

**MITSUKA MATSUI**

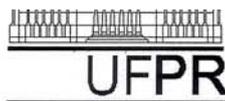
**“CORRELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA, SUPER-  
ESTRUTURA MACROMOLECULAR E MORFOLOGIA DAS BLENDA  
E REDES POLIMÉRICAS À BASE DE QUITINA E POLIURETANO”**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Área de Concentração: Engenharia e Ciências dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Leni Akcelrud

**CURITIBA**

**2007**

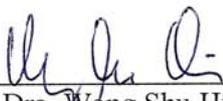


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Setor de Tecnologia

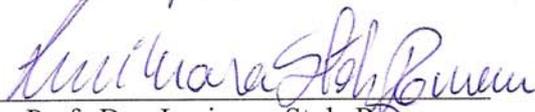
**RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

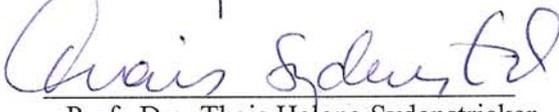
Aos cinco dias do mês de setembro de 2007, no auditório do CEHPAR - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof.Dr. José Viriato Coelho Vargas, coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia, a Banca Examinadora para a vigésima primeira defesa de tese de doutorado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia, foi constituída pelos professores doutores: Wang Shu Hui (USP), Joseane Valente Gulmine (Fac. Radial), Thais Helena Sydenstricker (UFPR), Lucimara Stolz Roman (UFPR) e Leni Campos Akcelrud (UFPR). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Mitsuka Matsui** a fazer a apresentação da tese de doutorado intitulada “**Correlações entre estrutura química, super-estrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a argüição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO da candidata, (de acordo com a determinação dos artigos 62 e 63 da resolução 62/03 de 22.07.2003).

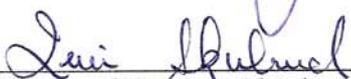
Curitiba, 05 de setembro de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a.Dra. Wang Shu Hui

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a.Dra. Joseane Valente Gulmine

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a.Dra. Lucimara Stolz Roman

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a.Dra. Thais Helena Sydenstricker

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a.Dra. Leni Campos Akcelrud

*Ao meu querido pai Motoyoshi Matsui,  
que com certeza sempre esteve, e está ao meu  
lado, olhando por mim.*

## AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão:

A Deus pela vida e presença constante em todos os momentos.

A minha mãe Tieko pelo carinho, amor, dedicação, confiança e apoio prestados.

Aos meus queridos irmãos Roberto, Agostinho, César, minha irmã e amiga Cristina, cunhadas e cunhado e meus queridos sobrinhos pelo apoio, incentivo e carinho.

A minha estimada amiga Valcineide O. A. Tanobe pela amizade, atenção e apoio nos momentos de dificuldades.

Aos meus colegas do Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa - LaPPS, os quais me acompanharam e auxiliaram na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Leni Akcelrud pelas idéias, paciência, apoio, incentivo e pela confiança depositada em mim.

A Marilda Munaro do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC, pela realização das análises de TGA, DSC e DMA, pelo apoio e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Lucy Ono do Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi – Departamento de Patologia Básica – UFPR, pelos testes de citotoxicidade e biocompatibilidade.

A Profa. Dra. Ângela Kinoshita e Prof. Dr. Sérgio Catanzaro da Universidade Sagrado Coração- Bauru- S.P. Pelos ensaios *in vivo* de biocompatibilidade.

A CAPES pela bolsa de Doutorado concedida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Justificativa e relevância .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
3.1. Biomateriais .....	5
3.2. Polímeros.....	7
3.2.1. Polímeros naturais.....	8
3.2.2. Polímeros sintéticos .....	8
3.2.3. Biopolímeros.....	9
3.2.4. Sistemas bioartificiais .....	11
3.3. Áreas de aplicação biomédica .....	11
3.3.1. Próteses e implantes ortopédicos.....	11
3.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....	16
3.5. Biomateriais degradáveis e biodegradação .....	18
3.5.1. Biomateriais degradáveis .....	18
3.5.2. Biodegradação .....	20
3.6. Quitina .....	24
3.6.1. Breve histórico da quitina e quitosana.....	24

3.6.2. Fontes e Processos de obtenção .....	25
2.6.3. Estrutura da quitina .....	27
3.6.4. Solubilidade.....	29
3.6.5. Degradação térmica .....	30
3.6.6. Aplicações da quitina.....	31
3.7. Policaprolactona .....	33
3.8. Poliuretano.....	34
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>40</b>
4.1. Materiais e métodos .....	40
4.1.1. Síntese do pré-polímero de poliuretano (PU) .....	40
4.1.2. Síntese da rede poliuretano/quitina (rede PU/QTN) .....	41
4.2. Preparação das blendas de poliuretano/quitina (blendas PU/QTN) .....	42
4.3. Tratamento térmico dos filmes de PU/QTN .....	42
4.4. Ensaio biológicos .....	42
4.4.1. Ensaio de grau de hidratação e degradação <i>in vitro</i> – Solução de HBSS.....	43
4. 4. 2. Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade.....	44
4.5. Ensaio <i>in vivo</i> .....	49
4. 5.1. Procedimento cirúrgico.....	49
4.5.2. Análise histológica .....	50
4.6. Caracterização dos materiais sintetizados.....	52
4.6.1. Determinação do Mn e Mw do PU.....	52
4.6.2. Caracterização espectroscópica.....	52
4.6.3. Caracterização térmica.....	53

4.6.4. Caracterização morfológica dos materiais por microscopia eletrônica de varredura .....	53
4.6.5. Cristalinidade dos filmes.....	53
4.6.6. Caracterização mecânica .....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
5.1. Determinação da massa molar do poliuretano .....	55
5.2. Síntese das redes e blendas de Poliuretano/Quitina .....	55
5.3. Caracterização espectroscópica dos materiais.....	57
5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho .....	57
5.4. Caracterização termogravimétrica (TGA) .....	62
5.5. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	67
5.6. Difração de raios X .....	73
5.7. Análise termo-dinâmico- mecânica (DMTA) .....	76
5.7.1. Poliuretano e quitina .....	76
5.8. Comportamento mecânico das blendas .....	84
5.9. Caracterização morfológica (MEV).....	86
5.10. Grau de hidratação e degradação <i>in vitro</i> - solução de HBSS.....	90
5.11. Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade - células Vero .....	93
5.11.1. Citotoxicidade das soluções .....	93
5.11.2. Ensaio de biocompatibilidade - Adesão celular .....	95
5.12. Análise histológica do implante subcutâneo da membrana de quitina..	99
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>105</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Tipos de moléculas poliméricas: a) linear; b) ramificado; c) com ramificações em estrela; d) escalar; e) grafitizado ou enxertado; f) semi-escalar; g) com ligações cruzadas ou reticuladas. ....	8
Figura 02 – Ciclo da quitina.....	25
Figura 03 – Estrutura da quitina. ....	27
Figura 04 – Estrutura da celulose. ....	27
Figura 05 – Estrutura química quitina/quitosana. ....	28
Figura 06 – Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina.	29
Figura 07 – Estrutura química da poli ( $\epsilon$ -caprolactona), PCL. ....	34
Figura 08 – Grupo característico dos poliuretanos.....	35
Figura 09 – Representação esquemática da separação de fases em poliuretanos segmentados.....	37
Figura 10 – Síntese do poliuretano (PU): (a) pré-polímero e (b) composto modelo.	41
Figura 11 – Amostras (seção quadrada utilizados durante os ensaios de degradação). ....	44
Figura 12 – Procedimento cirúrgico: (a) anestesia do animal, (b) tricotomia (c) assepsia com PVPI, (d) incisão no dorso do animal, (e) Divulsão da pele, (f) implante filme (rede) PU/ QTN- 50/50. ....	51
Figura 13 – Material coletado - rede PU/QTN (50/50).....	52
Figura 14 – Representação da estrutura proposta para a rede PU/QTN.....	56
Figura 15 – Espectro de IV do filme de PU. ....	57
Figura 16 – Espectro de IV do filme de quitina.....	58
Figura 17 – Espectros de IV das redes e blendas (a) 20/80 (b) 40/60 e c) 60/40. ...	60

Figura 18 – Estrutura química provável da quitina reticulada com TDI - rede modelo. .....	61
Figura 19 – Espectros de IV do PU e da rede modelo. ....	61
Figura 20 – Curvas termogravimétricas em várias composições das blendas de PU/QTN e dos polímeros puros. ....	62
Figura 21 – Porcentagem de massa de água em função da concentração de quitina nas blendas. ....	63
Figura 22 – $T_d$ em função da concentração de PU presente nas blendas. ....	64
Figura 23 – Curvas termogravimétricas em várias composições das redes PU/QTN. .....	65
Figura 24 – $T_d$ em função da concentração de PU presente nas blendas. ....	66
Figura 25 – Porcentagem de massa de água em função da concentração de quitina nas redes. ....	66
Figura 26 – Curva de DSC do PU. ....	67
Figura 27 – Curva de DSC da quitina. ....	68
Figura 28 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as blendas PU/QTN, ao resfriamento. ....	69
Figura 29 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as blendas PU/QTN, no segundo aquecimento. ....	70
Figura 30 – Entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) da fase cristalina do PU em função da concentração deste nas blendas. ....	71
Figura 31 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as redes PU/QTN, no resfriamento. ....	71
Figura 32 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as redes PU/QTN, no segundo aquecimento. ....	72

Figura 33 – Difratoograma de raios X de PU (a) e de quitina (b) e das blendas blendas PU/QTN: (c) 10/90, (d) 20/80, (e) 30/70, (f) 40/60, (g) 50/50, (h) 60/40 e (i)70/30.....	74
Figura 34 – Porcentagem de cristalinidade das blendas com relação a concentração de PU.....	75
Figura 35 – Difratoograma de raios X : a ) blenda e rede 30/70, b) blenda e rede 50/50 e c) blenda e rede 70/30. ....	76
Figura 36 – Módulo de armazenamento (E') e de perda (E'') para o filme de PU. ...	77
Figura 37 – Módulo de perda (E''), tan $\delta$ e delta S para o filme de quitina. ....	78
Figura 38 – Módulo de perda (E'') para as blendas PU/QTN. ....	78
Figura 39 – Tan $\delta$ para as blendas PU/QTN.....	79
Figura 40 – Módulo de perda (E'') para as redes PU/QTN.....	80
Figura 41 – Tan $\delta$ para as redes PU/QTN.....	80
Figura 42 – Delta S em função da temperatura para as blendas PU/QTN.....	81
Figura 43 – Delta S em função da temperatura para as redes PU/QTN. ....	82
Figura 44 – Módulo de armazenamento (E') para as blendas PU/QTN.....	83
Figura 45 – Módulo de armazenamento (E') para as redes PU/QTN.....	83
Figura 46 – Tensão na ruptura em função da concentração de PU nas blendas PU/QTN.....	85
Figura 47 – Deformação em função da concentração de PU nas blendas PU/QTN.	85
Figura 48 – Micrografias de filmes de (a) PU, (b) PU-fratura e (c) quitina e (d) quitina- fratura. ....	87
Figura 49 - Micrografia das blendas: a)10/90, B) 20/80, c) 30/70, d) 40/60, e)50/50, f)60/40, g) 70/30 e respectivas fraturas.....	89

Figura 50 - Micrografias das redes de PU/QTN: a) 20/80, b) 40/60, c) 60/40 e d) 70/30.....	90
Figura 51 - Grau de hidratação dos filmes em função da concentração de PU. ....	92
Figura 52 - Porcentagem de perda de massa no ensaio de degradação.....	93
Figura 53 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade direta das soluções de HBSS puro e das submetidas no ensaio de degradação dos filmes PU e quitina puros e das redes 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40 e 70/30.....	94
Figura 54 – Resultados do ensaio de adesão das células Vero após 48 horas de contato com os componentes puros (PU e quitina) e das redes 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40 e 70/30. ....	96
Figura 55 – Análise em microscópio invertido de contraste de fases do comportamento das células Vero após 48 horas de contato com os materiais: (a) controle positivo, filmes (b) PU puro, (c) quitina e rede (d) 10/90.....	98
Figura 56 – Rede de PU/QTN – 50/50, após 15 dias do material implantado.....	99
Figura 57 - Rede de PU/QTN – 50/50, após 30 dias do material implantado. ....	100
Figura 58 - Rede de PU/QTN – 50/50, após 30 dias do material implantado. ....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Lista de biopolímeros .....	10
Tabela 02 – Aplicações de materiais sintéticos e materiais naturais modificados em medicina.....	16
Tabela 03 – Polímeros biodegradáveis sintéticos em engenharia de tecidos.....	20
Tabela 04 – Composição da solução HBSS .....	44
Tabela 05 – Atribuições das principais absorções de espectro do PU.....	57
Tabela 06 – Atribuições das principais absorções de espectro da quitina. ....	58
Tabela 07 – Temperatura de cristalização dos polímeros puros e das blendas.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMP	Proteínas morfogenéticas do osso
DA	Grau de desacetilação
DMAc	Dimetilacetamida
DMTA	Análise termo-dinâmico-mecânica
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
GA	Grau de acetilação
HBSS	Soluções fisiológicas simuladas - <i>Hank's balanced salt solutions</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
$M_n$	Massa molecular numérica média
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo
$M_w$	Massa molecular ponderal média
NCO	Grupamento isocianato
NMP	N-metil-pirrolidona
OP	Proteína osteogênica
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PEG	Poli(etilenoglicol)
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Poli(hidroxibutirato)
PLA	Poli(ácido láctico)
PMMA	Polimetacrilato de metila
PU	Poliuretano

PVA	Poli(álcool vinílico)
PVPI	Polivinilpirrolidona
QTN	Quitina
$S_p$	Variância ponderada
Tan $\delta$	Tangente $\delta$ (dinâmico mecânico)
$T_c$	Temperatura de cristalização
TCA	Ácido tricarboxílico
TDI	2,4-2,6 tolueno diisocianato
$T_g$	Transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
$\Delta H_f$	Entalpia de fusão
$T_d$	Temperatura de degradação

## RESUMO

Polímeros para aplicações biomédicas devem possuir propriedades físico-químicas e mecânicas assim como biocompatibilidade adequada. Alguns polímeros sintéticos possuem as propriedades físicas requeridas mas não são suficientemente biocompatíveis. Por outro lado, polímeros naturais são biocompatíveis mas suas propriedades mecânicas são inadequadas. A mistura de polímero sintético e natural na forma de blendas e materiais ligados quimicamente constitui um recurso que reúne as propriedades de ambos num único material.

A quitina é um polímero natural com grande potencial de aplicação que já está sendo explorado para uso na área de saúde, devido a características favoráveis, tais como baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade. A combinação deste polímero com os poliuretanos que são polímeros versáteis, e cuja estrutura pode ser desenhada de modo a apresentar biodegradabilidade, usando-se segmentos biodegradáveis em sua estrutura como a policaprolactanodiol (PCL) foi a estratégia usada nesta Tese para a obtenção de materiais que possam ter utilidade em aplicações biológicas.

A combinação das propriedades da quitina com as do poliuretano foi realizada através da interconexão dos dois polímeros através da reação de condensação entre um pré-polímero uretânico com terminações isocianato (NCO) e os grupos NH e OH da quitina. A densidade de ligações cruzadas nas redes resultantes foi fixada através da proporção dos dois componentes, sendo que o comprimento do PU foi mantido constante ( $M_w = 66.000$  g/mol e  $M_n = 48.000$  g/mol). A região da composição estudada situou-se entre 10 e 70% de PU, pois em concentrações superiores ocorre uma separação de fase macroscópica. Blendas de

mesma composição também foram preparadas. A caracterização estrutural e morfológica foi feita com os métodos espectroscópicos usuais, como o FTIR, DMTA, difração de raios X e MEV.

Os ensaios de biocompatibilidade demonstraram que o filme tem uma menor capacidade de adesão celular, em torno de 40% em relação ao controle positivo. Os ensaios *in vivo* demonstraram que para os tempos e locais testados, os materiais produziram estado inflamatório.

## ABSTRACT

Polymers for biomedical applications should convey at the same time biocompatibility with good physical- mechanical properties. Some synthetic polymers present the required physical characteristics, but are not biocompatible. On the other hand, natural polymers are biocompatible, but lack the adequate mechanical properties. The combination of natural polymers with synthetic ones in blend form or covalently linked is a resource that provides the obtainment of both features in only one material.

Chitin is a natural polymer with a great potential application, and is being already explored in the health area, due to favorable characteristics such as low toxicity, biocompatibility, and mucoadhesivity. The combination of this polymer with polyurethanes, that are versatile materials and which structure can be designed in biodegradable form by using degradable segments, as polycaprolactonediol (PCL), was the strategy used in this Thesis for the preparation of material that could be useful in biological applications.

The combination of the chitin and polyurethane properties was accomplished by the interconnection of the two polymers through the condensation reaction between the terminal isocyanate groups (NCO) of a urethane pre-polymer and the NH and OH of the chitin molecule.

The crosslinking density was set by the ration between the two components, since the polyurethane block was kept constant ( $M_w= 66.000$  g/mol,  $M_n=48.000$  g/mol).

The composition range studied spanned from 10 to 70% of the polyurethane component, at higher concentrations a macroscopic phase separation occurred. Blends of similar compositions were also prepared. The structural and morphological characterization was done with the usual spectroscopic methods, such as FTIR, DMTA, X-ray diffraction and MEV.

The biocompatibility tests demonstrated that the film has a lower capacity of cellular adhesion, around 40% in relation to the positive control. The *in vivo* essays showed that for the periods of time and locations tested, the materials brought about a inflammatory reaction.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Justificativa e relevância

Dentro da ciência de materiais, a área de biomateriais tem demonstrado um desenvolvimento ímpar. Biomateriais poliméricos vêm sendo usados para a substituição de tecidos epidérmicos, dérmicos e/ou subdérmicos, para a regeneração de ossos, cartilagens e nervos, dentre outras funções. Biomaterial pode ser definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos. Os biomateriais são utilizados desde as civilizações mais antigas: olhos artificiais, orelhas, dentes e até narizes foram notificados em múmias egípcias. Chineses e indianos já usavam ceras, resinas e tecidos para reconstruir partes perdidas ou defeitos do corpo. Ao longo dos séculos, avanços nos tipos de materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização vêm permitindo o uso de biomateriais em partes do corpo não visualizadas até então [1]. Além disso, esses materiais são produzidos para serem usados em tecidos do corpo que experimentam níveis consideravelmente altos de agressividade. O pH nos fluídos corpóreos de vários tecidos varia sob faixas bastante amplas (1 a 9 em alguns casos). Cotidianamente os ossos são submetidos a tensões de até 4 MPa enquanto os tendões e ligamentos suportam entre 40 e 80 MPa. Estas tensões são flutuantes e repetitivas, o que torna o ambiente ainda mais agressivo [2].

Os poliuretanos são industrialmente importantes devido à variedade dos grupos presentes entre as ligações uretânicas, os quais podem dar origem aos mais

diversos produtos, como elastômeros, plásticos, espumas e pela possibilidade de polimerização controlada através da formação de intermediários estáveis (pré-polímeros). Estes permitem a adaptação do processo e da composição para a obtenção de materiais que possam cumprir as mais variadas exigências. A forma mais simples de um poliuretano é a linear, na qual os materiais de partida (composto hidroxilado e isocianato) possuem funcionalidade igual a dois. Porém, ao incorporar materiais com funcionalidade maior que dois, são produzidos poliuretanos reticulados (ou entrecruzados), os quais são mais resistentes mecânica e termicamente, além de exibirem maior resistência aos solventes, visto que são insolúveis. Por estas razões, os poliuretanos podem ser sintetizados com grande variação nas propriedades físicas [3],[4].

Um dos grandes desafios da pesquisa na área de biomateriais é o desenvolvimento destes a partir de matérias-primas de baixo custo, fácil acesso e com características adequadas para a função destinada. A quitina se enquadra dentro destes pré-requisitos.

A quitina é um polímero natural, constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, também designada N-acetil-D-glucosamina (GlcNHAc), unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . A sua estrutura é bastante semelhante à da celulose, na qual o grupo hidroxila do carbono 2 do anel de glucopiranosose se encontra substituído por um grupo acetamida.

A quitina e a quitosana (polímero obtida a partir da desacetilação da quitina) vêm despertando grande interesse de cientistas e tecnólogos como materiais poliméricos com aplicações na área biomédica. Estes polissacarídeos, além de apresentarem propriedades biológicas adequadas ainda apresentam diversas outras características tecnológicas e economicamente relevantes, como por exemplo: são

resíduos da indústria da pesca produzidos a partir do processamento da carapaça dos crustáceos e apresentam um grande valor comercial devido à sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89%), quando comparada à celulose substituída sinteticamente (1,25%), tornando-as agentes quelantes [5].

A quitina em especial se mostra mais favorável à aplicação em biomateriais devido ao grupamento acetamida, presente em maior quantidade em sua estrutura, comparado com a quitosana. Este grupamento é muito similar à ligação amida presente nas proteínas que constituem o tecido vivo, tornando a quitina mais biocompatível que a quitosana. O grupamento amina, presente em maior quantidade na quitosana, tem ação hemostática quando implantada como biomaterial.

## 2. OBJETIVOS

Sintetizar redes de poliuretano e quitina com arquitetura molecular pré-definida através da variação sistemática da densidade de ligações cruzadas;

Elucidar a morfologia do material sintetizado e caracterizar as propriedades mecânicas e térmicas das redes formadas, correlacionando-as com as propriedades obtidas;

Preparar blendas de poliuretano e quitina, a fim de verificar a influência da reticulação nas propriedades da rede;

Avaliar de forma preliminar a biocompatibilidade dos materiais sintetizados através de ensaios de citotoxicidade e degradação em solução fisiológica simulada.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biomateriais

Existem varias definições para o conceito de biomateriais destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [6],[7]. Muitas vezes associa-se o conceito de biomateriais a materiais de origem natural, mais conhecidos por biopolímeros, mas esta definição não é inteiramente correta, já que existem biomateriais de origem sintética que podem entrar em contato com o organismo, desempenhando diversas funções benéficas na área da saúde. A evolução dos biomateriais é relativamente recente. No entanto, é possível dividi-la em 3 gerações: i) primeira geração de biomateriais - implantes ósseos (primeira articulação artificial do quadril desenvolvida em 1961); ii) segunda geração de biomateriais - dispositivos bioativos (iniciou-se nos anos 70); iii) terceira geração- engenharia de tecidos (até a atualidade).

A área de biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até as funções biológicas a nível molecular nos tecidos, passando pela engenharia de materiais, onde são desenvolvidos sistemas com propriedades adequadas a determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais depende assim dos avanços das diversas áreas, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais.

Uma definição importante é a de biocompatibilidade com o organismo, podendo ser definida como a capacidade do material ter uma resposta favorável numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou

tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos [8]. Não existem materiais totalmente inertes, há sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho quando inserido no corpo humano. Alterando algumas propriedades dos materiais é possível minimizar ou controlar a resposta do tecido.

Biomateriais poliméricos não devem exibir toxicidade, comportamento irritante, ou quaisquer respostas fisiológicas adversas [9]. A bioatividade é também importante na funcionalidade de um biomaterial. Um material é bioativo quando há uma resposta biológica específica na interface do material, por exemplo permitindo o crescimento ósseo e a ligação entre o tecido e o material [10]. As 3 principais classes de materiais utilizados em medicina são os metais, polímeros, cerâmicas e combinações destes três tipos em compósitos. Os biomateriais podem ser bioinertes ou biodegradáveis. Materiais bioinertes não sofrem alterações, durante o período de implantação, causando resposta mínima nos tecidos adjacentes, e mantendo as propriedades estruturais durante longos períodos [11]. Os biomateriais degradáveis degradam-se quando em contato com os fluidos orgânicos. A taxa de degradação deve permitir a substituição gradual do novo tecido, transferindo progressivamente a tensão para o tecido em recuperação, evitando assim uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção do implante[12]. Os polímeros biodegradáveis apresentam grande potencial em aplicações biomédicas, como por exemplo, em placas ósseas, parafusos de fixação ou suturas.

Os sistemas biodegradáveis devem ser degradados *in vivo*, e formar produtos solúveis facilmente removíveis do local de implantação e excretados do corpo pelos mecanismos metabólicos normais. Os principais fatores que afetam a taxa de degradação de polímeros sintéticos e meio biológico são: (i) estrutura do polímero, principalmente hidrofiliabilidade e a presença de grupos funcionais, massa molar; (ii)

estado físico e morfológico do polímero, particularmente se é cristalino ou amorfo; (iii) condições ambientais (temperatura, pH, umidade, oxigênio); (iv) razão superfície/volume, tamanho e pureza do polímero [13]. A necessidade de ajustar a taxa de degradação do implante temporário ao crescimento dos tecidos adjacentes é um dos principais fatores da viabilidade de um suporte temporário [14].

Entre as aplicações mais freqüentes de biomateriais em ortopedia, salientam-se as próteses de quadril, joelho e ombro, visando restabelecer a capacidade de movimento e de transferência de carga [15].

### 3.2. Polímeros

São compostos tanto orgânicos quanto inorgânicos, naturais ou sintéticos de alta massa molar (da ordem de  $10^4$  a  $10^6$  g/mol) [16], caracterizado por seu tamanho, estrutura química e interações intra- e intermoleculares. Possuem unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia denominadas meros. As unidades repetitivas dos polímeros unem-se, de modo a formar uma estrutura linear, ou ramificada. As ramificações podem, ainda, interligar-se e formar uma rede tridimensional reticulada. A Figura 01 ilustra os principais tipos de arranjos dos meros.

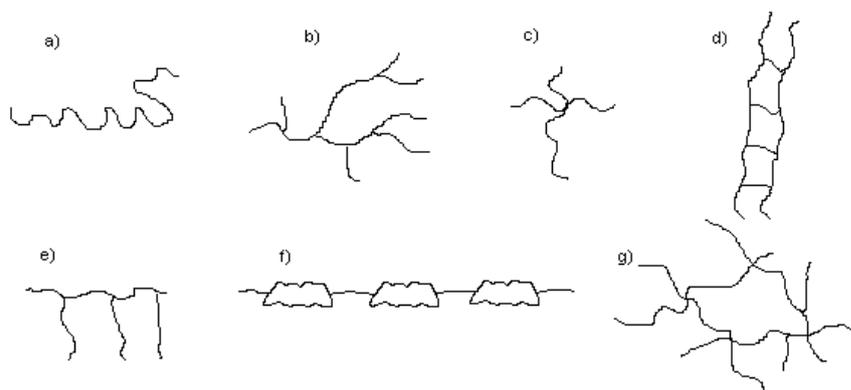


Figura 01 - Tipos de moléculas poliméricas: a) linear; b) ramificado; c) com ramificações em estrela; d) escalar; e) graftizado ou enxertado; f) semi-escalar; g) com ligações cruzadas ou reticuladas.

Os polímeros podem ser classificados em homopolímeros (se tiverem apenas um tipo de unidade repetitiva de monômeros da mesma natureza ou copolímeros (se conterem duas ou mais unidades repetitivas) [14].

### 3.2.1. Polímeros naturais

Polímeros naturais são os polímeros que ocorrem naturalmente; aqueles que são derivados de plantas e animais têm sido usados por muitos séculos. Esses materiais incluem a madeira, borracha, algodão, lã, couro e a seda. Outros polímeros naturais como as proteínas, enzimas, amido e a celulose, são importantes em processos biológicos e fisiológicos nas plantas e nos animais [17],[18].

### 3.2.2. Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos podem ser obtidos por meio de uma reação química denominada polimerização e as substâncias que lhes dão origem são chamadas de monômeros. Muitos dos plásticos, borrachas e materiais fibrosos que nos são úteis nos dias de hoje constituem os polímeros sintéticos. Os materiais sintéticos podem

ser produzidos de maneira barata e as suas propriedades podem ser administradas num nível em que muitas delas são superiores às suas contrapartes naturais. Entre algumas das aplicações, peças de metais e de madeira foram substituídas por polímeros apresentando resultados satisfatórios além de serem produzidos a custos baixos[17],[18].

O fato de os polímeros sintéticos e naturais (e respectivos compósitos) existirem numa grande variedade de composições combinado com a possibilidade de modificação de suas propriedades resultou em larga faixa de aplicações como biomateriais [19].

### 3.2.3. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros naturais tais como colágeno, elastina, ácido hialurônico, dextrana, celulose e quitina. A sua síntese envolve reações catalisadas enzimaticamente e reações de polimerização de cadeia. Os biopolímeros estruturais e de reserva energética mais importantes são os polissacarídeos [6].

Nos últimos anos, os polímeros naturais têm sido propostos como alternativas aos biomateriais atualmente usados em aplicações biomédicas. Uma das vantagens destes materiais é seu baixo custo como resultado da disponibilidade da matéria-prima [20]. A Tabela 01 [21] mostra alguns dos biopolímeros atualmente disponíveis.

Os biopolímeros constituem uma importante fonte de materiais com grande versatilidade química e elevado potencial em diversas aplicações biomédicas. As suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos físicos e químicos. Isto permite a seleção de propriedades importantes tais como capacidade de absorção de água, cinéticas de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas e determinadas aplicações [21].

Tabela 01 – Lista de biopolímeros [21].

<b>Plantas/Algas</b>	<b>Animais</b>	<b>Bactérias</b>
Amido (amilose, amilopectina)	Ácido hialurônico	Quitina
Celulose	Quitina	Quitosana
Pectina	Quitosana	Xantano
Alginato		Poligalactosamina
Carraginato		Gelano
Gomas		Dextrano
Soja, glúten de trigo		
Caseína, soro de albumina		
Sedas		
Elastina		
Polihidroxicanoatos		

Os polímeros naturais são apropriados como materiais biomédicos devido a sua semelhança estrutural com os componentes dos tecidos. O fato de conterem monômeros semelhantes, ou mesmo idênticos, aos encontrados nas matrizes orgânicas dos organismos, reduz a possibilidade de ocorrência de problemas associados a toxicidade dos materiais, ou seus produtos de degradação, ou estimulação das reações inflamatórias crônicas [21]. No entanto, existem algumas desvantagens em utilizar polímeros naturais, como por exemplo: (i) fortes atividades fisiológicas e potencial para rejeição; (ii) dificuldade na avaliação das taxas de degradação *in vivo* devido a diferenças nas concentrações enzimáticas em diferentes partes dos tecidos vivos; e (iii) a resistência mecânica dos polímeros naturais é geralmente insuficiente. Por estas razões, a sua aplicação como materiais biomédicos tem sido limitada a pequenas áreas específicas [22].

Uma característica intrínseca dos polímeros naturais é sua capacidade de serem degradados por enzimas, garantindo que o implante seja metabolizado por mecanismos fisiológicos. Esta propriedade tem interesse em aplicações de biomateriais no qual se pretende uma função específica por um período de tempo

temporário, seguido do qual é esperado que o implante degrade completamente por processos metabólicos normais [23].

#### 3.2.4. Sistemas bioartificiais

Os materiais poliméricos bioartificiais são biomateriais que resultam das interações entre polímeros sintéticos e naturais. Os materiais bioartificiais combinam as propriedades dos polímeros sintéticos (boas propriedades mecânicas, fácil processamento, custos baixos de produção e transformação) com as propriedades específicas de biocompatibilidade e degradabilidade dos biopolímeros. A biocompatibilidade do material é determinante para as interações a nível molecular entre o material e os constituintes dos tecidos. Quanto menos afetada a funcionalidade biológica dos constituintes dos tecidos, melhor a biocompatibilidade do material sintético. Os materiais poliméricos bioartificiais têm melhor biocompatibilidade na redução de interações indesejáveis com os tecidos, comparativamente aos biomateriais sintéticos. Relativamente aos biopolímeros mostram melhores propriedades físicas e mecânicas [24].

### 3.3. Áreas de aplicação biomédica

#### 3.3.1. Próteses e implantes ortopédicos

Próteses e implantes ortopédicos são dispositivos médicos, aplicados mediante ato cirúrgico, total ou parcialmente no interior do organismo, com o objetivo de restabelecer ou substituir a capacidade funcional de um dado osso ou articulação [6],[7],[25],[22],[26]. Nenhum implante tem propriedades biomecânicas equivalentes aos tecidos que substitui. Todos os implantes apresentam um balanço

entre a compatibilidade bioquímica e biomecânica. Além da bioatividade, as propriedades físicas e mecânicas são essenciais para que um implante seja capaz de substituir o osso. Têm sido utilizados diversos materiais, ou propostos para serem usados, principalmente na fixação óssea, substituindo o osso e estruturas ósseas (graft). Os implantes metálicos tradicionais têm sido substituídos por cerâmicos, metais cerâmicos, polímeros e compósitos, em várias aplicações biomédicas.[15],[27],[28].

