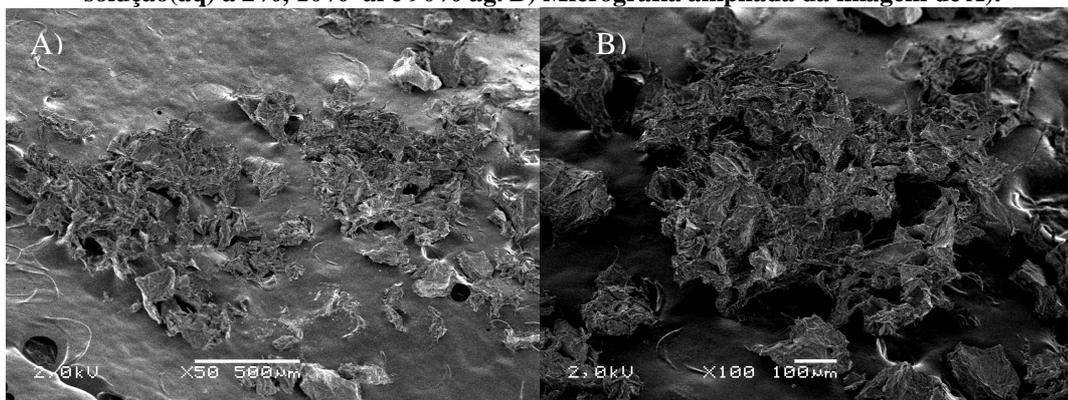
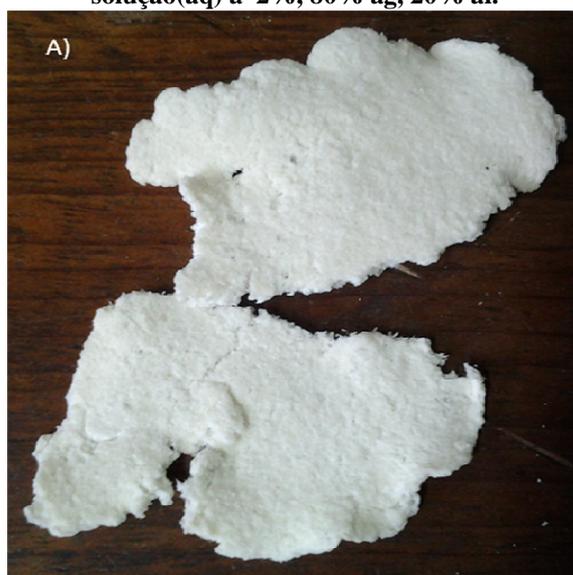


Figura 37. Imagem fotográfica de aglomerado de partículas obtido por *jet-spinning* da solução(aq) a 4%, 10% al e 90% ag.



Figura 38. Imagem fotográfica de algomerado de partículas bem compactado obtido por *jet-spinning* da solução(aq) a 2%, 80% ag, 20% al.



Somente foi observada a formação de estrutura fibrosa macroscopicamente e microscopicamente para as concentrações estudadas acima de 40% de alginato na blenda (Figura 39 e Figura 40).

Figura 39. Imagens fotográficas das fibras obtidas por *jet-spinning* da solução (aq) a A) 2%, 40% al - 60% ag; B) 2%, 60% al - 40% ag.

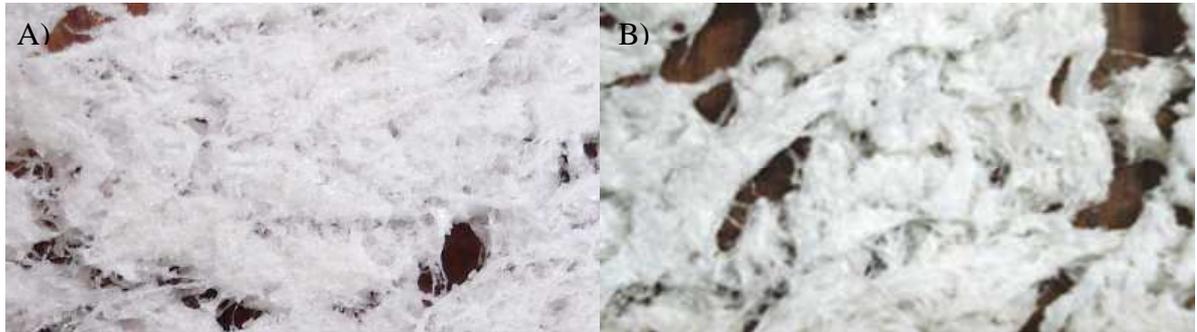
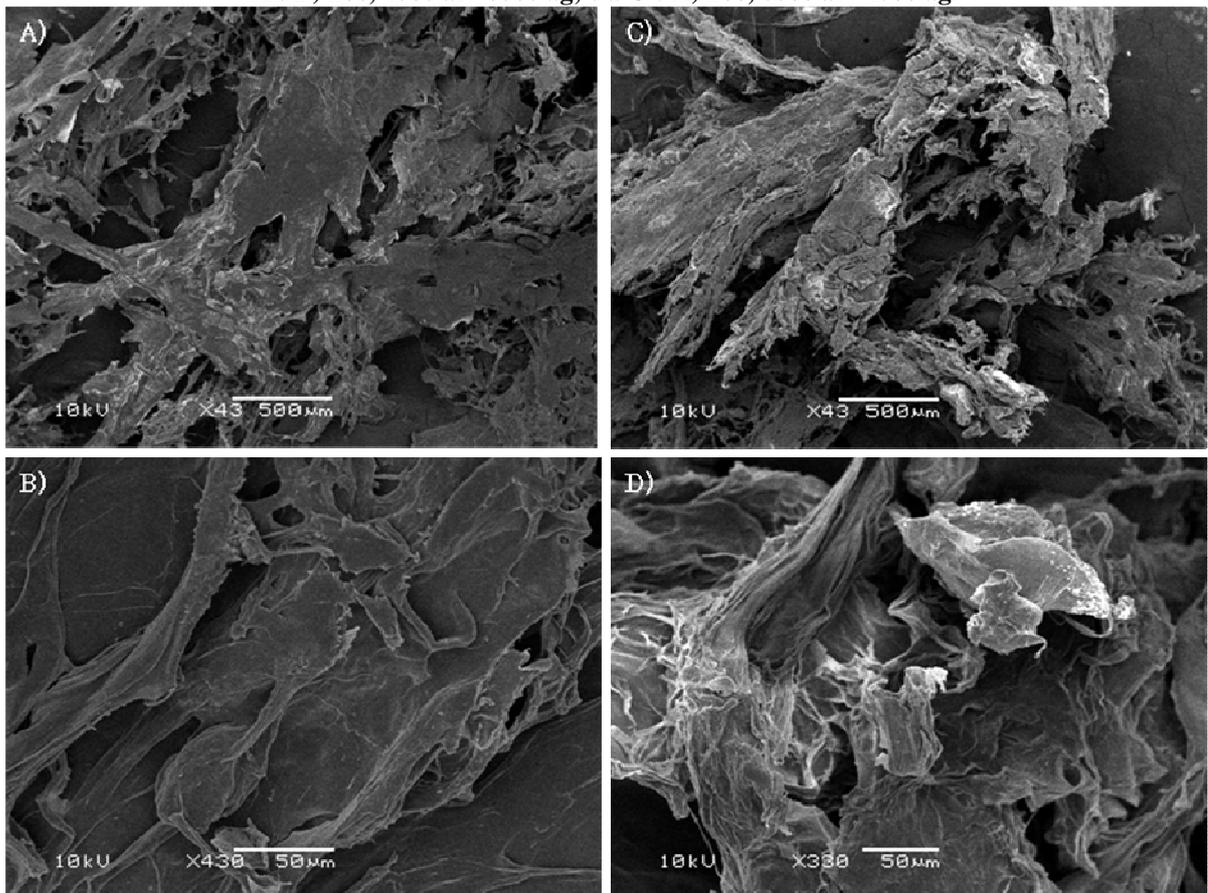


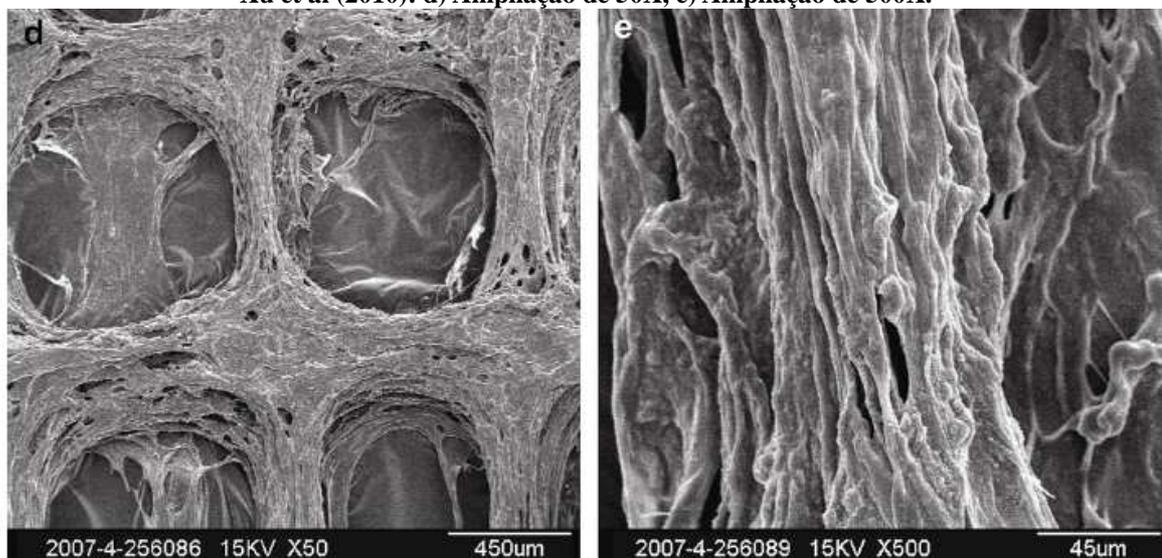
Figura 40. Micrografias obtidas por MEV de fibras formadas por *jet-spinning* a partir das soluções (aq) a A e B) 2%, 40% al - 60% ag; e a C e D) 2%, 60% al - 40% ag.



Pouca diferença visual pode ser percebida entre as imagens obtidas por MEV das fibras obtidas nas proporções: 60% al - 40% ag e 40% al - 60% ag. Entretanto, pode-se dizer que as fibras com maior quantidade de alginato de sódio, parecem menos planas do que as outras, e

mais rugosas. As fibras obtidas por Xu et al. (2010) (Figura 41) compostas por gelatina/alginato/fibrinogênio (2:1:1), parecem-se quanto à rugosidade às obtidas neste trabalho.

Figura 41. Micrografias obtidas por MEV de fibras de gelatina, alginato e fibrinogênio (2:1:1) obtidas por Xu et al (2010): d) Ampliação de 50X, e) Ampliação de 500X.



As fibras obtidas com proporção de 50% al e 50% ag, independente da concentração da solução aquosa, apresentaram mais quantidades e melhores estruturas fibrosas, do que aquelas fibras obtidas com diferentes proporções entre ágar e alginato (Figura 40). Parece que à proporção de 50% al e 50% ag existem menos estruturas planas junto às fibras, sendo mais fibras.

Contudo, ao comparar através de micrografia e fotografia as formações das fibras entre as concentrações das soluções aquosas para a mesma proporção de ágar e alginato (conforme Figura 42) torna-se mais difícil a diferenciação entre estas estruturas apenas por imagem. Assim, cabe ressaltar que as fibras obtidas à solução(aq) a 1% mostraram-se menos resistentes ao rompimento (ao tracionar o “tecido” fibroso com as mãos) do que as fibras obtidas a 2 e a 4%. Entretanto, esta diferença ao rompimento não foi percebida entre as fibras obtidas à solução a 2% e a 4%. Assim sendo, no sentido de suprir determinada resistência do *scaffold* e manter uma estrutura fibrosa reconhecível ao MEV, e havendo necessidade quanto à economia de recursos, optou-se por utilizar para os seguintes testes de caracterização do *scaffold*, as fibras a 2%, 50% al – 50% ag. O detalhe da ampliação da imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura na Figura 43 para esta composição demonstra a existência de fibras como estrutura do *scaffold*.

Figura 42. A, C, E) Imagens fotográficas e B, D, F) Micrografias obtidas por MEV das fibras obtidas por *jet-spinning* das soluções(aq) a 1% (A e B), 2% (C e D) e 4% (E eF), de proporção: 50% alginato - 50% ágar.

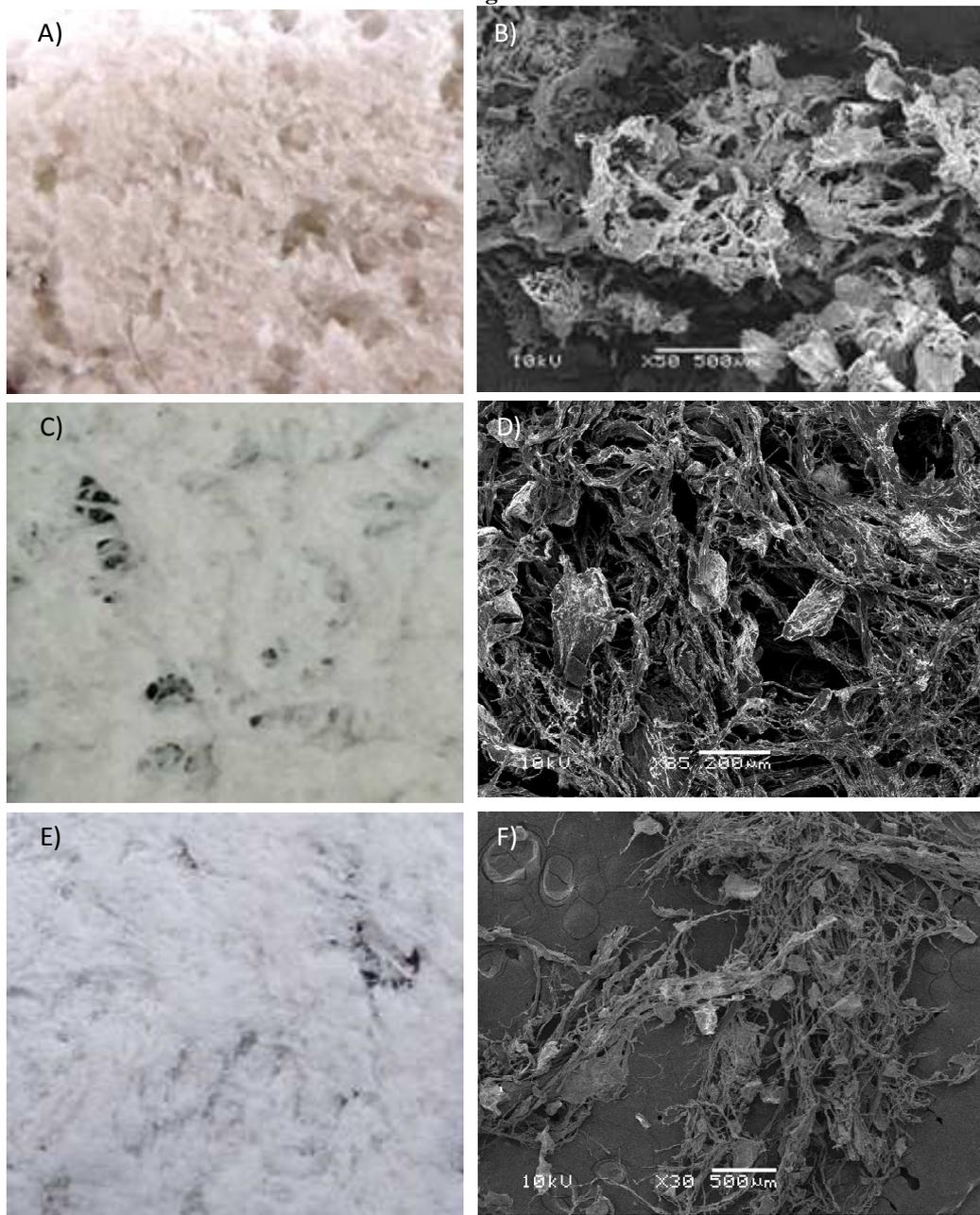
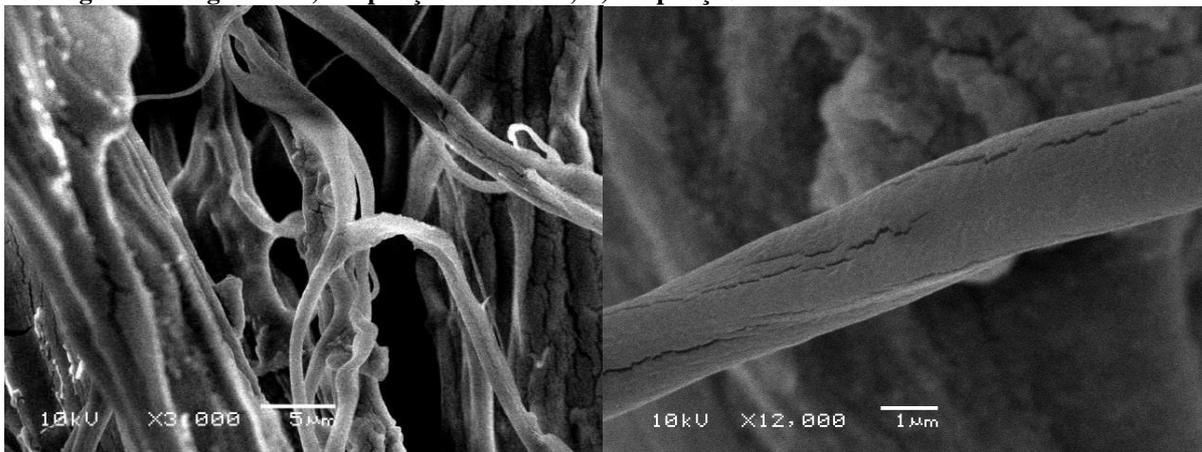


Figura 43. Micrografias obtidas por MEV de fibras obtidas por jet-spinning a partir da solução(aq) a 2%, 50% ágar-50% alginato: A) Ampliação de 3.000X, B) Ampliação de 12.000X.



Todas as fibras caracterizadas por MEV tiveram reticulação com cloreto de cálcio a 2%; contudo, algumas amostras também foram postas em contato com a solução de tanino a 2%. O tanino mostrou ser uma substância facilmente absorvida nas fibras, conferindo cor e certa suavidade ao toque do tecido fibroso depois de liofilizado; entretanto, pouca diferença visual (e também por microscopia eletrônica de varredura) foi percebida quanto ao entrelaçamento das fibras (Figura 44 e Figura 45).

Figura 44. Fb 2%, 50% ag - 50% al, gelificadas em solução aquosa de cloreto de cálcio 2%. A) sem reticulador tanino. B) com reticulador tanino 2%, 40°C.