Ensaio mecânico são realizados com o objetivo de avaliar o desempenho mecânico de um potencial biomaterial como implante. Em implantologia ortopédica é de extrema importância conhecer a resistência do biomaterial à solicitação de forças de compressão, torção, tração, tenacidade à fratura e o comportamento elástico. O desgaste e a fadiga são duas causas comuns de degradação dos materiais ortopédicos. Os principais tipos de desgaste envolvidos na deterioração dos implantes protéticos são: desgaste por abrasão, fadiga e adesão [6]. As aplicações médicas de polímeros encontram-se divididas em duas categorias principais: implantes permanentes e temporários. Os implantes temporários são utilizados para restabelecer ou apoiar um dado osso na sua consolidação, após fratura, ou promover o seu alongamento (caso de fixadores externos). Os dispositivos permanentes uma vez aplicados, não devem terminar a sua função durante o tempo de vida do paciente. Há muitas vezes necessidade de revisão da prótese, devido à deterioração da junção prótese/osso na zona de interface com separação entre a prótese e o osso, bem como a possível degradação dos componentes da prótese, devido a fenômenos de desgaste e corrosão, ou problemas associados a possíveis infecções [29]. Dentre os diversos tipos de próteses e implantes que se utiliza em ortopedia, salientam-se as próteses de quadril, joelho e ombro, todas do tipo

articular, visando restabelecer a capacidade do movimento e de transferência de carga. Outro tipo de próteses bastante comum são as placas de osteossíntese, que visam fixar porções de osso fraturado, de modo a inibir o respectivo movimento relativo, e assim permitir a consolidação do calo formado na zona fraturada [15]. Muitos destes dispositivos, sobretudo quando destinados a permanecer em contato com o organismo durante períodos relativamente curtos, são fabricados com ligas metálicas, que permitem fácil construção a custos relativamente baixos. Dentre as ligas mais utilizadas, salientam-se os aços inoxidáveis AISI 316L (Ti-6Al-4V), constituídos por cromo, níquel, molibdênio e ferro. Estas ligas são de baixo custo, mas apresentam problemas de degradação, podendo libertar íons agressivos para os tecidos envolventes, ou que se acumulem em órgãos específicos, possuem propriedades elásticas bastante diferentes das do osso, podendo alterar a biomecânica do conjunto [6]. O osso cortical e o aço têm propriedades mecânicas muito diferentes. A constante de elasticidade do osso é 1/10 do aço implantado. Assim, a remoção dos implantes metálicos pode ser seguida por um período de enfraquecimento do osso, com o perigo de refratura [22],[30]. Nas próteses articulares é comum associar diferentes polímeros, com boa resistência e razoável “biocompatibilidade”. A combinação de metais ou cerâmicos é uma forma de minimizar a deterioração da zona de contato na articulação, devido à elevada resistência ao desgaste na zona de contato destes materiais [6],[14]. É comum distinguir dois tipos de implantes degradáveis: estruturas de suporte temporárias e sistemas de libertação controlada de fármacos [22],[31]. Nas matrizes de libertação controlada de fármacos, a matriz polimérica degradável serve como transportador que desaparece tão rapidamente quanto necessário, após a libertação do agente ativo farmacológico. Muitos polímeros biodegradáveis são hidrofílicos por natureza,

quando a água penetra na matriz, o fármaco torna-se mais hidrofílico, sendo mais facilmente removido [11]. As suturas cirúrgicas estão divididas em duas classes: absorvíveis e não absorvíveis [32],[22]. As suturas absorvíveis, de origem natural ou sintética, fornecem suporte aos tecidos durante o estado inicial de reabilitação, sendo depois eliminados por absorção ou digestão metabólica. As suturas não absorvíveis, devem fornecer suporte aos tecidos durante longos períodos de tempo, ou permanecer ligados aos tecidos em sistemas prostéticos [33]. A primeira sutura sintética degradável foi aplicada originalmente em 1970 à base de poli(ácido glicólico) (Dexon). Uma limitação prática das suturas Dexon é que tendem a perder a resistência mecânica rapidamente, durante um período de duas a quatro semanas após implantação. Mais tarde, outros copolímeros de poli(ácido glicólico) e poli(ácido láctico) foram desenvolvidos. A sutura mais utilizada, Vicryl, é composta por um copolímero poli(ácido glicólico)/poli(ácido láctico) (90/10), tendo sido introduzida no mercado em 1974 [31],[33]. As estruturas de suporte temporário são utilizadas nos casos em que o tecido natural enfraqueceu por doença, lesão, ou cirurgia e que necessita de um suporte artificial. Uma lesão mal curada, um osso partido, ou um vaso sanguíneo danificado são alguns exemplos. Sistemas de fixação óssea (parafusos ou placas) são sistemas de suporte. Em todas estas circunstâncias, o implante degradável funciona como suporte mecânico temporário. Para que um implante temporário desempenhe corretamente a sua função, deve ocorrer uma transferência gradual da carga: à medida que o tecido natural cresce, o implante degradável deve tornar-se mais fraco. A necessidade de ajustar a taxa de degradação do implante temporário ao crescimento dos tecidos adjacentes é um dos principais fatores da viabilidade do suporte temporário [14].

O osso é um órgão dinâmico capaz de auto-regeneração após lesão. Ocasionalmente, quando a lesão é grave, o osso não recupera corretamente falhando na função mecânica [30]. Muitas vezes, os defeitos ósseos necessitam de um substituto ósseo extrínseco para a sua restauração funcional e morfológica. A função dos substitutos ósseos é de enchimento ou estrutura de suporte [34]. O cimento ósseo é uma alternativa sintética viável ao tecido natural, utilizado normalmente para preencher defeitos ou na fixação de próteses do osso. Desde 1960, o poli(metacrilato de metila) tem sido utilizado, devido à sua bioestabilidade e boas propriedades mecânicas [35]. Um problema comum na substituição do quadril é o desprendimento de cimento na junção da prótese, em muitos casos está relacionado com a falha mecânica no cimento ósseo acrílico [36],[30]. Melhoramentos no uso de cimentos com poli(metacrilato de metila) têm sido obtidos com o uso de reforços de partículas ou fibras na matriz. A adição de pequenas fibras de carbono ou enchimentos inorgânicos ajuda a reduzir a deformação dos cimentos ósseos, aumentando a dureza e reduzindo a mobilidade molecular das cadeias poliméricas [36]. Sistemas de fixação óssea, parafusos, placas, substitutos de ligamentos degradáveis e suturas são exemplos comuns de implantes temporários em medicina humana. Outros sistemas biodegradáveis à base de colágeno, polihidroxibutirato, policaprolactona, policarbonatos derivados de tirosina, derivados de celulose, quitina, quitosana, poli(etilenoglicol) (PEG), poli(álcool vinílico) (PVA), tem sido propostos mas nenhum tem aplicação atual no mercado [31]. A Tabela 02 seguinte descreve algumas aplicações de materiais sintéticos no corpo [37].

Tabela 02 – Aplicações de materiais sintéticos e materiais naturais modificados em medicina [37].

<b>Aplicações</b>	<b>Tipos de materiais</b>
<b>Esqueleto</b>	
Próteses (quadril, joelho)	Titânio, ligas de Ti-Al-V, polietileno
Placas ósseas para fixação de fraturas	Aço inoxidável, ligas cobalto-crômio
Cimento ósseos	Polimetacrilato de metila
Reparação de defeitos ósseos	Hidroxiapatita
Tendões e ligamentos artificiais	Teflon, dacron
Implantes dentários para fixação de dentes	Titânio, fosfato de cálcio, alumina
<b>Sistema cardiovascular</b>	
Vasos sanguíneos	Dacron, teflon, poliuretano
Válvulas cardíacas	Aço inoxidável, carbono
Cateteres	Silicone, poliuretano
<b>Órgãos</b>	
coração artificial	Poliuretano
Pele artificial	Compósito silicone-colágeno
Rins	Celulose, poliacrilonitrila
<b>Olhos</b>	
Lentes intra-oculares	Polimetacrilato de metila, silicone, hidrogel
Lentes de contato	Silicone-acrilato, hidrogel

### 3.4. Ensaio *in vitro*

A crescente utilização de biomateriais em medicina, conduziu à necessidade de desenvolvimento de testes reprodutíveis e efetivos de biomateriais. A restrição da experimentação animal ao mínimo aumentou o interesse pelos sistemas *in vitro*, na distinção entre biomateriais potenciais e os que não são adequados para aplicação humana. Os métodos *in vitro* são um auxiliar necessário para os estudos *in vivo* na avaliação de biomateriais [38],[39],[40]. Uma das funções mais importantes é detectar efeitos tóxicos dos biomateriais numa fase preliminar. As alterações variam desde morte celular a alterações de adesão celular, proliferação e atividade biossintética. Os métodos *in vitro* devem ser confrontados com a validação de extrapolação para a situação *in vivo* [40]. Os ensaios *in vitro* são testes

conduzidos em condições que simulam o meio com o qual o material estará em contato quando implantado, e permitem avaliar possíveis mecanismos de reações interfaciais entre o implante e os tecidos [6],[41],[42]. Os principais fatores que afetam a taxa de degradação de polímeros sintéticos em meio biológico são [13]: (i) estrutura do polímero, especialmente hidrofiliabilidade e a presença de grupos funcionais, massa molar e a distribuição de massa molar; (ii) estado físico e morfológico do polímero, particularmente se é cristalino ou amorfo; (iii) condições ambientais (temperatura, pH, umidade, oxigênio); (iv) razão superfície/volume, tamanho e pureza do polímero [13]. A seleção das condições experimentais para os ensaios *in vitro* devem ser baseadas na relação estrutura/propriedades do polímero biomédico, componentes fisiológicos e interações no meio *in vivo* [43]. O primeiro passo para testar biomateriais potenciais são os testes de biocompatibilidade “gerais”, que permitem o reconhecimento de efeitos nocivos do biomaterial nas células, envolvem normalmente a utilização de várias linhagens celulares cultivadas em laboratório durante longos períodos. A avaliação pode ser feita diretamente (em contato com o material), em extratos (detectando produtos lixiviados que possam ter efeitos nocivos) ou indiretamente (as células estão separadas do material por um gel ou uma membrana permeável). Estes métodos devem ser seguidos de uma segunda fase *in vitro*, no qual são utilizadas células primárias relevantes para a aplicação proposta do sistema médico. Os materiais com baixa toxicidade são sujeitos a testes de citocompatibilidade, na presença de células com as quais o material vai entrar em contato quando implantado [6],[40]. Os testes de biocompatibilidade “específica” constituem uma forma de simular a situação *in vivo* tão próximo quanto possível. A elevada sensibilidade do método permite o reconhecimento de potenciais materiais citotóxicos excluindo numa fase inicial de

experimentação. No entanto, a experimentação *in vitro*, “geral” ou “específica”, não pode substituir a experimentação *in vivo*. Ambas são necessárias para testar biomateriais potenciais [40]. Uma das principais desvantagens dos métodos *in vitro* é o problema fundamental de extrapolação para a situação *in vivo*. Os testes *in vitro* representam apenas uma parte do estudo da biocompatibilidade. As espécies classificadas como biocompatíveis *in vitro* devem entrar numa fase seguinte de observação *in vivo* [29],[39],[40]. Os ensaios *in vivo* constituem a última etapa a que os biomateriais são sujeitos antes da fase do ensaio clínico; procuram avaliar a força e a natureza da ligação implante-tecido ósseo e a resposta biológica do organismo hospedeiro à presença do biomaterial, através da identificação e quantificação de tecidos e células circundantes [6],[41],[44],[45].

### 3.5. Biomateriais degradáveis e biodegradação

#### 3.5.1. Biomateriais degradáveis

Nas aplicações clínicas é importante distinguir polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis. Os polímeros biodegradáveis são decompostos no corpo humano, mas os seus produtos de degradação permanecem nos tecidos durante bastante tempo. Os polímeros bioabsorvíveis podem ser definidos como polímeros que degradam após implantação em produtos não tóxicos, que são eliminados do corpo ou metabolizados [22]. Os materiais degradáveis devem obedecer a parâmetros mais estritos de biocompatibilidade que os materiais não degradáveis. Além do problema potencial de contaminantes tóxicos libertados pelo implante (monômeros residuais, estabilizantes, iniciadores de polimerização), é necessário considerar a toxicidade potencial dos produtos de degradação e metabólitos

subseqüentes [15],[46],[31]. Um material biodegradável quando implantado, entra em contato direto com os fluidos do corpo que difundem para o interior do polímero à medida que ocorre degradação [46],[11],[47]. Os produtos de degradação são liberados para o tecido adjacente e, portanto devem ser biocompatíveis. Os produtos de degradação poderão dissolver-se nos fluidos extracelulares à medida que são formados, sendo excretados pelos rins e pulmões [11],[26]. Os materiais biodegradáveis utilizados em aplicações clínicas devem ter propriedades mecânicas adequadas e taxas de absorção equivalentes às taxas de crescimento dos tecidos, sendo completamente reabsorvidos e gradualmente substituídos pelo novo tecido. A taxa de crescimento é diferente para cada tecido dependendo da sua localização no corpo humano. Após a regeneração, os polímeros biodegradáveis implantados devem ser degradados e absorvidos tão rápido quanto possível para minimizar efeitos indesejáveis [22]. No caso de implantes ósseos, a degradação contínua de sistemas cirúrgicos bioabsorvíveis causa uma transferência gradual de carga entre o osso e o elemento, previne o atrofiamento e estimula a remodelação óssea [48],[22],[26],[27]. Os materiais biodegradáveis incluem substâncias orgânicas e inorgânicas, mas a maior parte são polímeros orgânicos. Poli( $\alpha$ -hidroxiésteres), tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e seus copolímeros, encontram-se entre os polímeros sintéticos aprovados para o uso clínico humano. Exibem biocompatibilidade, biodegradabilidade e são facilmente processados por técnicas convencionais de moldagem [15],[26],[31],[27],[49]. A incorporação de partículas de hidroxiapatita nas matrizes assegura o comportamento bioativo do compósito, e resistência. A aplicação de tratamentos antes da implantação para induzir a formação de uma camada de apatita na superfície do material implantado, assegura

o caráter de ligação do implante ao osso, por revestimento biomimético da superfície, sem aplicação de reforços bioativos.

Outros materiais de relevância incluem poli(ortoésteres), poli(glicolide-co-trimetileno carbonato), poli(p-dioxanona), poli(anidridos), poli(caprolactona) (PCL), polihidróxibutirato e seus copolímeros[15],[27]. Os polímeros biodegradáveis mais comuns na área médica são descritos na tabela seguinte [29].

Tabela 03 – Polímeros biodegradáveis sintéticos em engenharia de tecidos [29].

Polímero	Aplicação
Poli(ácido láctico) (PLA)	Osso, cartilagem
Poli(ácido glicólico) (PGA)	
Polianidridos	Osso, liberação controlada de fármacos
Poliortoésteres	Liberação controlada de fármacos
Policaprolactona	Sistemas de fixação biodegradáveis
	Liberação controlada de fármacos
Policarbonato	Osso, sistemas de fixação biodegradável
	Liberação controlada de fármacos
Polifumarato	Osso

Todos os polímeros referidos na tabela anterior são biocompatíveis. No entanto, para além da biocompatibilidade, as suas propriedades mecânicas são igualmente importantes em aplicações ortopédicas, devido às solicitações contínuas [29].

### 3.5.2. Biodegradação

Os polímeros podem ser definidos quanto aos mecanismos e características de degradação em quatro termos: biodegradáveis, bioabsorvíveis, bioessorvíveis e bioerodíveis [31],[50]. A biodegradação tem sido definida de várias formas por diferentes investigadores [46],[11],[51]. Inclui alterações nas propriedades superficiais ou perda de resistência mecânica, assimilação por microrganismos, degradação por enzimas, ruptura de ligações da cadeia, redução da massa molar

média do polímero, ou extração de material de baixa massa molar, conduzindo a defeitos superficiais. A degradação pode ocorrer por um dos mecanismos anteriores ou a sua combinação [52],[50]. Durante o “Second International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics”, realizado na França no ano de 1991, foram consideradas as seguintes definições [13],[53]: i) degradação polimérica: variação das propriedades do polímero devido a variações na estrutura química; ii) polímero biodegradável é um polímero no qual a degradação é conduzida, pelo menos parcialmente, por um sistema biológico; iii) polímero bioabsorvível é um polímero que pode ser assimilado por um sistema biológico; iv) erosão reflete o processo de dissolução ou desgaste da superfície do polímero. Os efeitos da degradação de polímeros incluem [54]: i) variações na estrutura química; ii) variações na superfície, pois muitas degradações ocorrem na superfície do material, onde os efeitos de degradação são máximos); iii) perda de propriedades mecânicas; iv) redução na massa molar devido à cisão da cadeia; v) geração de radicais livres; vi) perda de aditivos e plastificantes; vii) enfraquecimento [54]. Os sistemas biodegradáveis devem ser degradados *in vivo*, mas também formar produtos solúveis facilmente removíveis do local de implantação e excretados do corpo pelas vias metabólicas normais. A biodegradação reflete os processos de degradação hidrolítica, enzimática e bacteriológica dentro da matriz polimérica [53]. A biodegradação pode ocorrer a diferentes níveis estruturais: molecular, macromolecular, microscópico e macroscópico. A degradação pode iniciar-se por hidrólise, mas à medida que o polímero é destruído, a área superficial e acessibilidade aumentam, podendo predominar a degradação enzimática. A definição de biodegradação deve incluir todos os tipos de degradação que ocorrem *in vivo* [50],[55]

Heller [55] definiu o termo “polímero bioerodível” como a conversão de um polímero insolúvel num material solúvel em condições fisiológicas, sem atender ao mecanismo específico envolvido no processo de erosão. A bioerosão indica a conversão de polímeros insolúveis em água em polímeros solúveis ou em pequenas moléculas. O prefixo “bio” indica que a erosão ocorre em condições fisiológicas [31].

A erosão de polímeros envolve várias etapas, que diferem para cada tipo de polímero. O objetivo é determinar o passo controlador de reação. Na primeira etapa a água tem contato com o polímero por acesso direto à superfície polimérica, ou penetra no interior deste por forças capilares. A degradação hidrolítica de polímeros causa a ruptura do polímero em unidades menores. Esta reação pode ser catalisada em condições ácidas, básicas ou outras condições, como temperatura, luz, etc. [54],[49]. Os principais fatores que influenciam o processo de erosão são a estabilidade química da cadeia polimérica, a hidrofobicidade da unidade repetitiva, a morfologia do polímero, a cristalinidade, a massa molar inicial do polímero, a presença de catalisadores, aditivos, ou plastificantes, e a geometria do implante [31],[56]. A hidrofobicidade pode evitar a absorção de água pelo polímero, reduzindo assim as taxas de hidrólise [56]. Em polímeros hidrofóbicos, a degradação é geralmente um fenômeno superficial com erosão lenta do polímero, em polímeros hidrofílicos a degradação ocorre normalmente até o interior do material. Assim, qualquer tratamento que altere a hidrofobicidade do polímero, tais como orientação e cristalinidade, afeta a sua taxa de degradação [57].

O processo de bioerosão de um implante polimérico está associado a variações macroscópicas; nas propriedades físico-mecânicas do material polimérico; e nas propriedades físicas tais como inchamento, deformação, ou desintegração estrutural; perda de peso e eventual perda funcional [31]. A bioerosão de um sólido

não está apenas associada à clivagem química da cadeia polimérica, a simples solubilização do polímero como resultado de variações no pH, pode conduzir à erosão do sólido [31].

Baseado na susceptibilidade da estrutura polimérica à hidrólise, é possível prever a tendência de qualquer polímero à bioerosão. No entanto, a taxa de erosão de um polímero sólido não pode ser baseada apenas na estrutura da cadeia polimérica. A taxa de erosão é fortemente dependente da capacidade das moléculas de água penetrarem na matriz polimérica [31]. Para um polímero ser degradável e erodível, os grupos hidrolisáveis da cadeia principal devem estar presentes e acessíveis [58]. A taxa de bioerosão é influenciada pela morfologia do polímero. No estado cristalino, as cadeias poliméricas são densas e regulares e oferecem elevada resistência à penetração da água na matriz polimérica. Conseqüentemente, a taxa de hidrólise é superior nas regiões amorfas de um polímero semi-cristalino que nas regiões cristalinas [31]. A taxa de hidrólise tende a aumentar com o aumento do número de grupos hidrolisáveis na cadeia principal ou cadeia lateral, grupos polares que aumentam a hidrofiliidade, baixa cristalinidade, baixa densidade e elevada área superficial/volume. Fatores que tendem a inibir as cinéticas hidrolíticas incluem misturas hidrofóbicas, ligações cruzadas, elevada cristalinidade devido à orientação da cadeia, baixa carga e forma compacta [31]. Uma vez que a superfície do polímero é o primeiro local de ataque na reação de hidrólise dos materiais poliméricos, a estrutura superficial e área superficial são os fatores mais importantes. Como as reações ocorrem normalmente em meio aquoso, o balanço hidrofílico- hidrofóbico do polímero afeta bastante a sua biodegradabilidade. Os polímeros que contêm segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos

tem maior biodegradabilidade do que os polímeros com estruturas hidrofóbicas ou hidrofílicas apenas [22].

### 3.6. Quitina

#### 3.6.1. Breve histórico da quitina e quitosana

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 pelo professor francês Henri Braconnot. Ele a descobriu em cogumelos, recebendo então a denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, que isolou esta substância insolúvel da armadura /carapaça dos insetos [59]. Em grego, quitina quer dizer túnica, envelope ou cobertura. Ela falhou em não detectar a presença de nitrogênio na quitina e em afirmar que se tratava de uma substância anteriormente encontrada em plantas. Posteriormente, Odier também observou a presença da quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material básico na formação do exoesqueleto de todos os insetos e possivelmente dos aracnídeos. Somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura [60],[61].

Apesar de a quitina ter sido descoberta há dois séculos, pesquisas e estudos de aplicações foram intensificados por volta de 1970, quando se percebeu o grande potencial de aplicação que apresentavam tanto a quitina quanto a própria quitosana. A quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971 no Japão e em 1986 quinze indústrias produzindo quitina e quitosana, em escala comercial, existiam naquele país. Atualmente, estes polissacarídeos têm sido consideravelmente pesquisados e suas aplicações são consideradas de elevado potencial para o século XXI. Acredita-se que num futuro bem próximo muitos materiais atualmente em uso irão perder seu lugar para estes biopolímeros por

apresentarem certas vantagens tais como: custo baixo, quantidades abundantes na natureza e biodegradabilidade [61].

A quitina e a quitosana são biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza, através do ciclo da quitina, conforme ilustrado na Figura 02. As enzimas hidrolíticas envolvidas neste processo (lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase) estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, nas plantas, além de também se encontrarem presentes em microrganismos do solo.

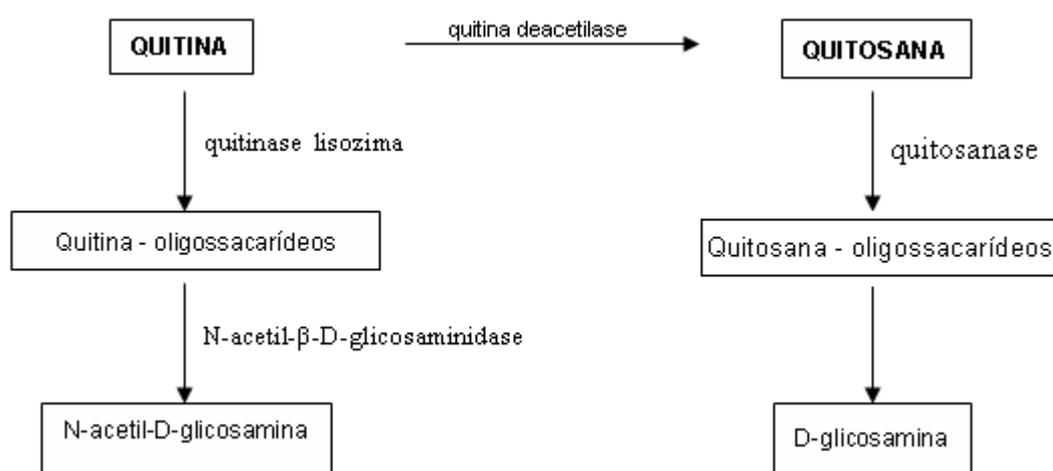


Figura 02 – Ciclo da quitina.

### 3.6.2. Fontes e Processos de obtenção

A quitina é a segunda maior fonte de biomassa e o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas classes de invertebrados, como os artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, estando também presente nas paredes celulares de alguns fungos e em algumas espécies de algas [62].

A taxa de regeneração da quitina na biosfera é de cerca de  $2,3 \times 10^9$  toneladas/ano, somente para os crustáceos, o que corresponde quase ao dobro da mesma taxa relativa à celulose ( $1,3 \times 10^9$  toneladas/ano). Estima-se que, só nas

costas dos países iberoamericanos, sejam produzidas anualmente cerca de 170 mil toneladas de resíduos ricos em quitina, provenientes da indústria da pesca, aqüicultura e indústrias de processamento de crustáceos e moluscos. Esta produção corresponde a uma fatia de 12% no total dos resíduos ricos em quitina produzidos em todo o mundo [63].

Os restos das carapaças dos crustáceos, além de quitina, contêm proporções variadas de proteínas, sais de cálcio (fundamentalmente carbonatos e fosfatos de cálcio) e pigmentos. Assim, o isolamento da quitina envolve normalmente três operações básicas: 1) desproteinização, 2) desmineralização e 3) despigmentação.

Para eliminação das proteínas, a matéria-prima é normalmente tratada com uma solução alcalina e levada a temperaturas que podem variar entre 65 a 100 °C. Em alguns trabalhos foram adotadas soluções aquosas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{NaHSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{S}$  no isolamento das proteínas, embora na maioria dos trabalhos seja escolhido o  $\text{NaOH}$ , variando ligeiramente o intervalo de temperatura, e de uma forma mais ampla, o intervalo de concentração da base, o tempo de duração da operação e o número de operações [63].

O conteúdo mineral dos resíduos dos crustáceos oscila entre 30 e 55%, e é constituído principalmente por carbonato de cálcio e, em menor proporção (10%), por fosfato de cálcio. A remoção desta matéria inorgânica é realizada através de tratamento com vários ácidos a diferentes concentrações, como o  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  e  $\text{HCOOH}$  e, na maioria dos casos, o  $\text{HCl}$  [64].

Os exoesqueletos dos crustáceos contêm pigmentos que não se encontram complexados com materiais inorgânicos ou proteínas, não sendo eliminados pelos tratamentos mencionados. Estes pigmentos podem ser eliminados por extração com

etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização, ou por tratamento com  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{NaClO}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NaHSO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  [63],[64].

Depois de realizadas as três etapas para o isolamento da quitina, o material seco é caracterizado de forma a definir as suas propriedades através de parâmetros como, por exemplo, o grau de acetilação (GA) ou de desacetilação ( $\text{GD} = 1 - \text{GA}$ ).

### 3.6.3. Estrutura da quitina

A estrutura da quitina é constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, também designada N-acetil-D-glucosamina (GlcNHAc), unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1>4) (Figura 03). A sua estrutura é bastante semelhante à da celulose (Figura 04), na qual o grupo hidroxila do carbono 2 do anel de glucopiranosose se encontra substituído por um grupo acetamida.

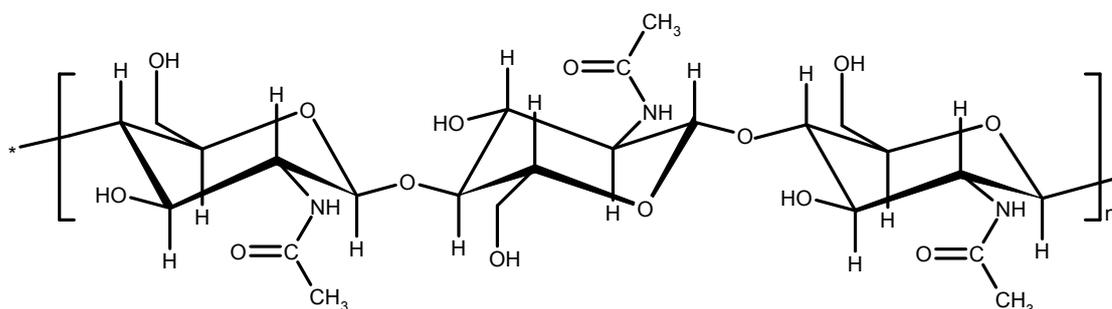


Figura 03 – Estrutura da quitina.

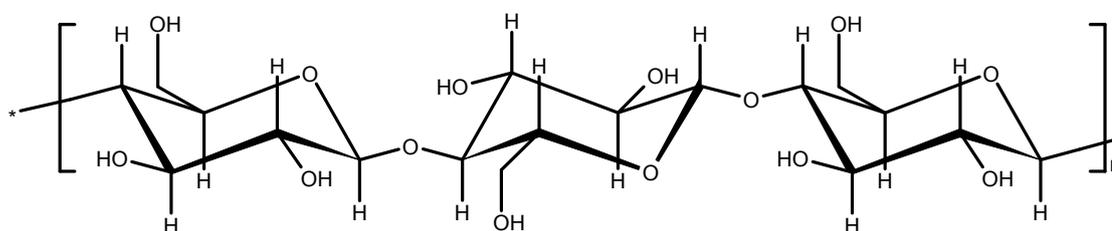


Figura 04 – Estrutura da celulose.

Por ser um produto natural, a quitina não possui uma composição uniforme. As diferentes cadeias polissacarídicas que compõem o polímero apresentam

diferenças importantes ao nível do tamanho, percentagem de grupos acetamida e posição destes grupos ao longo das cadeias poliméricas. A única exceção conhecida é a quitina obtida a partir de algas diatomáceas (*Thalassiosira fluviatilis* e *Cyclotella cryptica*), na qual todas as unidades monoméricas são iguais [65].

Após a desacetilação da quitina, a quitosana é caracterizada pelo seu grau de acetilação (GA), representado na Figura 05, na qual o GA tende a zero para a quitosana e a um para a quitina.

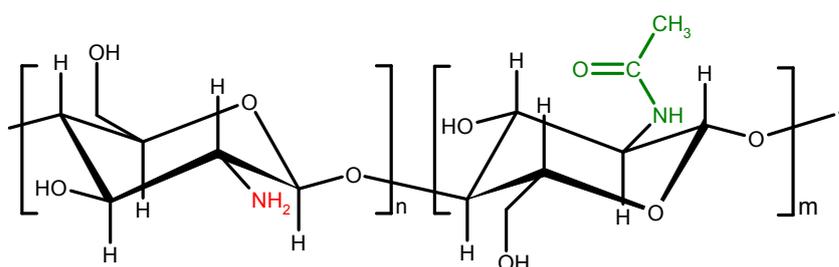


Figura 05 – Estrutura química quitina/quitosana.

Dependendo da sua origem, a quitina pode existir sob três formas diferentes, definidas de acordo com a disposição das cadeias que constituem o polímero. Na  $\alpha$ -quitina, as cadeias poliméricas apresentam-se em disposição antiparalela, na  $\beta$ -quitina apresentam-se em disposição paralela e na  $\gamma$ -quitina verifica-se um misto das duas disposições, segundo o esquema da Figura 06.

A forma mais estável e mais abundante é a  $\alpha$ -quitina, encontrada onde é necessária maior rigidez, como no exoesqueleto dos artrópodes. As outras formas ( $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina) são encontradas, por exemplo, nas lulas e são caracterizadas por apresentar simultaneamente flexibilidade e resistência. Mediante tratamento químico adequado é possível converter as formas  $\beta$  ou  $\gamma$  na forma  $\alpha$ , no entanto, estas conversões são irreversíveis [66].

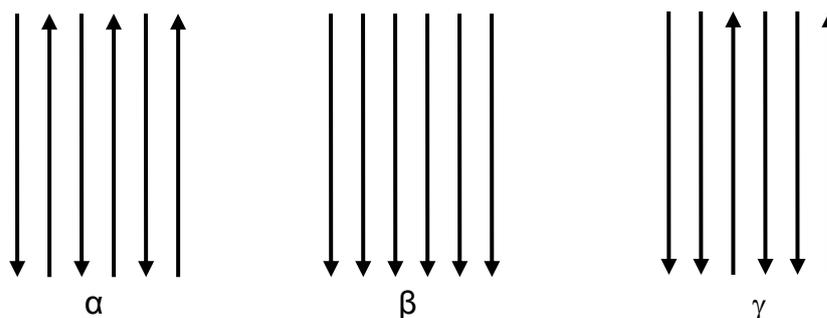


Figura 06 – Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina.

#### 3.6.4. Solubilidade

A quitina apresenta uma afinidade limitada por solventes devido a forte ligação hidrogênio intermolecular. Sua solubilidade em alguns solventes está relacionada com o tipo de matéria-prima utilizada para sua obtenção. A  $\alpha$ -quitina não é solúvel e não incha apreciavelmente em solventes comuns. Sendo solúvel somente em solventes especiais como a N,N-dimetilacetamida (DMAc) e a N-metilpirrolidona (NMP) contendo 5-10% em massa de LiCl. Misturas de DMAc e NMP contendo de 5-8% de LiCl são freqüentemente empregadas para obter filmes por *casting* [63]. Metanol saturado com cloreto de cálcio dihidratado, um solvente para nylons, foi utilizado para dissolver a quitina, embora o cloreto de cálcio anidro aparentemente não tenha sido eficaz [67]. A  $\beta$ -quitina obtida das cascas de siri, camarão e caranguejo, é solúvel em solventes do tipo hexafluoroisopropanol e hexafluoroacetona e é completamente solúvel em cloroálcoois associados a soluções aquosas de ácidos minerais ou ácidos orgânicos [68],[69].

A quitina solúvel em água contém aproximadamente 50% de aminas livres, é obtida pela desacetilação controlada [70]. A solubilidade é obtida em condições de hidrólise homogênea para assegurar a distribuição randômica dos substituintes acetila [70].

### 3.6.5. Degradação térmica

Quando polímeros são aquecidos a temperaturas mais elevadas, várias mudanças físicas e químicas podem ocorrer como formação de gases, líquidos, mudanças de cor, etc. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações da cadeia principal, bem como em cadeias laterais. A capacidade do polímero em resistir à decomposição química causada pelo aquecimento é chamada de estabilidade térmica. A estabilidade térmica é geralmente caracterizada pela temperatura na qual a decomposição do polímero se torna perceptível, isto é, pela formação de produtos e pela cinética do processo. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal [71]. A ligação C-C é uma das mais resistentes à degradação térmica, sendo especialmente estável no diamante. A presença de átomos de hidrogênio na molécula do polímero (macromolécula) diminui a energia da ligação C-C, motivo pelo qual os hidrocarbonetos de alta massa molar e seus derivados possuem comparativamente baixa estabilidade, sendo facilmente degradados com o aquecimento a temperaturas mais altas [72]. Quitina e quitosana, quando aquecidas a temperaturas mais elevadas, sofrem degradação. Os termogramas da quitina e quitosana realizados por calorimetria de análise térmica diferencial e termogravimétrica, mostraram um efeito endotérmico a 60 °C (liberação da água absorvida), seguido por fortes efeitos exotérmicos a 280 °C e 480 °C. A estabilidade térmica da quitina aumenta com o aumento do grau de acetilação, isto é, quando a forma acetilada prevalece, o efeito exotérmico aparece em 320 °C, enquanto que na forma desacetilada o efeito ocorre a 280°C [73].

### 3.6.6. Aplicações da quitina

A quitina possui baixa toxicidade e é inerte no trato gastrointestinal dos mamíferos; é biodegradável, devido a presença de quitinase amplamente distribuída na natureza e encontrado em bactérias, fungos e plantas, e no sistema digestivo de muitos animais. As quitinases estão envolvidas na defesa contra a invasão de bactérias. As lisozimas obtidas a partir do ovo branco, figo e papaya, degradam a quitina e a parede celular bacteriana. Foi demonstrado que um certo grau de desacetilação é necessário para permitir a hidrólise da quitina.

A quitina apresenta grande variedade de usos, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Entretanto, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, que pode ser utilizada em diversas aplicações.

A quitosana é produzida comercialmente pela desacetilação da quitina, com a hidrólise dos agrupamentos acetamida ( $\text{NHCOCH}_3$ ) para grupamentos amina ( $\text{NH}_2$ ).

A quitina em especial se mostra mais favorável à aplicação em biomateriais devido ao grupamento acetamida, presente em maior quantidade em sua estrutura, comparado com a quitosana. Este grupamento é muito similar à ligação amida presente nas proteínas que constituem o tecido vivo, fazendo a quitina ser mais biocompatível que a quitosana. O grupamento amina, presente em maior quantidade na quitosana, tem ação hemostática quando implantada como biomaterial.

Esses dois polímeros, quitina e quitosana, nativos ou quimicamente modificados ocupam uma extensa área de aplicação em vários tipos de indústrias e tecnologias como também na medicina devido às características físico-químicas significativas e convenientes.

Tanto a quitina como a quitosana apresentaram baixa toxicidade em ensaios de laboratório [74], também atividade farmacológica como aceleradores de cicatrização em pacientes diabéticos [74],[75]. Lentes de contato feitas a partir da quitina são mais biocompatíveis com relação às produzidas por plásticos sintéticos [77]. Produtos baseados em quitina existem atualmente no mercado, sob a forma de pó finamente dividido, tecidos-não-tecidos, esferas microporosas, géis liofilizados, laminados e filmes transparentes. Derivados da quitina em solução salina podem ser administrados por via intramuscular ou endovenosa [78].

Outro fator importante deve-se ao fato da quitina e a quitosana serem essencialmente não digeridas em humanos, já que nós não possuímos em nossa flora intestinal, bactérias que contenham quitinases e quitosanases [79],[80],[81]. Tais enzimas estão presentes em baixas concentrações na saliva e nos fluidos estomacais humanos, degradando quitina e quitosana em pequena extensão. A degradação hidrolítica também ocorre no estômago, em pH entre 1 e 2 [82].

Os efeitos dietéticos da quitina e da quitosana em animais de teste têm sido examinados em vários estudos. Coletivamente estes indicam que a toxicidade da quitosana é relativamente baixa e esta apresenta substancial atividade hipocolesterolêmica. A quitina parece ter menos efeitos tóxicos que a quitosana, no entanto não tem demonstrado atividade hipocolesterolêmica consistente. Vale enfatizar que estudos em ratos têm sugerido que grandes quantidades de quitosana (>2.5% da dieta total) são necessárias para se observar uma significativa redução do colesterol. Entretanto, o consumo de quitosana a níveis maiores que 5% podem causar efeitos adversos tais como alterações hepáticas (hepatomegalia), renais, redução nos níveis de hemoglobina, hipotrofia, diminuição dos níveis de proteínas sanguíneas, impedimento da conversão do colesterol a coprostanol, que

normalmente ocorre devido à ação das bactérias da flora intestinal. [83]. Apesar do uso da quitina e da quitosana em alimentos serem muito limitados, patentes e artigos científicos têm sido publicados sobre este assunto nos últimos anos. Dados os efeitos hipocolesterolêmicos apresentados e a recente demonstração por japoneses que a quitina pode ser incorporada em processos alimentares parece provável o seu uso como ingrediente alimentício [83]. Atualmente não parecem existir comercialmente disponíveis alimentos que contenham quitina como aditivo, sendo que os que utilizam a quitosana, hoje, são muitos poucos, por exemplo, alguns biscoitos dietéticos, macarrões e vinagres modificados [79]. Aplicações da quitina e derivados podem ser classificadas de um modo geral em membranas para rim artificial, sistemas para liberação controlada de fármacos, suturas absorvíveis, anticoagulante para sangue (tipo heparina), pele artificial, e aplicações anti microbianas [78],[84]. Recentemente foi reportado um sistema de liberação controlada de fármacos por microesferas de quitina/poli(ácido láctico) [84].

### 3.7. Policaprolactona

Um dos mais promissores polímeros sintéticos biodegradáveis é a policaprolactona (PCL) (Figura 07), que é biocompatível, flexível, apresenta baixo ponto de fusão (67°C) [85],[86] e baixo módulo, tipicamente 350-450 MPa [87],[88] que a inviabiliza como substituto ósseo. É um poliéster alifático linear semi-cristalino, está sujeito a biodegradação devido a susceptibilidade de suas ligações éster alifáticas à hidrólise. Os produtos gerados são metabolizados através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) ou eliminados diretamente pela secreção renal. Extensivos estudos de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados,

resultando na aprovação pelo órgão americano Food and Drug Administration (FDA) de um número de produtos médicos e liberadores de medicamentos [89],[90],[91],[92]. PCL é considerada um material compatível com o tecido macio e rígido, incluindo suturas reabsorvíveis, sistemas liberadores de fármacos, e como substituto ósseo de enxertia. Contudo, aplicações da PCL podem ser limitadas, porque as velocidades de degradação e reabsorção são menores do que as de outros poliésteres alifáticos, devido a sua hidrofobicidade e alta cristalinidade.

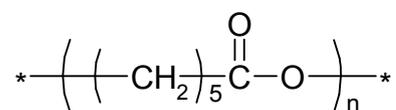


Figura 07 – Estrutura química da poli (ε-caprolactona), PCL.

### 3.8. Poliuretano

A descoberta do grupo de polímeros atualmente conhecido por poliuretanos, foi feita pelo Dr. Otto Bayer e seus colaboradores da I. G. Farbeindustrie, Leverkusen, Alemanha, atual Bayer A. G., como uma resposta ao trabalho concorrente sobre poliamidas (Nylons) realizado por Carothers para a Du Pont, USA [93].

Os poliuretanos (PU) são formados pela reação de adição entre um isocianato, composto que contém o grupo [-N=C=O] e um hidrogênio ácido (H+) existente em um outro composto. Esta reação de adição ocorre através da dupla ligação C=N, sendo a reação mais importante a que ocorre entre um isocianato e um composto que contenha o grupo -OH (hidroxila), formando ésteres carbâmicos, denominados uretanos, cujo grupo característico é mostrado na Figura 08 [94].

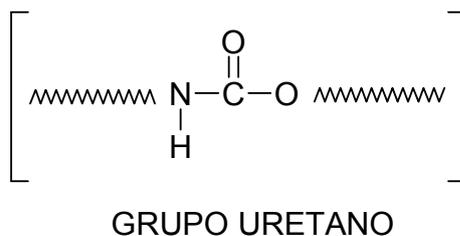


Figura 08 – Grupo característico dos poliuretanos.

Estes polímeros são industrialmente importantes devido à variedade dos grupos presentes entre as ligações uretânicas, os quais podem dar origem aos mais diversos produtos, como elastômeros, plásticos, espumas, e pela possibilidade de polimerização controlada pela formação de intermediários estáveis (pré-polímeros). Estes permitem a adaptação do processo e da composição para obtenção de materiais que possam cumprir as mais variadas exigências. A forma mais simples de um poliuretano é a linear, na qual o composto hidroxilado e o isocianato possuem funcionalidade igual a dois. Porém, ao incorporar materiais com funcionalidade maior que dois, são produzidos poliuretanos reticulados (ou entrecruzados), os quais são resistentes mecânica e termicamente, além de exibirem maior resistência aos solventes, visto que são insolúveis. Por estas razões, os poliuretanos podem ser sintetizados com grande variação nas propriedades físicas [95],[96].

A química envolvida na síntese de um poliuretano baseia-se nas reações do grupo isocianato. Os grupos isocianatos são extremamente reativos e facilmente convertidos em grupos uretânicos sem formação de subprodutos. A alta reatividade dos isocianatos também pode gerar problemas, como danos à saúde e possíveis reações laterais não desejadas como a reação com a umidade do ar ou com grupos uretânicos ou uréia da cadeia polimérica previamente formada.

Os elastômeros de PU são uma classe de materiais que apresentam uma deformação altamente reversível. Este tipo de comportamento requer uma alta

flexibilidade das cadeias, isto é, um baixo grau de interação intermolecular e a presença de entrecruzamentos, os quais previnem uma deformação plástica causada pelo deslizamento das cadeias. A natureza do entrecruzamento pode ser física ou química, sendo ambas utilizadas nos elastômeros. O entrecruzamento físico é obtido através da formação de ligações de hidrogênio, as quais levam à formação de domínios rígidos. Já o entrecruzamento químico é introduzido via constituintes tri- ou multifuncionais. Uma vez introduzido, o entrecruzamento químico produz uma rede irreversível, a qual não pode ser facilmente destruída por tratamento térmico, como ocorre no entrecruzamento físico [97].

Poliuretanos com ligações cruzadas físicas ou virtuais constituem um tipo de copolímeros em bloco, formados por segmentos flexíveis e rígidos alternados. Devido à diferença de polaridade e natureza química dos blocos, estes se separam originando duas fases, formadas pela agregação dos segmentos rígidos e flexíveis. Os segmentos rígidos, contendo os grupos uretânicos associam-se em domínios altamente coesos devido à formação de ligações de hidrogênio (Figura 09). Assim, os segmentos rígidos atuam como pontos de entrecruzamento físico. Poliuretanos segmentados são desta forma, polímeros constituídos de duas fases (bifásicos), sendo que as propriedades do material são afetadas pela extensão da separação [97].

Além da razão rígido/flexível entre segmentos e a natureza química destes, a morfologia dos poliuretanos é afetada por uma série de outros fatores, tais como condições de polimerização, reatividade relativa entre as hidroxilas do macroglicol e as do extensor da cadeia, compatibilidade entre os reagentes, efeitos de concentração, partição dos reagentes entre fases e viscosidade, para citar os mais

relevantes. A correlação entre algumas destas variáveis com a morfologia final e comportamento físico destes materiais tem sido objeto de intensa pesquisa [97].

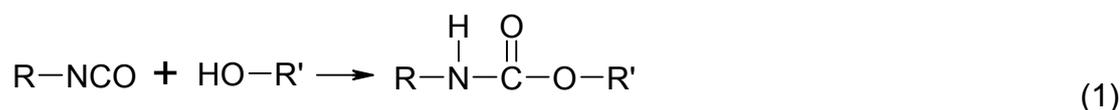
Os elastômeros de PU são obtidos através de dois procedimentos básicos: a técnica do pré-polímero e o método em uma etapa (one-shot process). Dentro do método do pré-polímero, um diisocianato e um diol de cadeia longa são misturados em quantidades pré-estabelecidas, de modo a se obter uma concentração específica de segmentos rígidos e flexíveis, sendo que a reação é conduzida até que todos os grupos hidroxilas sejam consumidos. Quando um excesso de grupos isocianatos é utilizado, a molécula de pré-polímero formada tem a terminação NCO, sendo que a razão  $[OH]/[NCO]$  determina a massa molecular do pré-polímero [97].



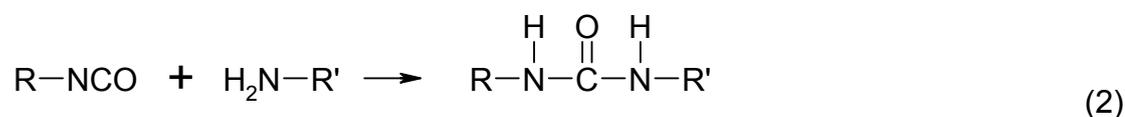
Figura 09 – representação esquemática da separação de fases em poliuretanos segmentados.

As principais reações da química dos poliuretanos são as seguintes [97]:

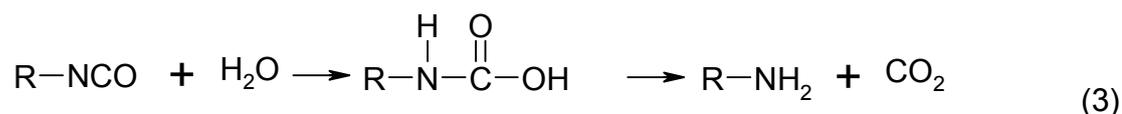
- Formação da ligação uretânica



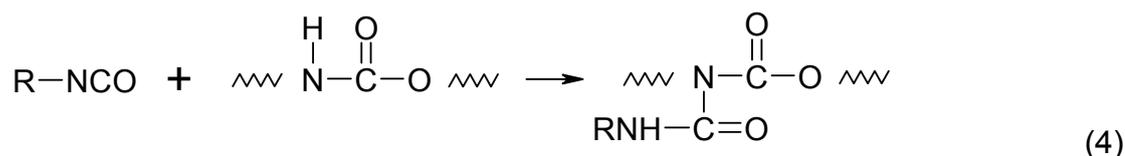
- Formação da ligação uréia



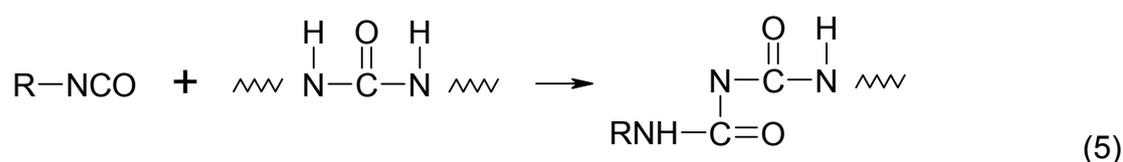
- Reação com água



- Formação de alofanato



-Formação de biureto



Para preparar um segmento de PU linear (sem ligações cruzadas), as reações 4 e 5 devem ser eliminadas, sendo que a reação 2 é uma consequência da reação 3. Alofanatos são formados a uma velocidade de reação considerável em temperaturas entre 120 e 150°C, sendo que esta reação também pode ocorrer a temperaturas mais baixas quando um excesso de isocianato está presente. A formação de biureto ocorre na mesma faixa da temperatura que a de alofanato. A propriedade básica dos grupos alofanato e biureto é sua baixa estabilidade térmica, desde que a dissociação aos componentes de partida ocorre a partir de 150°C. Isto significa que o material que foi quimicamente entrecruzado com grupos alofanato e biureto irá sofrer quebra destas ligações, visto que o entrecruzamento é um processo reversível acima desta temperatura. Todas as temperaturas citadas acima podem ser consideradas como aproximadas, desde que as reações químicas

podem ocorrer em velocidades baixas a baixas temperaturas. Assim, o tempo é um fator tão importante quanto os limites de temperaturas utilizados [97],[98]:

Devido à versatilidade de estruturas que podem ser obtidas através da reação de isocianatos com álcoois ou aminas, os poliuretanos têm sido bastante explorados na síntese de polímeros biodegradáveis [99],[100]. Alguns exemplos incluem poliuretanos preparados utilizando-se um extensor de cadeia por reação de L-fenilalanina e 1,4-ciclohexano di-metanol [101]. Poliuretanos contendo grupamentos ibuprofeno pendentos [102], contendo mono- e di-sacarídeos [103], ou ainda sintetizados na presença de componentes vegetais tais como melão, lignina, madeira, café moído foram preparados com vistas à produção de estruturas biodegradáveis de baixo custo e com boas características de desempenho mecânico [104]. Correlações entre biodegradabilidade e composição foram estabelecidas introduzindo-se variações estruturais nestes polímeros, através do uso de diferentes di-isocianatos, macroglicóis e extensores de cadeia, avaliando-se a biodegradabilidade em função da composição [105].

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Materiais e métodos

#### 4.1.1. Síntese do pré-polímero de poliuretano (PU)

Para a síntese do poliuretano foram utilizadas a PCL (Acros;  $M_n = 2000$ ) seca à vácuo (5 mmHg) a temperatura de 70°C por 24 horas. O diisocianato de tolueno, TDI (composto de uma mistura de isômeros 2,4/2,6 na proporção 80/20) (Bayer do Brasil) destilado sob pressão reduzida (5 mmHg) e armazenado em refrigerador. O Solvente utilizado para a reação de síntese do PU, o N-metilpirrolidona, NMP (Vetec), foi primeiramente tratado com  $MgSO_4$  anidro e depois desta secagem inicial, o solvente foi tratado com hidreto de sódio. Em seguida, o NMP foi destilado sob pressão reduzida (5 mmHg). O isopropanol (Vetec) foi utilizado após a secagem e destilação. Para a solubilização da quitina (Fluka) foram utilizados o NMP e o cloreto de lítio (Vetec).

O pré-polímero foi sintetizado adaptando-se o procedimento relatado por Simas et al [106], descrito a seguir: 1 mol de poli( $\epsilon$ -caprolactona) diol, PCL ( $M_w = 2000 \text{ g.mol}^{-1}$ , Acros), dissolvido em NMP, reagiu com excesso de TDI (5% em massa), a 65°C e sob atmosfera de nitrogênio, durante 2 horas. Na preparação do composto modelo do PU, adicionou-se excesso de isopropanol para reagir com as terminações NCO livres do pré-polímero. Esta reação está representada na Figura 10.

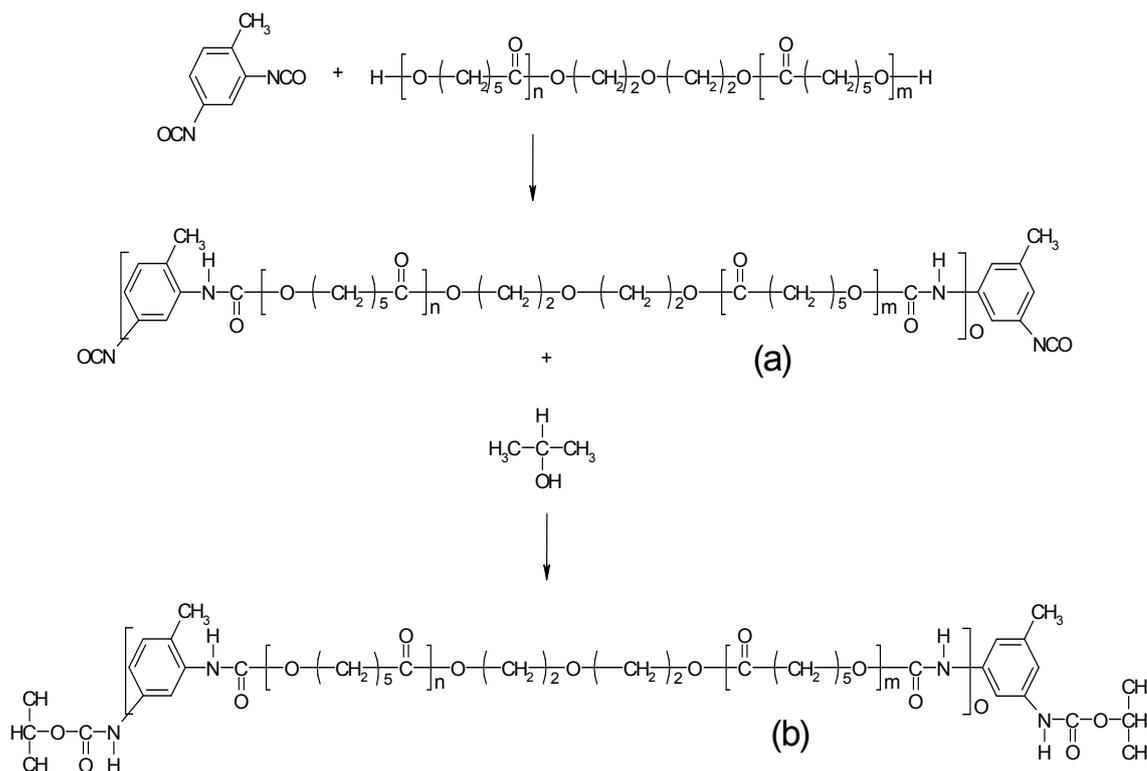


Figura 10 – Síntese do poliuretano (PU): (a) pré-polímero e (b) composto modelo.

#### 4.1.2. Síntese da rede poliuretano/quitina (rede PU/QTN)

A rede PU/QTN foi obtida através da reação entre cadeias de PU com terminação NCO (pré-polímero uretânico, Figura 10 (a) e quitina (Fluka-Mr=400.000), previamente dissolvida em NMP com 5% de cloreto de lítio. O pré-polímero uretânico utilizado em todas as sínteses das redes foi preparado imediatamente antes da adição da quitina, a fim de garantir o teor de NCO livre. Foram preparadas redes de PU/QTN onde a concentração máxima de PU adicionada na quitina era de 70% (m/m).

O tempo de reação utilizado na preparação das redes foi de 4 horas, sendo que neste período estava incluída a síntese do pré-polímero uretânico. Após o término da reação o produto foi vertido sobre uma placa de vidro e curado a uma temperatura de 70°C por 48 horas. Em seguida as amostras foram lavadas com água destilada, para a retirada do cloreto de lítio e do solvente restante nos filmes.

#### 4.2. Preparação das blendas de poliuretano/quitina (blendas PU/QTN)

As blendas PU/QTN foram obtidas através da mistura física dos dois polímeros, o PU dissolvido em NMP e a quitina em NMP com 5% de cloreto de lítio. Estas foram preparadas, a fim de obter-se uma comparação com as redes, em termos de propriedades físicas.

Após 24 horas de agitação magnética da mistura, a solução foi vertida em substrato de vidro, e seca em estufa a 70°C por 48 horas. Assim como nas redes as blendas foram lavadas com água destilada.

Tanto nas redes como nas blendas foram obtidos filmes com composições de PU/QTN (m/m) nas proporções: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30.

#### 4.3. Tratamento térmico dos filmes de PU/QTN

Primeiramente os filmes foram colocados na estufa a vácuo (5 mmHg) a 80°C por 1 hora, resfriados até a temperatura ambiente, em seguida levado a temperatura de -40°C por 24 horas e novamente a temperatura ambiente no dessecador para análise de DMTA.

#### 4.4. Ensaio biológicos

Várias técnicas de avaliação da adequação de um novo material para aplicações biomédicas têm sido desenvolvidas numa tentativa de simular do desempenho do material após sua inserção no corpo humano. Essas técnicas compreendem testes *in vitro* e testes *in vivo*. Para testes *in vitro*, são utilizados

normalmente testes de bioatividade em líquido corporal simulado e estudos em cultura de células. Os estudos em cultura de células normalmente compreendem testes de citotoxicidade, medições bioquímicas de atividade celular, avaliação de proliferação, crescimento e morfologia celular.

#### 4.4.1. Ensaio de grau de hidratação e degradação *in vitro* – Solução de HBSS.

Para a determinação do grau de hidratação dos filmes, estes foram previamente pesados, mergulhados na solução por 48 horas, eliminado o excesso de solução superficial para posterior pesagem. O cálculo para a determinação de quanto o filme absorveu água é a seguinte:

$$\% \text{água} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

onde  $m_1$  e  $m_2$  representam as massas das amostras secas e após imersão na solução.

Com os ensaios de degradação pretendeu-se estudar o comportamento de biodegradação do material num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo, que ocorrem quando estes materiais são colocados em contato com os fluidos do corpo humano.

Foi preparada a solução de HBSS (*Hanks's balanced salt solution*), solução fisiológica que simula a concentração salina do soro humano, tendo a seguinte composição em sais (Vetec) (tabela 04):

O pH da solução foi equilibrado para 7,4. A solução foi filtrada em filtro 0,22  $\mu\text{m}$  (TPP) para a esterilização do mesmo.

Tabela 04 – Composição da solução HBSS

Compostos	Concentração (g/dm <sup>3</sup> )
NaCl	8,0
CaCl <sub>2</sub>	0,14
KCl	0,4
NaHCO <sub>3</sub>	0,35
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,06
Glucose	1,0

Para os ensaios de degradação as amostras foram escolhidas de forma a apresentarem uma área específica de exposição à solução de aproximadamente 0,2 cm<sup>-1</sup> (área/volume) para um volume final de 30 cm<sup>3</sup>, estas foram esterilizadas em autoclave (120°C) por 30 min, imersos na solução de HBSS a 37°C, em recipiente individuais de 50 cm<sup>3</sup>, e com agitação (150 rpm) por 120 dias.

Os ensaios foram realizados em duplicatas.



Figura 11 – Amostras (seção quadrada utilizadas durante os ensaios de degradação).

#### 4. 4. 2. Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade

##### - Cultivo celular:

Foram utilizadas células Vero, linhagem de células epiteliais provenientes de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), ATCC no CCL-81 (ATCC [107]), doadas pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – CDME/SEAB -

PR. As células Vero foram mantidas em meio meio Eagle (*Minimum essential medium eagle*, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell), enrofloxacin (Bayer, 10 mg/L), penicilina G-potássica (Cultilab, 100.000 UI/L), sulfato de estreptomicina (Cultilab, 100 mg/L) e anfotericina B (Crisália, 1,25 mg/L), em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Realizaram-se as trocas do meio sempre que houve acidificação e os repiques foram realizados sempre que a cultura atingiu a confluência. Para avaliar a viabilidade celular e adequação do inóculo para os testes, após 48 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, utilizou-se o método de exclusão pelo Azul de Tripán (Vetec) onde os meios de cultura tripsinizados foram coletados, e as células viáveis foram contadas em Câmara de Neubauer.

- Avaliação da citotoxicidade dos produtos liberados no ensaio de degradação com solução de HBSS:

Em termos biológicos, sabe-se que um material biomédico ideal não deve liberar produtos tóxicos e nem mesmo causar reações adversas, o que pode, em primeira instância, ser avaliado através de testes de citotoxicidade *in vitro*. Para este ensaio foi utilizada uma cultura de células Vero. O meio de cultura utilizado foi o Eagle suplementado com 10% de SFB. A técnica empregada no ensaio de citotoxicidade, desenvolvida por Mosmann [108], utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo), que é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas, formando o precipitado azul denominado formazan, detectável espectrofotometricamente.

Os filmes de quitina pura, poliuretano puro, redes de quitina-poliuretano (10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30) foram colocados em contato com

solução fisiológica simulada esterilizada (HBSS, conforme descrito anteriormente). A citotoxicidade do material liberado no meio foi avaliado sobre células Vero.

As células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços (10.000 células viáveis/poço, 200  $\mu$ L/poço, meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos) por 48 h em estufa de CO<sub>2</sub> (5,0%) a 37°C. Após o fechamento da monocamada celular, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados:

- controle negativo: meio Eagle 2% de soro fetal bovino e ATBs;
- controle HBSS (sem ter entrado em contato com os filmes): HBSS1 (diluído 1,5x); HBSS2 (diluído 3x), HBSS3 (diluído 6x), HBSS4 (diluído 12x), HBSS5 (diluído 24x);
- meio (HBSS) que ficou em contato com os filmes de quitina pura e poliuretano puro, redes quitina-poliuretano (10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30), nos quais foram feitas a mesma diluições: 1 (diluído 1,5x); 2 (diluído 3x), 3 (diluído 6x), 4 (diluído 12x), 5 (diluído 24x).

Para as amostras onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de absorvâncias foi determinada a porcentagem de células Vero vivas em relação ao controle negativo (células em contato apenas com meio de cultura), considerando 100% de viabilidade a média de absorvância do controle negativo.

Teste F (Fisher Snedecor):

$F_{\text{tabelado}}$  (graus de liberdade do numerador =  $n_1 = 8$ , graus de liberdade do denominador =  $n_2 = 8$ ) = 3,44

$F_{\text{calculado}}$  = maior variância/menor variância

Caso o  $F_{\text{calculado}}$  seja maior ou igual a 3,44, as variâncias das amostras são diferentes e, portanto, os graus de liberdade (V) que serão empregados no teste t deverão ser recalculados pela equação:

$$V = \left[ \frac{(\omega_1 + \omega_2)^2}{\frac{\omega_1^2}{n_1 + 1} + \frac{\omega_2^2}{n_2 + 1}} \right] - 2 \quad (2)$$

onde:

$s_2$  = variância amostral,

$$\omega_1 = \frac{s_1^2}{n_1} \quad (3)$$

$$\omega_2 = \frac{s_2^2}{n_2} \quad (4)$$

Teste t (*student*) bilateral:

$t_{\text{tabelado}}$  (graus de liberdade =  $n_1 + n_2$  = nível de significância = 0,05, = 2,14).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\overline{X_2} - \overline{X_1}}{\sqrt{s_p^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (5)$$

onde  $X_2$  = média do controle de adesão total e  $X_1$  = média da amostra de filme.

A variância ponderada ( $S_p$ ) é calculada pela equação:

$$s_p = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (6)$$

Caso o  $t_{\text{calculado}}$  seja maior ou igual a 2,14, isso indica que há diferença estatisticamente significativa entre as médias de absorvância do controle e da amostra.

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi – Departamento de Patologia Básica – UFPR.

- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das soluções de HBSS (ensaio de degradação):

O ensaio de biocompatibilidade *in vitro* foi realizado conforme descrito por Sarasam et al [109], através da quantificação pelo método do MTT já descrito anteriormente.

Os filmes de quitina-poliuretano (10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30), além dos filmes de quitina pura foram cortados na forma dos poços das microplacas utilizadas (diâmetro do poço = 6,2mm) e previamente autoclavados (121°C, 15min) para a esterilização antes da adição no fundo dos poços das microplacas esterilizadas (TPP). O filme de PU foi obtido pela fusão direta do material dentro dos poços (60°C), sendo depois esterilizado por meio de radiação ultravioleta (40min).

Como controle de total adesão das células Vero (controle positivo) foi utilizado como substrato a própria placa de poliestireno (n=8 poços), contendo somente células Vero (20.000 células viáveis/poço, sendo a contagem de células viáveis realizada pela adição de azul de tripan (Vetec) em câmara de Neubauer). Para as amostras (quitina pura, poliuretano puro, filmes de quitina-poliuretano), foram realizados controles negativos (n=8), onde adicionou-se apenas meio de cultura (200µL) e os testes, onde adicionaram-se células Vero (20.000 células/poço, 200 µL/poço). As células Vero foram deixadas em contato por 48 h, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5,0%) a 37°C. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 50 µL de solução de MTT (1 mg/mL), mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> (5,0%) por 3h a 37°C. O MTT foi retirado e os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO (50 µL/poço), sendo a leitura da absorbância realizada em

leitadora de microplacas Thermoplate, modelo TP-reader, no comprimento de onda de 540nm (subtraindo a absorbância de interferência da placa em 630 nm).

As absorbâncias das amostras de filmes com células foram subtraídas das absorbâncias dos controles de filmes sem células. Para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre a média de absorbância do controle de adesão total (células cultivadas diretamente sobre a placa) e as médias de absorbância das células cultivadas sobre os filmes, foi aplicado o teste t (Student), além do teste F (Fisher-Snedecor) para avaliar diferenças entre as variâncias das amostras.

Para as amostras onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de absorbâncias do controle de adesão total e dos filmes, foi determinada a porcentagem de células Vero aderidas aos filmes em relação ao controle de adesão total, considerando 100% de adesão a média de absorbância do controle de adesão total.

Os experimento de biocompatibilidade foram realizados no Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi – Departamento de Patologia Básica – UFPR.