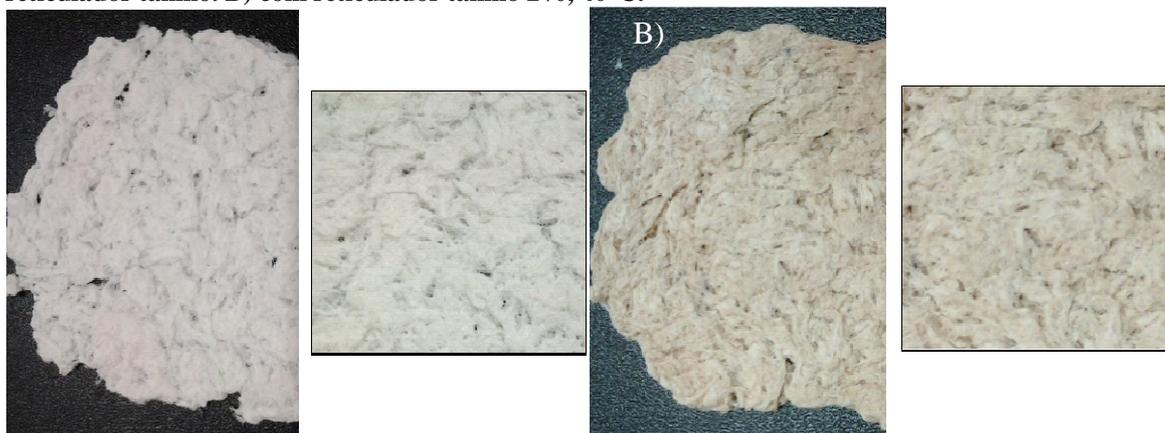
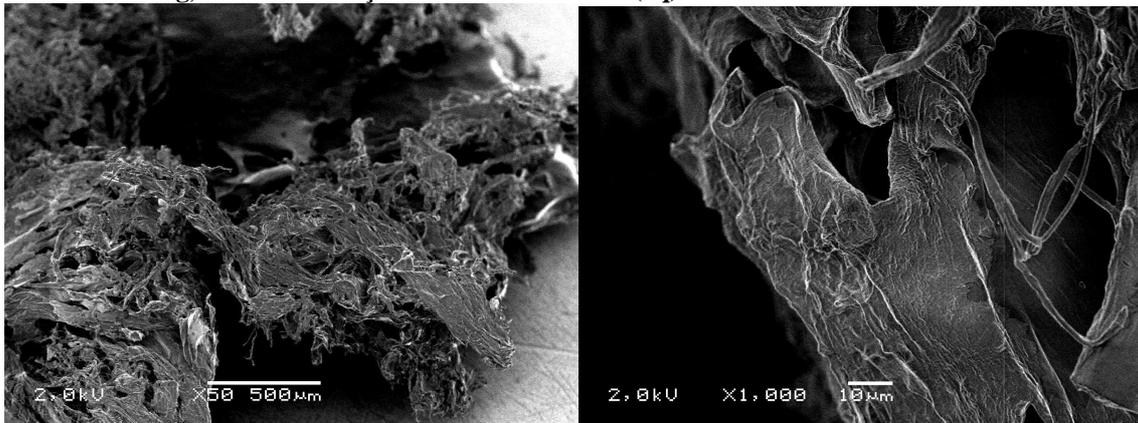


Figura 45. Micrografia obtida por MEV de fibra obtida por *jet-spinning* formada por solução(aq) a 2%, 50% al- 50% ag, e com reticulação adicional de tanino (aq) a 2%.



5.1.1. DENSIDADE REAL DO ÁGAR

Os parâmetros medidos estão relacionados na Tabela 9, bem como a média e o desvio padrão entre as medidas da densidade real obtida, conforme Equação 1.

Tabela 9. Massas de picnômetros para medida de densidade.

W (g)	Wa (g)	Was (g)	Ws (g)	Cálculo da densidade real
13	15.9715	35.9947	34.6467	1.8259
13.0042	16.3722	36.1233	34.5822	1.8436
12.9982	16.3709	36.1356	34.5974	1.8385
média				1.8360
desvio padrão				0.0091

Como os valores são em relação ao álcool etílico 99%, multiplicou-se pela massa específica do álcool etílico 99% (20°C) para obtenção da densidade apenas do ágar.

$$\rho_{AG}=1,8360 * 0,79 \text{ g/mL} = 1,4504 \text{ g/cm}^3$$

O valor obtido de 1,508g/cm³ aproxima-se de valores de densidade real de fibras de vegetais, como por exemplo, a polpa da fibra do bambu (*Bambusa vulgaris*): 1,506g/cm³ (JUNIOR, MARIO GUIMARÃES ET AL., 2013).

5.1.2. DENSIDADE REAL DO ALGINATO DE SÓDIO

Os parâmetros medidos estão relacionados na Tabela 10, bem como a média e o desvio padrão entre as medidas da densidade real obtida, conforme Equação 7.

Tabela 10. Massas de picnômetros para medir densidade.

W (g)	Wa (g)	Was (g)	Ws (g)	Cálculo da densidade real
13.0127	17.8446	37.062	34.6087	2.0314
12.9899	19.7356	38.0268	34.6106	2.0260
12.9914	19.9509	38.1249	34.6098	2.0205
média				2.0260
desvio padrão				0.0054

Da mesma forma que para o ágar, como os valores são em relação ao álcool etílico 99%, multiplicou-se a densidade obtida pela massa específica do álcool etílico 99% (20°C) para obtenção da densidade apenas do alginato de sódio.

$$\rho_{AL} = 2,0260 * 0,79 \text{ g/mL} = 1,6005 \text{ g/cm}^3.$$

O Valor obtido de densidade real também aproxima-se ao valor do ágar e de fibras naturais.

5.1.3. DENSIDADE APARENTE DAS FIBRAS

Na Figura 46 estão ilustrados os valores de densidade aparente (volumétrica) das fibras obtidas a 2%, 50% ágar - 50% alginato, produzidas em três bateladas de fabricação (1, 2 e 3), conforme o molde circular da Figura 27.

Figura 46. Densidade aparente das Fb 2%, 50% ag- 50% alg em três bateladas (1, 2 e 3).

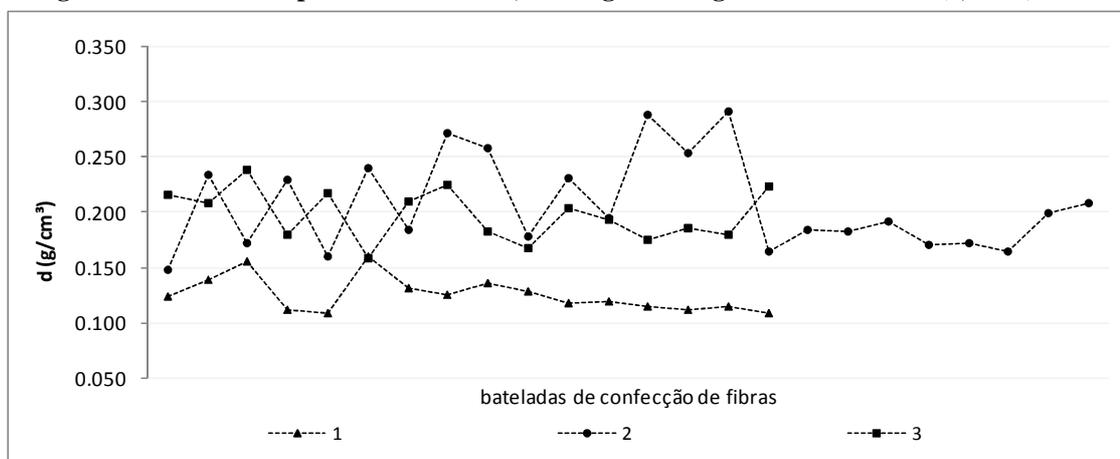
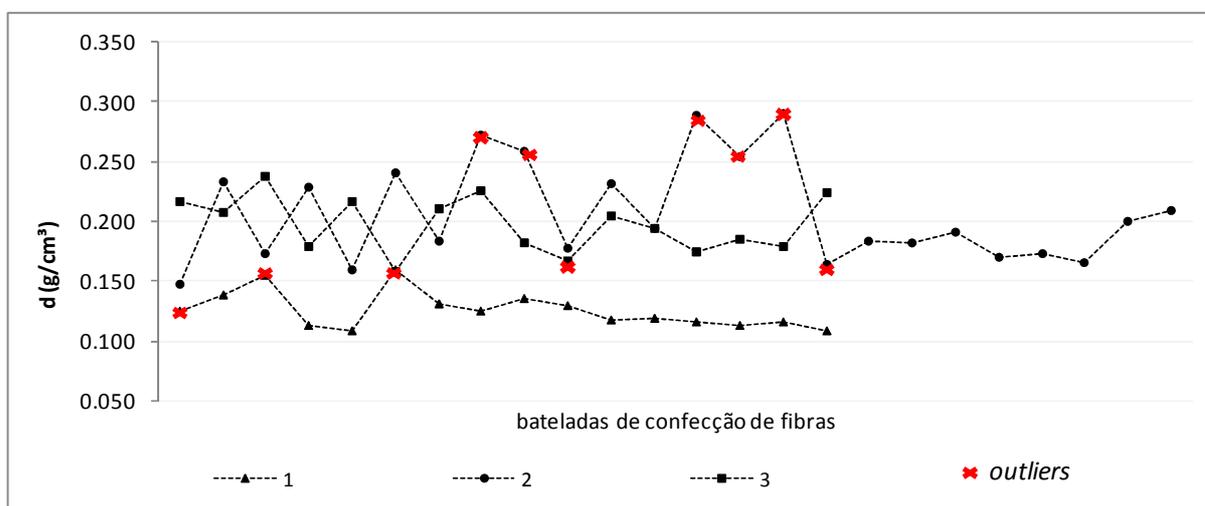


Tabela 11. Parâmetros calculados das densidades aparentes para as bateladas 1, 2 e 3.

medidas:	1	2	3
Média (g/cm ³)	0.2070	0.1976	0.1255
Desvio (g/cm ³)	0.0425	0.0232	0.0155
Mínimo (g/cm ³)	0.1475	0.1585	0.1083
Máximo (g/cm ³)	0.2908	0.2382	0.1597

Os pontos que extrapolaram os desvios para cada grupo (“*outliers*”) foram marcados em vermelho na Figura 47, de acordo com o cálculo dos desvios padrão para cada grupo.

Figura 47. Densidade aparente das Fb 2%, 50% ag- 50% al em três bateladas (1, 2 e 3), identificando os outliers.



Percebe-se que a única batelada que apresentou menores densidades para todas as amostras foi a do grupo 1. Analisando os resultados verificou-se que é devido a menor espessura das amostras com relação às demais. Ou seja, a forma de prensagem durante o processo de obtenção das fibras poderia ser otimizada de forma a garantir que as espessuras das amostras não variassem muito entre si.

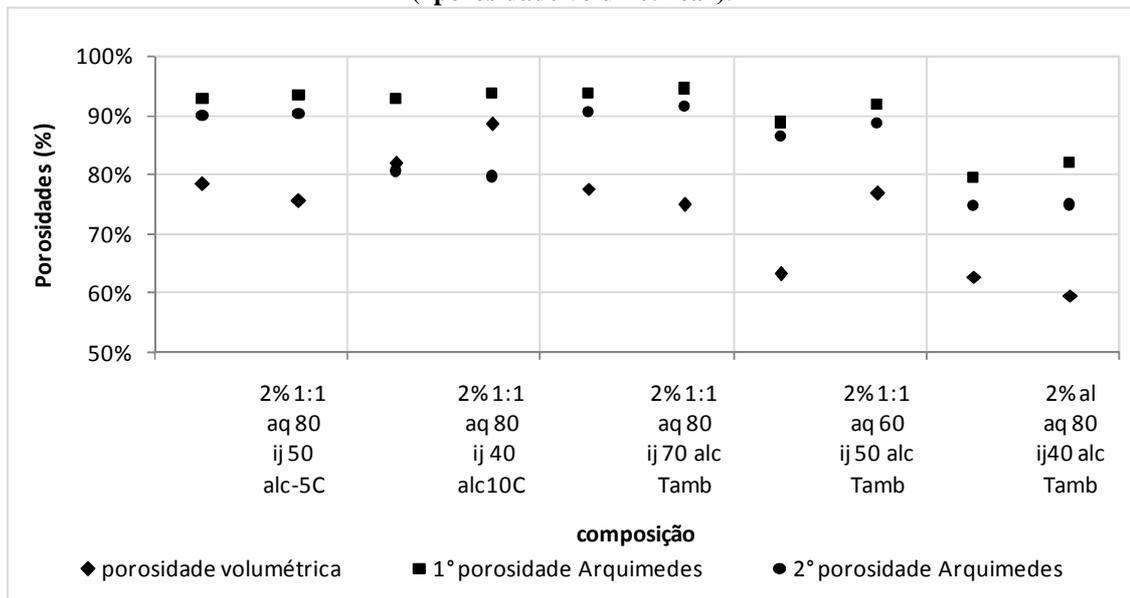
Contudo, conforme o procedimento, as fibras podem ser classificadas em certa faixa de densidades, de 0.110 a 0.250 g/cm³, considerando dentre as bateladas, a menor média e seu respectivo desvio e a maior média e seu respectivo desvio.

5.1.4. POROSIDADE

De acordo com a Figura 28, foram medidas as porosidades das fibras de mesma composição, na forma tecido, para diferentes variáveis de processamento (temperatura de aquecimento da solução, de injeção e temperatura do álcool de desidratação).

De forma a comparar os resultados obtidos entre duas metodologias (Arquimedes e ASTM), inclusive comparando medidas de porosidade das mesmas amostras após liofilização, os resultados foram relacionados na Figura 48 e referem-se as médias das duplicatas.

Figura 48. Valores de porosidade para amostras Fb 2%, 50% ag – 50% a1 para diferentes variáveis de fabricação, comparando as metodologias de análise de porosidade por Arquimedes e pela ASTM (“porosidade volumétrica”).



Uma das hipóteses para maiores porosidades obtidas por Arquimedes pode ser devido a hidratação das fibras, uma vez que o álcool utilizado era uma solução aquosa a 5%. Por conter água em solução, mesmo que minimamente, os valores podem estar superestimados, já que a água pode ter permeado para dentro da estrutura do hidrogel aumentando a massa durante os experimentos. As únicas amostras que tiveram grandes diferenças na segunda medida de porosidade por Arquimedes foram as de especificação fb 2% 1:1 aq 80°C ij 40°C em álcool a 10°C. Não foi encontrada justificativa para o ocorrido uma vez que praticamente as outras amostras mantiveram certa repetibilidade, conforme Figura 49.

Figura 49. Porosidades das fibras em forma tecido por Arquimedes.

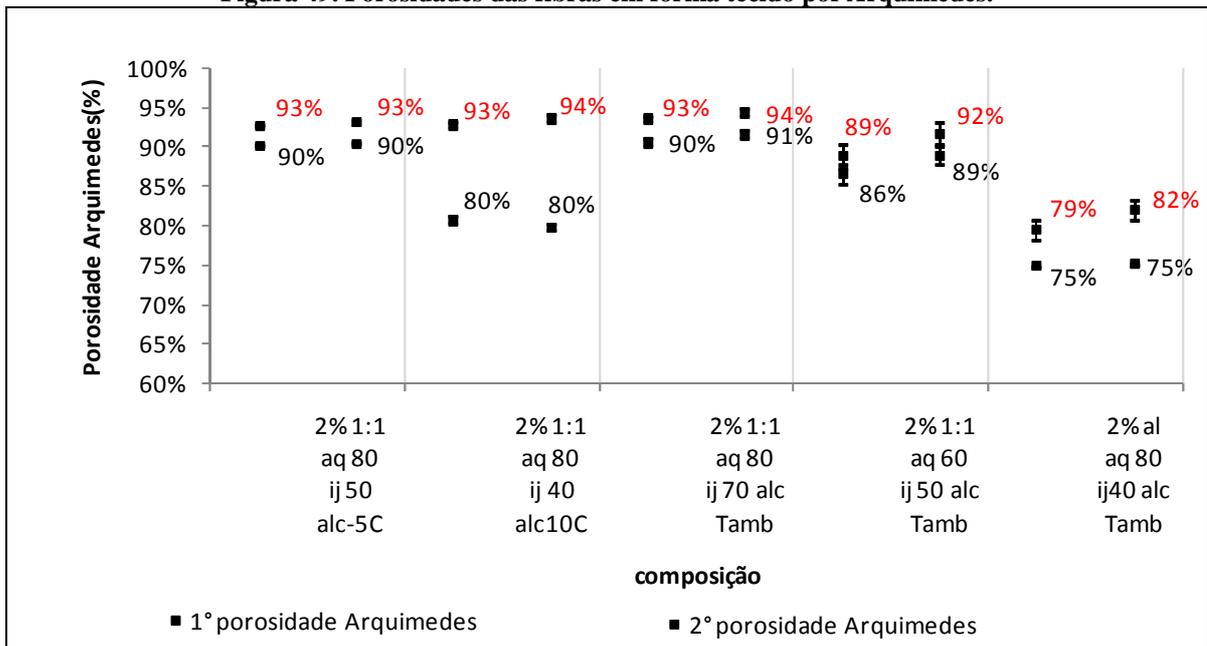
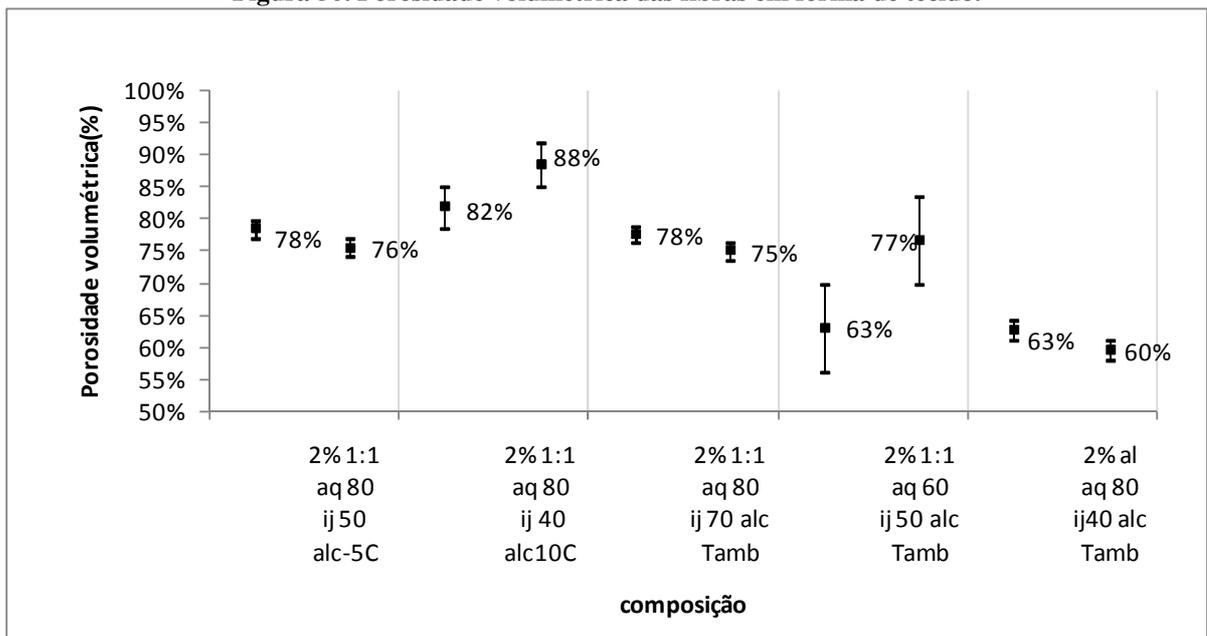


Figura 50. Porosidade volumétrica das fibras em forma de tecido.