#### 4.5. Ensaio *in vivo*

##### 4.5.1. Procedimento cirúrgico

As cirurgias foram realizadas no Biotério da Universidade do Sagrado Coração, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração da medicação pré-anestésica de relaxante muscular (Diazepan), na dose de 0,1 mL por animal, seguido pela administração intramuscular do anestésico

geral (Ketamina) na dose de 0,1 ml por animal (Figura 12 (a)). Após este procedimento, foi realizada a tricotomia da região a ser operada (dorso) (Figura 12 (b)) e a região passou pelo processo de assepsia com PVPI (polivinilpirrolidona) tópico (Figura 12 (b)). Realizou-se uma incisão linear no dorso do animal, de aproximadamente 1 cm, com tesoura reta (Figura 12 (c)). Após a divulsão dos tecidos (Figura 12 (d)), o material foi a rede PU/QTN (50/50) (Figura 12 (e)), e suturado com fio de seda, logo a seguir (Figura 12 (f)). Após 15 dias e 30 dias, os animais implantados com a membrana de quitina foram sacrificados com superdosagem anestésica, o material implantado foi coletado (Figura 12) e fixado em formol 10% para confecção de lâminas histológicas.

#### 4.5.2. Análise histológica

A quitina, em pequenos fragmentos, foi implantada no tecido subcutâneo do camundongo. Após 15 e 30 dias o material foi removido cirurgicamente (Figura 13). A peça cirúrgica foi cuidadosamente removida tendo-se o cuidado de retirar todo o tecido que circundava o material.

As peças cirúrgicas foram fixadas em formol a 10% por 5 dias. Em seguida as peças foram recortadas e submetidas a desidratação em soluções de álcool em concentração crescente e, em seguida, clarificadas em xilol. Após a clarificação as peças foram incluídas em parafina e cortadas em fatias de 6 micrômetros de espessura. Em seguida procedeu-se a coloração com a técnica da hematoxilina e eosina.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 12 – Procedimento cirúrgico: (a) anestesia do animal, (b) tricotomia (c) assepsia com PVPI, (d) incisão no dorso do animal, (e) Divulsão da pele, (f) implante filme (rede) PU/ QTN- 50/50.

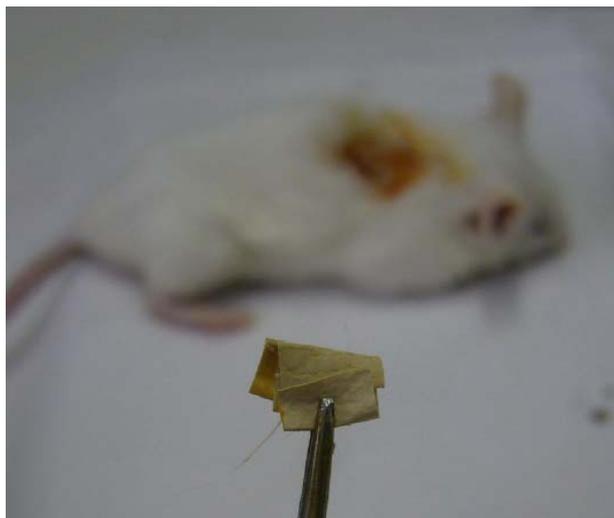


Figura 13 – Material coletado rede PU/QTN (50/50).

#### 4.6. Caracterização dos materiais sintetizados

##### 4.6.1. Determinação do $M_n$ e $M_w$ do PU

Foi utilizado um cromatógrafo Waters de permeação em gel equipado com duas colunas HR4E e HR5E de poliestireno e uma bomba modelo 1500. O solvente utilizado foi o DMF, em um fluxo de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , a  $270^\circ\text{C}$  sendo as colunas conectadas a um detector duplo (UV, índice de refração) e a calibração foi baseada nos padrões de poliestireno.

##### 4.6.2. Caracterização espectroscópica

Para caracterizar os materiais poliméricos através da espectroscopia na região do infravermelho utilizou-se um espectrofotômetro Biorad FTS 3500GX através do uso de pastilhas de KBr (Acros), acumulação de 16 medidas e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.6.3. Caracterização térmica

Para as medidas de termogravimetria (TGA) realizadas, foi utilizado o equipamento Netzsch modelo 209, com aquecimento programado de 20°C/min com um fluxo de nitrogênio de 15 mL/min, partindo a temperatura ambiente até 550°C e de oxigênio até 800°C; Os ensaios de DSC foram realizados em equipamento Netzsch DSC 204 F1, na faixa de temperatura de -30 a 120°C, em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), com taxa de aquecimento de 10°C/min.

Para a caracterização termo-dinâmico mecânica foi utilizado um equipamento Netzsch modelo DMA 242, no modo de tração. Na faixa de temperatura de -100 a 200 °C, frequência de 1 Hz, atmosfera de N<sub>2</sub> a 50 mL/min e taxa de aquecimento de 3°C/min.

#### 4.6.4. Caracterização morfológica dos materiais por microscopia eletrônica de varredura

Os filmes de PU, quitina, blendas e redes de PU/QTN foram metalizados com ouro no aparelho BAL-TEC modelo, SCD 005. As micrografias foram realizadas no equipamento PHILLIP modelo XL030, com ampliações de 1000x e 2000x, utilizando feixes eletrônicos com potenciais de 10 e 20 kV.

#### 4.6.5. Cristalinidade dos filmes

As análises dos filmes por difração de raios X foram realizadas em um difratômetro de raios X, Shimadzu, XRD-6000, sob as seguintes condições: voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, 2θ variando de 5 a 60°, velocidade de varredura de 1°/s, radiação Cu-Kα=1,5418° Å. Para a realização dos ensaios, as amostras foram fixadas em um suporte de alumínio.

A cristalinidade das amostras foram determinada pelo Data Collection of Joint Comitee on Powder Diffraction Standard, PCPDWIN version 2.2, June 2001.

#### 4.6.6. Caracterização mecânica

Para a caracterização mecânica de tração, cinco amostras de cada filme foram testadas em um equipamento Instron 4467, utilizando uma célula de carga de 10 kN, na velocidade de 5 mm/min e comprimento inicial ( $L_0$ ) de 10 mm, na temperatura ambiente.

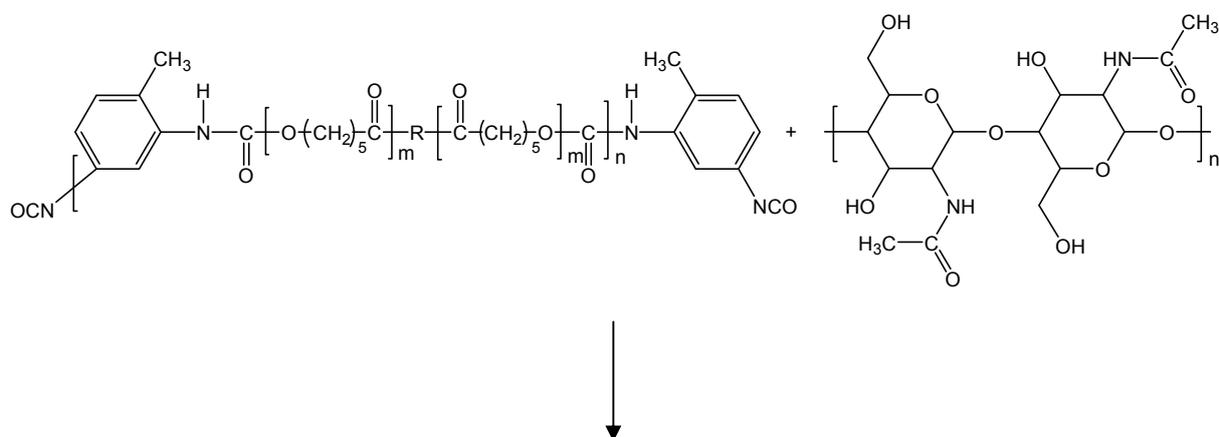
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Determinação da massa molar do poliuretano

Através da cromatografia de permeação em gel (GPC), foi determinado para PU uma massa molar ponderal média ( $M_w$ ) igual a 66.000 e uma massa molar numérica média ( $M_n$ ) de 48.000. A polidispersão do material foi de 1,4.

### 5.2. Síntese das redes e blendas de Poliuretano/Quitina

A Figura 14 apresenta uma proposta de estrutura para a rede de Poliuretano/Quitina sintetizada neste trabalho. Neste esquema observa-se que os grupamentos NCO do pré-polímero de PU reagem com os grupamentos amida e as hidroxilas da quitina. Considerando que o tamanho médio dos segmentos poliuretânicos foi mantido constante, a distância média entre os pontos de entrecruzamento (densidade de ligações cruzadas) foi variada sistematicamente através da variação da razão PU/QTN na síntese.



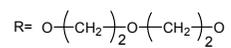
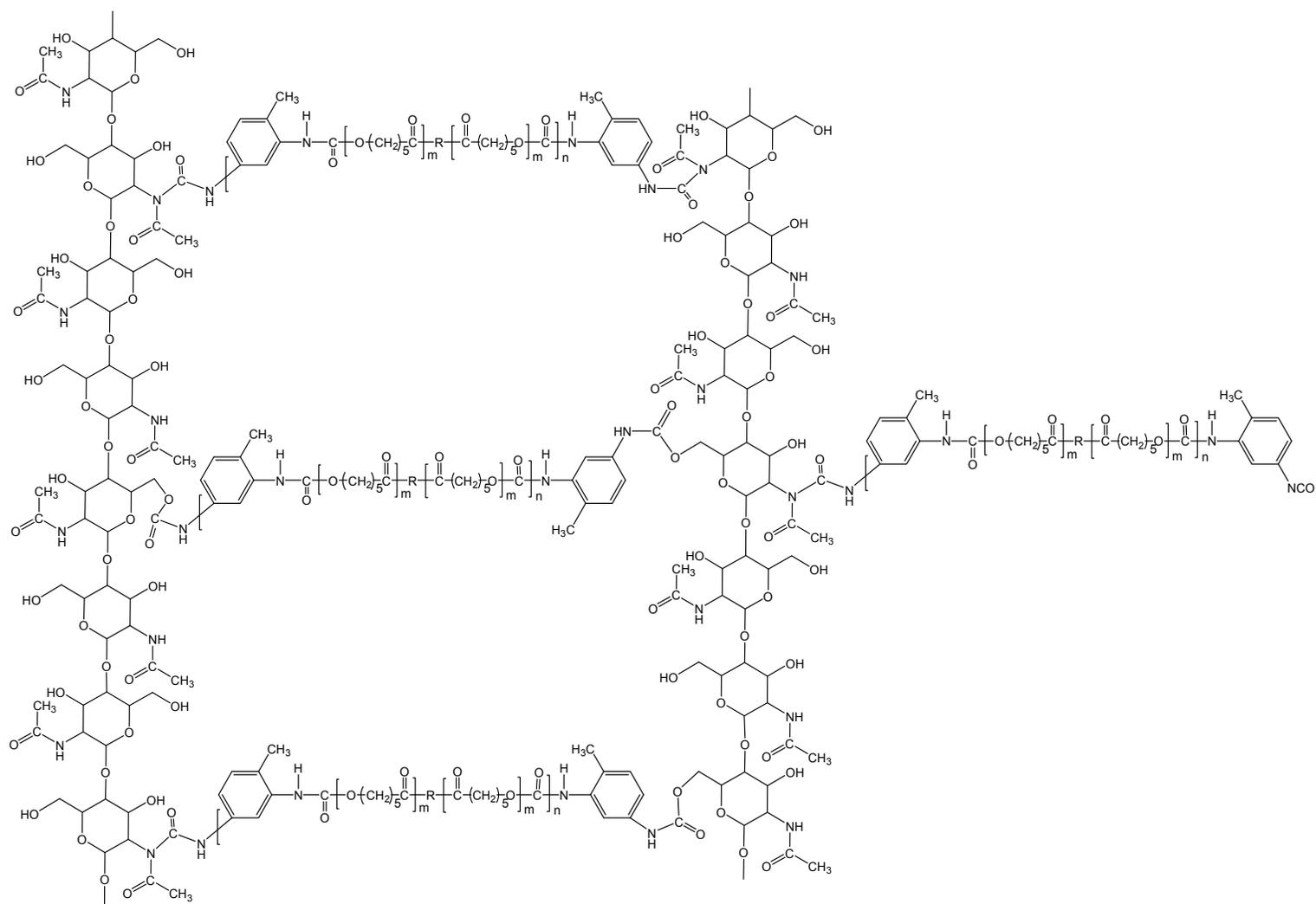


Figura 14 – Representação da estrutura proposta para a rede PU/QTN.

### 5.3. Caracterização espectroscópica dos materiais

#### 5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 15 apresenta o espectro de infravermelho do PU sintetizado. As atribuições dos picos principais estão relacionados na Tabela 05.

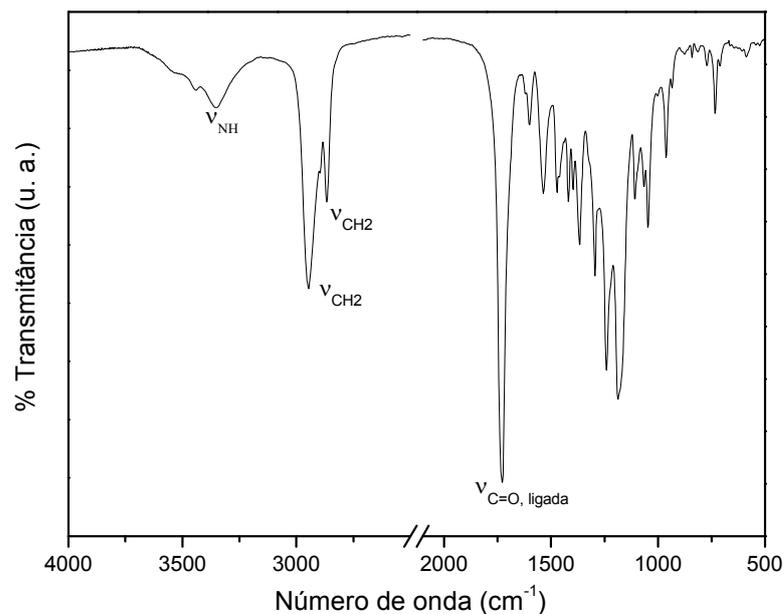


Figura 15 – Espectro de IV do filme de PU.

Tabela 05 – Atribuições das principais absorções de espectro do PU.

Bandas/cm <sup>-1</sup>	atribuição
3352	ν (N-H) de amina (H livre)
2945, 2868	ν <sub>assim.</sub> CH <sub>2</sub>
1724	ν(C=O) uretânico (carbonila ligada)
1600, 1535	ν(C=C) de anel benzênico
1240, 1184	ν(C-O-C)
732	ν (C-H) de anel aromático

É importante ressaltar que nos espectro não foi detectado a presença de isocianato residual (2250 cm<sup>-1</sup>).

Analisando o espectro do filme de quitina (Figura 16), as absorções características deste polímero estão representadas na Tabela 06.

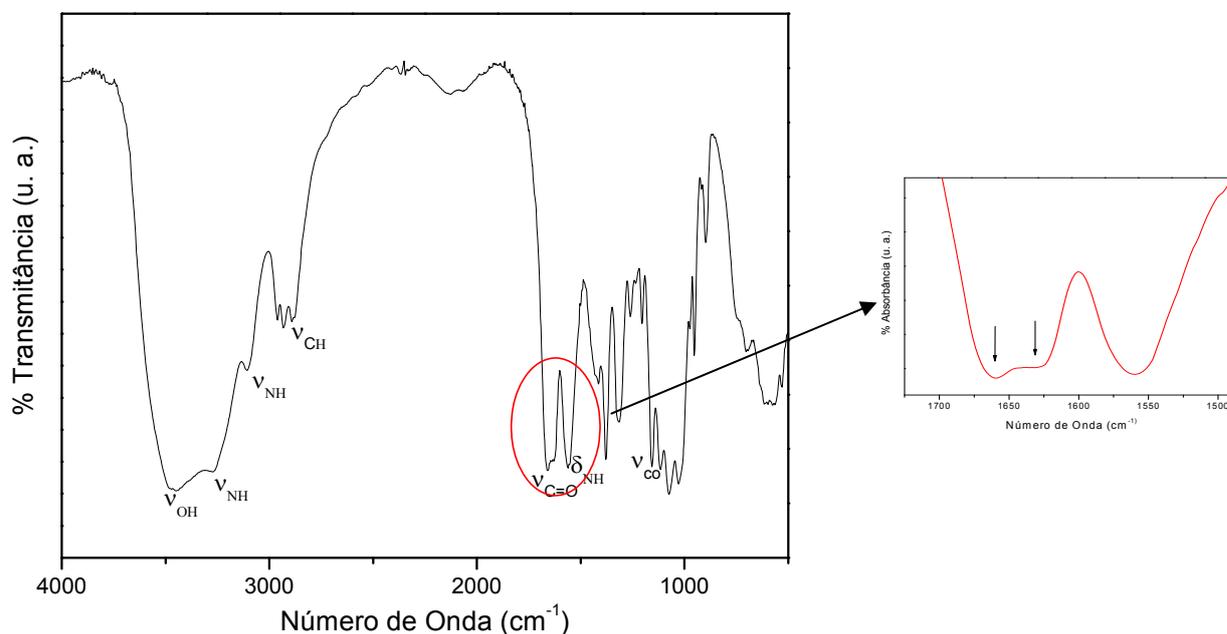


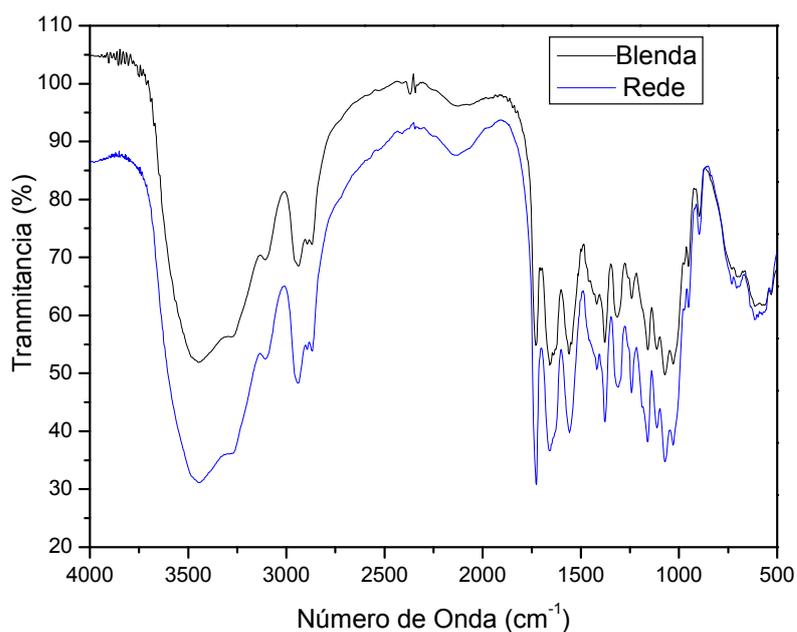
Figura 16 – Espectro de IV do filme de quitina.

Tabela 06 – Atribuições das principais absorções de espectro da quitina.

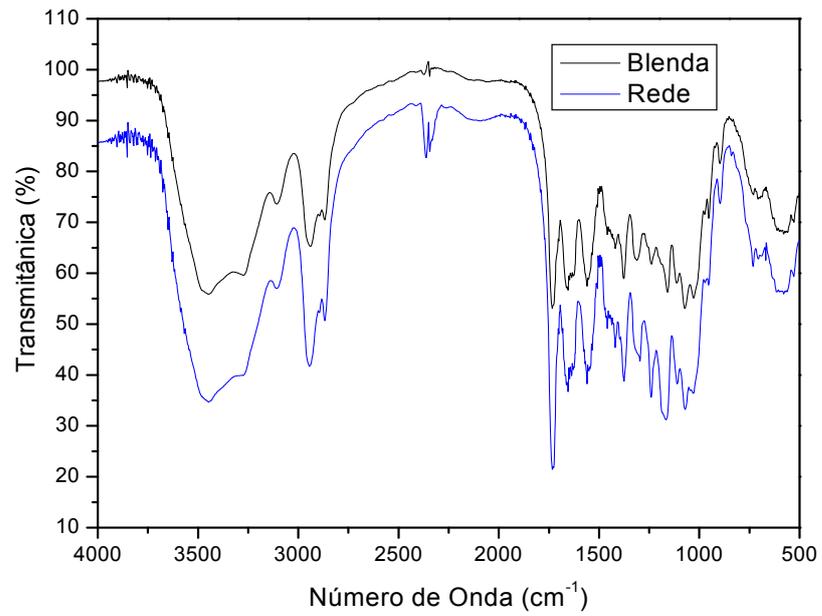
Bandas/cm <sup>-1</sup>	Atribuição
3455	ν (O-H)
3260, 3106	ν(N-H) de amida (H ligada)
2866	ν <sub>assim.</sub> CH <sub>2</sub>
1652, 1619	ν(C=O)
1558	δNH

A partir do espectro é possível determinar que a quitina utilizada neste trabalho foi a  $\alpha$ -quitina. Pois analisando a região onde ocorrem as bandas devidas as vibrações de deformação axial de C=O, o desdobramento da banda amida é observado no espectro da quitina (região ampliada). Uma banda em 1652 e 1619 cm<sup>-1</sup> são observadas no espectro de  $\alpha$ -quitina, o que não ocorre no caso da  $\beta$ -quitina, esta apresenta somente uma banda em aproximadamente 1660 cm<sup>-1</sup>.

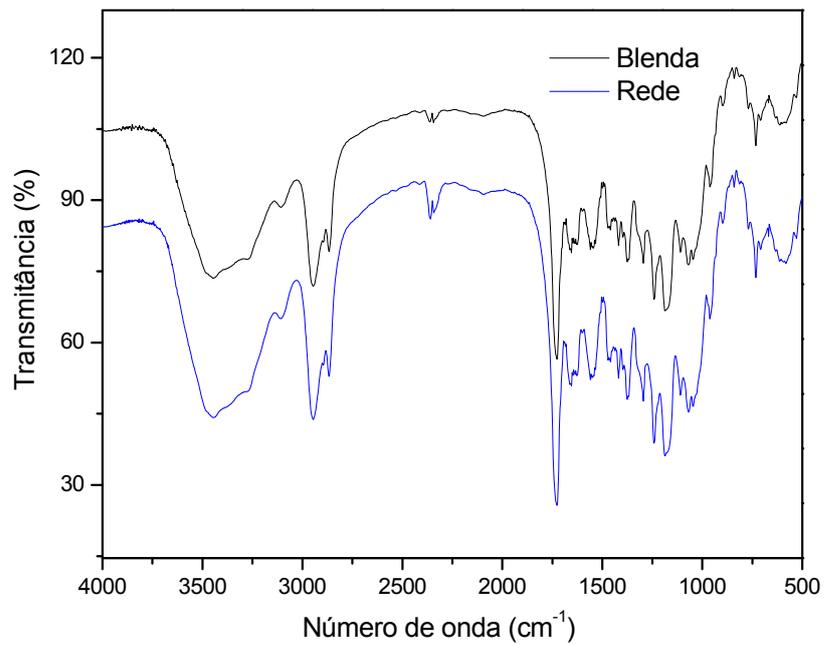
Pelos espectros de infravermelho das blendas e das redes (Figura 17), é importante notar que não foi possível detectar com a clareza necessária a absorção do grupamento uréia formado pela reação dos grupamentos isocianato terminais do PU com os grupamentos acetamido da quitina. Para comparação, foi sintetizada uma rede modelo a partir de quitina com TDI (Figura 18). No espectro relativo a esta (Figura 19) verifica-se que a carbonila sofre um deslocamento de 1731 (carbonila uretânica ) para  $1652\text{ cm}^{-1}$  característica de ligações do tipo uréia, o que não foi observado nos espectros das redes. Este efeito se deve à proximidade das bandas de amida, da quitina, da carbonila uretânica e da ligação uréia, que podem estar sobrepostas dificultando a visualização dos mesmos.



(a)



(b)



(c)

Figura 17 – Espectros de IV das redes e blendas (a) 20/80 (b) 40/60 e c) 60/40.

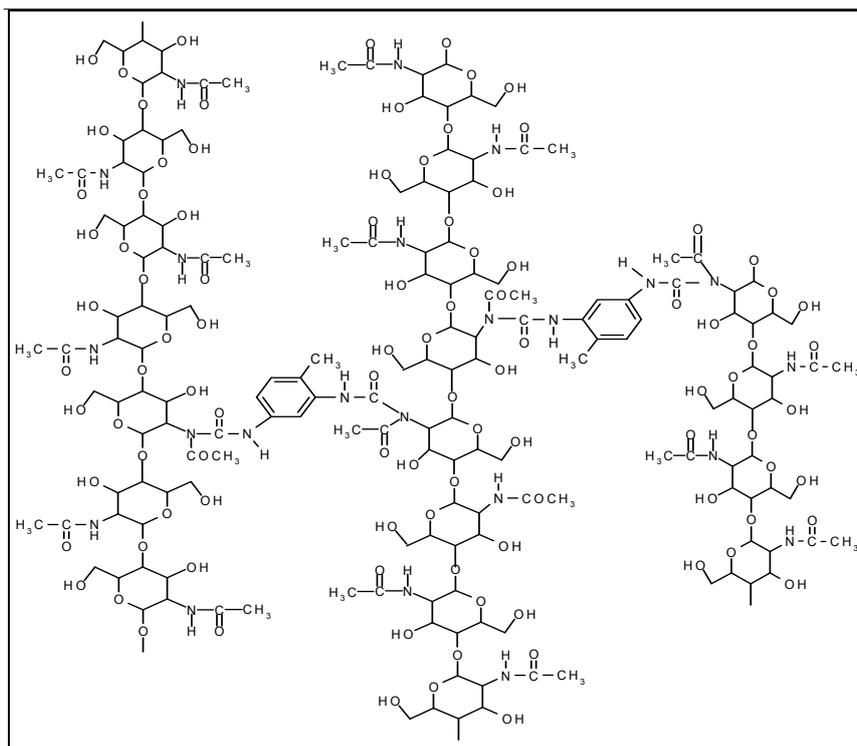


Figura 18 – Estrutura química provável da quitina reticulada com TDI - rede modelo.

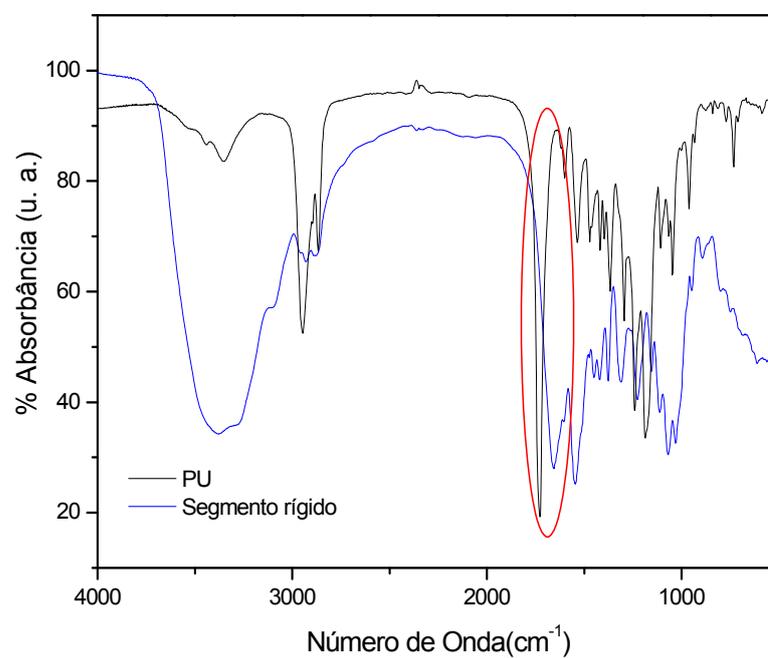


Figura 19 – Espectros de IV do PU e da rede modelo.

#### 5.4. Caracterização termogravimétrica (TGA)

Os resultados obtidos através da TGA do PU, quitina e das blendas estão mostrados na Figura 20. O filme de PU apresentou uma região principal de perda de massa entre 218-475°C ( $\Delta m=96,61\%$ ) relacionada a quebra das ligações uretânicas, e a quitina apresentou duas regiões de perdas de massa principais, a primeira entre 20-65°C ( $\Delta m=12\%$ ) relacionada a evaporação de moléculas de água; a segunda, entre 188-399°C, atribuída a degradação da estrutura sacarídica incluindo a desidratação dos anéis sacarídicos e a decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas [110],[111], que se mostraram menos estáveis que as ligações presentes no PU. A completa decomposição dos polímeros ocorreu a temperaturas superiores a 550°C sob atmosfera de oxigênio.

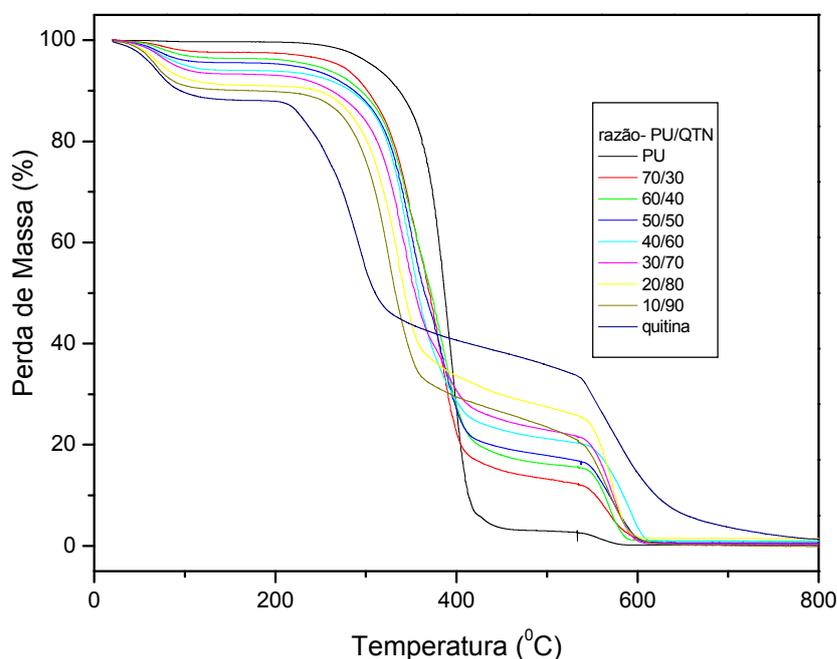


Figura 20 – Curvas termogravimétricas em várias composições das blendas de PU/QTN e dos polímeros puros.

Devido às características hidrofóbicas da PCL constituinte do PU, esse praticamente não apresenta perdas até 200°C, enquanto a quitina apresentou perda de massa nessa faixa de temperatura que corresponde à saída de água que foi absorvida pelo polímero devido aos grupos hidroxilas presente na cadeia.

Nas blendas as perdas de massa de água foram intermediárias aos dos componentes puros. O aumento do conteúdo de quitina acarretou num aumento da massa de água presente nas amostras (Figura 21).

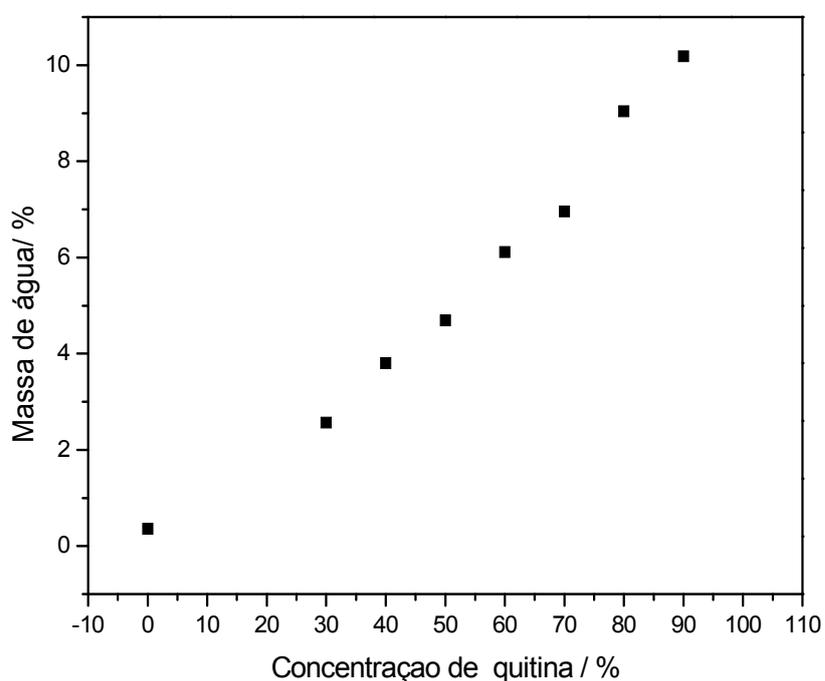


Figura 21 – Porcentagem de massa de água em função da concentração de quitina nas blendas.

Pelas curvas termogravimétricas das blendas (Figura 20) também foi possível obter a temperatura de início de decomposição ( $T_d$ ), esta temperatura corresponde a estabilidade térmica do material. Construindo um gráfico de  $T_d$  em função da concentração de PU nas blendas (Figura 22) nota-se que em concentrações superiores a 40% de PU ocorre uma inversão sigmoideal indicando uma provável mudança da fase contínua nas amostras, onde a matriz seria constituída pelo PU e

a fase dispersa pela quitina. Para se comprovar esta inversão de fase, ensaios com outras técnicas de análise foram realizados.