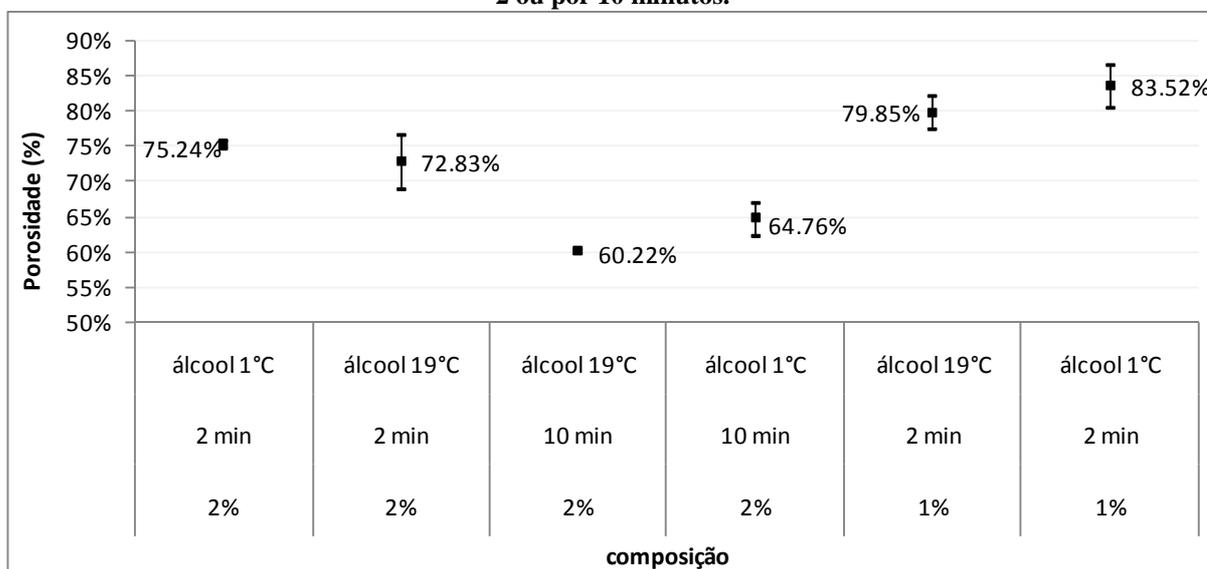
Na análise dos resultados de porosidade volumétrica percebe-se que as amostras de maior variabilidade foram as aquecidas até apenas 60°C e injetadas a 50°C. As amostras que apresentaram menor porosidade volumétrica foram aquelas apenas fabricadas com alginato, enquanto que aquelas que apresentaram as maiores porosidades foram as amostras 2% 1:1 (50% ag – 50% al), quando aquecidas até 80°C e injetadas a 40°C, em álcool resfriado. Percebe-se que os resultados para esta composição ficaram mais próximos entre si nas duas metodologias de porosidade empregadas, resultando em no mínimo 80% de porosidade.

Assim, definiram-se os parâmetros de processo: temperatura de aquecimento até 80°C, temperatura de injeção de 40°C e álcool resfriado a 10°C.

Estudos demonstram que *scaffolds* devem exibir grandes valores de porosidade (AGRAWAL ET AL., 2006), no mínimo 90% para que providenciem grande área superficial para as interações entre as células e o biomaterial, além de adequarem a difusão de nutrientes e resíduos nas culturas *in vitro* (FREED, L.E. ET AL, 1994). Entretanto, mesmo *scaffolds* com menores porosidades, cerca de 81%, puderam apresentar bons resultados em culturas de condrócitos, conforme Barry et al (2004) apud Agrawal et al (2006). Esta evidência é reiterada nos estudos de Verma et al (2006), em que é possível concluir que mesmo que o *scaffold* apresente um meio permeável aos fluidos e nutrientes, ou seja com bom parâmetro de porosidade e permeabilidade, é necessário que exista certa rugosidade na estrutura do biomaterial, a fim de aderir as células à estrutura.

Os resultados da Figura 51 mostram o impacto da temperatura do álcool, bem como a concentração e o tempo de lavagem no cloreto de cálcio, sobre as porosidades das fibras de forma tecido, em triplicatas, produzidas a 2%, 50% ag – 50% al, aq 80° ij 40°C.

Figura 51. Comparação entre valores de porosidade por Arquimedes, para Fb 2%, 50% al - 50% ag, desidratadas com álcool a temperatura de 1° ou 19°C, reticuladas com cloreto de cálcio a 1% ou a 2%, por 2 ou por 10 minutos.



A temperatura do álcool em nada parece ter influenciado a porosidade das fibras. Entretanto, no que se refere à reticulação com cloreto de cálcio, percebe-se que, quanto maior é o tempo de contato com a solução menores são os valores de porosidade das fibras. Possivelmente isto é devido ao tempo necessário para que os íons cálcio difundam através da

rede da blenda, a fim de empacotar as cadeias de alginato na conformação “caixa de ovo”. A concentração dos íons cálcio influenciará o empacotamento das cadeias e consequentemente a disponibilidade de espaços que influenciará o grau de porosidade e a permeabilidade entre as fibras. Quanto maior a quantidade de íons cálcio na solução, maior será o empacotamento das cadeias de alginato, e menores serão os espaços entre as mesmas que repercutem em menores porosidades. E quanto menor a quantidade de cátions disponíveis em solução (1% CaCl_2), mais tempo será necessário para que ocorra a difusão entre a rede da blenda e a reticulação.

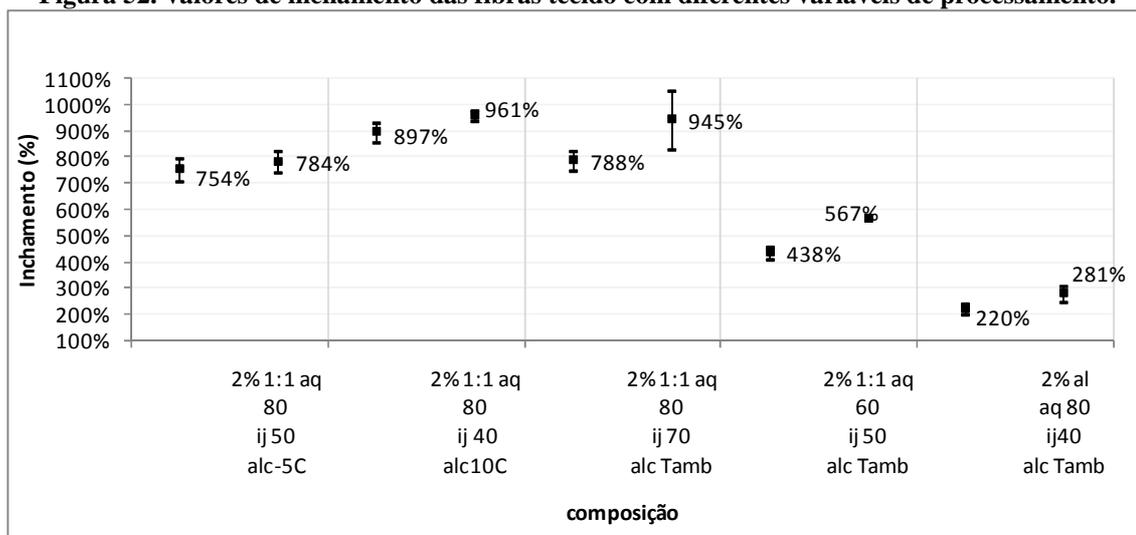
Através deste experimento conclui-se que é possível controlar a porosidade da fibra através do uso do reticulante.

5.2. ESTABILIDADE FÍSICA

5.2.1 INCHAMENTO

Na Figura 52 seguem os valores obtidos para as amostras em forma de tecido com diferentes variáveis de processamento em relação à capacidade de absorção de água destilada a 20°C, conforme caracterização (Figura 28). As pesagens das amostras úmidas foram realizadas a cada 30 minutos, durante 1 hora; contudo, nas três oportunidades verificou-se que praticamente o valor de inchamento variou muito pouco para cada amostra. A partir disso, supõe-se que o material é altamente hidrofílico e responde imediatamente ao meio aquoso.

Figura 52. Valores de inchamento das fibras tecido com diferentes variáveis de processamento.



Para as três especificações das fibras 2% 1:1 (50% ag – 50% al), que tiveram suas soluções aquecidas até 80°C na etapa de processamento das fibras, percebem-se valores de

inchamento maiores do que 700%, independentemente da temperatura de injeção ou temperatura do álcool nestes casos. Comparadas com a especificação de fibra-gel que contém apenas alginato, pode-se dizer que a proporção de ágar é fundamental para capacidade de inchamento do biomaterial.

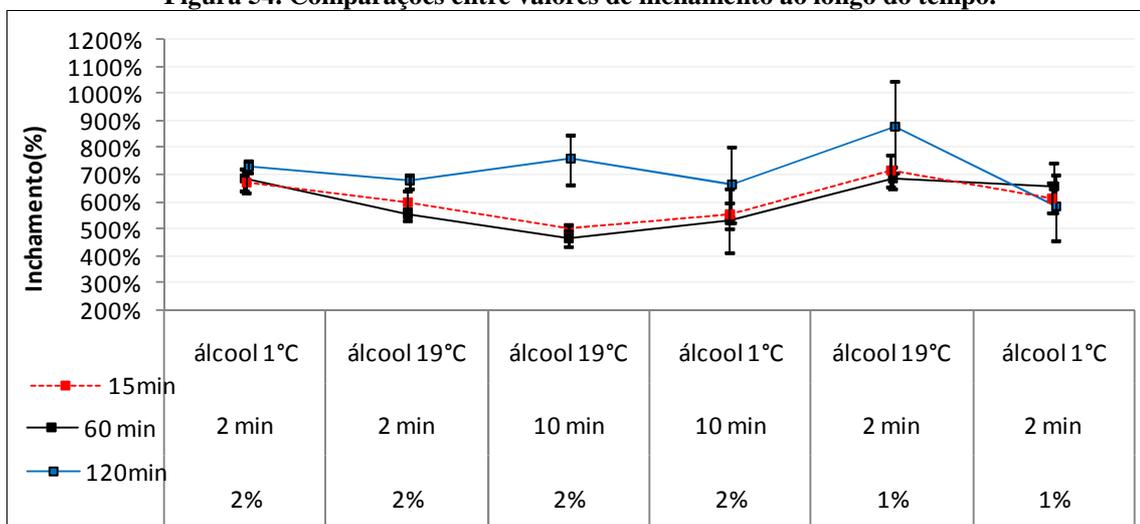
A especificação da fibra que atingiu maiores valores de inchamento foi justamente aquela aquecida a 80°C e injetada a 40°C. Conforme os autores Prasad et al (2007) e Labropoulos et al (2002) os géis de ágar ordenam as suas cadeias poliméricas, a partir do resfriamento da solução de 80°C até abaixo de 40°C, em formas helicoidais e géis muito resistentes. Quanto mais helicoidal for a conformação das moléculas de ágar, maior será a capacidade de difusão das moléculas de água para dentro dessas estruturas, aumentando a capacidade de absorção destes géis.

Figura 53. Amostra em formato tecido em teste de inchamento.



Quanto ao teste de reticulante (cloreto de cálcio), os resultados de inchamento (Figura 54) demonstram que praticamente não houve aumento considerável da capacidade de inchamento com o aumento do tempo de contato com a solução reticulante. Isto nos leva a crer que principalmente a proporção de ágar na blenda é que eleva a capacidade de inchamento da fibra-gel.

Figura 54. Comparações entre valores de inchamento ao longo do tempo.



Percebe-se que dependendo do grau de inchamento há perda de resistência e forma do *scaffold* com o passar do tempo, possivelmente devido ao enfraquecimento das forças atrativas entre as moléculas, em um meio mais aquoso. Um parâmetro que possivelmente possa auxiliar no entendimento do mecanismo de forças atrativas seja a medida de pH durante os testes de inchamento, uma vez que, conforme citado anteriormente, os géis de ágar tornam-se fracos em pHs abaixo de 6; enquanto, que os géis de alginato tornam-se mais resistentes em pHs mais ácidos.

Contudo os valores de inchamento ficaram de certa forma, próximos aos encontrados na literatura. Foram encontrados valores de inchamento da ordem de até 1.200% para *scaffolds* de alginato a 2,5% e metilcelulose a 2%, reticulados com fosfato dissódico 0,2M, para um tempo de reticulação de 3 horas (LIANG ET AL, 2004). No estudo, a utilização do íon fosfato criou um efeito de repulsão aos íons carboxílicos da estrutura do alginato, havendo assim o inchamento da estrutura do compósito depois de longo tempo de contato.

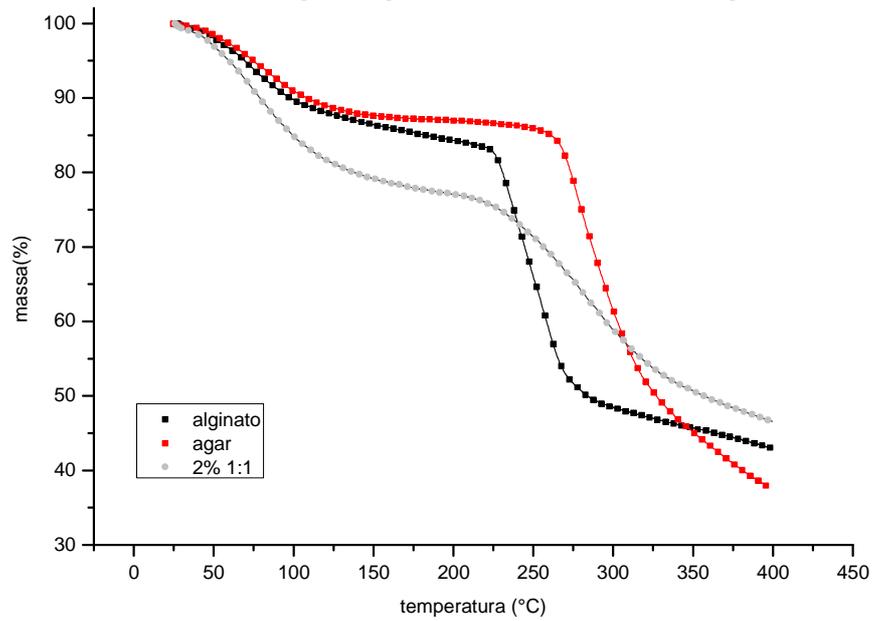
Verma et al (2006) produziu *scaffolds* de ágar e gelatina (3:1) a 1% em PBS (*phosphate buffer saline* - tampão salino de fosfato), que apresentaram valores de inchamento de até 4.500% após 1 hora nesta solução tampão.

A diferença dos valores mais altos de inchamento para as espécies com ágar se deve ao fato que os grupos hidroxila da água penetram nas estruturas helicoidais dos géis de ágar e formam pontes de hidrogênio intra- e intermoleculares (ARNOTT ET AL, 1974; GABRIELSON & EDIRISINGHE, 1996 APUD LABROPOULUS ET AL, 2002). O inchamento dos géis se dá devido a hidrofiliçidade do ágar, diferentemente do caso citado de Liang et al (2004), em que a utilização de fosfato na reticulação dos alginatos, fazia agir forças iônicas de repulsão, e conseqüentemente, o inchamento.

5.2.2. TERMOANÁLISES

Os resultados para todas as amostras analisadas por termogravimetria estão ilustrados na Figura 55. Os testes seguiram até 400°C devido ao parecer do técnico operador do equipamento.

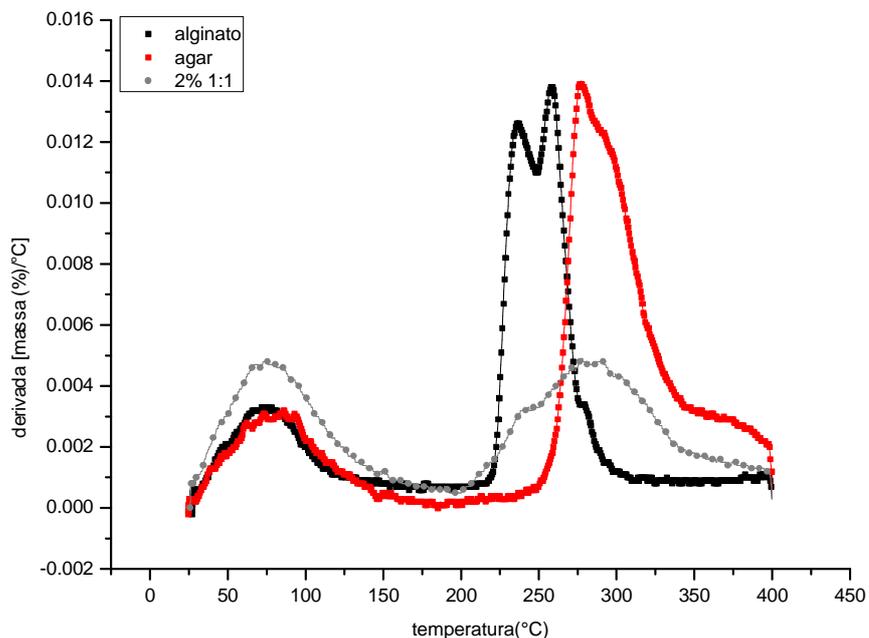
Figura 55. TGA dos constituintes ágar e alginato e das fibras 2%, 50% ag- 50% al (1:1).



Percebe-se que para a amostra de fibra, a curva de perda de massa é muito mais suave do que as curvas das amostras dos constituintes (ágar e alginato de sódio), não sendo evidenciado um patamar a certa faixa de temperatura, em que a massa torna-se constante e abruptadamente caia. Isto pode estar relacionado à presença de hidroxilas (água de ligação) na composição das fibras-gel. Conforme aumenta a temperatura, ocorre a liberação e quebra das moléculas de água e polissacarídicas gradativamente.

Na Figura 56 foi obtida a derivada da Figura 55, a fim de determinar as temperaturas referentes aos patamares e às mudanças de inclinação das curvas.

Figura 56. Derivada das curvas de TGA apresentadas na Figura 55.



De maneira geral todas as curvas tiveram a primeira mudança de declividade em torno de 75°C, exceto para o ágar, que ocorreu especificamente em torno de 85°C. Nesta faixa de temperaturas, as moléculas adquirem certa mobilidade do estado fundido. E estes resultados já demonstram que o *scaffold* consegue suportar temperaturas bem maiores do que a temperatura corporal em estado febril (~40°C); e portanto, pode ser utilizado para a aplicação que se estuda na dissertação.

De acordo com o estudo de Prasad et al (2007) a temperatura de fusão do ágar foi encontrada na faixa entre 79° e 87°C e a redução de até 80% da sua massa foi encontrada entre 90° e 110°C. Estes valores de degradação encontrados por Prasad encontram-se muito próximos daqueles encontrados por outro autor citado por ele, entre 120 e 130°C (KRUSADI IS. ERVADI). Porém analisando os resultados obtidos tanto para o ágar como para o alginato, percebe-se que os últimos estágios de degradação foram mais intensos, e ocorreram em temperaturas muito acima de 110° ou mesmo 130°C, ou seja acima de 200°C.

A agarose, por exemplo, fase purificada do ágar com maior poder gelificante, atinge a fusão acima das temperaturas de 90 e 95°C (ROCHAS & LAHAYE, 1988), quando as estruturas D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose desestabilizam-se. Assim, pode-se supor que quão mais próximas as temperaturas de fusão forem de 95°C, maiores serão as proporções de agarose, em relação à agarpectina no ágar, corroborando para géis mais resistentes.

Suzuki et al (2001) comparou o efeito do peso molecular de diferentes tipos de ágar, com diferentes conteúdos de 3,6-anidro-L-galactose, sulfatos e ácido úrico, sobre as características das soluções e dos géis formados a partir delas. O autor percebeu que a temperatura de fusão aumenta com o peso molecular (como é de se supor) e pode chegar para a grande maioria dos ágares até 95°C. Esta constatação também pode ser observada nos resultados obtidos.

A perda de massa substancial das amostras analisadas ocorre em torno de 236° C e 270° C para o alginato de sódio, 277° para o ágar, e próximo de 290°C para a fibra estudada. A partir das curvas, entende-se que o processo de degradação é exotérmico e o acompanhamento das temperaturas de degradação se deu até a reminiscência de menos de 50% da massa inicial dos seus constituintes. Observa-se que as curvas do ágar e do alginato, que ocorreram após 200°C, não se sobrepõem, e demonstram que o alginato degrada-se antes do ágar. Contudo, a curva da fibra constituída pelos dois polissacarídeos apresentou a atenuação das bandas de seus constituintes, e um único pico, que inicia a aproximadamente 250°C (início do pico do alginato) e termina em aproximadamente 350°C (fim da curva do ágar, com deslocamento da

linha de base). Isso pode demonstrar que a blenda formada na fibra está bem homogênea de forma que não é possível evidenciar os picos de seus constituintes separadamente.