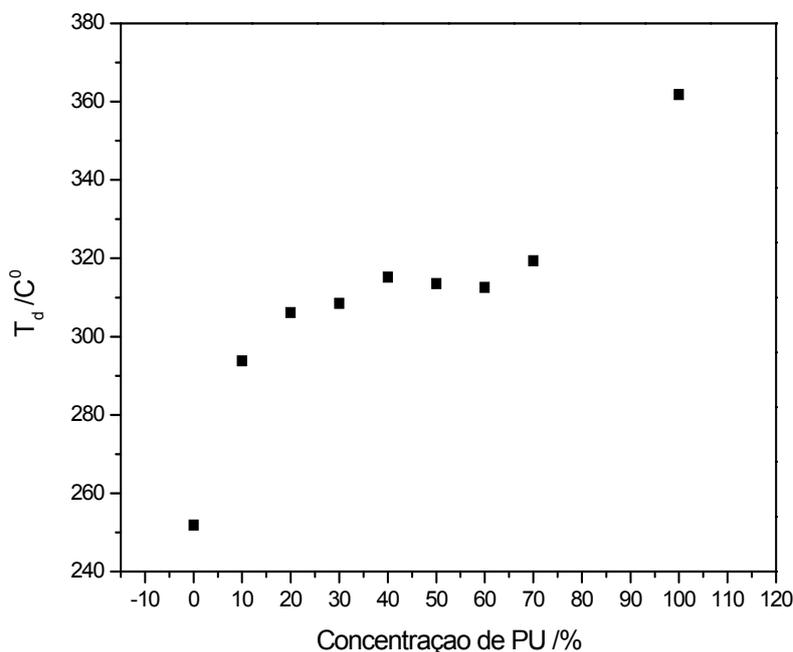


Figura 22 –  $T_d$  em função da concentração de PU presente nas blendas.

A partir das curvas termogravimétricas das redes (Figura 23) foi determinada a temperatura inicial de degradação ( $T_d$ ) para as redes. Construindo um gráfico de  $T_d$  em função da concentração de PU nas redes (Figura 24). Pode se observar que com o aumento do conteúdo de PU entre 10 e 40% ocorre um aumento da temperatura inicial de degradação, com um valor máximo para a rede contendo 40% de PU, para concentrações superiores a 50% de PU, observa-se diminuição da temperatura inicial de degradação, sendo mais pronunciada para rede contendo 70% de PU. Este fato pode demonstrar que, devido a quantidade de reticulação PU/quitina, a estabilidade térmica da rede foi diminuída.

A diminuição na temperatura de degradação (entre 200 e 300°C) quando comparando com as blendas de mesma composição (Figura 20), pode ser explicada

pela formação das ligações do tipo uréia entre o PU e a quitina, que são termicamente menos estáveis do que as ligações uretânicas. A variação da temperatura inicial de degradação ( $T_d$ ) das redes, quando comparados com os resultados das blendas, pode ser explicada pelas diferentes possibilidades de ligação dos grupamentos NCO terminal do pré-polímero com a quitina como demonstrado na Figura 14. Seja produzindo ligações uretânicas com as hidroxilas (OH), ou produzindo ligações uréia com o grupamento acetamida da quitina.

A reticulação permite um maior afastamento das cadeias de quitina, reduzindo as fortes ligações do tipo hidrogênio entre as moléculas de quitina, desta forma possibilitando um sutil aumento na absorção de água como observado na Figura 25, em relação as blendas. Ainda, nota-se que a curva obtida não apresenta o mesmo comportamento linear das blendas, outro indício de mudança da estrutura química.

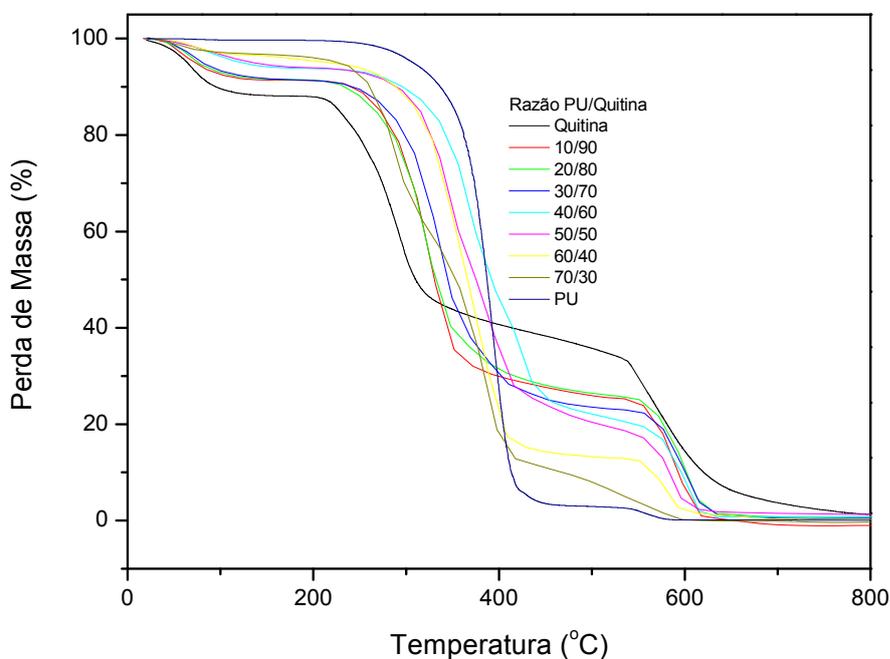


Figura 23 – Curvas termogravimétricas em várias composições das redes PU/QTN.

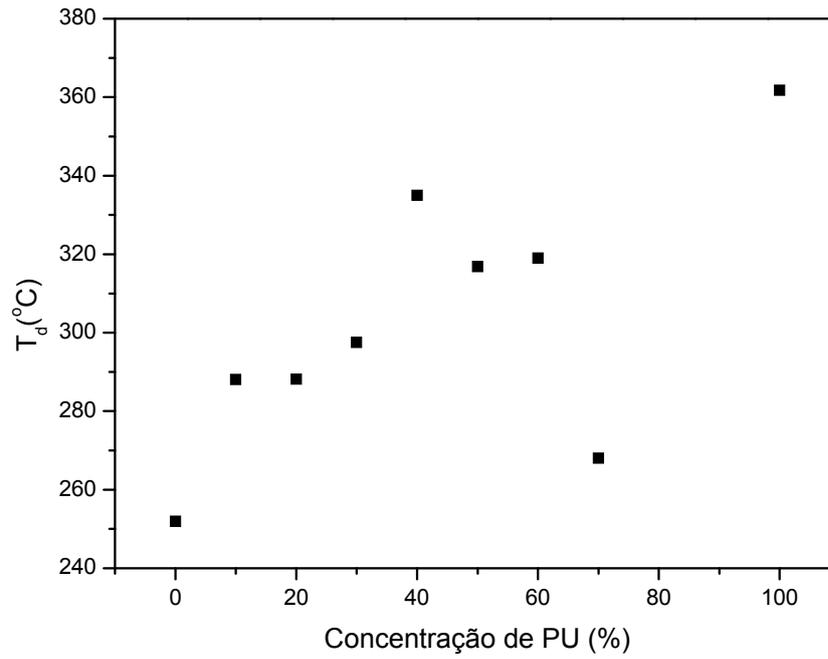


Figura 24 –  $T_d$  em função da concentração de PU presente nas redes.

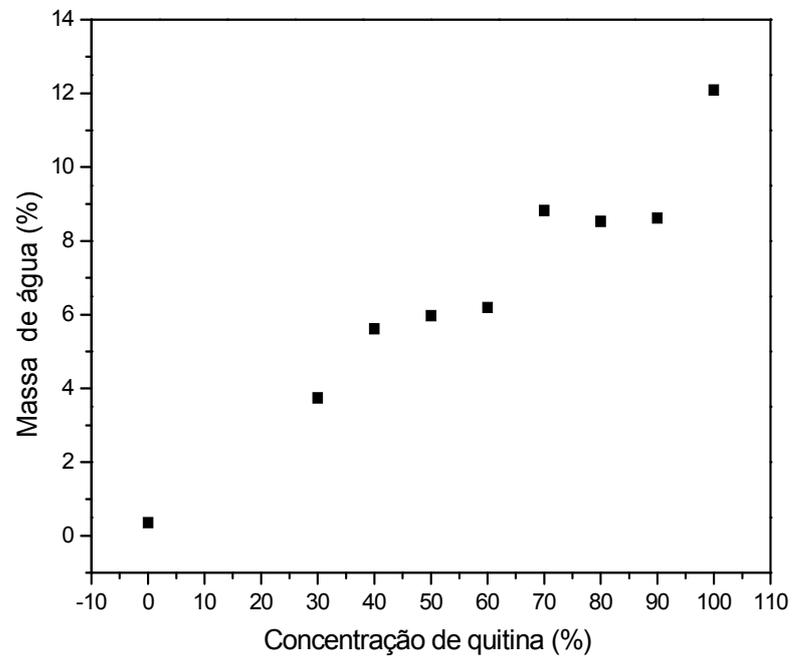


Figura 25 – Porcentagem de massa de água em função da concentração de quitina nas redes.

### 5.5. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As transições vítreas ( $T_g$ ) do PU (Figura 26) e da quitina (Figura 27) foram obtidas a partir de um tratamento térmico específico. No caso do PU foi realizado um resfriamento muito rápido a partir do fundido para minimizar a cristalização do polímero. Os valores obtidos foram 233 [112],[113] e  $-55,78^\circ\text{C}$ , para quitina e o PU respectivamente. Em uma blenda miscível seria de esperar que as transições vítreas fossem intermediárias aos seus componentes puros e no caso de blendas imiscíveis se observaria duas transições, no entanto, a  $T_g$  do PU é difícil de se determinar nas blendas devido a alta cristalinidade conferida pela PCL, já a  $T_g$  da quitina ocorre a uma temperatura muito alta, devido a alta rigidez do polímero.

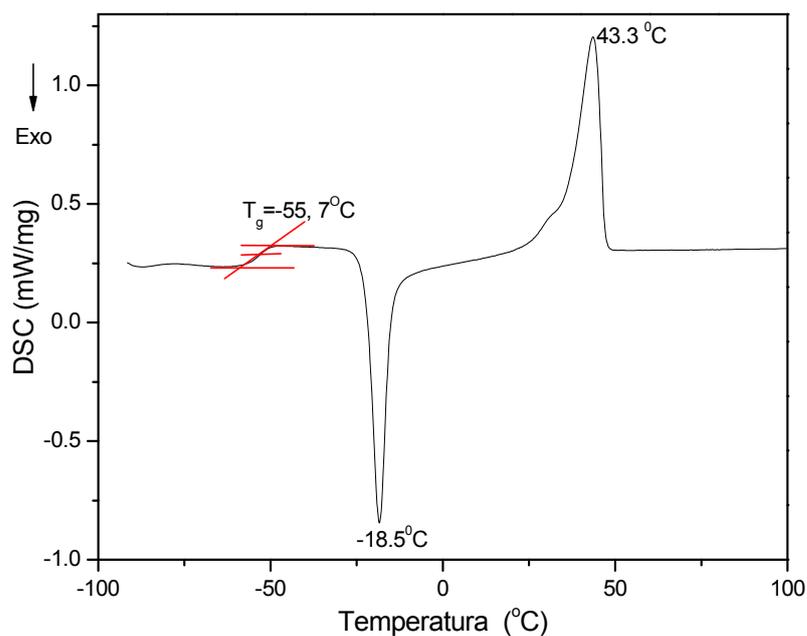


Figura 26 – Curva de DSC do PU.

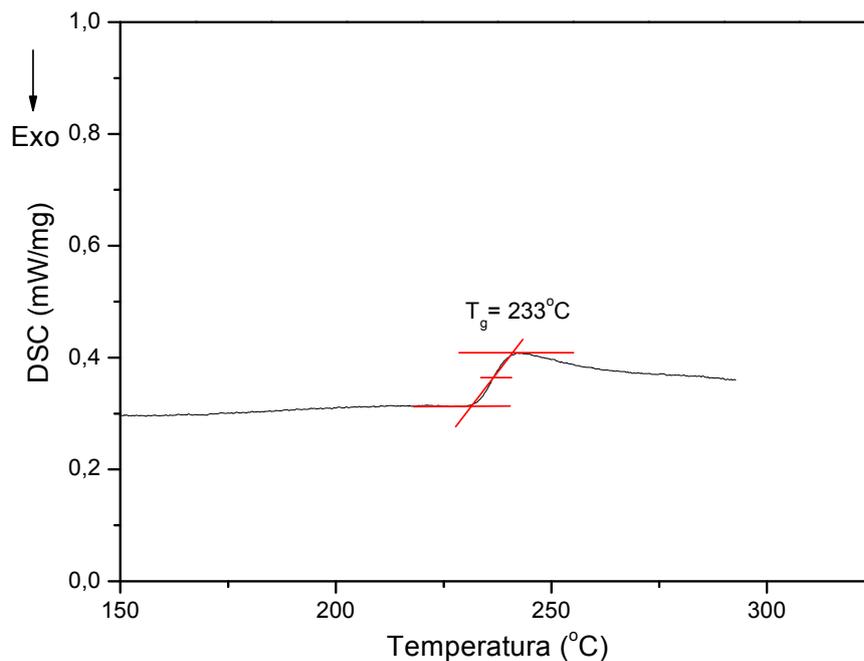


Figura 27 – Curva de DSC da quitina.

O primeiro aquecimento foi realizado para apagar a história térmica das blendas e compará-las em condições térmicas similares.

A Figura 28 mostra as curvas de DSC para as blendas no resfriamento, as quais foram utilizadas para a determinação das temperaturas de cristalização ( $T_c$ ), apresentadas na Tabela 07. Durante o resfriamento houve um aumento dos valores de  $T_c$  do PU com o aumento do conteúdo de PU de 10 a 50%. Este aumento pode ser explicado pela formação de domínio puros de PU dispersos na matriz de quitina, e a medida que a concentração de PU aumenta na matriz de quitina, o tamanho dos cristais também aumenta. Pode se observar que com 60% de PU ocorre uma inversão de fase com PU como a matriz e a quitina como polímero disperso, pois ocorre uma diminuição na temperatura da  $T_c$  tendendo a  $T_c$  do PU puro. Para a blenda contendo 70% de PU houve um aumento da  $T_c$ . Este resultado não esperado pode ser explicado pelo fato de que com 70% de PU ocorreu uma separação

macroscópica de fases, e a região onde o material foi coletado para análise se mostrou parecida com a blenda contendo entre 40 e 50 % de PU.

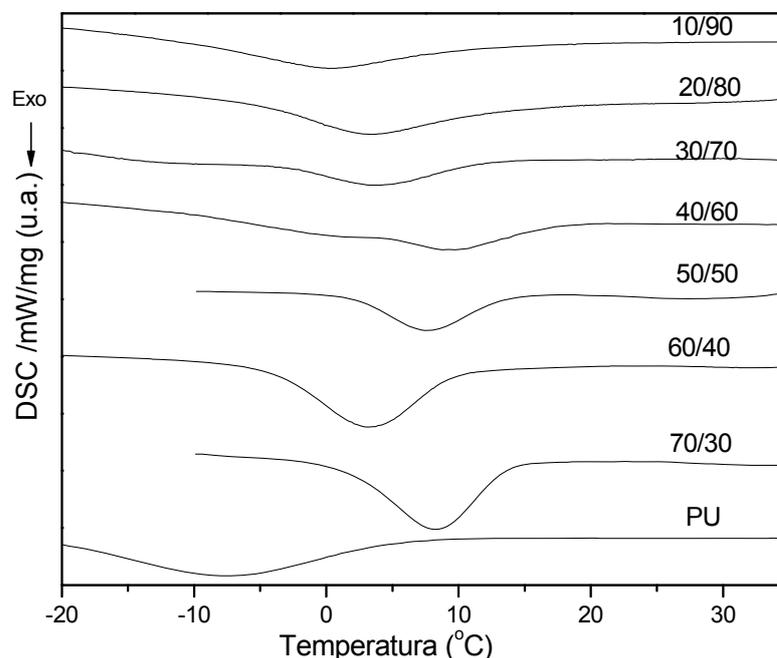


Figura 28 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as blends PU/QTN, ao resfriamento.

Tabela 07 – Temperatura de cristalização dos polímeros puros e das blends.

Razão PU/QTN	T <sub>c</sub> (°C)
10/90	0,1
20/80	2,8
30/70	3,7
40/60	7,1
50/50	7,6
60/40	3,1
70/30	(7,1)
PU puro	-7,4

Na Figura 29 são apresentadas as curvas de DSC para o segundo aquecimento referente aos componentes puros e blends em diferentes composições. Sabendo que a PCL possui dois picos de fusão em 45,1 e 51,4°C, indicando a presença de duas zonas cristalinas de diferentes graus de ordenamento ou tamanho dos cristalitos. O mesmo foi observado para o PU, a temperaturas menores (35,2 e 43,3°C). A quitina não apresentou pico de fusão, um resultado

direto da alta rigidez da cadeia molecular tornando-o susceptível a degradação antes da fusão. Nas blendas as variações na temperatura de fusão foram muito sutis (dentro do erro do equipamento), demonstrando que este método não é adequado para avaliar a miscibilidade das blendas.

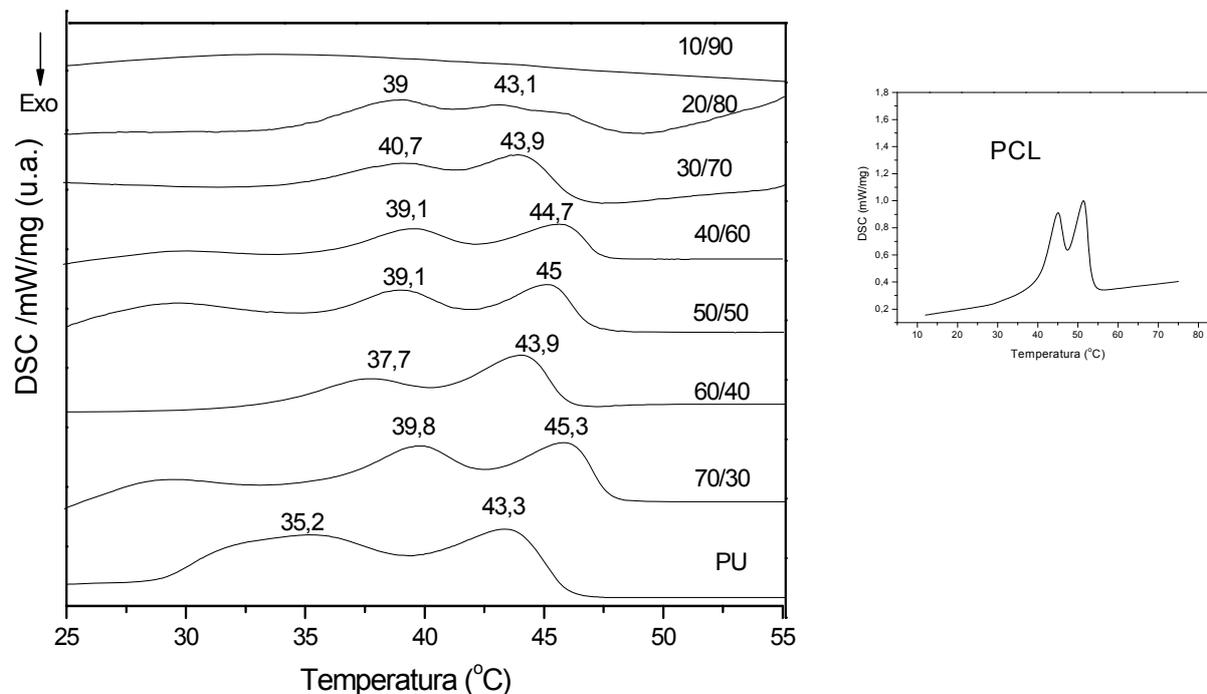


Figura 29 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as blendas PU/QTN, no segundo aquecimento.

O gráfico da entalpia de fusão (Figura 30) em função da concentração de PU nas blendas, mostra que o aumento de PU na faixa entre 10 a 40% acarreta em um aumento exponencial na entalpia de fusão. A concentrações elevadas, o crescimento é linear até 100% de material cristalino, ou seja, o  $\Delta H_f$  é proporcional ao material cristalino de PU presente na amostra. A quitina influencia na cristalização do PU nas blendas com até 50% de PU, refletindo a morfologia e as propriedades térmicas dos polímeros. Nas concentrações superiores com a inversão de fase determinada pela  $T_d$  (TGA) e pela  $T_c$  (DSC), onde a matriz é o PU e a quitina a fase dispersa, prevalece o material cristalino do PU.

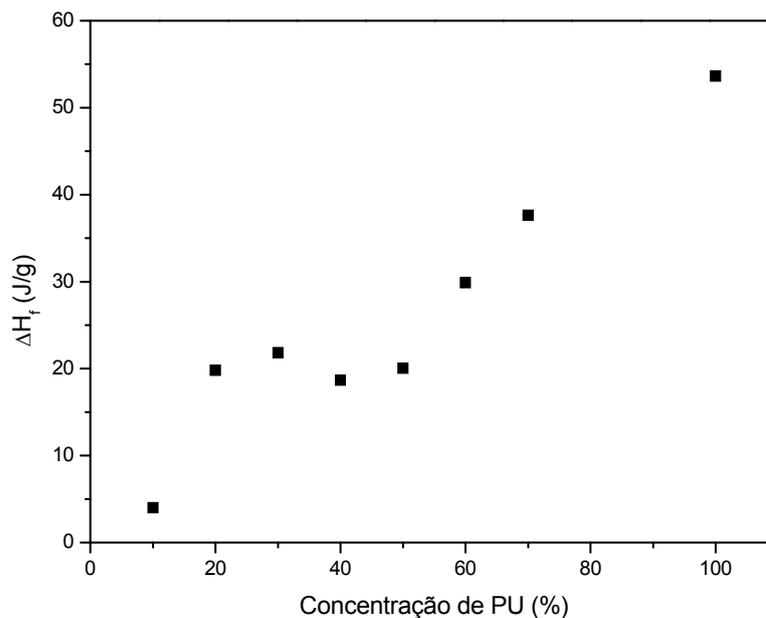


Figura 30 – Entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) da fase cristalina do PU em função da concentração deste nas blendas.

Para as redes (Figura 31) é possível observar um pico de cristalização, indicando que uma quantidade de PU presente no material pode se cristalizar dentro da rede.

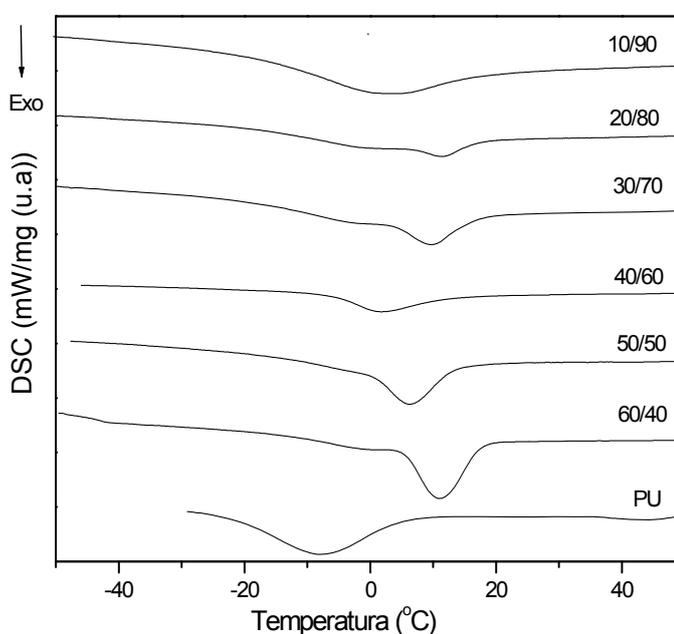


Figura 31 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as redes PU/QTN, no resfriamento.

Na segunda fusão (Figura 32) são observados picos de fusão, próximos ao valor de fusão do PU. Para todas as redes observa-se um pico largo a temperaturas superiores a 50°C devido à presença de água nas mesmas.

As curvas relativas às redes de composição 70/30 PU/QTN não foram introduzidas nas Figuras 31 e 32, devido à separação de fases macroscópica que ocorre a partir deste teor de PU nos materiais. Regiões diferentes poderão apresentar quantidades diferentes dos componentes, e, portanto não serão amostras representativas do todo.

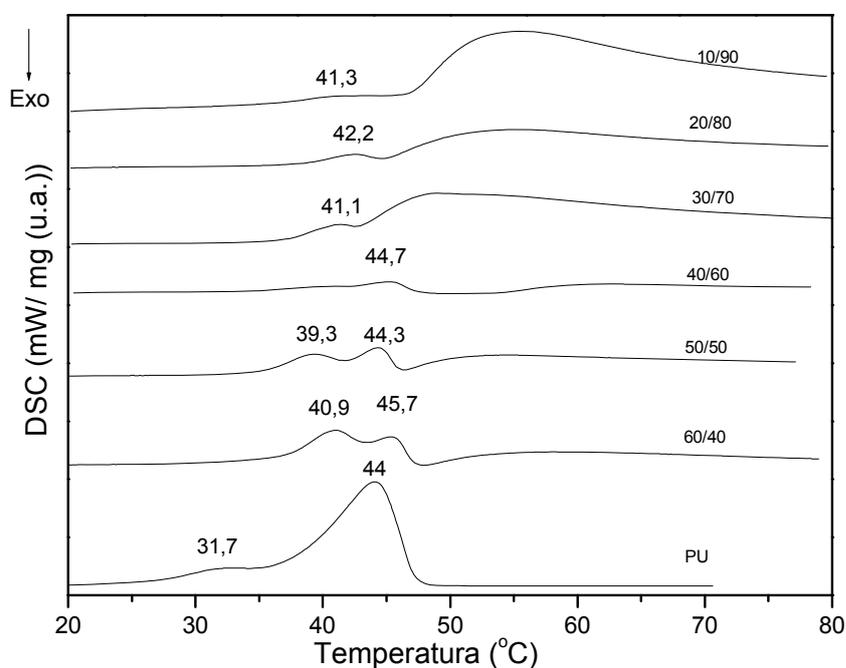


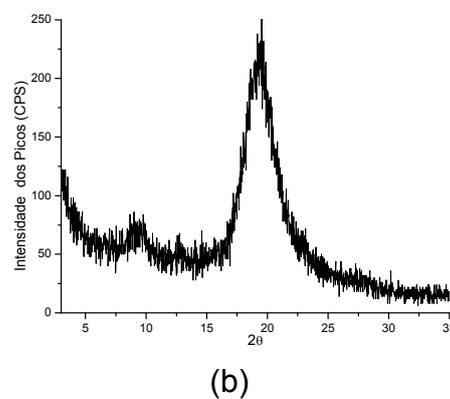
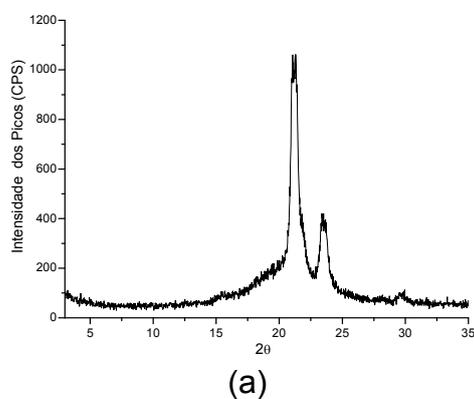
Figura 32 – Curvas de DSC para os polímeros puros e para as redes PU/QTN, no segundo aquecimento.

## 5.6. Difração de raios X

As medidas de DSC não podem ser aplicadas para o estudo da influência do PU na cristalização da quitina nas blendas, pois a quitina se degrada termicamente antes da fusão. Para este estudo foram obtidos espectros de raios X a temperatura ambiente.

Os espectros de difração do PU puro, quitina pura estão apresentadas na Figura 33 (a) e (b). O PU puro apresentou dois picos em torno de 23,5 e 21,3° valores coincidentes com os relatados na literatura para a policaprolactona [114]. Este resultado demonstra que a fase cristalina do PU está associada à cristalização da PCL (segmento flexível) [115]. O filme de quitina pura exibiu dois picos em 8,7 e 19,5 devido a presença dos planos cristalográficos (020) e a mistura de (110) e (040) respectivamente. Este resultado está em geral de acordo com os encontrados por Ren e Tokura [116].

Nos espectros das blendas (Figura 33 (c-i)), o aumento do componente de quitina ou de PU inibe a cristalização nas blendas PU/QTN, que está consistente com o caso normal de blendas binárias de polímeros semi-cristalinos [117].



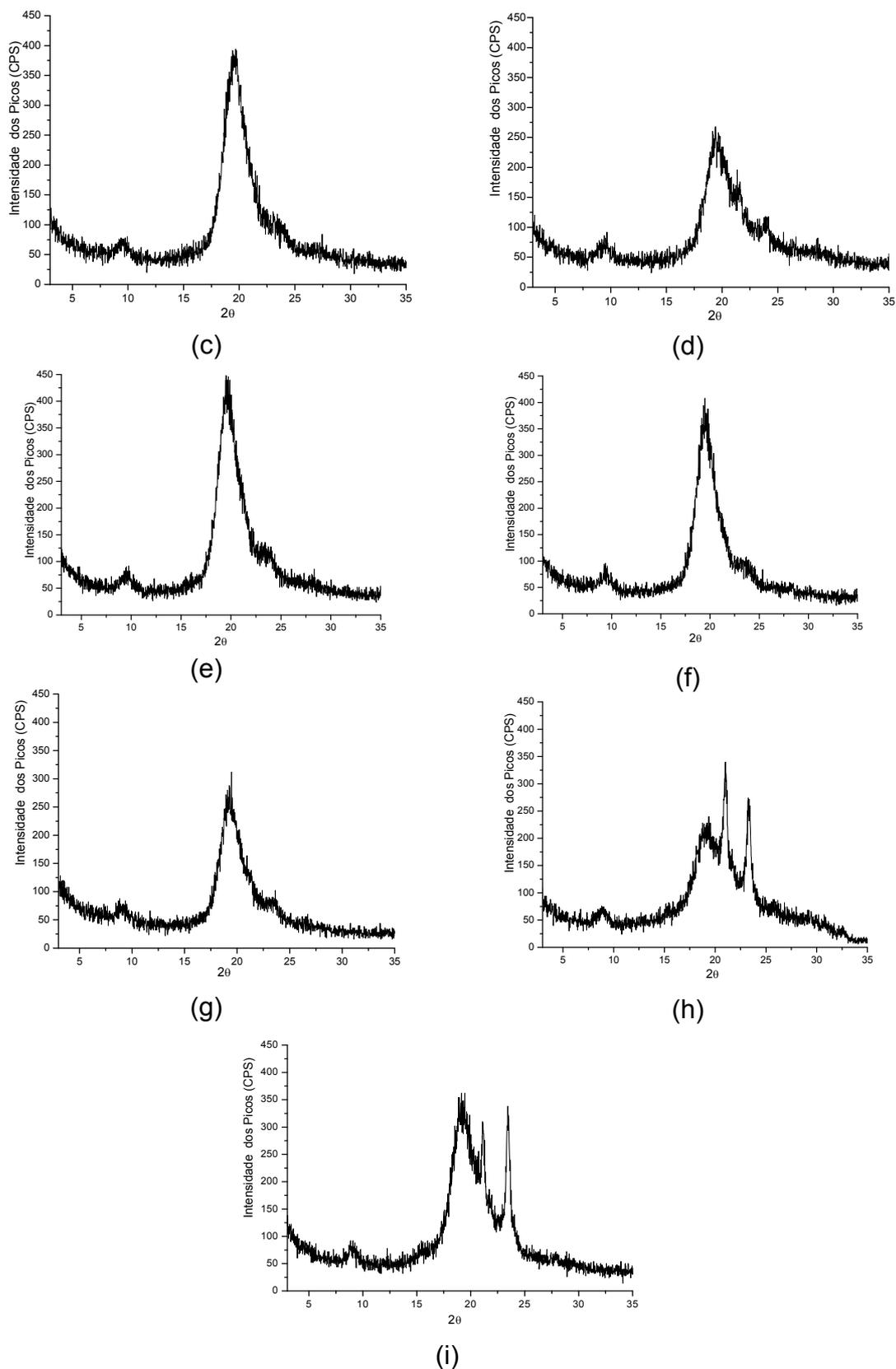


Figura 33 – Difratoograma de raios X de PU (a) e de quitina (b) e das blends PU/QTN: (c) 10/90, (d) 20/80, (e) 30/70, (f) 40/60, (g) 50/50, (h) 60/40 e (i)70/30.

O grau de cristalinidade determinado a partir dos componentes puros e das blendas (Figura 34) demonstra que a cristalinidade da quitina diminui com o aumento de até 40% de PU nas blendas. Isto pode ser explicado pela possibilidade de se formar ligações hidrogênio intermoleculares entre as moléculas de PU e de quitina que inibe a cristalização desta. Acima de 40% com a inversão de fase, a cristalinidade das blendas é determinada pela fase matriz de PU que possui um valor de cristalinidade maior.