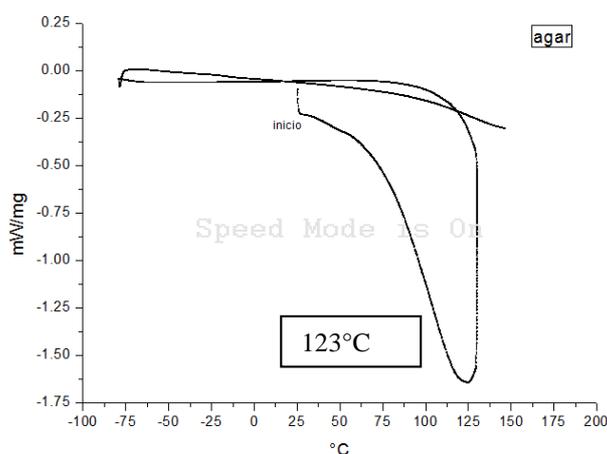
Milena Segato (2007) estudou análises térmicas de diferentes sais de alginato, e para os sais de cálcio, observou os seguintes processos por intervalos de temperaturas: desidratação (perda de 7% em massa) entre 22,31° a 171,97°C, decomposição (perda de 55,20% em massa) entre 172,97° a 694,17°C, e por fim o resíduo carbonizado (perda de 37,53% em massa) a 694,17°C. Há que se salientar que de acordo com os residuais de cálcio e sódio dos alginatos diferentes processos de degradação poderão ocorrer por intervalo de temperatura.

Assim sendo, percebe-se que os resultados obtidos são parciais, já que acima de 400°C, pelo menos para os alginatos, há a ocorrência da degradação até obtenção do carbonizado.

Santana et al (2010) detectaram dois estágios de degradação para o ágar utilizado para a blenda entre polietileno e ágar, entre 40° e 130°C e entre 265 e 340°C, sendo este último referente à degradação das unidades de galactose. Estes resultados também se aproximam daqueles obtidos por esta dissertação.

Os resultados de DSC não foram realizados em sua totalidade, como se pode perceber na Figura 57. Contudo, percebe-se que o segundo ciclo de aquecimento do ágar apresentaria uma banda bem acima da temperatura de 200°C, já que o ágar apresenta histerese (LABROPOULUS ET AL, 2001; MOHAMMED ET AL, 1998^a, APUD LABROPOULUS ET AL, 2002), ou seja, modifica suas propriedades de acordo com o ciclo de aquecimento e resfriamento.

Figura 57. DSC do ágar.



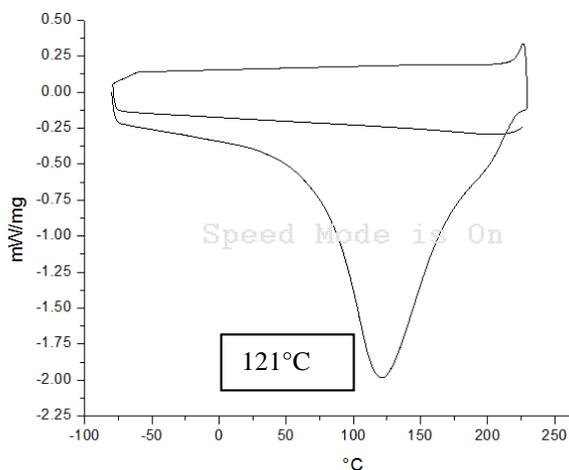
Assim, um dos desafios em se utilizar o ágar é o domínio e o controle sobre as variáveis de processamento, como taxas de resfriamento, aquecimento e temperaturas de equilíbrio (ou “cura”), já que também as propriedades elásticas são moduladas por estas variáveis, ou seja,

por toda história térmica das moléculas no gel. Sendo este um polímero termorreversível, e que apresenta modificação de sua microestrutura em razão de ciclos de aquecimento, os parâmetros de processamento acabam sendo imprescindíveis de controle para a obtenção reprodutível das fibras-gel obtidas a partir dele.

É aceito para os polissacarídeos termorreversíveis o modelo “Zíper” de agregação entre as moléculas, em que se supõem regiões cristalinas, suportadas pelas estruturas helicoidais e suas terminações, e regiões amorfas, praticamente coloidais (REES, 1969^a APUD DEA ET AL, 1972; NISHINARI ET AL, 1990 APUD SUZUKI ET AL, 2001). As terminações das estruturas helicoidais podem estar envolvidas no controle da textura biológica dos tecidos (LAWSON & REES, 1970 APUD DEA ET AL, 1972). Assim, pode-se supor que acima de 120°C ocorrem a desagregação das estruturas helicoidais, havendo apenas a degradação das moléculas acima desta temperatura conforme resultados de TGA.

Da mesma forma o resultado de DSC da fibra de ágar e alginato apresentou uma banda em 121°C conforme Figura 58, muito próxima da banda encontrada no DSC do ágar (Figura 57).

Figura 58. DSC da fibra obtida por solução (aq) a 2%, 50% ágar - 50% alginato.



5.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.3.1. EDS

As fibras 2%, 50% ag - 50% al foram analisadas por EDS, de forma a procurar identificar os principais elementos constituintes, bem como elementos tóxicos possivelmente presentes.

Na Figura 59 procurou-se analisar a diferença entre as partes lisa e mais rugosa da fibra, identificadas nos pontos: pt(1), quadrado azul, e no pt(2), ponto laranja.

Figura 59. Análise EDS, 10 kV, 270 x, na área lisa (pt1) e na área fibrosa (pt2) da fibra.

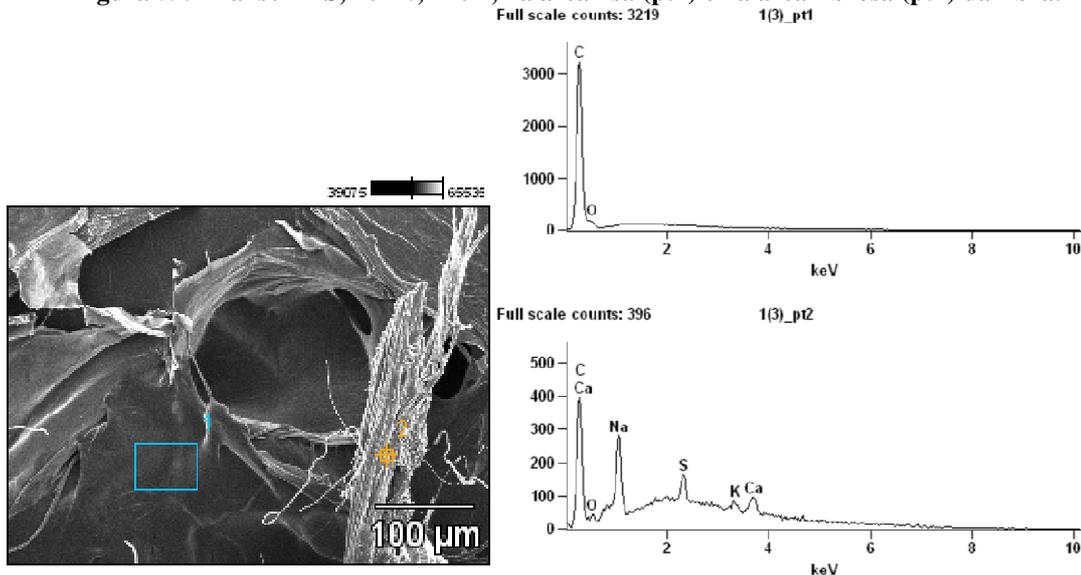


Tabela 12. Quantificação dos elementos por EDS de acordo com a Figura 64.

	Compound %					
	C	O	Na	S	K	Ca
1(3)_pt1	99.89	0.11				
1(3)_pt2	78.55	1.69	8.33	4.15	1.86	5.42

Percebe-se que na área mais rugosa da fibra foram identificados outros elementos, que não somente o carbono (C), principal componente das cadeias polissacarídicas. Pode-se inferir que a fibra não foi totalmente reticulada, já que a presença do sódio (Na) está em maior quantidade do que a do cálcio (Ca), conforme Tabela 12, indicando baixa reticulação das cadeias de alginato de sódio nas fibras. Nesse sentido a hipótese parece fazer sentido no momento em que se observam mais áreas planas superficiais à fibra do que áreas agregadas, de formação lamelar e fibrosa, que indiquem aproximação das moléculas, reticulação e formação das fibras.

Foi testada a análise de cádmio nas amostras, já que este elemento pode ser um dos constituintes tóxicos dos alginatos, conforme Braga et al (2007). Entretanto, a análise não foi quantificável, conforme Tabela 13.

Figura 60. Teste de identificação do elemento cádmio (Cd) nas amostras da Figura 64.
Full scale counts: 396 1(3)_pt2

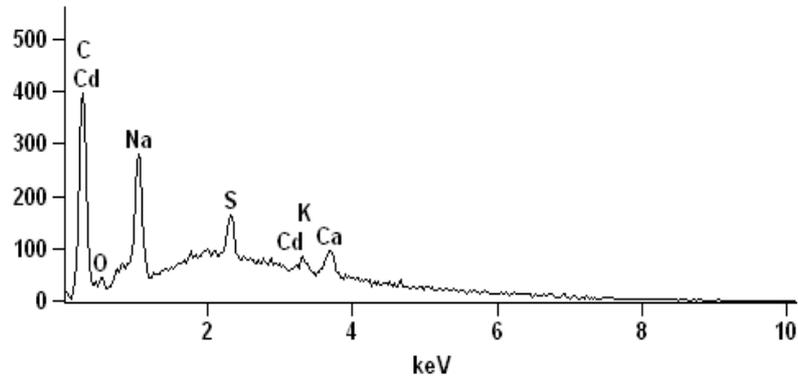


Tabela 13. Quantificação dos elementos por EDS de acordo com a Figura 64.
Compound %

	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>Na</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Cd</i>
<i>1(3)_pt2</i>	78.55	1.69	8.33	4.15	1.86	5.42	0.00

Para as superfícies mais cilíndricas, em que se observam as fibras, também foram analisados outros elementos, conforme Figura 61.

Figura 61. Análise EDS, 10 kV, 1.100x, na amostra fibrosa.

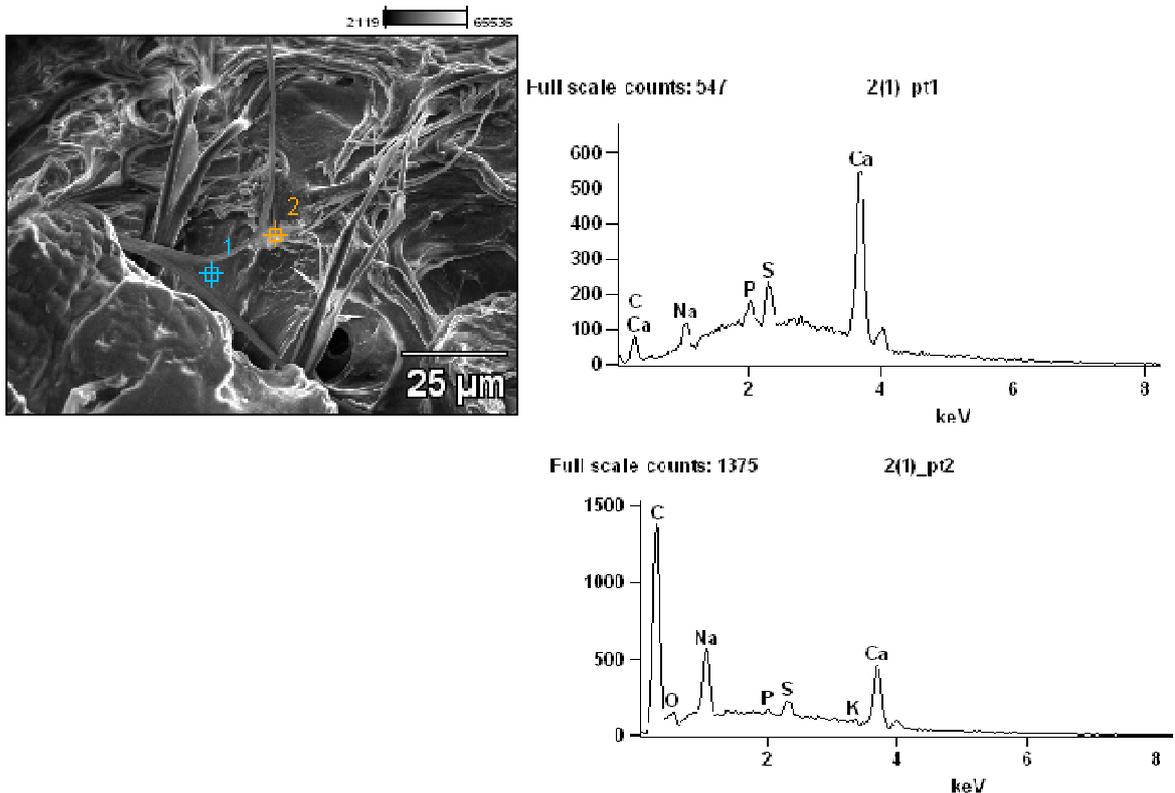


Tabela 14. Quantificação dos elementos por EDS conforme Figura 66.

	Compound %						
	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>Na</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>
<i>2(1)_pt1</i>	20.86		3.80	2.77	7.51		65.06
<i>2(1)_pt2</i>	74.72	2.75	5.47	0.40	2.12	0.47	14.07

A hipótese de que quanto mais bem formada a fibra, maior é a reticulação do alginato de sódio parece ser verdadeira, uma vez que a quantificação de Ca para esta análise é maior do que a de sódio, e se observam as estruturas fibrosas mais cilíndricas. Outro elemento sempre detectado é o sulfato (S), presente nas extremidades das moléculas de ágar, que confere ainda mais hidrofiliçidade à fibra.

Na amostra da Figura 62 se observam possivelmente resquícios de cloreto de cálcio, talvez não dissolvidos, uma vez que o pico do cloro (Cl) é bem intenso, bem como a sua quantificação na Tabela 15.

Figura 62. Análise EDS, 10 kV, 2.000x, em particulado sobre a amostra.

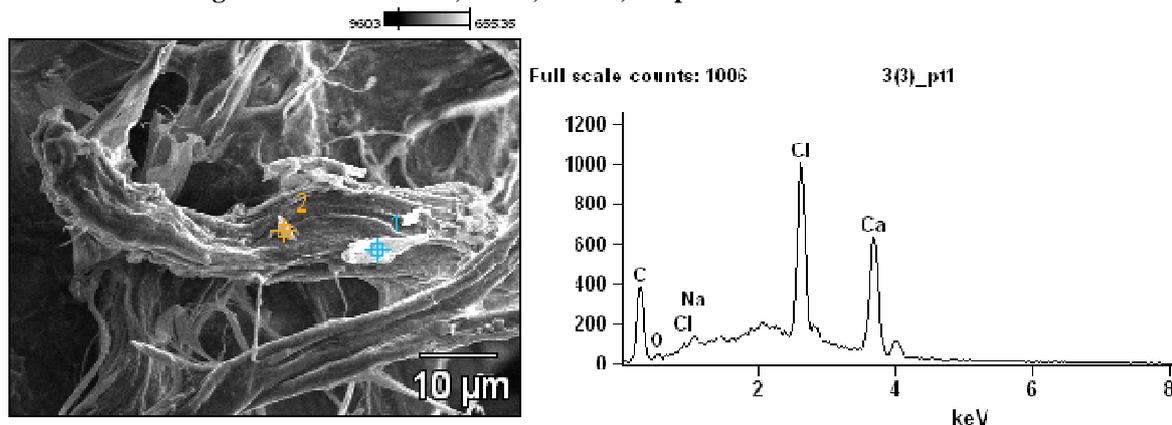


Tabela 15. Quantificação dos elementos encontrados no ponto pt(1) e no ponto pt(2) da Figura 67.

	Compound %				
	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>Na</i>	<i>Cl</i>	<i>Ca</i>
<i>3(3)_pt1</i>	55.44	1.18	0.61	19.42	23.35

Com o intuito de verificar se havia alguma contaminação por zinco (Zn) foi realizada a análise para este elemento e percebeu-se que não foi significativamente quantificável pela análise, conforme Tabela 16.

Tabela 16. Quantificação dos elementos no ponto pt(2), principalmente com intuito de verificar contaminações com zinco.

	Compound %								
	C	O	Na	P	S	Cl	Ca	Zn	I
3(3)_pt2	57.33	1.19			0.58	18.44	22.45	0.00	

Em suma, não foram identificados elementos estranhos aos constituintes da fibra, e através da análise das imagens e da quantificação dos elementos pode-se supor sobre a efetividade das reticulações dos géis e consequente formação de uma estrutura porosa e fibrosa.

5.3.2. INFRAVERMELHO

Os picos identificados na Figura 63 e na Figura 64 são característicos dos constituintes estudados, conforme Sartori et al (1997), Milena P. Segato (2007), Odóñez et al (2011), Babak (2012) e Guerrero (2014).

Para os dois polissacarídeos, inclusive para a fibra, a faixa de bandas entre 3400 e 1.400 cm^{-1} são muito semelhantes, distinguindo-se principalmente na faixa de comprimentos de onda, de 1.400 a 400 cm^{-1} .

A presença da banda em torno de 3.420 cm^{-1} é característica dos grupamentos hidroxilas de suas moléculas, além de também constituir os acréscimos de umidade das amostras.

As bandas em 2.929 cm^{-1} (Figura 63) e em 2.937 cm^{-1} (Figura 64) são referentes ao estiramento assimétrico dos grupamentos $-\text{CH}_2$, conforme Smith (1998), Coimbra et al (1998) e Synytsya et al (2010) apud Ordóñez et al (2011). Segundo Patel et al (1999) apud Letícia Vasconcellos (2012) e Guerrero (2014), estes alongamentos de C-H alifático, e aqueles referentes às ligações C-O, com alongamentos em torno de 1035 e 1038 cm^{-1} , são bem característicos de polissacarídeos em geral.

Milena Segato realizou estudos termoanalíticos de diferentes sais do ácido algínico, inclusive o próprio. As principais bandas identificadas no estudo referente ao alginato de sódio foram as seguintes: 3.413,4; 2.931,3; 1.612,2; 1.413,6; 1.303,6; 1.091,5 e 1.031,7, que são muito próximas das encontradas nesta dissertação.

Já as bandas presentes nos dois espectrogramas dos dois constituintes das fibras (inclusive no espectrograma da fibra - Figura 66), em 2.138 cm^{-1} e em 2.148 cm^{-1} , não são características dos polissacarídeos estudados, conforme literatura, e podem ser referentes a

ligações triplas entre carbono e hidrogênio, as quais não fazem parte das moléculas estudadas, havendo a necessidade de maiores esclarecimentos.

As bandas visualizadas no alginato de sódio em 1.611 cm^{-1} e em 1.415 cm^{-1} correspondem às vibrações, assimétrica e simétrica, dos grupos COO^- , respectivamente, conforme Sartori et al (1997). A mesma semelhança entre estas bandas, na Figura 63, pode ser percebida para o ágar, correspondentes a 1.620 cm^{-1} e a 1.425 cm^{-1} . A diferença de somente 10 cm^{-1} pode significar a mesma medida na prática, na tolerância do equipamento. Contudo há que se salientar que, segundo Guerrero (2014), bandas em 1.607 cm^{-1} , bem próximas à 1.611 cm^{-1} do alginato de sódio, podem indicar a presença de proteínas, e conseqüentemente possível toxicidade à cultivos celulares (DUSSEAULT ET AL, 2005).