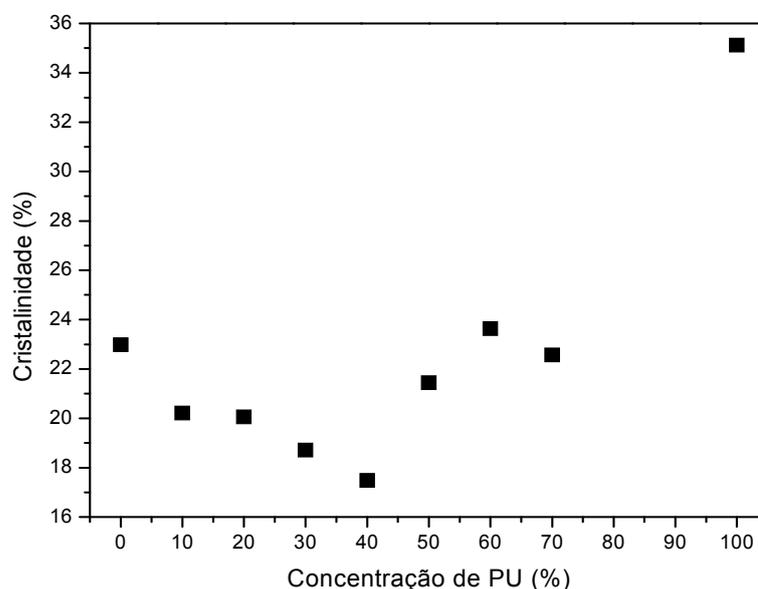


Figura 34 – Porcentagem de cristalinidade das blendas com relação a concentração de PU.

Para as redes, pode-se observar pelas Figuras 35, que com o aumento de material reticulável (PU) ocorre uma diminuição na cristalinidade do filme, sendo muito mais visível para a rede 70/30, com o desaparecimento dos picos do PU presentes na blenda de mesma composição. A reticulação neste caso acarreta em um afastamento entre as moléculas de quitina, diminuindo a cristalinidade do material. Este dado corrobora os resultados obtidos na TGA, que mostraram a rede

degradando a temperaturas menores, devido ao maior grau de reticulação (formação das ligações uréia menos estáveis).

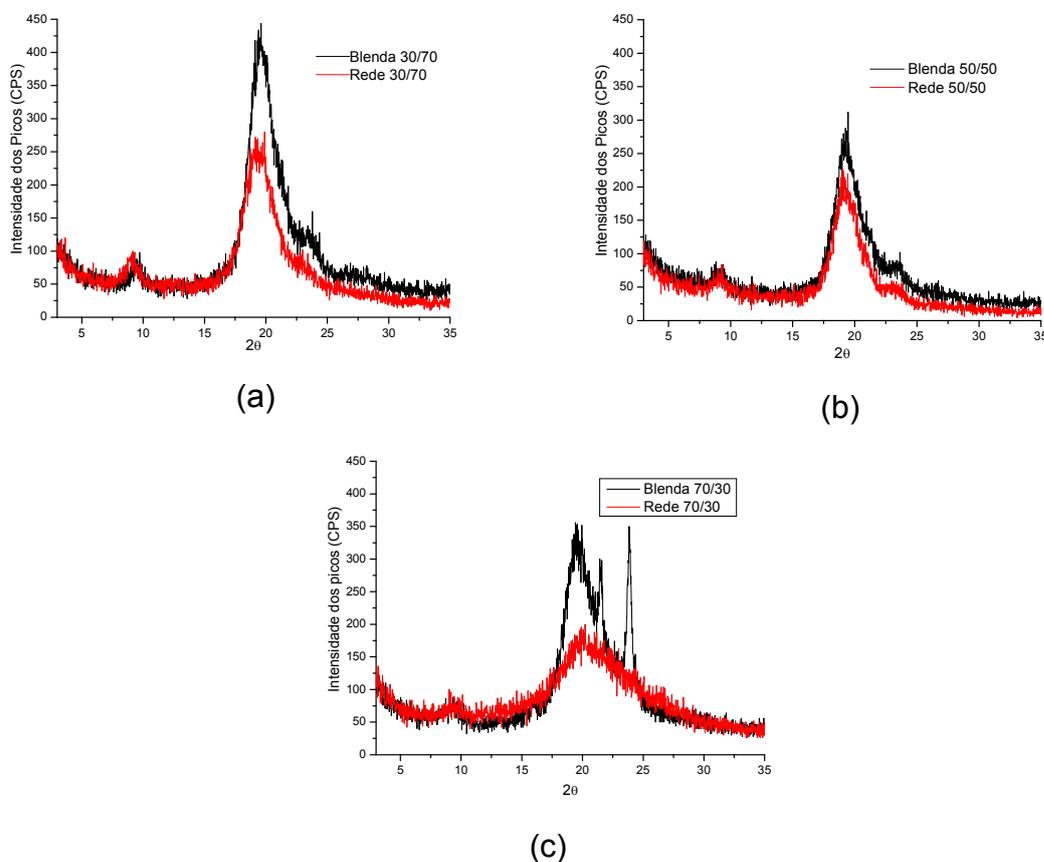


Figura 35 – Difratoograma de raios X: a ) blenda e rede 30/70, b) blenda e rede 50/50 e c) blenda e rede 70/30.

## 5.7. Análise termo-dinâmico- mecânica (DMTA)

### 5.7.1. Poliuretano e quitina

Para o PU (Figura 36) observa-se nas curvas dos módulos de armazenamento ( $E'$ ) e de perda ( $E''$ ) um pico em aproximadamente  $-30^\circ$  C atribuído a transição vítrea ( $T_g$ ) do PU. O perfil do pico de  $T_g$  na curva de  $E''$ , é característico de polímeros semi-cristalinos [118]. A diminuição abrupta do módulo de armazenamento ( $E'$ ) nesta mesma faixa de temperatura comprova a transição.

Acima de 50°C não é possível observar nenhuma transição, pois o polímero ao passar por Tg escoou completamente.

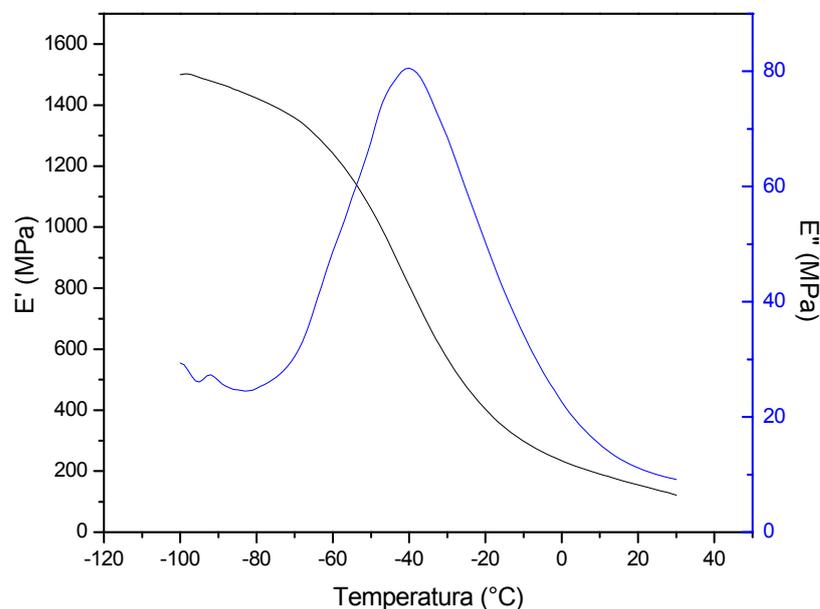


Figura 36 – Módulo de armazenamento (E') e de perda (E'') para o filme de PU.

Para o filme de quitina (Figura 37) observa-se um aumento no módulo de perda (E'') e de  $\tan \delta$  com o aumento da temperatura, demonstrando um aumento na rigidez do filme com a saída de água, que atua como plastificante. Em torno de 30°C na curva de  $\tan \delta$  observa-se uma relaxação atribuída a movimentação das moléculas de água ligadas ao filme de quitina e posterior saída, como observado na curva de delta S, pela retração do filme.

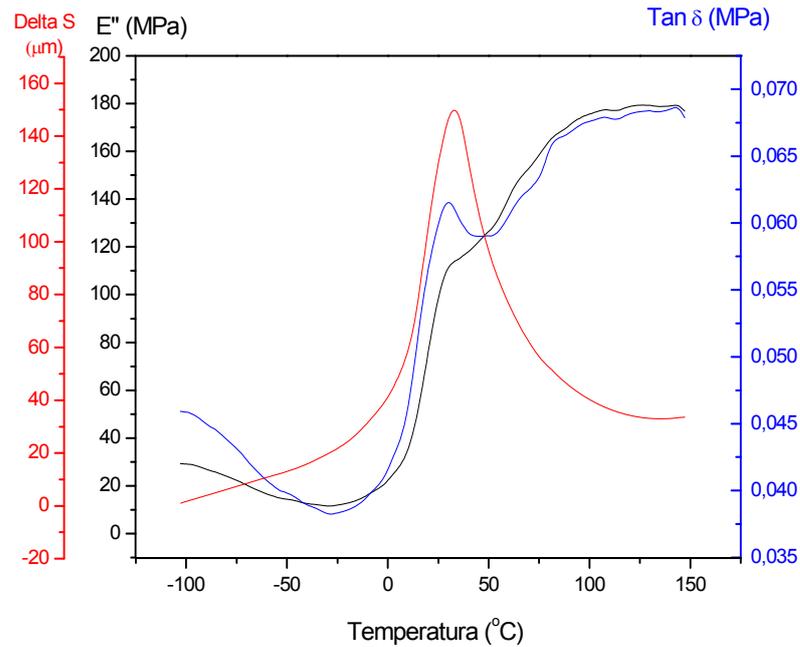


Figura 37 – Módulo de perda ( $E''$ ),  $\tan \delta$  e delta S para o filme de quitina.

Nas blendas de PU/QTN observa-se no módulo de perda ( $E''$ ) (Figura 38) uma intensificação na curva (região entre  $-40$  e  $0^\circ\text{C}$ ), devido a interação PU e quitina. A introdução do PU aumenta a flexibilidade da blenda a partir desta temperatura.

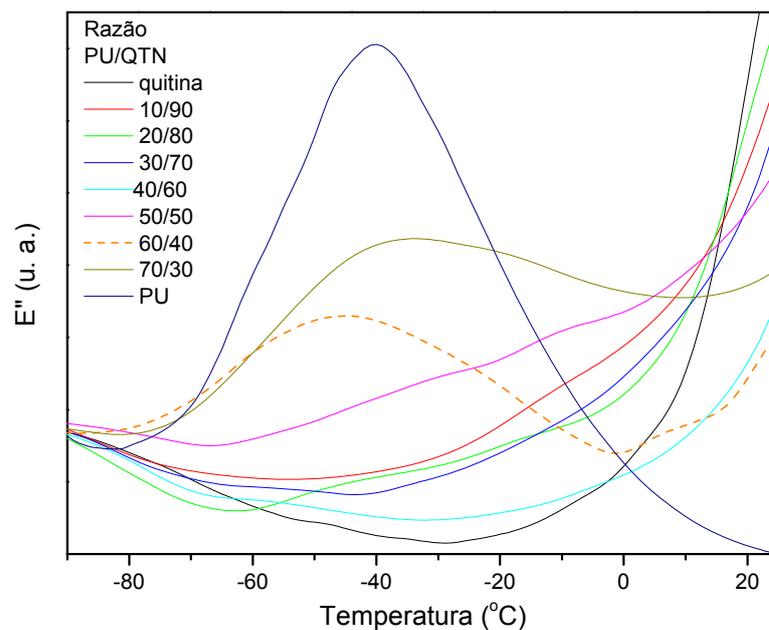


Figura 38 – Módulo de perda ( $E''$ ) para as blendas PU/QTN.

Na curva de  $\tan \delta$  (Figura 39) observa-se que a mobilidade das cadeias aumenta a medida que o conteúdo de PU aumenta.

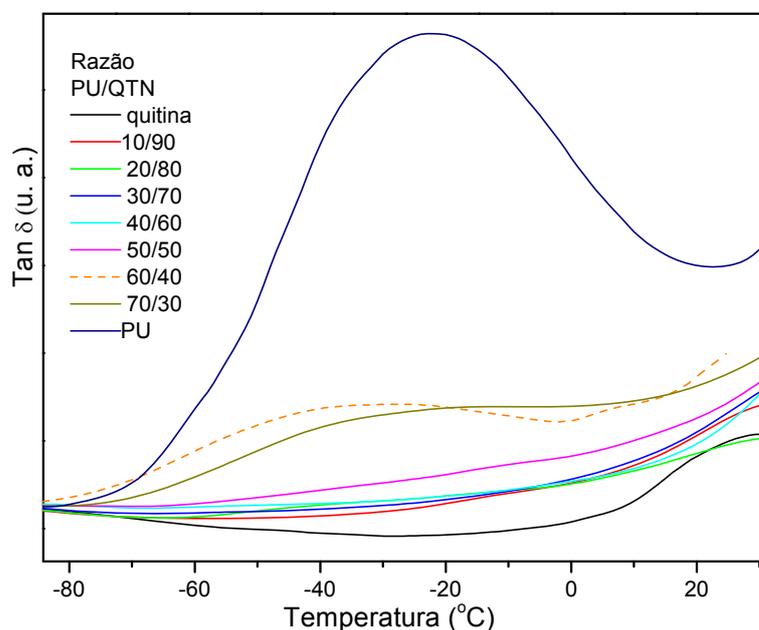


Figura 39 –  $\tan \delta$  para as blends PU/QTN.

Nas curvas do módulo de perda ( $E''$ ) das redes (Figura 40), nos filmes contendo acima de 30% de PU começa a ser observada uma transição que corresponderia a transição vítrea-borrachosa do PU, que se intensifica com a adição deste polímero e ainda se observa uma segunda transição em temperaturas superiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pode ser atribuída a uma transição de uma zona interfacial formada entre PU/QTN.

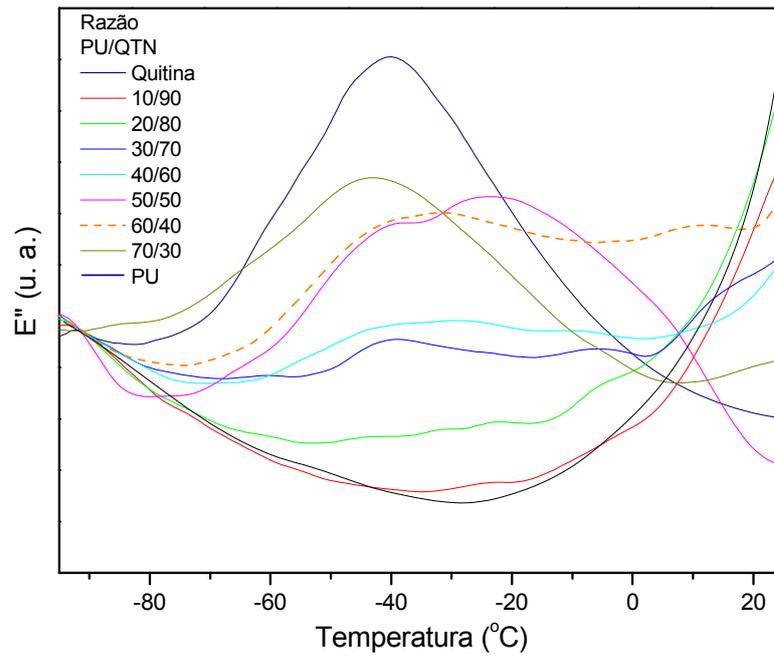


Figura 40 – Módulo de perda ( $E''$ ) para as redes PU/QTN.

Os dados do módulo de perda ( $E''$ ) (Figura 40) estão em concordância com os dados de  $\tan \delta$  da Figura 41.

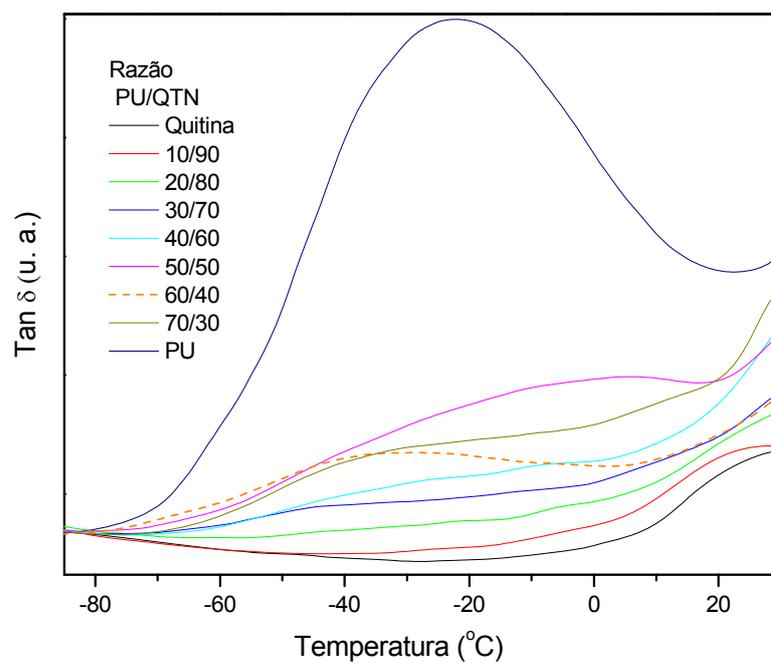


Figura 41 –  $\tan \delta$  para as redes PU/QTN.

A partir das curvas de variação da extensão linear (delta S) das blendas (Figura 42) em função da temperatura, pode-se observar que nas blendas contendo 60 e 70% de PU, o comportamento é parecido ao do PU puro. Com o aquecimento a interação entre as cadeias diminui, fazendo com que ocorra um escoamento entre elas, observado pelo aumento de delta S. Para as blendas contendo 30, 40 e 50 % de PU, ambos os polímeros (PU e quitina) atuam no processo de alongamento, seja o PU atuando como plastificante, facilitando o escoamento entre as cadeias, e as moléculas de quitina devido as fortes ligações hidrogênio, dificultando o escoamento das mesmas, permitindo que a medida seja realizada em temperaturas mais altas. Nas blendas com 10 e 20% de PU o comportamento é mais semelhante ao da quitina, que inicialmente apresenta um escoamento com o aumento de delta S e a temperaturas acima de 25°C apresenta encolhimento observado pela redução do delta S, que pode ser explicado pela saída das moléculas de água, permitindo a aproximação entre as moléculas de quitina, diminuindo as dimensões das amostras.

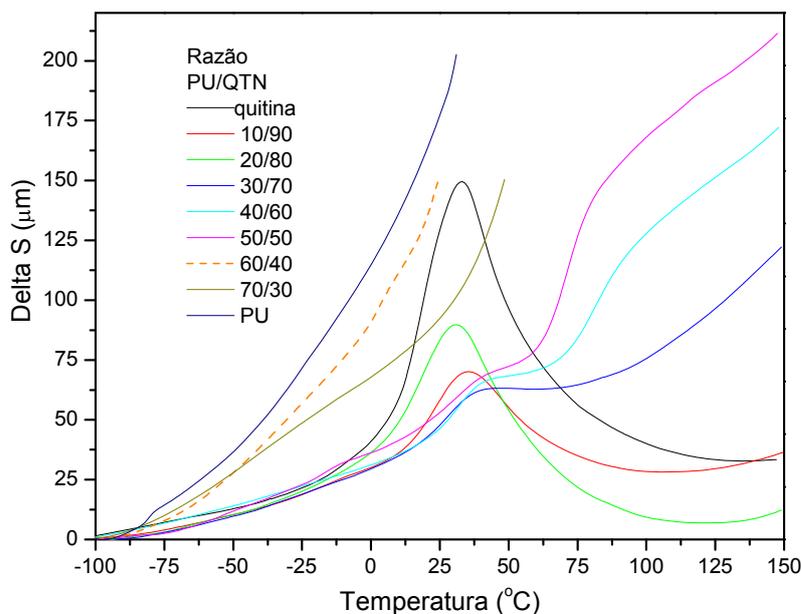


Figura 42 – Delta S em função da temperatura para as blendas PU/QTN.

Nas curvas de variação da extensão linear (delta S) das redes (Figura 43) contendo 10, 20 e 30% de PU, o número de reticulações entre PU e quitina são muito menores, permitindo uma maior interação das cadeias quitina-quitina. Desta forma o comportamento foi mais semelhante ao da quitina.

Para as redes contendo 40, 50, 60 e 70% de PU, a quitina reticulada com o PU demonstrou uma grande influência na propriedade, diminuindo o escoamento do PU, devido a rede tridimensional formada.

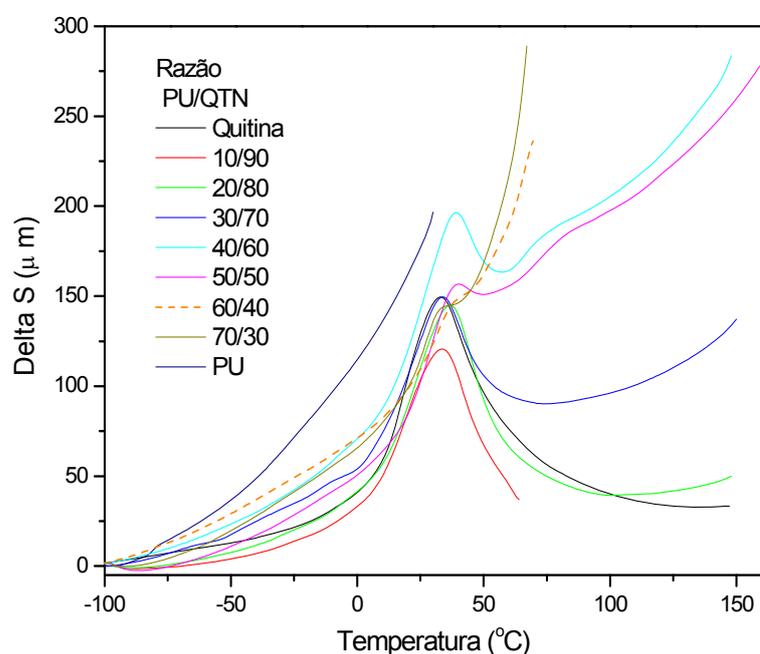


Figura 43 – Delta S em função da temperatura para as redes PU/QTN.

Nas curvas do módulo de armazenamento ( $E'$ ) das blendas (Figura 44) observa-se um aumento da rigidez com o aumento do módulo, devido a saída de água. As mesmas observações feitas para as curvas de delta S podem ser aplicadas para as curvas do módulo de armazenamento ( $E'$ ) onde a temperatura de encolhimento da amostra coincide com a temperatura em que ocorre o aumento do módulo  $E'$ , ou seja aumento da rigidez do material.

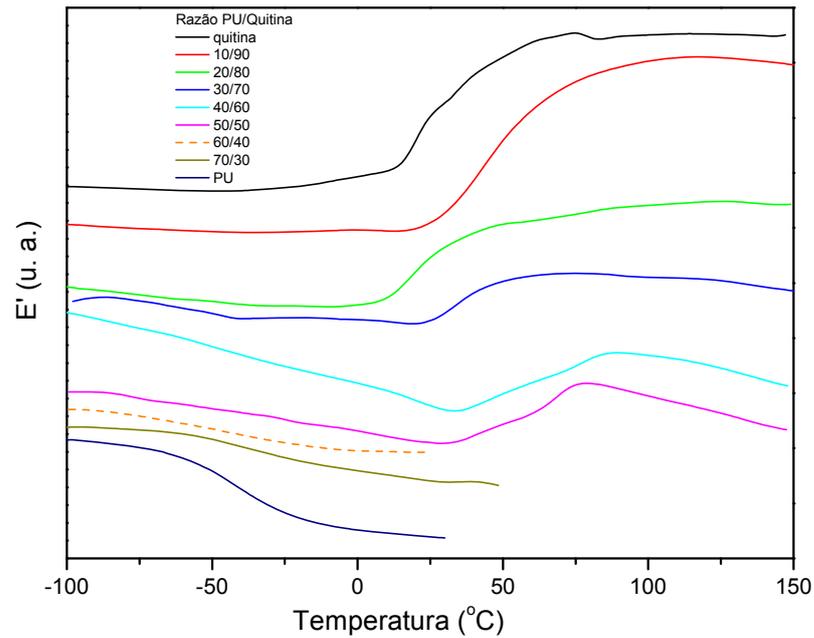


Figura 44 – Módulo de armazenamento (E') para as blendas PU/QTN.

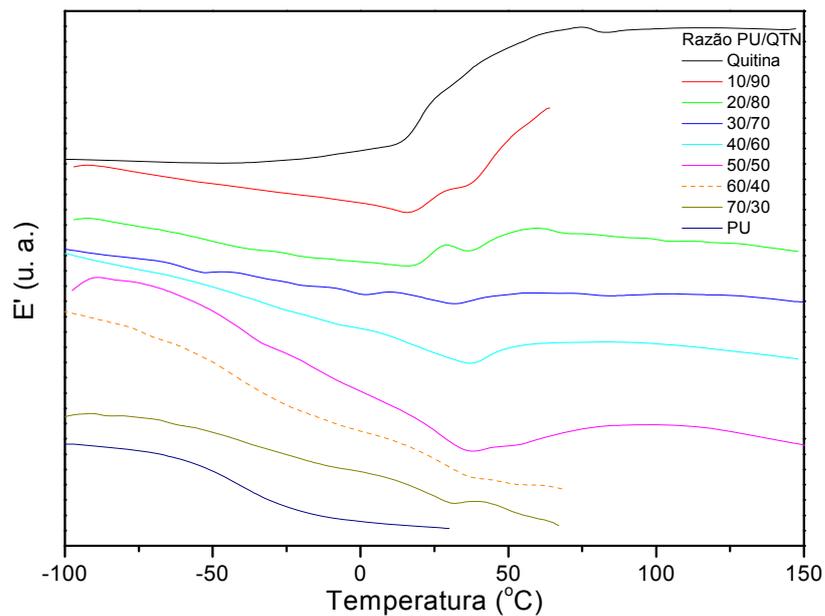


Figura 45 – Módulo de armazenamento (E') para as redes PU/QTN.

Pelas curvas do módulo de armazenamento (E') das redes (Figura 45), comparado com as blendas, observa-se que a reticulação torna o material menos rígido, mesmo após a saída de água. Esse fato pode ser explicado pela rede

tridimensional formada entre a quitina e PU, que dificulta as fortes ligações do tipo hidrogênio entre as moléculas de quitina.

#### 5.8. Comportamento mecânico das blendas

As propriedades mecânicas em função da concentração de PU nas blendas estão apresentadas nas Figuras 46 e 47. A tensão na ruptura ( $\sigma$ ) (Figura 46) diminuiu com o aumento do conteúdo de PU, o qual está consistente com a separação de fase e a diminuição das interações das ligações hidrogênio entre as duas fases. Nas blendas contendo entre 30, 40 e 50% de PU ocorre um leve aumento demonstrando uma melhor interação PU/QTN, como observado nos dados de raios X, DMA e DSC e TGA. A deformação ( $\epsilon$ ) (Figura 47) das blendas aumentou para concentrações superiores a 20 % de PU com um valor máximo na blenda contendo 50% de PU, demonstrando que nesta razão PU/QTN, ocorre uma melhor interação entre ambas, permitindo desta forma um melhor deslizamento entre as moléculas, ou seja, maior deformação.

Como se pode observar as blendas apresentaram valores de tensão de ruptura (13 a 56 MPa) considerados adequados para a aplicação como substituto ósseo, pois cotidianamente os ossos são submetidos a tensões de até 4 MPa enquanto os tendões e ligamentos suportam entre 40 e 80 MPa.

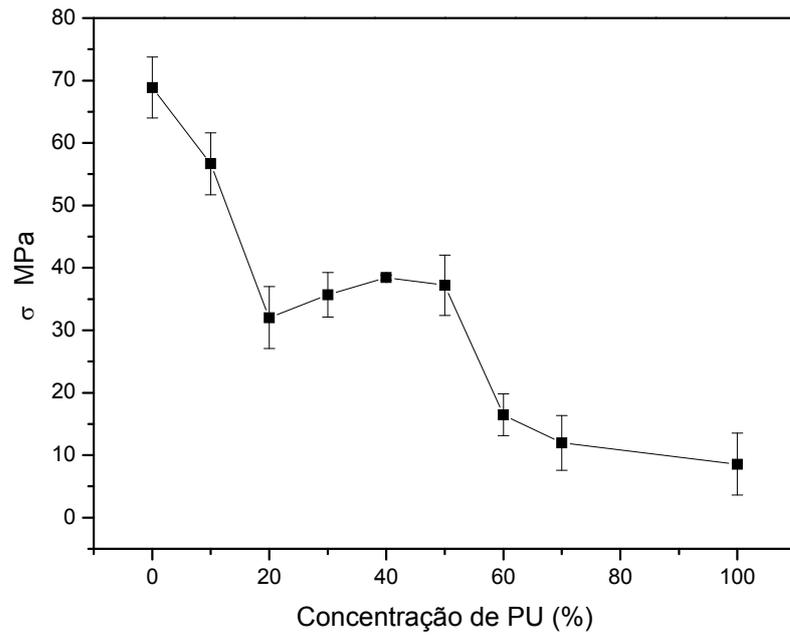


Figura 46 – Tensão na ruptura em função da concentração de PU nas blendas PU/QTN.

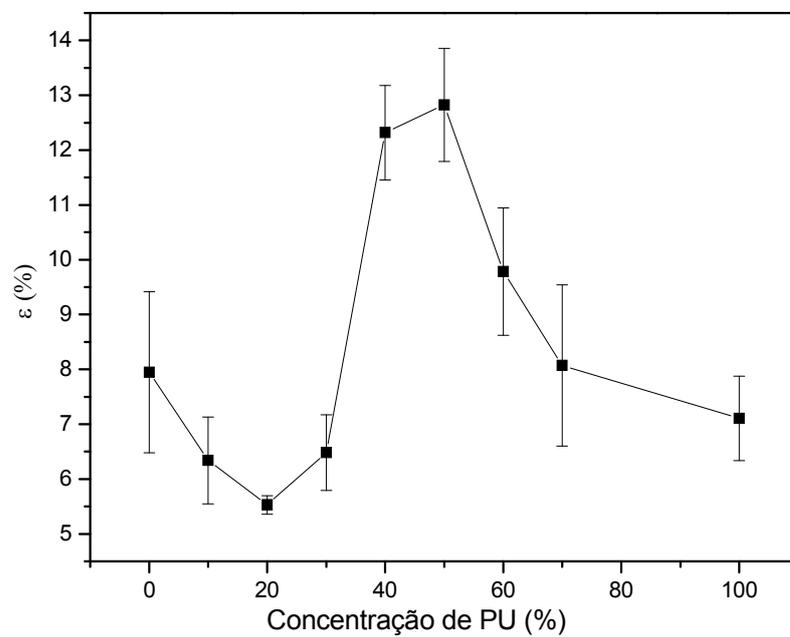
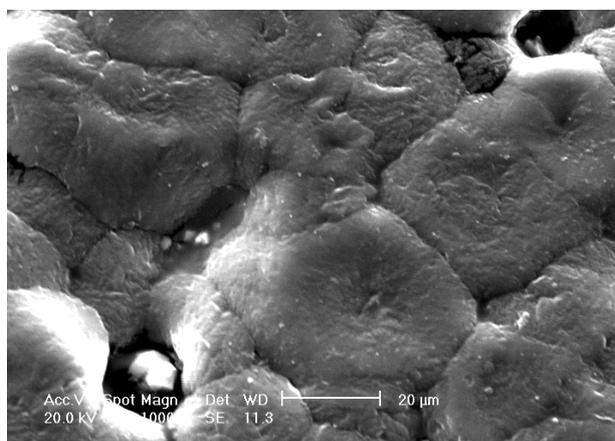


Figura 47 – Deformação em função da concentração de PU nas blendas PU/QTN.

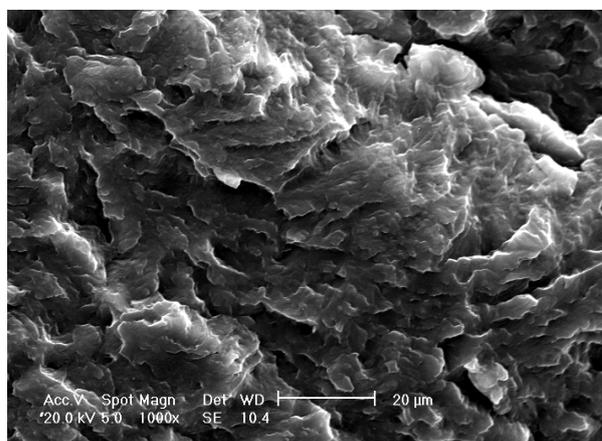
### 5.9. Caracterização morfológica (MEV)

Analisando-se primeiramente os componentes puros (Figura 48) observa-se, numa ampliação de 1000x, uma superfície rugosa e irregular para o PU e para a quitina uma superfície lisa.