Figura 63. Espectrograma de infravermelho do alginato de sódio (Sigma-Aldrich).

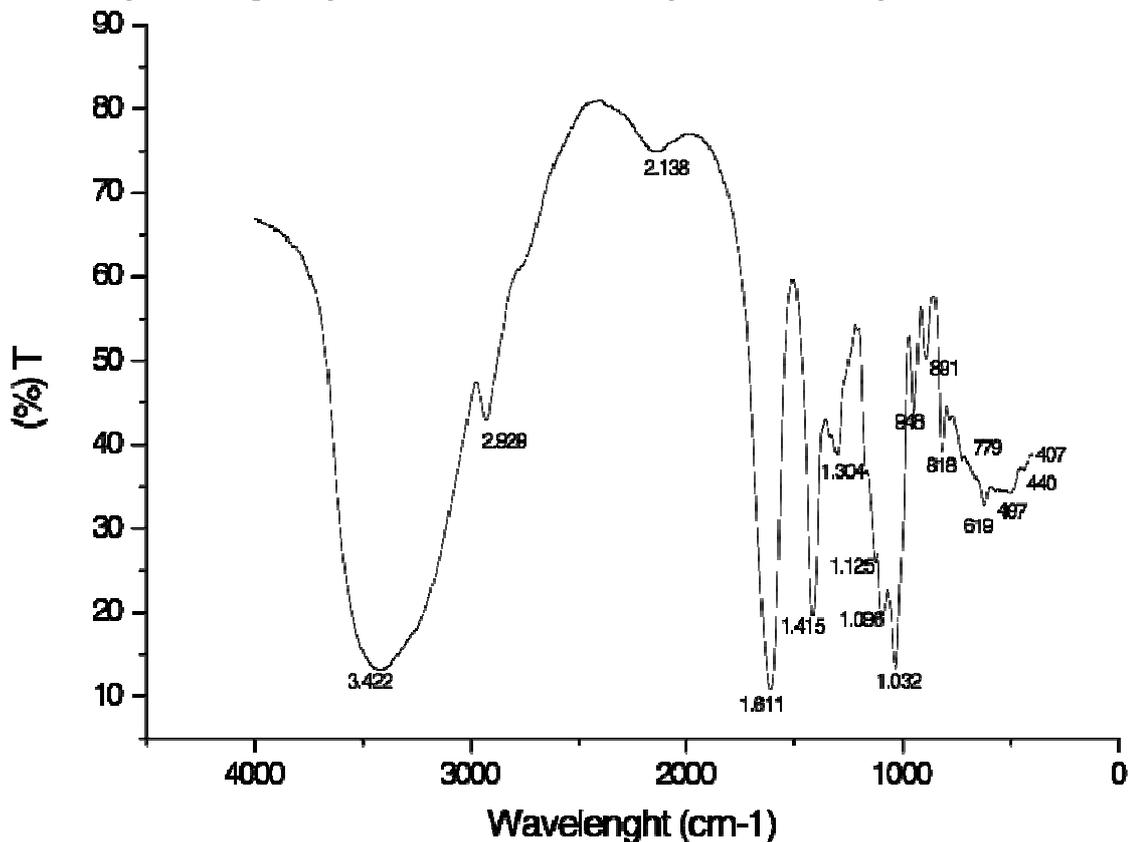
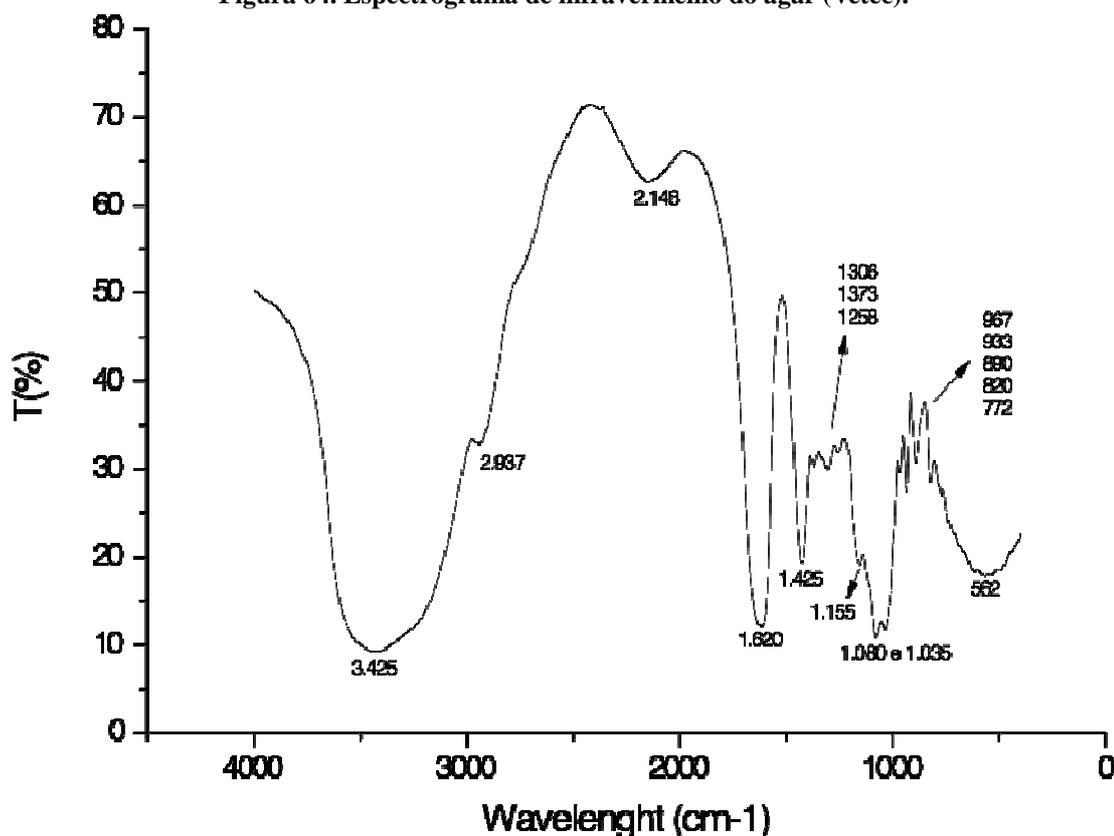
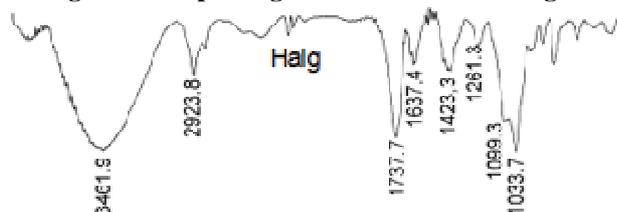


Figura 64. Espectrograma de infravermelho do ágar (Vetec).



Corroborando para a identificação dos resíduos dos ácidos carboxílicos, principalmente quanto à molécula de alginato de sódio, a identificação das vibrações entre 1440 e 1395, segundo Smith (1998), podem corresponder as vibrações de grupos-OH no plano de ligação dos ácidos carboxílicos ou dos carboxilatos. Conforme identificado por Milena Segatto (2007), a banda referente à ligação dos ácidos carboxílicos (C=O e C-O) do ácido algínico, por exemplo, está presente em torno de $1.737,3 \text{ cm}^{-1}$. Quando há a salificação do ácido, esta banda desaparece e intensificam-se outras duas, uma mais intensa entre 1600 e 1620 cm^{-1} , referente à deformação axial assimétrica da ligação C-O, e outra em torno de 1400 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-O. A Figura 65 ilustra as bandas do ácido algínico, principalmente no que se refere à banda em $1.737,7 \text{ cm}^{-1}$, correspondentes a ácidos carboxílicos não salificados.

Figura 65. Espectrograma de IV do ácido algínico.



Fonte: Milena Segatto – USP (2007)

Em torno de 1300 cm^{-1} , tanto para o ágar quanto para o alginato de sódio, verificam-se alongamentos, que conforme Milena Segatto (2007), correspondem a deformações angulares no plano do grupo OH. Conforme Guerrero (2014), para o ágar as bandas em torno de 1.370 , 1.243 e 1.149 cm^{-1} , indicam vibrações sulfato e éster-sulfato. No espectrograma do ágar e das fibras, é possível identificar alongamentos em 1.373 , 1.258 e 1.149 cm^{-1} e em 1.371 , 1.257 e 1.149 cm^{-1} , respectivamente, indicando estas vibrações, tradicionalmente encontradas em moléculas de ágar (IZUMI, 1973; ROCHAS & LAHAYE, 1988, BABAK, 2012).

Dependendo do tipo e da origem da alga sabe-se que algumas bandas podem sofrer pequenas modificações conforme estudo de Ordóñez et al (2011). Este fato corrobora para os resultados de Sartori et al (1997), que evidenciou algumas diferenças de intensidade entre as bandas de alginato de sódio, que poderiam indicar diferenças quanto a quantidade de blocos gularônicos (G) ou manurânicos (M), entre as bandas 1.400 cm^{-1} e 820 cm^{-1} , principalmente entre 1030 e 1080 cm^{-1} para G e 808 e 787 cm^{-1} para M; contudo, nos casos por ele estudados, nenhuma diferença significativa entre intensidades de bandas foi indicada como função de diferentes pesos moleculares.

Ordóñez et al (2011) indica que as bandas entre 950 e 750 cm^{-1} são bem características de polissacarídeos, principalmente em se tratando de algas marrons.

Figura 66. Comparação entre os espectrogramas da fibra para a concentração 2% e proporção entre ágar e alginato de sódio; 50%-50%, e de seus constituintes.

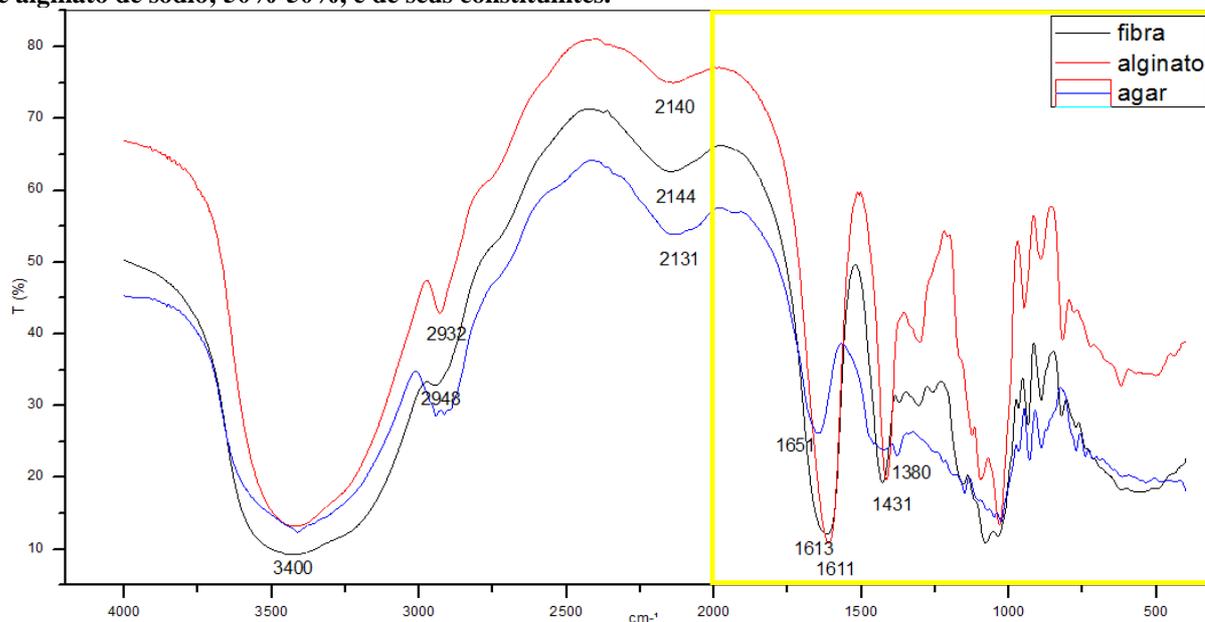
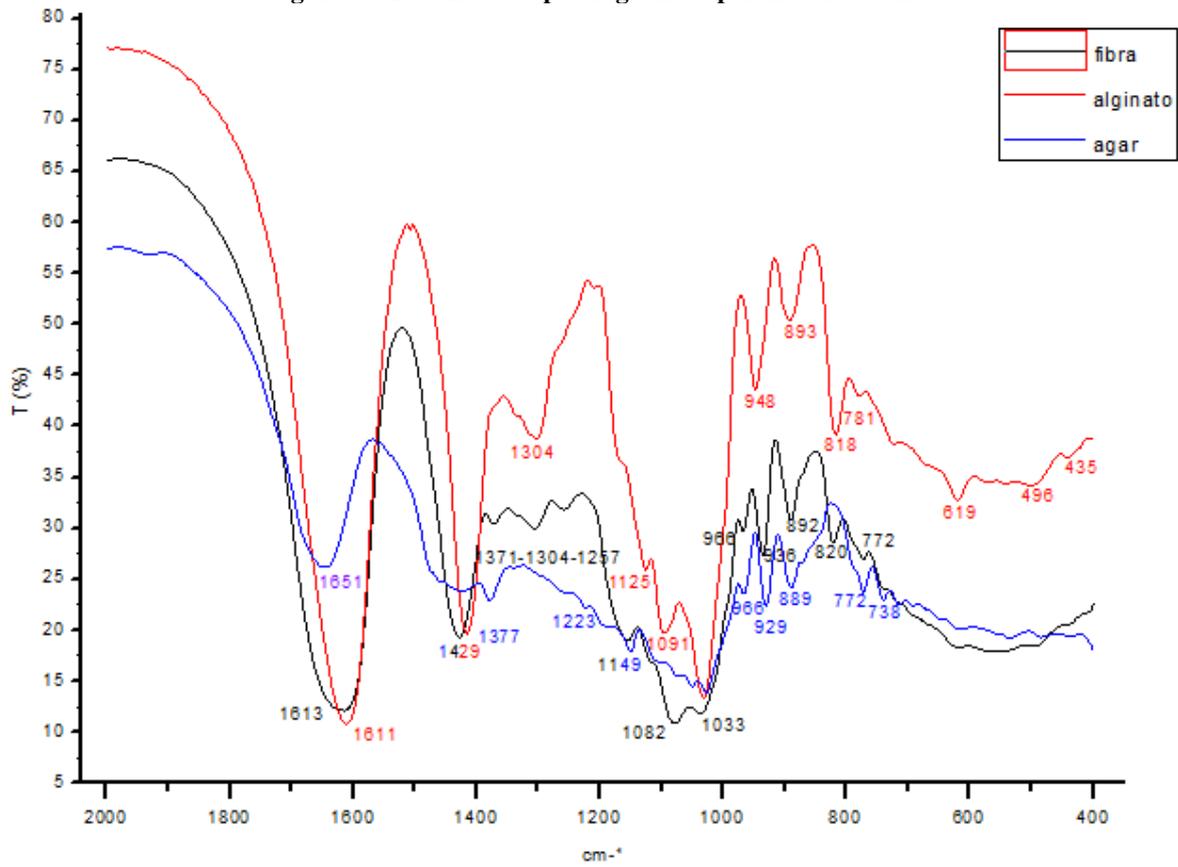


Figura 67. Detalhe do espectrograma a partir de 2000cm⁻¹.



Apesar da observação de Senturk et al. (2010) de que para blendas que tem polímeros naturais, é comumente encontrada a divisão em duas bandas da banda referente aos grupos hidroxilas, em torno de 3.400 cm⁻¹, acredita-se que ocorreu uma mistura homogênea entre os constituintes que formam a fibra, ou seja uma blenda polimérica. Na Figura 68 há um comparativo entre relatos e faixas de bandas encontradas na literatura citada e dos valores das bandas detectadas nos resultados de infravermelho dos constituintes alginato de sódio e ágar, inclusive da fibra (solução aquosa a 2% e proporção de 50% entre ágar e alginato de sódio).

Percebe-se que algumas bandas das fibras ora parecem-se com as do alginato e ora com as do ágar, havendo inclusive modificação da intensidade e deslocamentos dessas bandas afins, como pode ser observado na Figura 66 e na Figura 67, principalmente entre os comprimentos de onda 1.400 e 400 cm⁻¹, como já dito anteriormente.

Figura 68. Comparativo entre as bandas detectadas de alginato de sódio, ágar e das fibras, e entre a literatura.

Alginato	Milena Sagatto	Sartori et al	Guenero	Odóñez et al	Ágar	Odóñez et al	Guerrero	Babak	fibra
3422	3.413,4				3425		3291		3400
2929	2.931,3				2937	2960 2920	2932		2948
2138					2148	2845	2845		2144
1611	1.612,2	1608-1611			1620	1640	1607		1613
1415	1.413,6	1413-1414			1425				1429
1304	1.303,6				1373 1306	1370	1370		1371 1304
1125		1124-1126			1258	1250	1243 1250		1257
1096	1.091,5			1063	1080				1082
1032	1.031,7	1030 - 1035	1030 e 1080: resíduos G	1024	1035	1038		1072 - 1078: ligação glicosídica	1033
948		947-950		950 - 750	967				966
891		892		878	890	900	891		892
818		818	808: resíduos M	817	820	845			820
779		781	787: resíduos M		772	705			772
619		497			562				

5.4. VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES

Foi observado durante a experimentação que a mistura entre os constituintes ágar e alginato apenas se fez possível ao misturá-los juntos em solução aquosa a partir da temperatura ambiente.

Foi constatado que não é possível que primeiro se faça a dissolução do ágar em água destilada (1%), até aquecê-lo a 60°C (após aproximadamente 1 hora de mistura), para que depois se adicione o alginato de sódio (1g), mesmo elevando a temperatura aos 80°C, durante 1 hora de mistura, conforme pode ser percebido na Figura 69. Possivelmente o alginato fica totalmente disperso na solução de ágar a 1%, devido à maior interação entre as moléculas de ágar umas com as outras, através de pontes de hidrogênio com a água, a ponto de não

oferecerem volume livre suficiente para que ocorra a dissolução do alginato de sódio para esta situação.

Sabe-se que próximo ao ponto de ebulição da água, as moléculas de ágar mantém uma conformação randomicamente coloidal (REES, 1972), dispersando-se homoganeamente no volume da solução. Ao resfriar, a conformação coloidal das moléculas de ágar varia para a helicoidal (de acordo com o tempo para a efetiva organização). As moléculas poderão estar livremente ou associadas em *clusters* para qualquer tipo de conformação, coloidal ou helicoidal; contudo, ao atingir a temperatura a partir da qual não há mais energia para deslocamentos de cadeia ou modificações de conformação, o estado gel é atingido.

Quando há a formação e agregação de estruturas helicoidais (dupla- ou triplamente) (DEA ET AL, 1972; VIEBKE ET AL, 1994; AYMARD ET AL, 2001; LABROPOULUS ET AL, 2002) os géis apresentam-se mais resistentes e elásticos, e observa-se a formação de fibras. Aproximando-se à temperatura de gel, que pode ser relacionada à temperatura de transição vítrea (Tg), para hidrogéis, haverá a atuação das forças intermoleculares preponderantemente ao deslocamento das moléculas, formando assim com o tempo uma rede tridimensional.

Assim, pode-se inferir, pelo resultado do experimento de dissolução, que possivelmente à temperatura de 60°, ou mesmo à 80°C, associações em *clusters*, poderiam estar presentes, facilitadas pelo tempo de mistura (de 1 hora) e pelo atrito condicionado da agitação, impedindo que o alginato de sódio se dissolvesse no volume da solução.