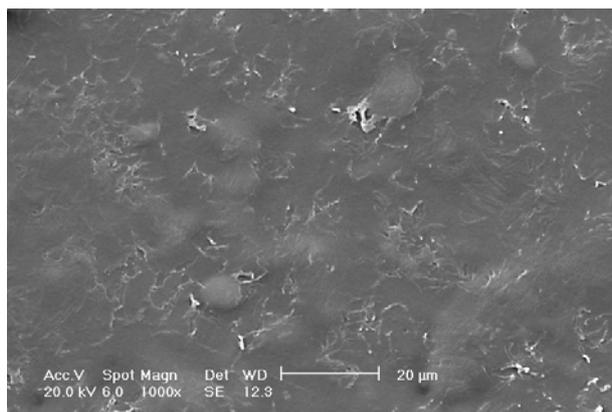
Para as blendas (Figura 49) com o aumento da concentração de PU de 10 a-40%, observa-se uma matriz lisa de quitina e o aumento das microesferas de PU dispersa no filme. Na blenda com razão PU/QTN- 50/50, não se observa separação de fase, formação de microesferas, nem uma estrutura áspera observada na micrografia da fratura do PU puro. Como se houvesse ocorrido uma miscibilidade entre os polímeros. Com o aumento de PU ocorre uma inversão de fase, sendo PU a matriz e as microesferas constituídas de quitina. Para altas concentrações de PU (acima de 70 % de PU) observa-se a separação macroscópica de fase dos polímeros.



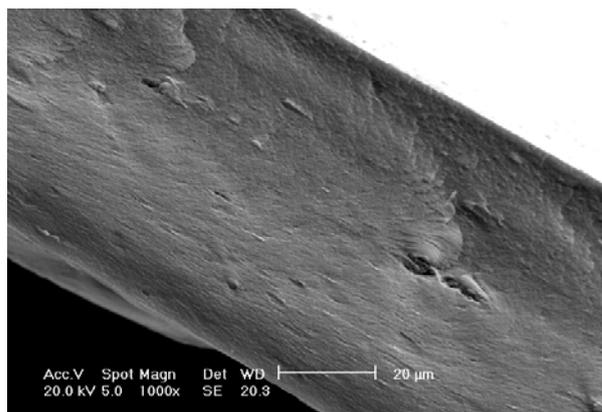
(a)



(b)

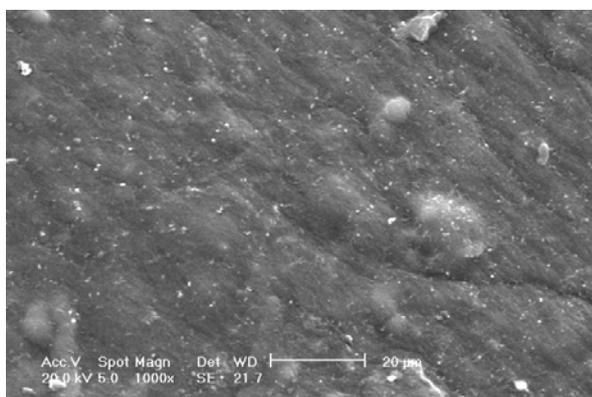


(c)

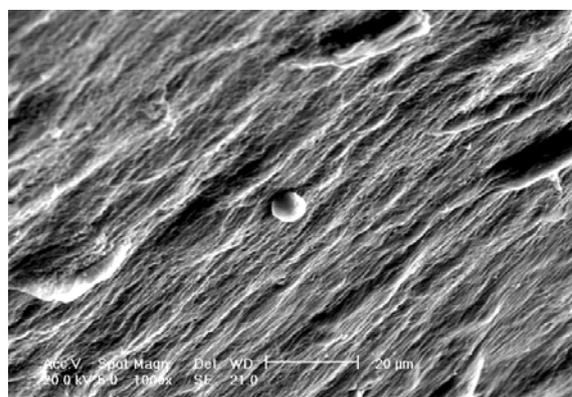


(d)

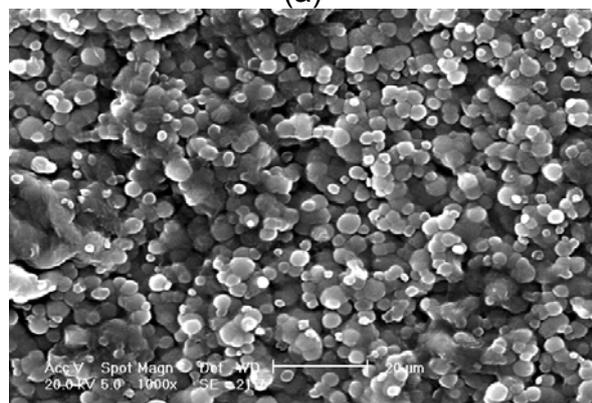
Figura 48 – Micrografias de filmes de (a) PU, (b) PU-fratura e (c) quitina e (d) quitina- fratura.



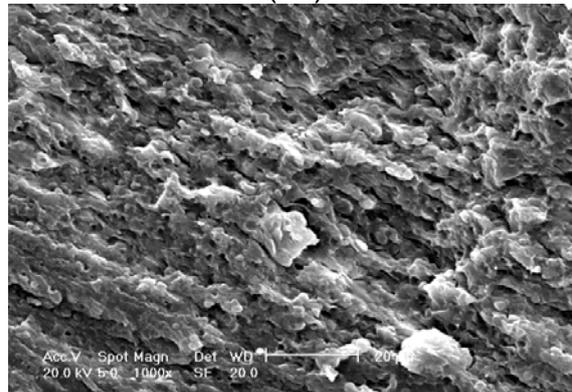
(a)



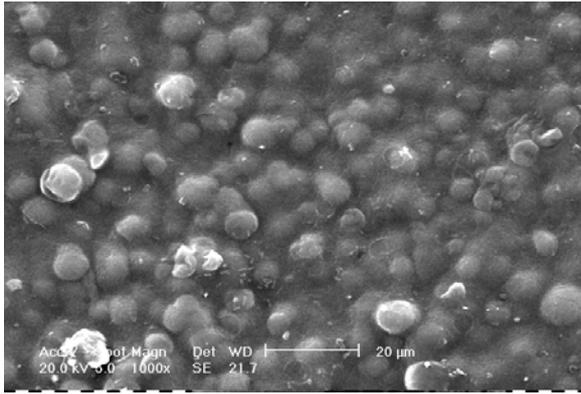
(a1)



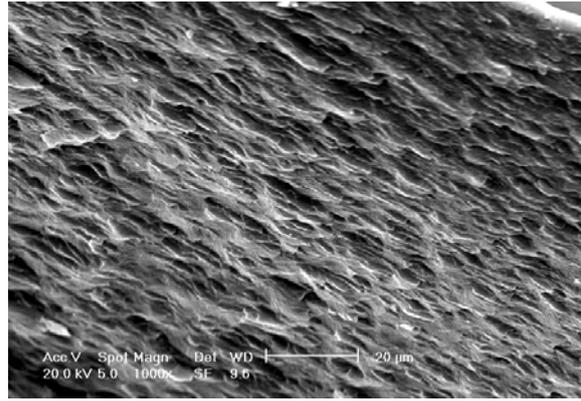
(b)



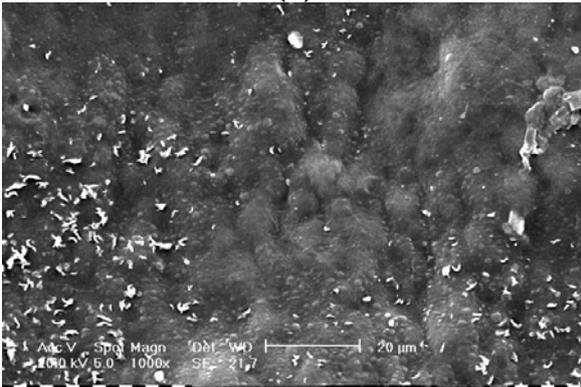
(b1)



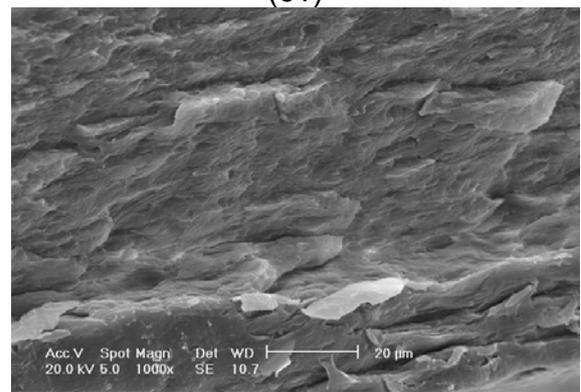
(c)



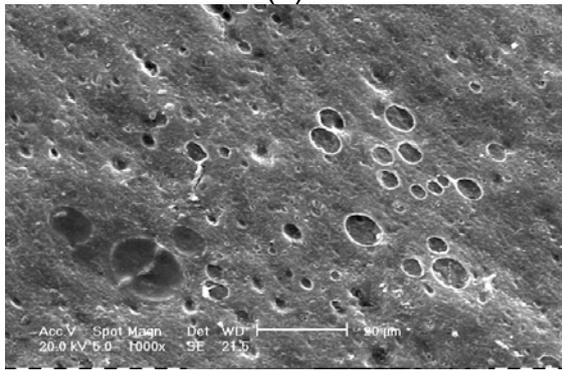
(c1)



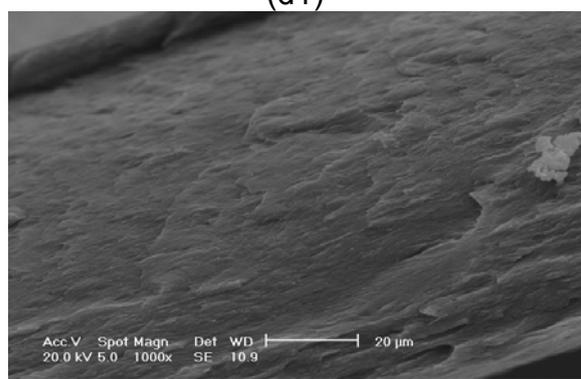
(d)



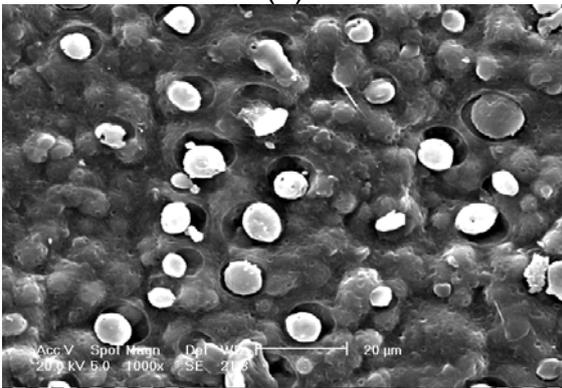
(d1)



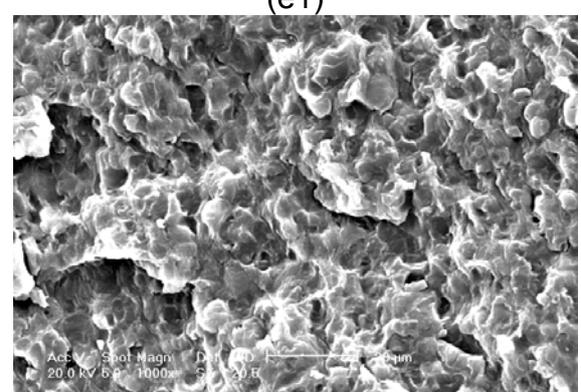
(e)



(e1)



(f)



(f1)

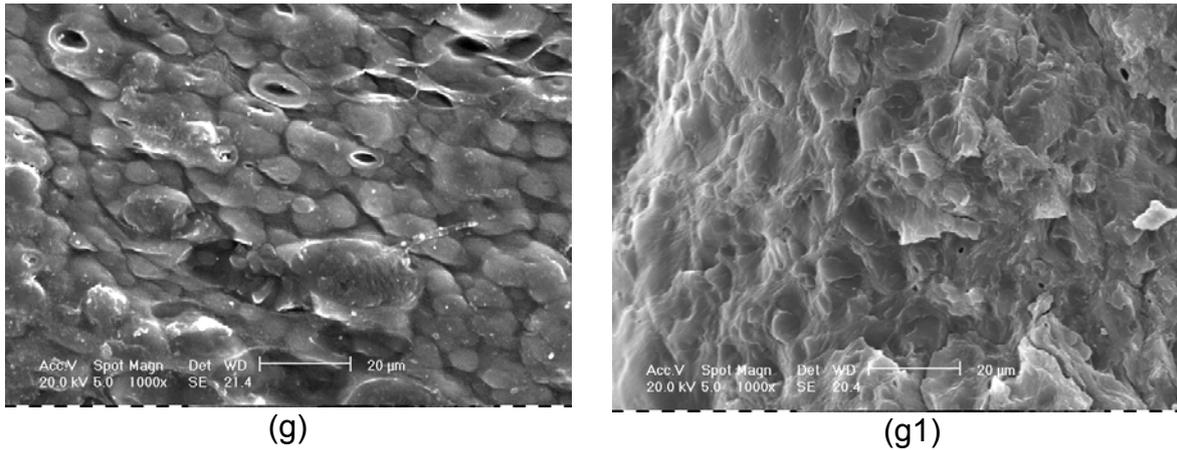
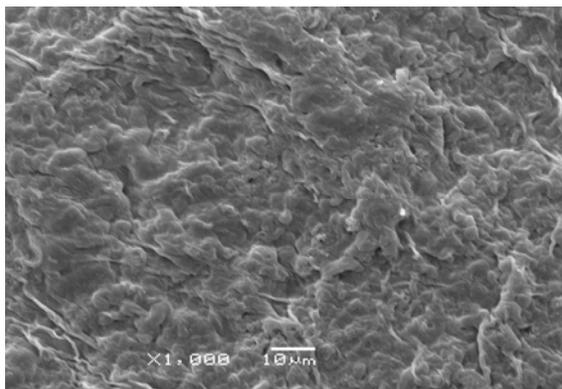
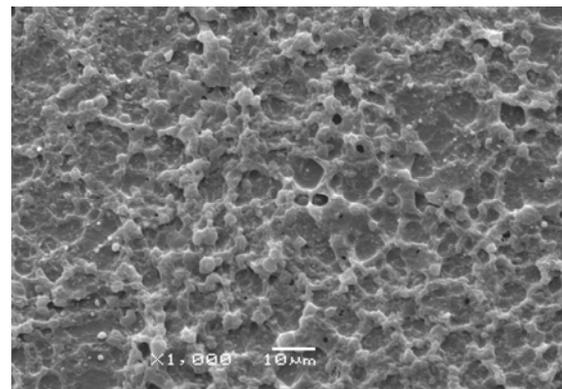


Figura 49 - Micrografia das blendas: (a) 10/90, (b) 20/80, (c) 30/70, (d) 40/60, (e) 50/50, (f) 60/40, (g) 70/30 e (a1), (b1), (c1), (d1), (e1), (f1), (g1) suas respectivas fraturas.

Para as redes contendo 20, 40 e 60% de PU (Figura 50), observa-se que as microesferas de PU e quitina observada nas blendas contendo a mesma concentração de PU perdem seu formato, ficando mais dispersa na matriz. Já para o filme contendo 40% de PU o aparecimento de uma estrutura celular. Para a rede com 70% de PU observa-se uma separação macroscópica de fase.



(a)



(b)

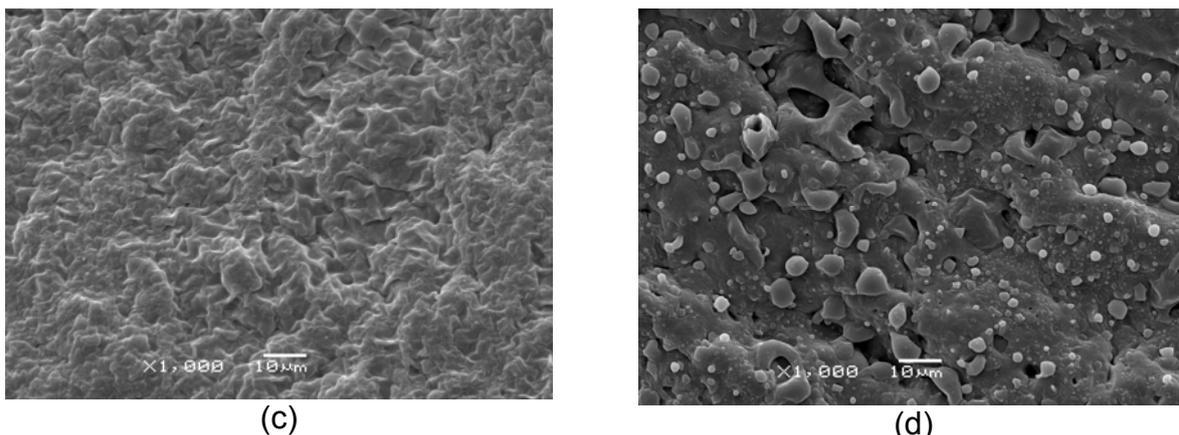


Figura 50 - Micrografias das redes de PU/QTN: a) 20/80, b)40/60, c) 60/40 e d) 70/30.

#### 5.10. Grau de hidratação e degradação *in vitro* - solução de HBSS.

Uma das funções mais importantes do uso dos polímero biodegradáveis para aplicação clínica, é conhecer os produtos liberados durante a sua degradação e se esses produtos apresentam efeitos tóxicos para o organismo.

Os testes de degradação *in vitro* em soluções fisiológicas simuladas, são uma forma de simular as interações entre os fluidos corporais e o biomaterial, e o estudo da sua estabilidade e taxa de degradação. Apesar de ser impossível simular completamente o caráter químico, mecânico e dinâmico do sistema *in vivo* para prever o comportamento dos biomateriais no meio fisiológico humano, os estudos *in-vivo* e *in vitro* são uma parte integrante importante de potenciais materiais para implantes. É também necessário assegurar que os produtos de biodegradação não sejam tóxicos para o organismo, e sejam elimináveis através de qualquer um dos sistemas orgânicos de eliminação.

Os principais objetivos destes ensaios foram verificar a estabilidade do material em solução, avaliar a toxicidade do material liberado e a quantidade de água absorvida (grau de hidratação). Alguns materiais sofrem mudanças dramáticas

em sua resistência a tração, à fadiga, à fluência, em seu módulo de elasticidade, torção ou flexão quando ligeiramente umedecidos. A degradação também é afetada pela absorção de água: materiais hidrofílicos tendem a se degradar do interior para a superfície enquanto materiais hidrofóbicos tendem a ter primeiramente suas superfícies degradadas.

Os resultados de absorção de água estão apresentados na Figura 51 demonstram que tanto para as redes como para as blendas ocorre uma diminuição na capacidade de absorção de água com o aumento da concentração de PU, em relação a quitina pura. Aparentemente as redes apresentaram uma melhor capacidade de retenção de água em relação as blendas, isto pode ser explicado pela rede tridimensional formada que propicia o afastamento das cadeias permitindo uma melhor absorção de água. Apesar do grau de hidratação diminuir, as amostras apresentaram um alto grau de hidratação, superiores a 50%.

De forma a identificar possíveis produtos tóxicos de degradação liberados, além dos da capacidade de absorção de água, os testes de degradação são importantes para determinar o tempo de vida de um polímero biodegradável quando implantado.

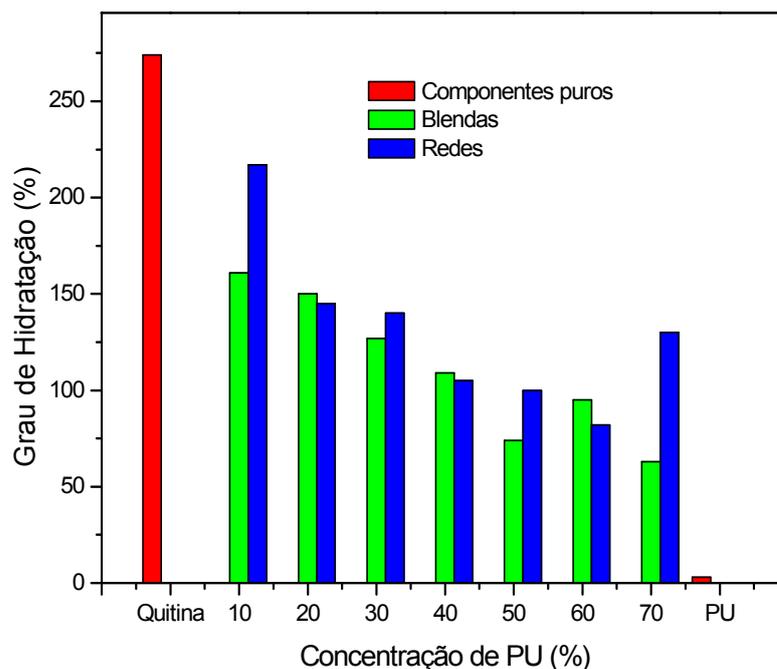


Figura 51 - Grau de hidratação dos filmes em função da concentração de PU.

Os resultados obtidos no ensaio de degradação com a solução de HBSS (Figura 52), demonstram uma baixa taxa de degradação, entre 1 a 11% para as blendas e entre 1 e 7% para as redes. É pouco provável que o PU que se encontra nas blendas seja liberado para a solução, devido ao tamanho elevado do PU, liberando apenas cadeias poliméricas pequenas para a solução por efeito de difusão, e também resíduos de reação, como sal de cloreto de lítio e solvente.

Nas redes o grau de degradação foi menor em relação as blendas, devido a maior estabilidade obtida pela reticulação de PU/QTN.

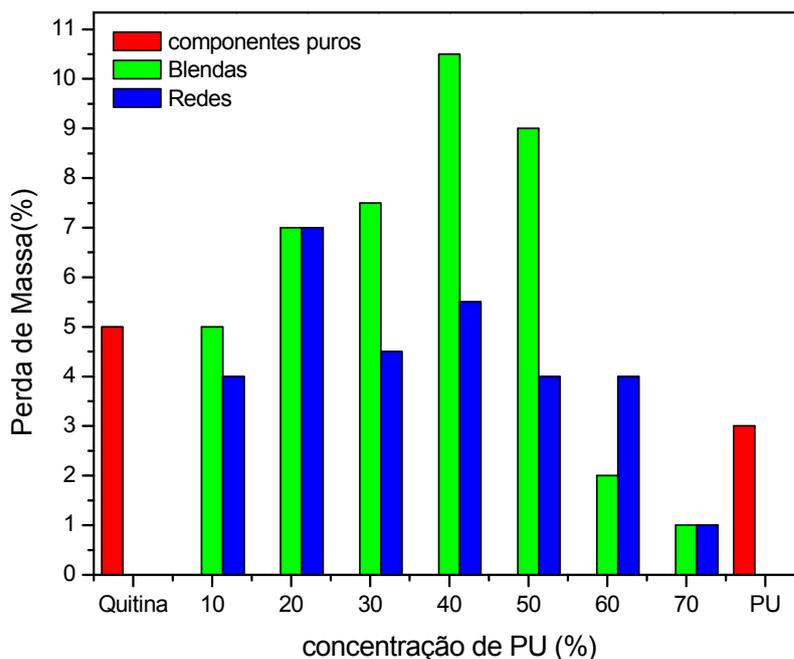


Figura 52 - Porcentagem de perda de massa no ensaio de degradação.

### 5.11. Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade - células Vero

#### 5.11.1. Citotoxicidade das soluções

Em termos biológicos, sabe-se que quando há a pretensão de se utilizar um material na área biomédica, este não deve liberar produtos tóxicos e nem mesmo causar reações adversas, o que pode, em primeira instância, ser avaliado através de testes de citotoxicidade *in vitro*. Para este ensaio foi utilizada uma cultura de células Vero. De acordo com a literatura pesquisada (ISO 10993-5E e Kirkpatrick [119],[120], esta linhagem é recomendada para os estudos de citotoxicidade e de interações entre biomateriais. Os resultados dos ensaios biológicos de biocompatibilidade realizados com os sete diferentes tipos de composições dos filmes PU/QTN e dos componentes puros (PU e quitina), são mostrados na Figura 54, empregando-se células Vero. A concentração do produto da reação do MTT, o composto colorido formazan, pode ser diretamente associado

ao número de células viáveis, uma vez que a transformação dos cristais de MTT em formazan ocorre pela ação das enzimas mitocôndrias das células viáveis e ativas.

A análise estatística dos resultados de citotoxicidade direta das soluções submetidas no processo de degradação, para avaliar resíduos tóxicos liberados dos filmes estão apresentados na Figura 53, os quais correspondem às médias das absorbâncias de oito amostras, mostrou que não houve uma diminuição estatisticamente significativa nos valores de absorbância para as amostras com relação ao controle. Os valores calculados estatisticamente demonstraram 100% de viabilidade para os componentes puros (PU e quitina) e a para as redes (10/90, 20/80 30/70 40/60 50/50 e 60/40), ou seja os produtos liberados não foram tóxicos. Uma exceção foi a amostra 70/30 que apresentou 86%.

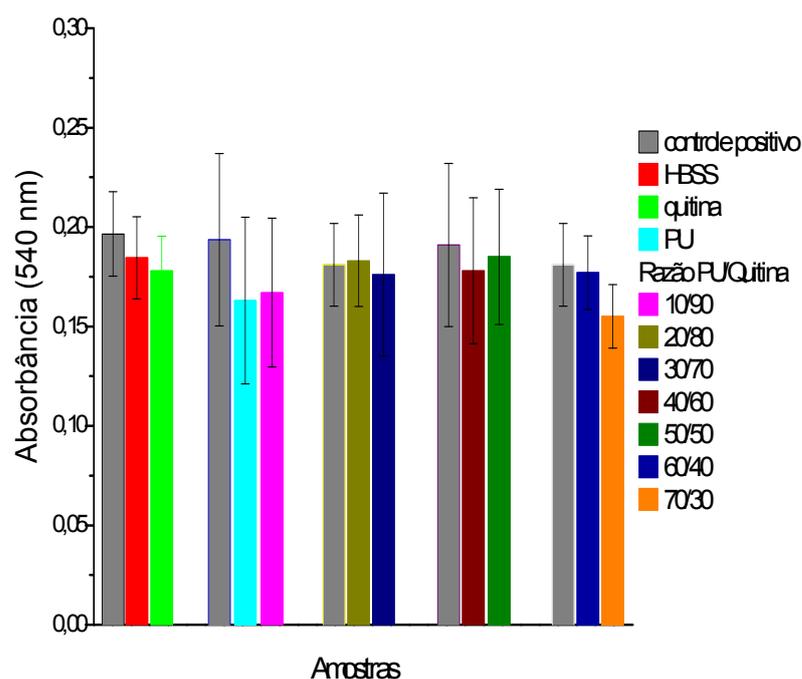


Figura 53 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade direta das soluções de HBSS puro e das submetidas no ensaio de degradação dos filmes PU e quitina puros e das redes 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40 e 70/30.

de viabilidade, ou seja o material liberados foi levemente tóxico, estes materiais liberados podem ser decorrentes de algum solvente, ou material que não foi completamente extraído do filme na lavagem com água destilada.

#### 5.11.2. Ensaio de biocompatibilidade - Adesão celular

A caracterização biológica dos filmes foram feitas pela avaliação das biocompatibilidade (adesão celular). Os resultados obtidos são discutidos nos itens que se seguem.

O ensaio de biocompatibilidade dos filmes sintetizados, deste novo conjunto de experimentos foram realizados utilizando-se o reagente MTT. Os resultados obtidos para a adesão das células Vero após 48 horas de contato com os materiais encontram-se ilustrados na Figura 54. Como se pode observar, todas as composições dos filmes apresentaram valores de absorbância estatisticamente inferiores ao valor de absorbância obtido para o controle positivo de adesão celular (placa de poliestireno utilizada para a cultura de células) e apenas as redes 70/30 apresentaram estatisticamente um sutil aumento nos valores de absorbância, em um intervalo de confiabilidade de 95%. Assim, pode-se concluir que os materiais sintetizados não favoreceram a adesão das células Vero em suas superfícies, como comparado ao do controle positivo. Isso não significa que o filme não seja biocompatível. Sabendo-se que os filmes não apresentaram efeito citotóxico para as células Vero (vide item anterior), os baixos valores de adesão poderiam ser decorrentes do curto tempo de exposição dos materiais às células.

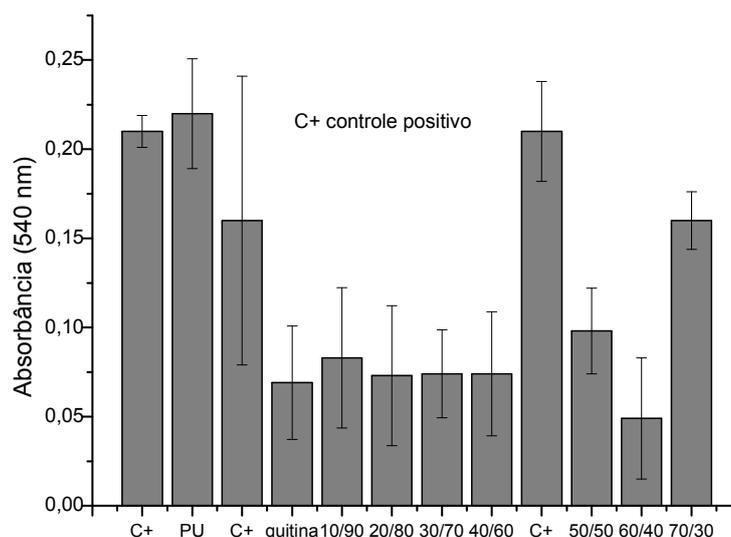


Figura 54 – Resultados do ensaio de adesão das células Vero após 48 horas de contato com os componentes puros (PU e quitina) e das redes 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40 e 70/30.

A morfologia das células presentes sobre as superfícies dos materiais mostra-se também diferenciada. De acordo com a literatura [121],[122], as células Vero, por serem dependentes de ancoragem para que haja sua reprodução, se ligam às superfícies dos materiais, apresentando morfologia alongada (Figura 55 (a)). Caso as condições ambientais não sejam adequadas, tal comportamento não é observado e as células apresentam morfologia arredondada (Figura 55 (b,c,d,e)), estando presas às superfícies dos materiais apenas por poucos pontos de contato ou seja, por ligações de fraca intensidade. Segundo Angelova e Ratner [123],[37], dentre os diversos fatores que podem influenciar a adesão das células às superfícies dos materiais destacam-se o tipo de célula utilizada (fibroblasto ou queratinócito), características físico-químicas da superfície dos materiais (energia livre superficial, carga superficial e topografia, destacando-se rugosidade, textura e porosidade).e no caso de materiais à base de quitosana o grau de desacetilação,

que segundo Chatelet et al [124], pode ser considerado o fator majoritário. De acordo com os últimos autores mencionados, para quitosana com grau de desacetilação de até 47% e células do tipo fibroblastos e queratinócitos, quanto maior o grau de desacetilação da quitina, menor a capacidade de adesão das células à superfície dos materiais e conseqüentemente, menor a proliferação celular. Já segundo Prasitsilp et al [125], que estudaram o comportamento biológico de fibroblastos (L929 e BHK21) quando do contato com membranas sintetizadas a partir de quitosanas com graus de desacetilação que variaram de 76 a 90%, o aumento do grau de desacetilação favoreceu a adesão celular. Como se pode observar, há controvérsia e a comparação entre os resultados mostrados na literatura é muitas vezes dificultada pelo uso de quitina de diferentes fontes, das diferenças entre as condições de obtenção dos biomateriais e das técnicas de caracterização utilizadas, as quais interferem diretamente nos resultados obtidos.

Já na Figura 55 (a), enquanto que o controle positivo que encontra-se repleto de células com morfologia normal, não foi observada a presença de células na superfície dos biomateriais. Em alguns casos, apenas fragmentos de células foram detectados (Figura 55 (b,c, d)). Tal fato deve estar associado, muito provavelmente, às ligações de fraca intensidade entre as células Vero e as superfícies dos materiais, conforme discutido no parágrafo anterior. Deve-se ressaltar que a baixa adesão das células Vero às superfícies dos filmes pode estar associada à própria morfologia dos filmes. De acordo com a literatura consultada [37], a ancoragem de um biomaterial ao tecido adjacente é influenciada pela presença de poros no material bem como pela morfologia e dimensão dos mesmos. Pesquisas realizadas por Campbell e Von Recum [126], mostraram que biomateriais com poros de dimensões inferiores a  $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$  causaram baixa adesão e estimularam

processos inflamatórios. Por outro lado, poros com dimensões superiores, apesar de permitirem o crescimento e a ancoragem, causaram reações inflamatórias severas.