Já quando primeiramente dissolveu-se o alginato de sódio em água destilada (1%), para depois adicionar o ágar (1g), a temperatura de 60°C, não houve problemas para a dissolução. Muito possivelmente, pois as moléculas de ágar são menores em tamanho do que as moléculas de alginato de sódio, e conseguem assim dissolver-se no volume da solução e/ou devido ao fato de que, como o alginato de sódio é menos polar do que o ágar, a dissolução do segundo através de pontes de hidrogênio, é facilitada. As fibras obtidas através deste método de dissolução não se apresentaram homogêneas, após a liofilização. Assim sendo, ao verificar estas condições de dissolução, optou-se por dissolver tanto o ágar como o alginato de sódio conjuntamente nas concentrações e proporções estudadas, elevando a temperatura gradualmente.

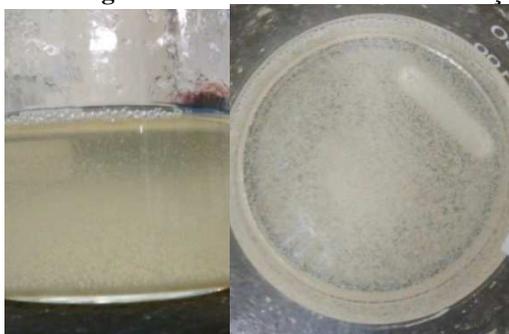
De acordo com a literatura, sabe-se que as condições de gelificação dependerão em muito do tipo e da origem dos polissacarídeos, bem como dos tratamentos adotados para a sua obtenção. Labropoulos et al (2001) menciona que a temperatura de gelificação do ágar depende da massa molar, que varia de acordo com a espécie, o local de origem da alga, e

também se o tratamento é alcalino ou ácido para obtenção do ágar (ROCHAS E LAHAYE, 1988).

Rochas & Lahaye (1988) fizeram um estudo de comparação entre agaroses (constituente gelificante do ágar) de origens diferentes, para determinação dos pesos moleculares em função das viscosidades e espalhamento de luz. Os autores observaram que a agarose somente apresenta cadeias desorganizadas acima das temperaturas de 90 ou 95°C, ou seja, quando atingem o estado fundido, randômico aleatório, a partir destas temperaturas.

Assim, corroborando para a explicação sobre a dissolução de ágar e alginato de sódio, há que se salientar que mesmo estando à temperatura acima daquela de gelificação; contudo, ainda abaixo da temperatura de fusão (*melting*), dificilmente haverá facilidade de dissolução e homogeneização a outro constituinte, já que principalmente ocorrem forças atrativas de pontes de hidrogênio, sendo necessário que se forneça mais energia para a desagregação entre as estruturas coloidais, ou mesmo helicoidais que houver, a fim de dissolver os constituintes para esta condição.

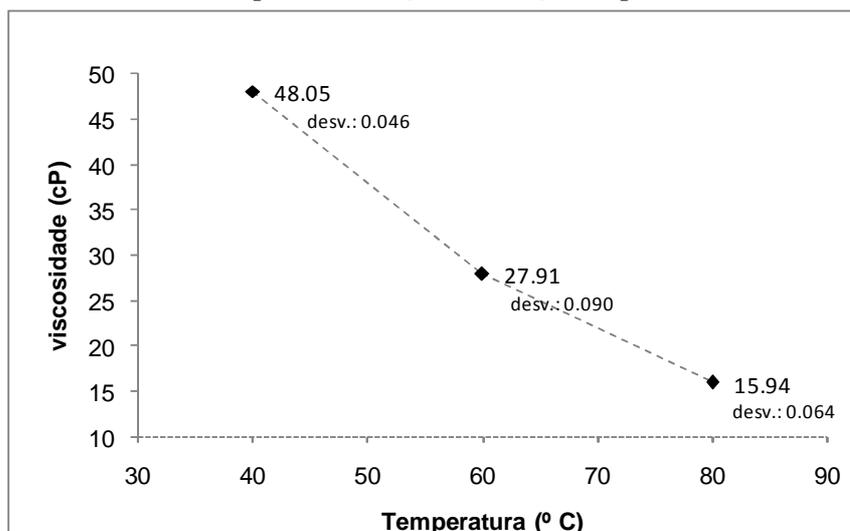
Figura 69. Solução 2% 1:1, primeiramente dissolvendo ágar em água destilada e posteriormente acrescentando alginato de sódio: não houve dissolução.



Com base nisto, primeiramente realizou-se a dissolução dos constituintes para depois, analisar as viscosidades das soluções, que mostraram-se diferentes entre os constituintes e a solução formada a partir deles.

Percebe-se na Figura 70, que a solução aquosa a 2% de alginato apresenta um significativo decréscimo das medidas de viscosidade com o aumento da temperatura, para uma mesma taxa de cisalhamento, como já era esperado para fluidos newtonianos (POTTER & WIGGERT, 2008).

Figura 70. Média de (8) medidas de viscosidade de solução (aq) de alginato de sódio a 2%, para cada temperatura: 40°, 60° e 80°C, a 10 rpm.



Os pontos ilustrados no gráfico da Figura 70, referentes ao alginato a 2%, foram obtidos através de leituras bem estáveis que durante 1 minuto permaneceram praticamente constantes aos parâmetros de medida (temperatura e rotação), apresentando desvios padrão não maiores do que 0.09, conforme pode ser percebido.

Da mesma forma, nenhum comportamento atípico foi observado para a solução de alginato de sódio, uma vez que para uma mesma temperatura, praticamente as viscosidades não variaram, mesmo quando a velocidade foi modificada. Salienta-se que para as medidas a 40°C, o torque do *spindle*, já encontrava-se no limite do equipamento, entre 80% e 96% para cada uma das velocidades; e por conta disso, não foi possível a medida para maiores velocidades.

Tabela 17. Viscosidades da solução de alginato a 2% em diferentes temperaturas e velocidades de rotação.

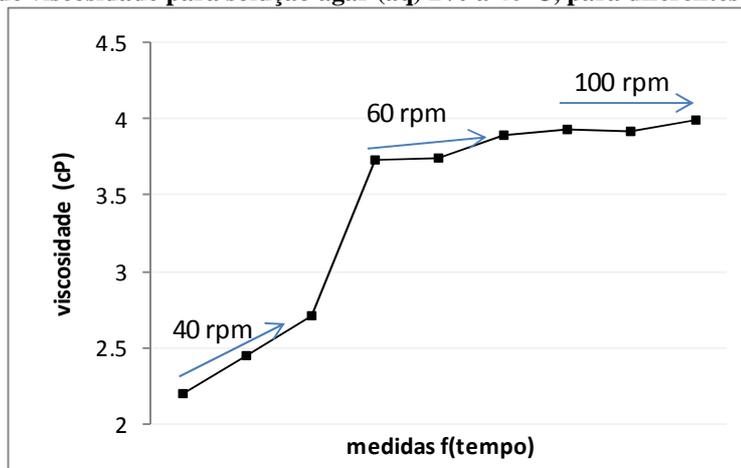
Temperatura (°C)	Velocidade (rpm)	Viscosidade média (cP)	Desvio padrão
40	10	48.055	0.046
40	20	48.186	0.090
60	10	27.905	0.064
60	20	27.740	estável
80	10	16.011	0.016
80	20	15.888	0.016

Já para a solução aquosa de ágar a 2% é evidenciado um comportamento bem diferente, observou-se que não houve estabilidade na obtenção dos valores de viscosidade para as temperaturas de 60° e 80°C, havendo continuamente um aumento da viscosidade. Assim sendo, na busca de uma condição estável para a medida da viscosidade, foi necessário que se

medisse o parâmetro em diferentes velocidades (alterando o torque do *spindle* conforme a escala do equipamento).

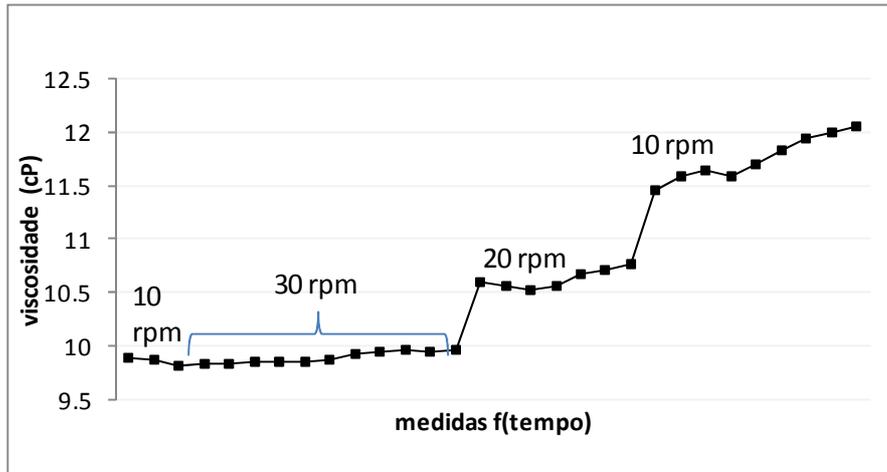
Primeiramente realizaram-se medidas a 40° C, havendo possibilidade de medição apenas a partir de 40 rpm. Entretanto, assim que a viscosidade foi aumentando, houve a necessidade de aumentar a velocidade por conta da escala do equipamento. Vê-se que somente a 100 rpm, a 40°C, foi possível a obtenção de medidas de viscosidade que fossem mais estáveis, evidenciando uma baixa viscosidade (4cP).

Figura 71. Medida de viscosidade para solução ágar (aq) 2% a 40°C, para diferentes rotações por minuto.



Ao modificarmos a temperatura para 60°C as medidas não permaneceram constantes para a velocidade inicial de 20rpm, saltando de uma média de 5 cP para 30 cP em torno de 13 minutos de acompanhamento das medidas. Isso indica que possivelmente conformações ou associações entre as moléculas estavam ocorrendo, já que certa resistência ao escoamento estava sendo detectada pelo *spindle* do viscosímetro (aumentando a viscosidade), necessitando conseqüentemente a modificação do parâmetro de agitação (velocidade).

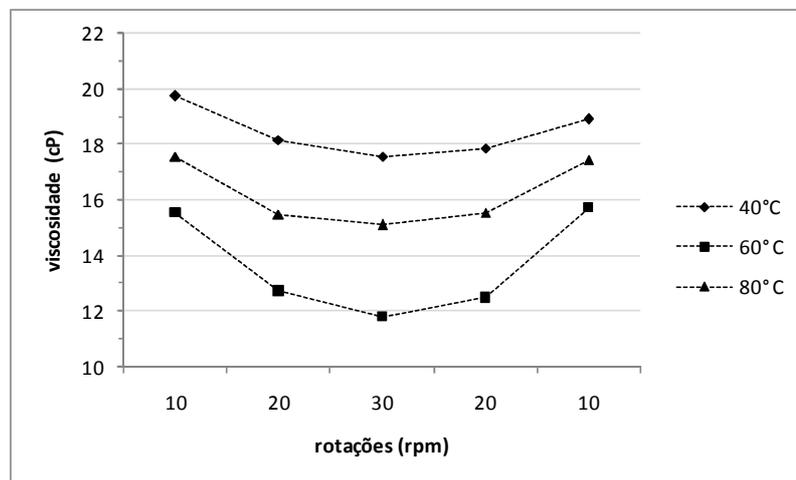
Figura 73. Medida de viscosidade de solução (aq) de ágar 2% a 80°C.



Suzuki et al (2011) verificou que para moléculas de agarose nas temperaturas entre 80° e 97°C, as massas moleculares variavam de 1,5 a 5,5 x 10⁻⁵ e as viscosidades, de 4 para 14 cP. Os valores de viscosidade obtidos para a temperatura de 80°C são realmente próximos aos encontrados para esta literatura, conforme indica a tendência da Figura 73. Entretanto os valores se distanciam daqueles verificados por Prasad, já relatados acima.

Para a solução com a concentração e proporção entre ágar e alginato, que origina fibras bem formadas, verificou-se valores e comportamentos da viscosidade bem diferentes.

Figura 74. Médias das medidas de viscosidades para a solução 2%, 50%-50%.



Percebe-se que existe uma faixa de viscosidades para cada temperatura, e que dependendo da energia cinética empregada na agitação das soluções (rpm), mesmo que para temperaturas diferentes, a viscosidade pode equivaler-se. Na Figura 74 fica clara a repetitibilidade das medidas, após a troca de rotações, para cada temperatura, mantendo um comportamento praticamente newtoniano, em que para uma mesma temperatura, a viscosidade varia muito pouco independentemente da taxa de cisalhamento. Para baixas

rotações (abaixo de 10rpm), a variação da viscosidade é muito pequena (10% entre uma e outra temperatura), podendo caracterizar o fluido como newtoniano nestas condições. Já para taxas de cisalhamento maiores do que 10rpm, percebe-se certa variação da viscosidade, com valores maiores do que 10% uma em relação à outra medida, principalmente na rotação de 30 rpm, assim sendo o fluido é caracterizado como não-newtoniano.

O resultado inesperado foi o de obtermos uma viscosidade maior a 80°C do que a 60°C, já que para líquidos espera-se que quanto maior a temperatura, maior a energia cinética entre as moléculas, e conseqüentemente menor é o intervalo de tempo em que as forças intermoleculares são efetivas, que deveriam resultar em uma diminuição da viscosidade, um aumento da mobilidade e da expansão volumétrica.

Pode-se inferir que na faixa de temperaturas entre 60 e 80°C ocorre algum fenômeno que atrai mais as moléculas umas às outras, com o auxílio de energia calorífica (pelo aumento da temperatura), resultando em um aumento do atrito interno, ou seja, da viscosidade para estas situações. Algumas modificações de conformação ou mesmo quebra de ligações químicas poderão requerer mais energia para ocorrerem. Por isso, uma das hipóteses a considerar é que nesta faixa de temperatura pode ocorrer a formação de redes interpenetrantes, em que moléculas de ágar e de alginato entrelaçam-se mutuamente, aumentando o atrito da solução.

O aumento ou a diminuição da rotação resultará, para qualquer temperatura, com que o intervalo de tempo em que ocorrem as forças intermoleculares seja maior ou menor, havendo variação da atividade entre as moléculas, ou seja, repercutindo em uma pequena mudança de viscosidade. Contudo, diferenças significativas na viscosidade podem indicar que outros fenômenos ocorrem, já que modificam graus de porosidade, permeabilidade e resistência dos géis de ágar, conforme Ross et al (2005), e conforme verificado nos resultados de porosidade e inchamento obtidos neste trabalho: em que fibras que foram aquecidas até 80°C obtiveram maior estabilidade nas medidas de porosidade e maiores valores de inchamento do que aquela aquecida a apenas 60°C (Figura 50 e Figura 52).

Assim, a partir desta discussão, entende-se que o controle sobre as variáveis de mistura (velocidade) e do processo de gelificação é necessário, principalmente quando há a proposição de caracterizar as fibras-gel formadas. A história térmica de cada um dos constituintes bem como quando misturados, deverá repercutir em características específicas do biomaterial.

5.5. CITOTOXICIDADE

Os resultados de citotoxicidade para o método indireto referente aos biomateriais compostos por fibras de diferentes concentrações mostraram maior atividade celular do que os resultados das amostras com diferenças quanto ao teste de reticulante, como ilustram os resultados quantitativos contidos na Figura 77 e a Figura 78.

A atividade celular é comparada através de leituras por absorvância em UV comparando àquelas obtidas dos controles positivos (linhagem L929) e negativos (DMSO). As imagens realizadas por microscópio óptico, conforme Figura 75 e Figura 76, ilustram a morfologia das células.

Figura 75. Imagens realizadas através de microscópio óptico do controle negativo (quando utilizado DMSO induzindo apoptose) dos métodos A) direto e B) indireto.

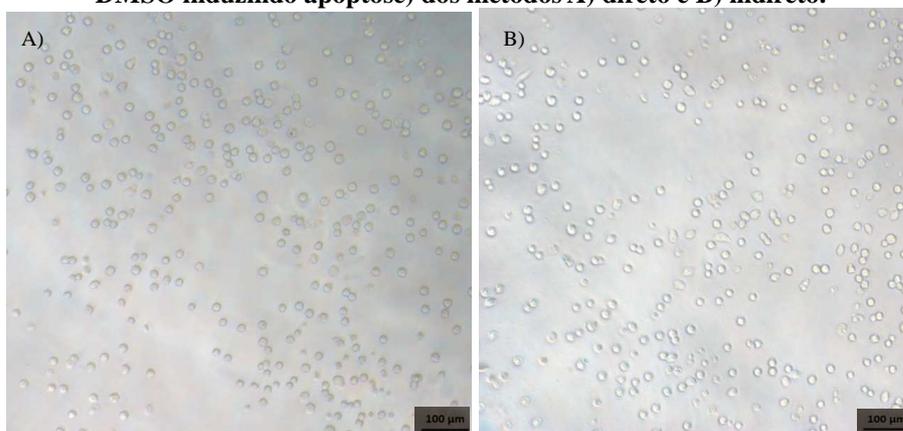


Figura 76. Imagens realizadas através de microscópio óptico dos controles positivos dos métodos A) direto e B) indireto, da atividade celular da linhagem L929.

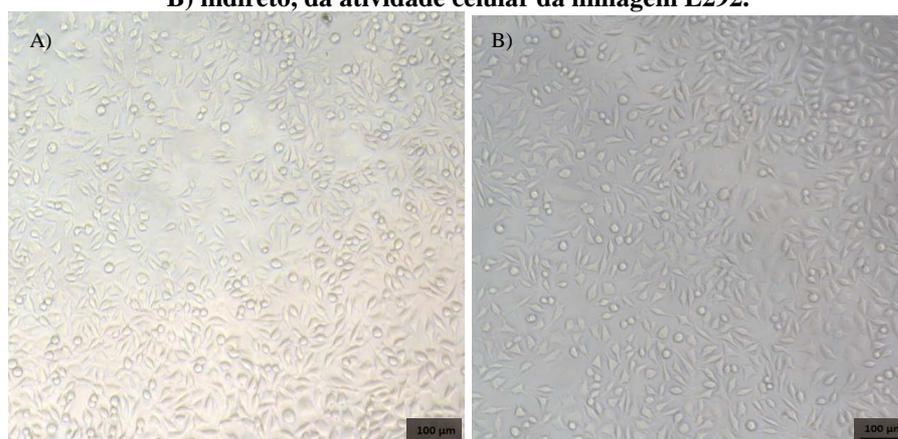


Figura 77. Resultados de citotoxicidade pelo método indireto para amostras de diferentes concentrações e mesmo método de obtenção e reticulação.

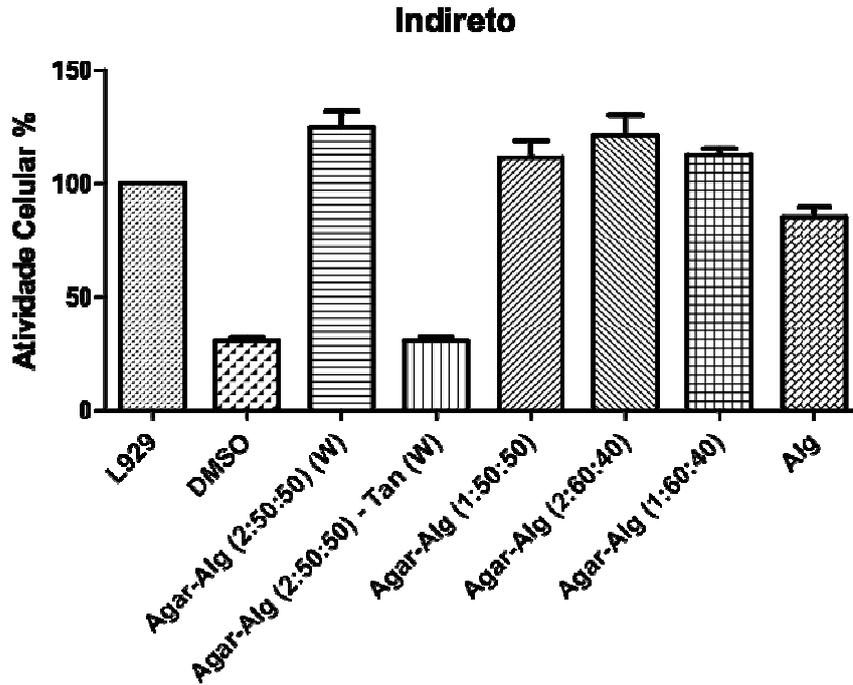
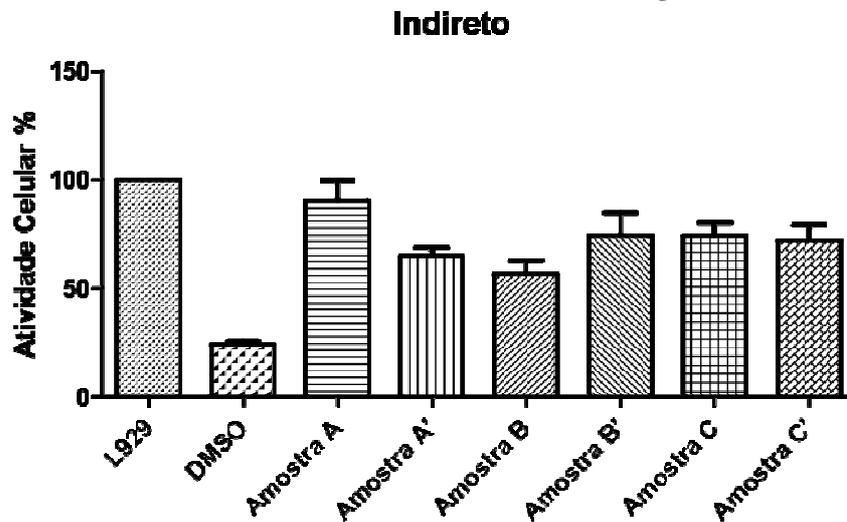


Figura 78. Resultados de citotoxicidade pelo método indireto para as amostras 2%, 50% ag - 50% al, utilizadas no teste de reticulante conforme Figura 34.



A especificação da fibra utilizada para os testes ilustrados na Figura 78 foi a 2% (50% ágar, 50% alginato), que comparativamente com o resultado de citotoxicidade da Figura 77, demonstra diminuição da atividade celular para os cultivos em que se testaram as condições do agente reticulante, cloreto de cálcio. Este fato pode indicar que possivelmente os constituintes do biomaterial não sejam citotóxicos, mas que as variáveis envolvidas na reticulação com cloreto de cálcio possam indicar toxicidade.

Figura 79. Resultados de citotoxicidade pelo método direto para amostras de diferentes concentrações e mesmo método de reticulação e fabricação.

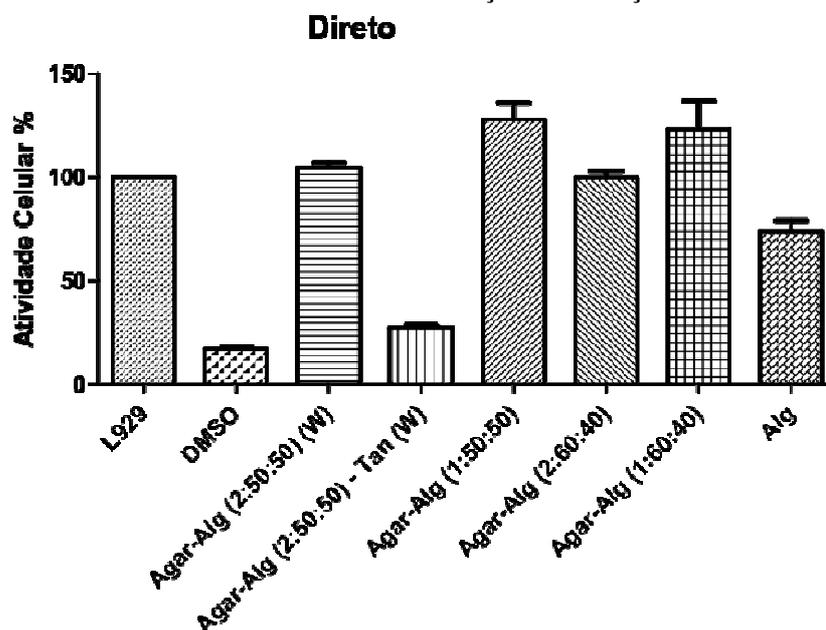
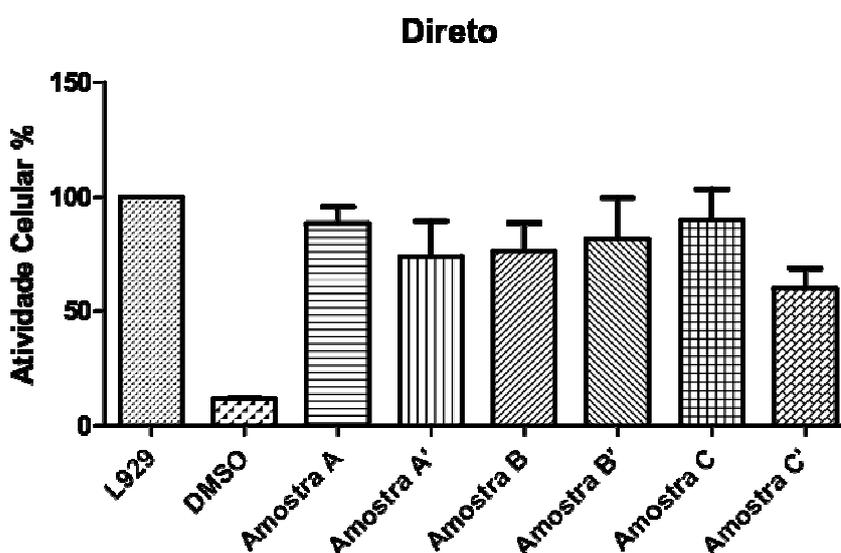


Figura 80. Resultados de citotoxicidade pelo método direto para as amostras 2%, 50% ag - 50% al, utilizadas no teste de reticulante conforme Figura 34.



A Amostra Agar-Alg (2:50:50) - Tan (W) foi a única considerada citotóxica para os dois métodos, apresentando morte celular de até 69% e de 72% para o método indireto e para o direto, respectivamente. Quantidades de tanino já foram referidas na literatura (CHUNG ET AL, 1998 APUD MONTEIRO ET AL, 2005) como citotóxicas, e o resultado evidencia isto.

As outras amostras que também se apresentaram citotóxicas foram as seguintes: a Amostra A' e a Amostra B, com morte celular (apoptose) de 35% e 43%, respectivamente, pelo método indireto, e a Amostra C', que apresentou 40% de inviabilidade celular pelo

método direto. De acordo com a norma ISO 10.993- 6: 2009, resultados que evidenciem até 30% de morte celular podem ser considerados citotóxicos. Não foi possível concluir sobre as variáveis que possam ter contribuído para a morte celular, tendo em vista que não houve repetitibilidade dos resultados entre os métodos. Contudo, é visível a diferença das atividades celulares entre os dois grupos de amostras testadas.

Tanto a amostra A' como a C' foram aquelas desidratadas a 1°C durante a fabricação das fibras, e reticuladas pelo tempo de 2 min; contudo variando a concentração de sal (2% e 1% respectivamente). Poder-se-ia supor que a desidratação em temperaturas muito baixas prejudica algum tipo de atividade entre as moléculas durante a sua conformação, ficando assim algumas terminações das moléculas suscetíveis a algum tipo de reação que libere componentes citotóxicos. Entretanto, esta hipótese não encontra aceitação, visto que a Amostra B também apresentou citototoxicidade para 19°C de temperatura do álcool de desidratação das fibras, tempo de reticulação de 10 min e concentração da solução salina de 2%, ou seja, não há nenhuma relação entre os outros parâmetros de fabricação das outras amostras que também foram consideradas citotóxicas. No Anexo I seguem as fotografias dos cultivos celulares.

Awad et al (2003) depois de reticular (gelificar) hidrogéis de alginato com cloreto de cálcio lavou por três vezes os *scaffolds* em PBS, provavelmente para retirar sais que não foram reticulados à estrutura e provavelmente estivessem no meio. Sabe-se que meios muito salinos podem provocar a apoptose por osmose e desidratação das células. Meios de cultura muito ácidos ou básicos podem interferir no cultivo celular de outras células, bem como as de fibroblastos, por isto é utilizado um tampão em meio de cultura para manter o pH biológico do meio em torno de 7.4. Contudo, o pH não foi acompanhado durante a incubação das células junto ao biomaterial, ou após a medida de citotoxicidade para verificação desta variável.

A partir de outros testes, como o de inchamento (*scaffold* e água destilada), foram medidos os pHs das águas de contato com o biomaterial e evidenciou-se um pH próximo de 5.5 depois de fabricada a fibra, e depois de 1 hora de contato do biomaterial com a água. Como foi referido no texto da Revisão Bibliográfica, a formação de géis de alginatos geralmente é favorecida por um decréscimo no pH, algo em torno de 3 e 7 (COVIELLO ET AL, 2007); enquanto, que para a formação de géis de ágar, pHs acima de 6 são mais aconselháveis para uma maior resistência de gel (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

De certa forma, comparando os resultados entre as amostras de diferentes concentrações, percebe-se que as fibras formadas somente a partir de alginato de sódio apresentaram menor atividade celular, porém não foram consideradas citotóxicas. Sabe-se que alguns componentes dos alginatos podem ser citotóxicos às células, como por exemplo endotoxinas, proteínas e polifenóis; contudo, pelo o que se supõem estas contribuições não foram significativas para a matéria-prima utilizada.

Em suma, mesmo que não seja possível concluir sobre as causas da citotoxicidade (exceto quanto à presença de tanino) pode-se dizer que para a concentração de fibra 2% 50% ágar- 50% alginato, o método indireto apresentou uma possibilidade de citotoxicidade de até 29%, ou seja, 2 em cada 7 amostras, e para o método direto de até 14% de citotoxicidade, ou seja, 1 em cada 7 amostras.

Outro fator que possa ter contribuído para esta variabilidade refere-se à falta de repetibilidade das amostras quanto à estrutura/forma. As amostras são tridimensionais e tem fibras aleatoriamente formadas, conforme verificado nos resultados de MEV, por isso, têm diferentes volume de vazios, diâmetros e formatos de fibras por volume, que poderão contribuir para a obtenção de diferentes resultados de citotoxicidade, por isso algum tipo de padronização dos tamanhos e massas das amostras teria sido importante.

Além disso, a norma ISO 10.993-5 (para testes de citotoxicidade) sugere a utilização de tamanhos de 10mm x 50mm para amostras poliméricas, além de estabelecer uma faixa de volume do líquido de extração utilizado em contato com o biomaterial, de acordo com a sua área superficial (de 0.5 cm²/mL a 6 cm²/mL).

Assim sendo, uma das hipóteses acima citadas poderia explicar possíveis causas de erros experimentais nos testes de citotoxicidade. Para os testes realizados para esta dissertação foram utilizados tamanhos de amostras menores do que 0.5mm x 0.5mm. Assim sendo, devido à morfologia do biomaterial, que macroscopicamente apresenta-se fibroso, o corte em pedaços muito pequenos poderia ter contribuído para a desagregação e cominuição das fibras, aumentando a área superficial e os sítios de reação do biomaterial, alterando suas propriedades e influenciando o meio.

Alterações no meio ao qual o biomaterial está submetido como por exemplo, variações de pH e interações entre cargas, devido a adição de moléculas diferentes poderiam também contribuir para os resultados obtidos.

6. CONCLUSÃO

Através de um processo inovador de fabricação, versão denominada como *Jet-spinning*, foi possível obter fibras de hidrogel de ágar e alginato, e algumas conclusões quanto ao processamento das mesmas e a sua aplicação como *scaffold* para engenharia de tecidos podem ser elencadas:

- é necessário o controle da temperatura de aquecimento da solução polissacarídica, para a dissolução dos dois constituintes de forma homogênea;

- Foi possível verificar a importância do aquecimento até 80°C e da injeção da solução a 40°C (temperatura genérica abaixo da qual géis de ágar gelificam) nas propriedades como porosidade e inchamento do *scaffold*;

- é necessário que se controle as condições de uso do agente reticulante, como concentração e tempo de contato com sais divalentes, a fim de que a reticulação das cadeias de alginato ocorra de forma eficiente, consequentemente controlando as propriedades do *scaffold*, como porosidade e inchamento;

- a temperatura do álcool etílico, para desidratação das fibras, não parecer ter influenciado na porosidade e nem no inchamento.

Sobre as propriedades das fibras-gel obtidas à concentração de 2% (1:1) concluiu-se :

- a faixa de densidade aparente obtida para as condições estudadas ficou em torno de 0.110 a 0.250 g/cm³ (considerando os desvios padrão dos limites mínimo e máximo);

- as porosidades obtidas por diferentes métodos (por Arquimedes e pela ASTM) se aproximaram, de forma a atingir um máximo de 94% de porosidade e mínimo de 79% por Arquimedes e máximo de 88% e mínimo de 60% pelo método da ASTM. Quando realizado o teste do agente reticulante, obteve-se porosidade máxima de 83% e mínima de 60% por Arquimedes;

- o percentual de inchamento máximo foi de 961% (e mínimo de 438% para diferentes processamentos das fibras-gel), sendo que quando realizado o teste de agente reticulante por um tempo de reticulação de 120min, obtiveram-se valores de inchamento de até 900%;

- a temperatura de degradação, que representou perda de até 50% da massa inicial de amostra testada, ficou acima de 300°C. Enquanto que a partir de 100°C infere-se que ocorre uma perda pequena de massa (~10%) devido à evaporação de água e consequente processo de desorganização (“desreticulação”) das cadeias de ágar, uma vez que em torno de 121°C foi detectado por DSC uma banda exotérmica. Assim, pode-se dizer que a temperatura de utilização das fibras-gel não poderá ultrapassar 100°C sem que haja modificação de sua estrutura e pode ser utilizada como *scaffold* de cultivos celulares uma vez que a temperatura não supera 40°C.

- não foram detectados metais como cádmio ou zinco na composição das fibras-gel, possivelmente encontrados como contaminantes em alginatos;

- não pode ser comprovada que houve polimerização entre o ágar e o alginato de sódio, uma vez que não foram encontrados indícios fortes de ligações químicas nos espectros de infravermelho da fibra, podendo-se inferir que os constituintes formam uma rede interpenetrante entre suas moléculas.

Com relação à aplicabilidade como *scaffold* para cultivo de fibroblastos de murinos, as fibras-gel obtidas apresentaram-se citotóxicas para alguns casos; contudo, os testes não foram conclusivos quanto às variáveis estudadas e seu efeito citotóxico para a especificação caracterizada (2% 1:1).

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Auxiliando ao prosseguimento dos estudos sobre o *scaffold* de fibras-gel sugere-se que se façam análises de ressonância magnética nuclear, no intuito de caracterizar a constituição das matérias-primas utilizadas, e das fibras obtidas para verificar se formam redes interpenetrantes (IPN) de hidrogéis entre si. Através da mesma técnica também é possível que se conheça o peso molecular aparente da solução utilizada, no intuito de parametrizar o processo de produção, tendo em vista que as características destes polímeros naturais variam de acordo com o tipo de alga, local, sazonalidade e temperaturas de processamento.

O estudo de análise do tempo de uso do reticulante poderia ter evoluído no intuito de se verificar qual seria a porosidade mínima, já que com o aumento do tempo de reticulação foi percebida uma diminuição da porosidade; contudo, não é conhecido se as características permeáveis do *scaffold* possam ter modificado. Ou seja, seria importante saber qual é o tempo máximo necessário para a reticulação completa do alginato na blenda utilizando concentrações de 1% e de 2% de cloreto de cálcio (ou outros sais).

Estudos sobre o impacto do pH sobre as propriedades porosidade e inchamento das fibras –gel poderia ser estudo, de forma a identificar os meios a que poderão estar suscetíveis sem que sua estrutura e integridade modifique.

Estudos de sorção com moléculas de fármacos ou fatores de crescimento para cultivo celular poderiam ser estudados relacionando às propriedades como porosidade e inchamento, visando a utilização das fibras-gel como sistemas de veiculação de drogas ou substâncias necessárias à regeneração das células em cultivo.

Outros estudos de sorção poderiam ser realizados no intuito de verificar potenciais aplicações das fibras como meio filtrante para tratamento de emissões atmosféricas, ou como biossorventes em tratamento de efluentes. A utilização como sistema de liberação de nutrientes para o desenvolvimento de plantas para agricultura, reflorestamento ou jardinagem, também poderia ser testada, assim como eletrólito de células voltaicas, uma vez que géis de ágar são microporosos e inertes possibilitando a difusão de sais condutores.

Avaliar o impacto do tamanho das amostras nos testes de citotoxicidade, para verificar se a metodologia (corte das amostras) influencia na citotoxicidade.

8. BIBLIOGRAFIA

Aditivos & Ingredientes;Ágar ou agar-agar, o mais antigo ficolóide; Revista nº 56,; p. 31 – 39; maio/junho 2008. Disponível em: www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes.

Agrawal, C.M.; McKinney, J.S. ; Lanctot, D. ; Athanasiou, K.A.; Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering; Biomaterials Vol. 21; p. 2443-2452; 2000.

Aves, E. P.; Gálvan, J.C.; Lima, I.R.; Granjeiro, J. M.; Bastos, I. N.; Soares, G. D.; Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastas femorais não-cimentadas. Cerâmica, São Paulo, Vol. 54, nº 332, 2008.

Aymard, P.; Martin, D. R.; Plucknett, K.; Foster, T.J.; Clark, A. H.; Norton, I. T.; Influence of Thermal History on the Structural and Mechanical Properties of agarose Gels; Biopolymers, Vol. 59, p. 131–144; 2001.

Awad, H. A.; Wickham, M.Q.; Leddy, H.A.; Gimble, J. M.; Guilak, F.; Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds; Biomaterials; Vol. 25; p. 3211-3222; 2004.

Babak, S.; Adsorptive removal of methylene blue by ágar: effects of NaCl and ethanol; Chemistry central journal; vol. 6; p. 14; 2012.

BioSpectrum Asia; Biomaterials market will be worth \$88.4 bn by 2017; 26 Mar. 2013.

Academic OneFile. Web. 28 Oct. 2015. Disponível em: www.biospectrumasia.com

Braga, A.S.; Braga, S.R.S.; Catirse, A.B.C.E.B.; Vaz, L.G.; Spadaro, A.C.C.; Potencial tóxico dos alginatos para uso odontológico; Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. (Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences), Vol. 28, n.2, p.153-158, 2007.

Bao, L. ; Yang, W. ; Mao, X. ; Mou, S. ; Tang, S.; Agar/collagen membrane as skin dressing for wounds; *Biomedical Materials*, Vol.3, p.044 - 108; 2008.

Calvo, Miguel; *Bioquímica de los Alimentos*; 1995; Disponível junto ao servidor Universidade de Zaragoza, ES: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/programasbio.html>

Carvalho, R.A.; de Lacerda, J. T.; dos Santos, E. S.; de Oliveira, E. F.; Extratos de Plantas Medicinais como Estratégia para o Controle de Doenças Fúngicas do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste; Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, 2., 2002. João Pessoa, PB, EMEPA-PB, 2002. Vol. 1; acesso em 24/05/2015: <http://emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf>.

Chemicals Principles: the quest for insight; Atkins, Peter e Loretta, Jones; W. H. Freeman and Company, NY, New York e Basingstone, 2001.

Chi, Won-Jae; Chang, Yong-Keun; Hong, Soon-Kwang; Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes; *Appl Microbiol Biotechnol*; Vol. 94; p. 917–930; 2012.

Choi, Sung-Wook , Moon¹,Seung-Kwan, Chu¹,Ji-Yeon, Lee,Hye-Won; Park, Tae-Joon; Kim, Jung-Hyun; Alginate Hydrogel Embedding Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide) Porous Scaffold Disks for Cartilage Tissue Engineering; *Macromolecular Research*, Vol. 20, No. 5, 447-452, 2012.

Chowdhury, T.T.; Bader, D.L.; Shelton, J. C.; Lee, D.A.; Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; Vol. 417; p.105-111; 2003.

Coviello, T; Matricardi, P; Marianecci, C.; Alhaique, F; Polyssacharide hydrogels for modified release formulations; *Journal of Controlled Release*; Vol. 119; p. 5-24; 2007.

Dea, I.C. M.; McKinnon, A. A.; Rees,D. A.; Tertiary and Quaternary Structure in Aqueous Polysaccharide Systems which Model Cell Wall Cohesion : Reversible Changes in Conformation and Association of Ágarose, Carrageenan and Galactomannans; *J. Mol. Biol.* Vol. 68, p. 153-172, 1972.

DeKosky, B. J.; Dormer, N. H.; Ingavle, G. C.; Roatch, C. H.; Lomakin, J.; Detamore, M. S.; Gehrke, S. H.; Hierarchically Designed Ágarose and Poly(Ethylene Glycol) Interpenetrating Network Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering; *Tissue Engineering; Part C*; Vol. 16; N° 6, Mary Ann Liebert, Inc.; 2010.

Díaz, E.D. de Apodaca; Velasco, M.C.V.; Pérez, F.R.; López, C.A.R.; Ibarreta, L.L.; Utilización de adsorbentes basados em quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos: Cu, Pb, Cr y Co; *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol 8(1); p. 20 - 37;2007.

Djabourov, M. ; Clark, A.H. ; Rowlands, D.W. ; Ross-Murphy, S.B.; Small-angle X-ray scattering characterization of agarose sols and gels; *Macromolecules*, Vol.22, p.180-188; 1989.

Drury, J. L.; Money, D. J.; *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*; *Biomaterials*, Vol. 24; p. 4337- 4351, 2003.

Dusseault, J.; Tam, S. K.; Ménard, M.; Polizu, S.; Jourdan, G.; Yahia, L'H.; Hallé, J-P.; *Evaluation of alginate purification methods: Effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination*, Wiley InterScience, p. 243 – 251, 2005.

Estrutura e bioquímica do Músculo, Apostila do Laboratório de Carnes, JUDITE LAPA GUIMARÃES, EDILENE AMARAL DE ANDRADE ADELL, DTA-FEA-UNICAMP, Junho de 1995.

Farris, S.; Schaich, K. M.; Liu, L.; Cooke, p. H.; Piergiovanni, L.; Yam, K. L.; *Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels*; *Food Hydrocolloids* Vol. 25; p. 61-70; 2011.

Fasman, G.D., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, 1996.

Faure,B.; Salazar-Alvarez, G.; Ahniyaz, A.;Villaluenga, I.; Berriozabal, G.; De Miguel,Y. R.; Bergstrom,L.;*Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticle for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens*; *Science and Technology of Advanced Materials*, Vol 14, p. 1- 23, 2013.

Felipe Thadeu Tolentino, EFEITOS DO USO DE CIPROFLOXACINA NOS ESTADOS DE AGREGAÇÃO ORDENADA DO COLÁGENO EM TENDÃO CALCÂNEO (B0324), Instituto de Biologia - IB, UNICAMP, 22 a 23 de setembro de 2010.

Finch, J.; *The ancient origins of prosthetic medicine*; *The Lancet*; Vol. 377; p. 548 – 549; 2011.

Formo, K.; Aarstad, O. A.; Skjåk-Bræk, G.; Strand, B. L.; *Lyase-catalyzed degradation of alginate in the gelled state: Effect of gelling ions and lyase specificity*; Vol. 110, p. 100–106, 2014.

Freed, L. E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R. J.; Eagles, D. B.; Lesnoy, D. C.; Barlow, S. K.; Langer, R.; *Biodegradable Plymer Scaffold for Tissue Engineering*; *Biotechnology*, Vol. 12; p. 689 – 693, 1994.

Fukae, R.; Maekawa, A.; Sangen, O.; *Gel-spinning and drawing of gelatin*; *Polymer* Vol. 46 p. 11193–11194, 2005.

Garcia-Cruz, C. H.; Foggetti, U.; da Silva, A. N.; *Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção*; *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 1800-1806, 2008.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *Febs Letters*, Vol. 32, p. 195-198, 1973.

Guerrero, P; Extraction of ágar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) and surface characterization of ágar based films; *Carbohydrate polymers*; vol: 99 pg:491 -498; 2014.

Gulrez, Syed K. H.; Al-Assaf, S. E; Phillpips, G. O.; *Hydrogels: Methods of Preparation, characterisation and Applications*, United Kingdom, 2011. Acesso: www.intechopen.com/source/pdffs/17237/IntechHydrogels_methods_of_preparation_charact erisation_and_applications.pdf

Guo, G.W J; MacCallum, D.K; Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads; *Connective Tissue Research*, Vol. 19; p. 277–297; 1989.

Harris, L. D.; Kim, B.; Mooney, D. J.; Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming; *John Wiley & Sons, Inc. J, Biomed Mater Res*, Vol. 42, p. 396–402, 1998.

Hehemann, Jh ; Correc, G ; Barbeyron, T ; Helbert, W ; Czjzek, M ; Michel, G; Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota; *Nature*, Vol.464 (7290), pp.908-U123, 2010.

Heyraud, A.; Gey, C.; Leonard, C.; Rochas, C.; Girond, S.; Kloareg, B.; NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase; *Carbohydrate Research*, Vol. 289; p. 11-23, 1996.

Huang, C.; Chung, Ying-C.; Liou, Ming-R.; Adsorption of Cu(II) and Ni(II) by pelletized biopolymer; *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 45, p. 265-277, 1996.

Ikeda, A., Takemura, A., Ono, H. Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. *Carbohydrate, Polymer*, Vol. 42, p. 421-425, 2000.

Izumi, K.; Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy; *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 320, p. 311-317, 1973.

J. Lee et al; Fabrication of a three-dimensional nanofibrous scaffold with lattice pores using direct-write electrospinning; *Materials Letters*, Vol. 93, p. 397–400, 2013.

Janaína Pires Santos; avaliação do teor e análise qualitativa do ágar das espécies *Gelidiella Acerosa* (*Forsskal*) Feldman and G. Hamel (*Gelidiales*, *Rhodophyta*) e *Gracilaria Domingensis* (*Kützing*) Sonder ex dickie em costões rochosos dos municípios de Ilhéus e Uruçuca, dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2011.

Jr Costa, E. de Souza; Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com gluteraldeído para aplicação em engenharia de tecido; Quim. Nova, Vol. 31, N° 6, p. 1460-1466, 2008.

JUNIOR, Mario Guimarães et al . Caracterização físico-química de fibra e polpas de Bambusa vulgaris Schrad para utilização em compósitos poliméricos. Rev. LatinAm. Metal. Mater., Caracas , v. 33, n. 1, p. 33-42, jun. 2013 . Disponível em <http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522013000100004&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 22 jan. 2016.

Kaklamani, G.; Chenelerd, D.; Grovera, L.M.; Adams, M. J.; Bowen, J.; Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation; Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Vol. 36, p. 135-142, 2014.

King, A. H., Brown seaweed extracts (Alginates). Food Hydrocolloids, Vol. 2, p. 115-188, 1983.

Kleber Diego Moreira; Efeito do Polímero Hidratassolo sobre propriedades físico-químicas em solução nutritiva no desenvolvimento da cebolinha (*Allium fistulosum L.*), Monografia apresentada à Direção do Curso de Química Licenciatura, como pré-requisito para obtenção do título de Licenciado em Química, da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Centro de Estudos Superiores de Caxias – CESC, 2011.

Klöck, G.; Frank, H.; Houben, R.; Zekorn, T.; Horcher, A.; Siebers, U.; Wöhrle, M.; Federlin, K.; Zimmermann, U.; Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation; Appl Microbiol Biotechnol Vol.40, p. 638-643, 1994.

Korbitt, G. & Mallet, A.G.; Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets; Tissue Engineering, Part A: Tissue Engineering: Vol. 15; p.1301; 2009.

Kuo, C K ; Ma, P X; Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering; Biomaterials, Vol.22(6), pp.511-521; 2001.

Labropoulos , K.C., Niesz , D.E., Danforth ,S.C., Kevrekidis , P.G.; Dynamic rheology of ágar gels: theory and experiments. Part I. Development of a rheological model; Carbohydrate Polymers Vol. 50, p. 393 – 406, 2002.

Labropoulos, K.C., Niesz , D.E., Danforth ,S.C., Kevrekidis , P.G.; Dynamic rheology of ágar gels: theory and experiments. Part II. Gelation behavior ágar sols and fitting of a theoretical rheological model.; Carbohydrate Polymers Vol. 50; p. 407 – 415; 2002.

Lahaye, Marc; Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry; Journal of Applied Phycology Vol. 13; p. 173–184, 2001.

Lahrech, Kh., Safouane, A.; Peyrelasse, J.; Sol state formation and melting of ágar gels rheological study; Physica A 358; p. 205–211; 2005.

Leinfelder, U.; Brunnenmeier, F.; Cramer, H.; Schiller, J.; Arnold, K.; Vásquez, J.A.; Zimmermann, U.; A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates; *Biomaterials*, Vol. 24, p. 4161 – 4172, 2003.

Letícia Araújo Vasconcellos; Obtenção de compósitos de cimento de fosfato de cálcio com fibras de PLGA e alginato de sódio, dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, área de concentração: Ciência dos Materiais, Porto Alegre, RS, 2012.

Lewitus, D.Y.; Landers, J.; Branc J. R.; Smith ,K. L.; Callegari, G.; Kohn, J.; Neimark, A. V.; Biohybrid Carbon Nanotube/Ágarose Fibers for Neural Tissue Engineering; *Adv. Funct. Mater*, vol. 21, p. 2624–2632, 2011.

Malafaya, P. B.; Reis, R. L.; Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor; *Acta Biomaterialia* Vol. 5, p. 644–660, 2009.

Marinjnissen, W. J. C. M.; van Osch, G. J. V. M.; Aigner, J.; van der Veen, S.W.;Hollander, A.P.; Verwoerd-Verhoef, H.L.; Verhaar, J. A. N.; Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering; *Biomaterials*; Vol. 23; p.1511-1517; 2002.

Marques, D. R. (2011) Obtenção e Caracterização de Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

McLachlan, J., Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization, *Plant and Soil* Vol. 89, p. 137-157, 1985.

Medina-Esquivel ,R.;Freile-Pelegriin,Y.;Quintana-Owen,P. ;Yáñez-Limón ,J. M.; Alvarado-Gil, J. J.; Measurement of the Sol–Gel Transition Temperature in Ágar; *Int J Thermophys* Vol. 29, p. 2036–2045, 2008.

Medical Devices & Surgical Technology Week; Brazil Biomaterial Market 2010 - 2015 - The Brazil Market for Biomaterials is Expected to Reach \$1.7 Billion in 2015; 29 May 2011: 63. Academic OneFile. Web. 28 Oct. 2015.

Milena Pinotti Segato; Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio; Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica); 2007.

Monteiro, J. M.; de Albuquerque, U. P.; Araújo, E. de Lima; Taninos: Uma abordagem da química à ecologia; *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.

Montanari, T. *Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas*. 3. ed. Porto Alegre: Tatiana Montanari, 2015. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto>.

Murano, E.; Toffanin; Zanetti, F.; Knusten, S.H.; Paoletti, S.; Rizzo, R.; Chemical and macromolecular characterization of ágar polymers from *Gracilaria dura* (C. Ágardh) J. Ágardh (Gracilariaceae, Rhodophyta).

Odóñez, G. E.; FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds; *Food hydrocolloids*; Vol. 25, pg:1514 -1520, 2011.

Pavlat, A. E.; Voisin, A., Robertson, G. H.; Pectin-based biodegradable water insoluble films.; *Macromolecular Symposium*, Vol. 140, p. 107-113, 1999.

Park, J. H.; Chung, B.G.; Lee, W.G.; Kim, J.; Brigham, M. D.; Shim, J.; Lee, S.; Hwang, C.M.; Durmus, N.G.; Demirci, U.; Khademhosseini, A.; Microporous Cell-Laden Hydrogels for Engineered Tissue Constructs; *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106; p. 138 -148; 2010.

Potter, M., Wiggert, D., *Fluid Mechanics*, Coleção Schaum, 2008.

Prasad, K.; Siddhanta, A.K.; Ganesan, M.; Ramavat, B.K.; Jha, B.; Ghosh, P.K.; Ágars of *Gelidium acerosa* of west and southeast coasts of India; *Bioresource Technology*, Vol. 98, p. 1907–1915, 2007.

Prokop, A. e Wang, T. G.; Purification of Polymers Used for Fabrication of an Immunoisolation Barrier; *Annals New York Academy of Sciences: Polymers for Immunoisolation, NASA#NAGW – 1707 “Encapsulation of Living Cells”*, p. 223 – 231.

Rafael Silveira Peres; Propriedades anticorrosivas de camadas de conversão à base de taninos como pré-tratamento para aço carbono 1020; dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul área de concentração: ciência dos materiais, 2010.

Ratner, Buddy D.; *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2004.

Rethwisch, Callister; *Ciência e Engenharia de Materiais Uma Introdução*, 2012.

Rochas & Lahaye; Average Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Agarose and Agarose-Type Polysaccharides; *Carbohydrate Polymers*, Vol.10, p. 289-298, 1989).

Rossi, F.; Chatzistravrou, X.; Perale G.; Boccaccini, A. R.; Synthesis and Degradation of Agar-Carbomer Based Hydrogel for Tissue Engineering Applications; *Journal of Applied polymer Science*, Vol. 123; p. 398-408; 2012.

Santos, M. L., Florentino, A. O., Saeki, M. J., Aparecida, A. H., Lia Fook, M. V., Guastaldi, A. C., Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico, *Ecl. Quím.*, São Paulo, Vol. 30(3), p. 29-35, 2005.

Sartori, C.; Finch, D.S.; Ralph, B.; Gilding, K.; Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r.Spectroscopy, *Polymer* Vol. 38 No. 1, pp. 43 51, 1997.

Schneider, G. F.; Kowalczyk, S. W.; Calado, V. E.; Pandraud, G.; Zandbergen, H. W.; Vandersypen, L. M. K.; Dekker, C.; DNA Translocation through Graphene Nanopores, *Nano Lett.* Vol. 10, p. 3163–3167, 2010.

Schafer, S. E. ; Stevens, E. S.; The optical rotation of ordered carrageenans; *Carbohydrate Polymers*, Vol.31, p.19-22, 1996.

Sharma, C; Dinda, A. K.; Mishra, N. C.; Fabrication and Characterization of Natural Origin Chitosan-Gelatin-Alginate Composite Scaffold by Foaming Method Without Using Surfactant; *J. Appl. Polym. Sci.* 2013.

Shabani, I. et al.; Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique; *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 423, p. 50–54, 2012.

Singh, L.; Pavankumar, A.R.; Lakshmanan, R.; Rajarao, G. K.; Effective removal of Cu²⁺ ions from aqueous medium using alginate as biosorbent; *Ecological Engineering*; Vol. 38; p. 119– 124, 2012.

Smith, B.; *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*; Boca Raton: CRC Press, p. 242 – 249, 1999.

Soares, de Almeida G.; *Biomateriais; Fórum de Biotecnologia Biomateriais; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos*, 2006.

Suzuki, Hisashi et al. The Effect of Apparent Molecular Weight and Components of ágar on Gel Formation. *Food Science Technology Research*, Gifu, Vol. 7, n °4, p.280-284, 2001.

Szechy, Maria Teresa M. De; Paula, Édison J. De; Padrões estruturais quantitativos de bancos de Sargassum (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, *Brasil. Rev. bras. Bot.*, São Paulo , v. 23, n. 2, p. 121-132, June 2000.

Teng, Y. D.; Lavik, E. B.; Qu, X.; Park, K. I.; Ourednik, J.; Zurakowski, D.; Langer, R.; Snyder, E. Y.; Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells; *PNAS*; vol. 99 ; no. 5, 3024–3029, 2002.

Tomlins, P.; Grant, P.; Mikhalovsky, S.; James, S.; Mikhalovska, L.; Measurement of Pore Size and Porosity of Tissue Scaffolds; *Journal of ASTM International*, Vol. 1, p. 1 -8, 2004.

Tweden, K & Helmus, MN; “Materials Selection”, In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Part A, Vol.1, pp.27-59, 1995.

Valenta, C. B.G. Auner; The use of polymers for dermal and transdermal Delivery; *European Journal Pharm. Biopharm.*; Vol. 58; p. 279–289; 2004.

Vasconcellos, L.A, dos Santos, L.A., Calcium phosphate cement scaffolds with PLGA fibers, *Materials Science and Engineering C* 33, p. 1032–1040, 2013.

Vechietti, F.A.; Santos, L.A.; Muniz, N.O.; Marques, D.; Fibers Obtaining and Characterization Using Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Poly (Isoprene) Containing Hydroxyapatite and α TCP Calcium Phosphate by Electrospinning Method. *Key Engineering Materials* (Online), v. 631, p. 173-178, 2014.

Verma, V.; Verma, P.; Kar, S.; Ray, P.; Ray, A. R.; Fabrication of Ágar-Gelatin Hybrid Scaffolds Using a Novel Entrapment Method for In Vitro Tissue Engineering Applications; *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 96, N° 2, p. 392- 400, 2007.

Viebke, Christer; Piculell, Lennart; Nilssont, Svante; On the Mechanism of Gelation of Helix-Forming Biopolymers; *Macromolecules*, Vol. 27, p. 4160-4166, 1994.

Vigolo, B.; Pénicaud, A.; Coulon, C.; Sauder, C.; Pailler, R.; Journet, C.; Bernier, P.; Poulin, P.; Macroscopic Fibers and Ribbons of Oriented Carbon Nanotubes; *Science* Vol. 290 ; 2000

Vossen, John L. e Werner, Kern; *Thin Film Processes*; Academic Press, Inc, p 502 – 522, 1991.

Wang, Chen-Chie; Yang, Kai-Chiang; Line, Keng-Hui; Liua, Yen-Liang; Liuf, Hwa-Chang; Lina, Feng-Huei; Cartilage regeneration in SCID mice using a highly organized three-dimensional alginate scaffold, 2011, *Biomaterials* 33 (2012) 120e127

Wang, F.; Shor, L.; Darling, A.; Khalil, S.; Sun, W.; Güçeri, S.; Lau, A.; Precision extruding deposition and characterization of cellular poly-e - caprolactone tissue scaffolds; *Rapid Prototyping Journal*; Volume 10 · Number 1, 42–49, 2004.

Wijesekaraa, I.; Pangestutia, R.; Kim, S-K.; Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae ; *Carbohydrate Polymers*, Vol.84 ; p. 14–21, 2011.

Wypych, George; *Handbook of solvents*, William Andrew publishing, Chemtech Publishing, 1ª Ed., 2000.

Xu, M.; Wang, X.; Yan, Y.; Yao, R.; Ge, Y.; An cell-assembly derived physiological 3D model of the metabolic syndrome, based on adipose-derived stromal cells and a gelatin/alginate/fibrinogen matrix, *Biomaterials* 31 (2010) 3868–3877 .