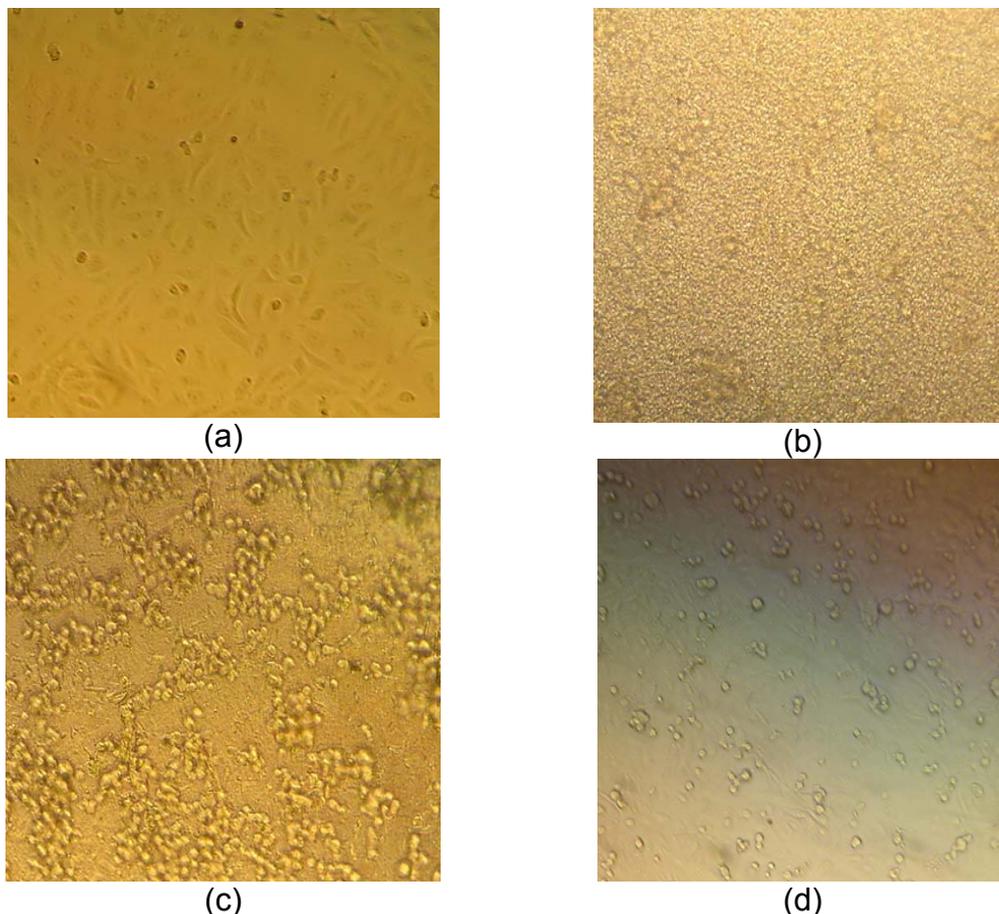


Figura 55 – Análise em microscópio invertido de contraste de fases do comportamento das células Vero após 48 horas de contato com os materiais: (a) controle positivo, filmes (b) PU puro, (c) quitina e (d) rede 10/90.

Baseando-se nos resultados de adesão e proliferação celular obtidos, pode-se dizer que todas as composições das redes PU/QTN sintetizadas neste trabalho apresentaram baixos valores de adesão de células Vero (cerca de 40%) em suas superfícies. Tal característica é favorável para biomateriais a serem utilizados como curativos do tipo barreira, já que os mesmos apresentam como funções principais a proteção física e microbiológica do ferimento, além do controle da perda de fluidos corpóreos. Para esta categoria de materiais, não é desejada a adesão celular, uma

vez que a retirada do material para a troca do curativo pode acarretar em danos no tecido ainda em cicatrização e, portanto, frágil [127].

#### 5.12. Análise histológica do implante subcutâneo da membrana de quitina

Na Figura 56, nota-se reação inflamatória crônica tipo corpo estranho contornando o material. A densidade celular em torno do material implantado é grande. Os elementos celulares predominantes são monócitos/macrófagos, linfócitos, células gigantes inflamatórias e em menor proporção, neutrófilos. Além desta composição celular observa-se, também, grande atividade angiogênica e áreas hemorrágicas dispersas na estrutura fibrovascular inflamatória. Várias células gigantes podem ser vistas em contato com o material implantado.

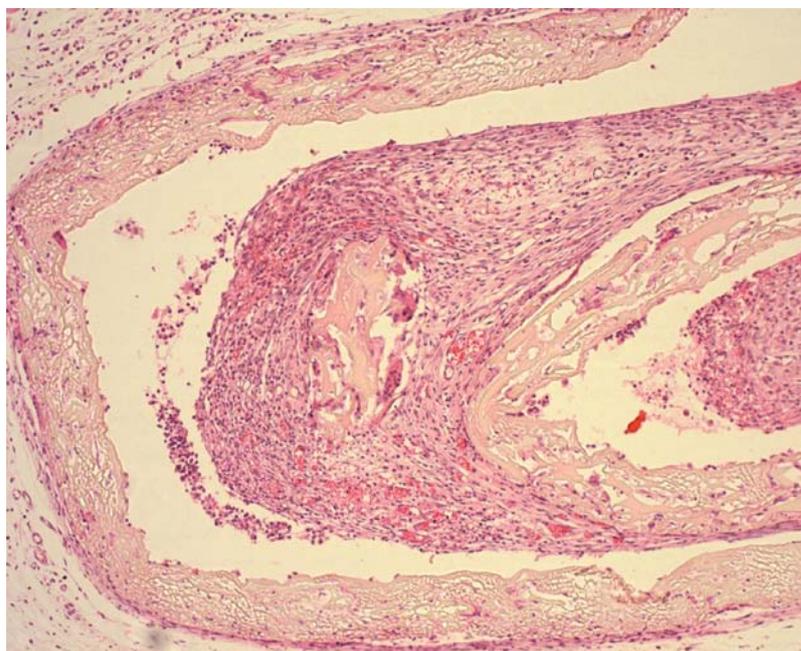


Figura 56 – Rede de PU/QTN – 50/50, após 15 dias do material implantado.

Observa-se na Figura 57, tecido fibrovascular inflamatório com predominância de monócitos/macrófagos.

Várias células gigantes são observadas em contato ou nas proximidades do material implantado.

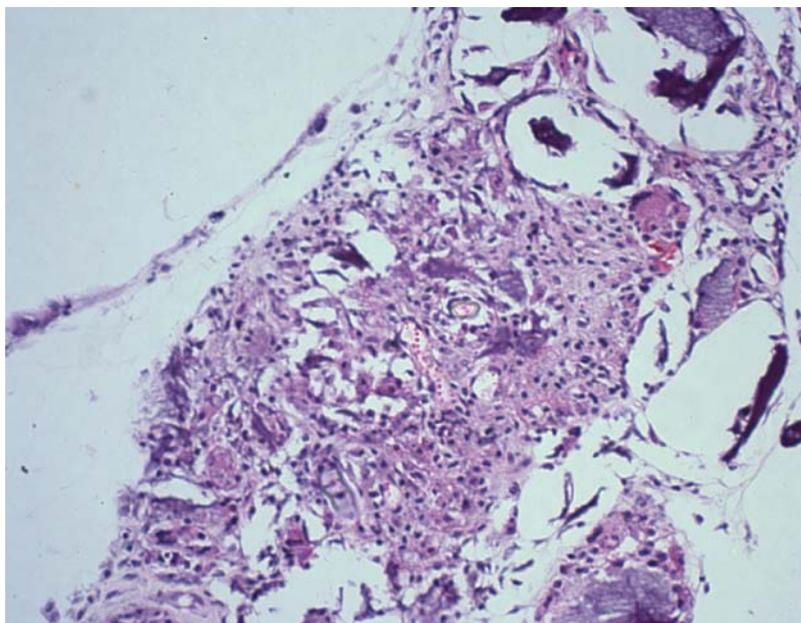


Figura 57 - Rede de PU/QTN – 50/50, após 30 dias do material implantado.

Na Figura 58, observa-se inúmeras células gigantes em contato com o material implantado. As células gigantes repousam sobre a estrutura fibrovascular definindo um autêntico granuloma tipo corpo estranho. O material eosinófilo observado na parte superior representa material fibrinóide precipitado em contato com a membrana de quitina, ou seja, necrose fibrinóide.

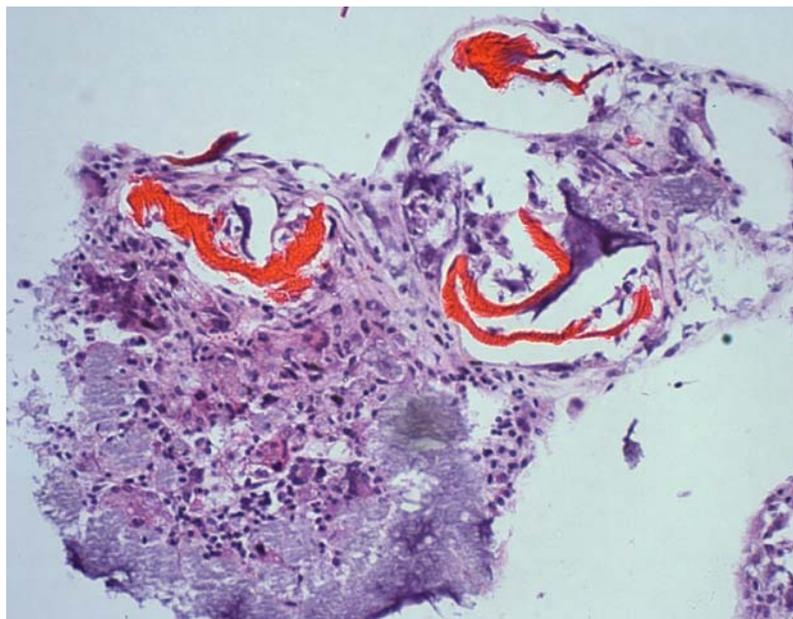


Figura 58 - Rede de PU/QTN – 50/50, após 30 dias do material implantado.

Os resultados indicaram o desenvolvimento de reação inflamatória crônica envolvendo o material no período de 15 dias. No período de 30 dias a reação inflamatória crônica se consolidou na forma de granuloma tipo corpo estranho. Isto não significa que o material não é biocompatível. A evolução vai depender se o material implantado vai atuar apenas como corpo estranho ou se vai atuar também como material imunogênico. No primeiro caso haverá formação de uma cápsula fibrosa contornando o material isolando-o do organismo. No segundo caso, haverá intensificação da reação inflamatória e rejeição do material.

Para uma melhor avaliação, o material de ser implantados em outras regiões, como intramuscular, subcutâneo e na derme para se comprovar a total incompatibilidade do uso do filme como um material biomédico.

## 6. CONCLUSÕES

A comparação com os diferentes métodos de caracterização empregados neste trabalho para as redes e para as blendas, demonstraram a viabilidade de se sintetizar redes de PU/QTN com arquitetura molecular pré-definida, onde o segmento de PU que uniu as cadeias de quitina apresentou tamanho constante. Diferentes graus de entrecruzamento foram obtidos através da variação da razão PU/QTN. Nas blendas, a interação entre os polímeros ocorreu através de uma interfase /interface que apresentou certa miscibilidade.

Verificou-se uma perda de massa para as redes contendo acima de 50% de PU, à temperaturas menores que aquelas das blendas de mesma composição, atribuída à quebra da ligação covalente (tipo uréia) entre o PU e a quitina, termicamente mais lábil.

Deslocamentos na temperatura de transição vítrea do PU, nos resultados de análise dinâmico mecânica (DMA) das blendas e das redes, indicaram um certo grau de miscibilidade entre os dois componentes. A presença de uma interfase foi confirmada através de uma nova relaxação no espectro de DMA.

Os espectros de raios X das blendas demonstraram que o aumento, de até 50% do conteúdo de PU na quitina, acarretou no aumento na miscibilidade devido a diminuição do grau da cristalinidade da quitina. Acima de 50% de PU ocorreu uma inversão de fase onde o PU atuou como matriz e a quitina como material disperso. O aumento da cristalinidade verificado nestas condições foi conferido pelo PU. Nas redes com a aumento do conteúdo reticulante (grupos NCO do PU) ocorreu a diminuição do material cristalino, devido à estrutura tridimensional formada entre as

cadeias de PU e quitina, que acarretou na redução da mobilidade das cadeias para a formação de lamelas.

O ensaio de tração demonstrou uma melhor interação PU/QTN na razão 50/50. As blendas apresentaram valores de tensão de ruptura considerados adequados (13 a 56 MPa) para aplicação como substituto ósseo, pois, cotidianamente, os ossos são submetidos a tensões de até 4 MPa, enquanto que, os tendões e ligamentos suportam entre 40 e 80 MPa.

Os estudos exploratórios para a observação direta da morfologia através de MEV revelaram que, para a blenda contendo 50% de PU, não foi possível se observar separação de fase, mas apenas de uma superfície uniforme. Esta é uma concentração onde possivelmente ocorreu um certo grau de miscibilidade entre os dois componentes, conforme sugerido por DMA e tração. As redes contendo 40% de PU revelaram uma estrutura celular e, com 20 e 60% de PU, o filme se mostrou mais liso, diferente das blendas de mesma composição.

Tanto as blendas como as redes apresentaram uma alta estabilidade com uma baixa perda de massa, não liberaram produto tóxico e tiveram uma relativamente baixa adesão celular. Característica favorável para biomateriais a serem utilizados como curativos do tipo barreira, já que os mesmos apresentaram como funções principais a proteção física e microbiológica do ferimento, além do controle de fluidos corpóreos. Os resultados preliminares *in vitro* apresentaram indicações de biocompatibilidade. Novos ensaios *in vivo* em outras regiões, e por mais tempo são necessários para concluir se o material será ou não biocompatível.

Como se pode notar, os estudos quanto ao uso da quitina na área biomédica são complexos e, apesar do grande número de trabalhos publicados envolvendo o uso da quitina nesta área, muitas vezes as informações são discrepantes ou então

incompletas, dificultando sua reprodução em laboratório. Assim, novos estudos podem contribuir muito para o desenvolvimento de biomateriais à base de quitina com características físicas, químicas, mecânicas e biológicas adequadas para a aplicação destinada.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar as propriedades mecânicas das redes PU/QTN, nas concentrações preparadas no presente trabalho.

- Realizar ensaios de biodegradação.

- Incorporar nas redes e blendas as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e proteínas osteogênicas (OPs), proteínas que induzem a neoformação óssea *in vivo* e realizar testes de liberação controlada.

- Realizar ensaios *in vivo*: Implantar os filmes nas regiões da derme, e intramuscular para concluir a biocompatibilidade destes materiais. Manter este material implantado por mais tempo para avaliar se o material será isolado por uma cápsula fibrosa ou haverá reação inflamatória e rejeição do material.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SCHILLING, A.F.; LINHART, W.; FILKE, S.; GEBAUER, M.; SCHINKE, T.; RUEGER, J.M.; AMLING, M.; "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts"; *Biomaterials*, **25** (2004) 3963-3972.
- [2] RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. "Biomedical applications of polymer-composite materials: an review"; *Composites Science and Technology*, **61** (2001) 1189-1224.
- [3] OERTEL, G. *Polyurethane Handbook*. 2a Ed. Cincinnati: Hanser Gardner. (1993).
- [4] DOMBROW, B. A. *Polyurethane*. 2a Ed. New York: Reinhold, (1965).
- [5] RABEA, E.I.; BADAWEY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGHE, G. e STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, **4** (1993) 1457-1465.
- [6] AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES M. A.; MARTINS M. C. L.; MONTEIRO F. J.; RIBEIRO C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A. C. *Biomateriais*. In: *Biotecnologia*., Lidel, (2003) 377-397.
- [7] BOOTH, C. E.; PRICE, C. *Polymers as biomaterials*. In: *Comprehensive polymer science – the synthesis, characterization, reaction and applications of polymers*. Pergamon Press (1989) 202-208.
- [8] HENCH, L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, **19** (1998) 1419-1423.
- [9] LYMAN, D. J.; ROWLAND, S. M. Biomaterials. In KROSCHWITZ, J. I.; *Polymers: biomaterials and medical applications*, John Wiley and Sons (1989) 52-71.

- [10] DUCHEYNE, P. Bioceramics: material characteristics versus *in vivo* behaviour. *J. Biomedical Materials Research: Appl. Biomaterials*, **21** (1987) 219-236.
- [11] GILDING, D. K. *Biodegradable polymers*. In: *Biocompatibility of clinical implants materials*. CRC Press (1981) 210-228.
- [12] PEREIRA, C. S., GOMES, M. E., REIS, R. L., CUNHA, A. M. Hard cellular materials in the human body: properties and production of foamed polymers for bone replacement. In: *Emulsions and cellular materials*. (1998) 193-204.
- [13] LENZ, R. W. *Biodegradable polymers*. In: *Biopolymers*, Springer-Verlag (1990) 3-39.
- [14] VISSER, S. A.; HERGENROTHER, W.; COOPER, S. Polymers. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*, Academic Press (1996) 50-60.
- [15] AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, **47** (1998) 89-144.
- [16] AKCELRUD, L. *Fundamentos da ciência dos polímeros*, Barueri, S.P. Manole (2007).
- [17] MANO, E.; *Introdução a polímero*, Ed. Edgard Blucher, 2a Ed. (1989).
- [18] JÚNIOR C. D. W. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*; Ed. LTC. 5<sup>a</sup> Ed.(2002).
- [19] SWIFT, G. Water-Soluble Polymers. *Polymer Degradation and Stability*, **45** (1994) 215-231.
- [20] DUMITRI, S.; VIDAL P.; CHORNET E. *Hydrogels based on polysaccharides*. In: *Polysaccharides in medicinal applications*. Wiley (1996) 125-194.

- [21] KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: *Biopolymers from renewable resources*, Springer-Verlag, (1998) 1-29.
- [22] HAYASHI, T. Biodegradable Polymers for Biomedical Uses. Progress in *Polymer Science*, **19** (1994) 663-702.
- [23] STACY, N.; LU, Z-J; CHEN, Z-X; NARAYAN, R. Biodegradable natural-synthetic polymer graft copolymers. *ANTEC*. (1989) 1362-1364.
- [24] LAZZERI, L. Progress in bioartificial polymeric materials. *TRIP*, **4** (1996) 249-252.
- [25] DEE, K. C., DAVID, A. P., BIZIOS, R. Biomaterials. In: *An Introduction to Tissue-Biomaterial interactions*. John Wiley & Sons, (2002) 1-13
- [26] IKADA, Y. Polymeric biomaterials in medical systems. In: *Polymeric based systems on tissue engineering, replacement and regeneration*, Kluwer academic publishers, (2002) 13-24.
- [27] MANO, J. F. E.; REIS, R. L. Viscoelastic monitoring of starch-based biomaterials in simulated physiological conditions. *Materials Science and Engineering A-Structural Materials Properties Microstructure and Processing*, **370** (2004) 321-325.
- [28] REIS, R. L. *Starch and Polyethylene based bone-analogue composite biomaterials*. Tese de doutorado, Universidade do Minho, Portugal (1999).
- [29] AGRAWAL, C. M.; RAY, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, **55** (2001) 141-150.
- [30] THOMSON, R. C.; YASZEMSKI, M. J.; POWERS, J. M.; MIKOS, A. G. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **7** (1995) 23-38.

- [31] LANGER, R.; KOHN, J. *Bioresorbable and bioerodible materials*. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press, (1996) 64-73.
- [32] BURG, K. J. L.; SHALABY, W. Absorbable materials and pertinent devices. In: *Handbook of biomaterials evaluation*, (1998) 99-110.
- [33] MUKHERJEE, D. P. Sutures In: *Polymers: biomaterials and medical applications*. John Wiley and Sons. (1989) 531-545.
- [34] JOHN, A.; HONG, L.; IKADA, Y.; TABATA, Y. A trial to prepare biodegradable collagen hydroxyapatite composites for bone repair. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **12** (2001) 689-705.
- [35] ESPIGARES, I.; ELVIRA, C.; MANO, J. F.; VAZQUEZ, B.; SAN ROMAN, J.; REIS, R. L. New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch blends and ceramic fillers. *Biomaterials*, **23** (2002) 1883-1895.
- [36] DEB, S.; BRADEN, M.; BONFIELD, W. Effect of crosslinking agents on poly(ethylmethacrylate) bone cements. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **8** (1997) 829-833.
- [37] RATNER, B. Biomaterials Science: An interdisciplinary endeavour. In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press, (1996) 1-8.
- [38] AGRAWAL, C. M. *In vitro testing of polymeric scaffolds*. In: *Polymeric based systems on tissue engineering, replacement and regeneration*. Kluwer academic publishers, (2002) 113-123.
- [39] BURMA, P.; SCHREURS, W.; VERDONSCHOT, N. Skeletal tissue engineering - from *in vitro* studies to large animal models. *Biomaterials*, **25** (2004) 1487-1495.

- [40] KIRKPATRICK, C. J.; MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects of testing potencial biomaterials *in vitro*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **1** (1990) 9-13.
- [41] GROS, L. Biological activity. In: *Polymers: biomaterials and medical applications*. John Wiley and Sons, (1989) 28-52.
- [42] WILLIAMS, D. F. *Mechanisms of biodegradation of implantable polymers*. *Clinical Materials*, **10** (1992) 9-12.
- [43] ANDERSON, J. M.; ZHAO, Q. H. Biostability of Biomedical Polymers. *Bulletin*, **16** (1991) 75-77.
- [44] HUANG, S Biodegradable polymers. In: *Polymers: biomaterials and medical applications*. John Wiley and Sons, (1989) 5-28.
- [45] MARCHANT, R. E. Biodegradability of biomedical polymers. In: *Handbook of polymer degradation*. Marcel Dekker, (1990) 617-631.
- [46] COURY, A. J.; LEVY, R. J.; MCMILLIN, C. R.; PATHAK, Y.; RATNER, B. D.; SHOEN, F. J.; WILLIAMS, D. F.; WILLIAMS, R. L. Degradation of materials in the biological environment. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press, (1996) 243-260.
- [47] OLIVEIRA, A. L.; REIS, R. L. Pre-mineralization of starch/polycrapolactone bone tissue engineering scaffolds by a calcium-silicate-based process. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **15** (2004) 533-540.
- [48] EL-AMIN, S. F.; LU, H. H.; KHAN, Y.; BUREMS, J.; MITCHELL, J.; TUAN, R. S.; LAURENCIN, C. T. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*, **24** (2003) 1213-1221.

- [49] LANGER, R.; CIMA, L.; TAMADA, J.; WINTERMANTEL, E. Future directions in biomaterials. *Biomaterials*, **11** (1990) 738-745.
- [50] PARK, K., WALEED, S. W., HAESUN, P. Biodegradation. In: *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. Technomic publishing, (1993) 13-28.
- [51] HUANG, S E EDELMAN, P. An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymer. In: *Degradable Polymers: Principles and Applications*. Chapman and Hall, (1995) 18-28.
- [52] AMINABHAVI, T. M.; BALUNDGI, R. H.; CASSIDY, P. E. A Review on Biodegradable Plastics. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **29** (1990) 235-262.
- [53] LI, S.; VERT, M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: *Degradable Polymers: Principles and Applications*. Chapman and Hall, (1995) 43-76.
- [54] KULSHRESHTHA, A. K. Chemical degradation. In: *Handbook of polymer degradation*. Marcel Dekker, (1990) 55-94.
- [55] HELLER, J. Drug delivery systems. In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press, (1996) 346-356.
- [56] MAYER, J. M.; KAPLAN, D. L. Biodegradable materials: balancing degradability and performance. *TRIP*, **2** (1994) 227-234.
- [57] LYMAN, D. Polymers. In: *Handbook of biomaterials evaluation*. (1998) 37-49.
- [58] HUANG, S.; EDELMAN, P. An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymers. In: *Degradable Polymers: Principles and Applications*. Chapman and Hall, (1995) 18-28.
- [59] SANDFORD, P. A., ANTHOSSEN, T., SKJAK-BRAEK, G.; *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. London, Elsevier (1989) 853.

- [60] CRAVEIRO, A. A., CRAVEIRO, A. C., QUEIROZ, D. C., *Quitosana- a fibra do futuro*. PADETEC, Fortaleza, Ceará, Brasil (1999) 122.
- [61] MONTEIRO, J. O. A. *Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana*. Campinas: Instituto da Química, Universidade estadual de Campinas. 2000, 113 (Tese de Doutorado).
- [62] DINESH, K.S.; ALOK, R.R.; *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews Part C*; **40** (2000) 69.
- [63] GOYCOOLEA, F. M.; AGULLÓ, E.; MATO, R.; *Fuentes y procesos de obtención en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú –CYTED-CIAD; (2004) 105
- [64] NO, H.K.; MEYERS, S.P.; Preparation of chitin and chitosan in: *Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); *European Chitin Society*; (1997) 475.
- [65] BLACKWELL, J.; PARKER, K.D.; RUDALL, K.M.; *Journal of Molecular Biology*; **28** (1967) 383.
- [66] JAWORSKA, M.; SAKURAI, K.; GAUDON, P.; GUIBAL, E.; Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties *Polymer International*, **52** (2003) 198.
- [67] ZAKARIA, M. B., MUDA, W.M.W., ABDULLAH, P., *Chitin and chitosan*. Malaysia. Universiti Kehangsaan (1994) 67.
- [68] CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. *Biomaterials*, **12** (1993) 65 -70.
- [69] MUZZARELLI, R.A.A., Parisier, E. R. Proceedings of the First International Conference on Chitin/chitosan, MIT *Sea Grant Report MITSG 78*, **7** (1978) 182.

- [70] SANNAN, T., KURITA, K. IWAKURA, Y.; Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses *Makromol. Chem.*, **178** (1977) 3197.
- [71] LIM, L.Y.; WAN, L. S. C. Heat treatment of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **21**, (1995.) 839 - 846.
- [72] TAGER, 1978TAGER, A. *Physical chemistry of polymers*. 2a.Ed. Moscou: Mir Publishers, (1978).
- [73] PENICHE-COVAS, C.; JIMÉNEZ, M. S. Characterization of silver-binding chitosan by thermal analysis and electron impact mass spectrometry. *Carbohydrate Polymer*, **9** (1988) 249 - 256.
- [74] ARAI, K.; KINUMAKI, T.; FUJITA, T.; Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **56** (1968) 89.
- [75] NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; SEO, H.; NISHI, N.; TOKURA, S.; AZUMA, I.; Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated. *J. Biome. Mater. Res.*, **20** (1986) 1359.
- [76] MUZZARELLI, R. A. A.; in *Polymeric Biomaterials* (S. Dumitriu, Ed.) Marcel Dekker, New York, (1994) 179.
- [77] MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, **67** (1990). 938- 942.
- [78] SINGH, D. K.; RAY, A. R.; Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Macromol. Chem. Phy.*, **C40** (2000) 69-83.
- [79] HIRANO, S. et al. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J. Agric. Food Chem.*, [S. I.], **38** (1990) 1214.

- [80] HIRANO, S.; ITAKURA, C.; SEINO, H. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activities on chitosan digestible in hens and rabbits. Presentation at the *International Symposium on Carbohydrate Chemistry*. New York: Ithaca, (1986).
- [81] KONO, M.; MATSUI, T.; SHIMIZU, C. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, [S. I.], **53** (1987) 125.
- [82] FUKADA, Y.; KIMURA, K.; AYAKY, Y. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipides*, [S. I.], **26** (1991) 395-399.
- [83] WINTEROWD, I. G.; SANDFORD, P. A. *Chitin and Chitosan*. In: *Food Polysaccharides and their application*. New York: Elsevier Applied Science, (1995) 441-462.
- [84] MI, F. W.; LIN, Y. M.; WU, Y. B.; SHYU, S. S.; TSAI, Y. H.; Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behaviour *Biomaterials*, **23** (2002) 3257-3267.
- [85] BALSAMO, V.; MEWMAN, D.; GOUVEIA, L.; HERRERA, L.; GRIMAU, M.; LAREDO, E., Molecular dynamics and crystallization kinetics in PSMA 14/PCL blends, *Polymer*, **47** (2006) 5810-5820.
- [86] ORAS, D. S.; LOPES, D. R.; CALIL, M. R., Thermal properties and enzymatic degradation of blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone) with starches, *Polym. Testing*, **24** (2005) 756-761.
- [87] CORDEN, T. J.; JONES, I. A.; RUDD, C.D.; CHRISTIAN, P.; DOWNES, S. Initial development into a novel technique for manufacturing a long fibre thermoplastic bioabsorbable composite in situ polymerization of poly-epsilon-caprolactone. *Composites Part A Appl. Sci.*, **30** (1999) 737-746.

- [88] CHEN, B., SUN, K., Poly( $\epsilon$ -caprolactone) / hydroxyapatite composites: effects of particle size, molecular weight distribution and irradiation on interfacial interaction and properties. *Polym Test.*, **24** (2005) 64-70.
- [89] BEZWADA, R. S.; JAMIOKOWSKI, D.D.; LEE, I.; VISHVAROOP, A.; PERSIVALE, J.; TREKA-BENTIHIN, S.; ERNETA, M.; SURYADEVARA, J.; YANG, A.; LIU, S. Monocryl suture, a new ultra-piable absorbable monofilament suture. *Biomaterials*, **16** (1995) 1141-1148.
- [90] DARNEY, P.D.; MONROE, S. E.; KLAISLE, C. M.; ALVARADO, A., Clinical evaluation of the Capronor contraceptive implant preliminary report. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **160** (1989) 1292- 1295.
- [91] WOODWARD, S. C.; BREWER, P. S.; MOATAMED, F. The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res.*, **44** (1985) 437-444.
- [92] PITT, C. G., GRATZEI, M. M., KIMMEI, G. L., SURLLES, J., SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters. II. The degradation of poly(DL-lactide), poly( $\epsilon$ -caprolactone), and their copolymer *in vivo*. *Biomaterials*, **2** (1981) 215-220.
- [93] HEPBURN, C. *Polyurethane Elastomers*. Elsevier Science Publishers Ltd. 2a Ed. New York (1992).
- [94] OERTEL, G. *Polyurethane Handbook*. Hanser Publisher, New York (1985).
- [95] OERTEL, G. *Polyurethane Handbook*. 2a Ed. Cincinnati: Hanser Gardner (1993).
- [96] DOMBROW, B. A. *Polyurethane*. 2a Ed. New York: Reinhold (1965).
- [97] PETROVIC, Z. S.; FERGUSON, J. Polyurethane elastomers. *Prog. Polym. Sci.*, **16** (1991) 695-836.
- [98] VILLAR, W. D. *Química e tecnologia dos Poliuretanos*. 1a Ed. Rio de Janeiro: Pronor (1993).

- [99] REHMAN, I. U.; Biodegradable Polyurethanes: Biodegradable Low Adherence Films for the Prevention of Adhesions after Surgery *J. Biomaterials Applications*, **11** (1996) 182-257.
- [100] PKHAKADZE, G.; GRIGORIEVA, M.; GLADIR, I.; MOMOT, V. Biodegradable polyurethanes; *J. Materials Science-Materials in Medicine*, **7** (1996) 265-267.
- [101] SKARJA, G. A.; WOODHOUSE, K. A.; Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J. Biom. Scie.- Poly. Edition*, **9** (1998) 271-295.
- [102] DAVARAN, S.; ENTEZAMI, A.; Synthesis and Hydrolysis of Polyurethanes containing Ibuprofen Groups. *J. Bioactive and Compatible Polymer*, **12** (1997) 47-58.
- [103] NAKAMURA, K.; NISHIMURA, Y.; ZETTERLUND, P.; HATAKEYAMA T.; HATAKEYAMA, H.; Phase transitions of lignin-based polycaprolactones and their polyurethane derivatives. *Thermochimica Acta*, **283** (1996) 433-441.
- [104] HATAKEYAMA, H.; HIROSE, S.; HATAKEYAMA, T.; NAKAMURA, K.; KOBASHIGAWA, K.; MOROHOSHI, N.; TG-FTIR studies on biodegradable polyurethanes containing mono- and disaccharide components *J. Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, **A32** (1995) 743-750.
- [105] DUPRET, I.; DAVID, C.; COLPAERT, M.; LOUTZ, J. M.; WAUVEN, C. V.; Biodegradation of poly(ester-urethane)s by a pure strain of micro-organisms. *Macromol. Chem. Phys.*, **200** (1999) 2508-2518.
- [106] SIMAS, E. R; AKCELRUD, L. Fluorescent aggregates in naphthalene containing poly(urethane-urea)s. *J. Luminesc.*, **105** (2003) 69-79.

- [107] Disponível em <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-81> (acessado no dia 09/07/2007).
- [108] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65** (1983) 55-63.
- [109] SARASAM, A.; SUNDARARAJAN, V. M.; Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, **26** (2005) 5500-5508.
- [110] TANODEKAEW, S.; SWASDISON M. P. S.; THAVORNYUTIKARN, B.; POTHSREE, T. PATEEPASEN, R.; Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application. *Biomaterials*, **25** (2004) 1453-1400.
- [111] ARGUELLES-MONAL, P.; DAVIDENKO, W.; SASTRE, N.; GALLARDO R.; ROMAN, A.; Self curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials*, **20** (1990) 1869-1878.
- [112] KIM, S.S.; KIM, S. J.; MOON, Y.D.; LEE, Y.M.; Thermal characteristics of chitin and hydroxypropyl chitin. *Polymer*, **35** (1994) 3212.
- [113] KIM, S.S.; KIM, S. J.; LEE, Y.M.; Preparation, characterization and properties of beta-chitin and n-acetylated beta-chitin. *Journal of Polymer Science; Part B: Polymer Physics*, **34** (1996) 2367-2374.
- [114] BITTIGER, H.; MARCHESSAULT, R. H.; NIEGISCH, W. D.; Crystal structure of poly- $\epsilon$ -caprolactone. *Acta Crystallographic*, **B26** (1970) 1923-1927.

- [115] BOGDANOV, B.; TONCHEVA, V.; SCHACHT, E. FINELLI, L. SARI, B. SCANDOLA, M.; Physical properties of poly(ester-urethanes) prepared from different molar mass polycaprolactone-diols. *Polymer*, **40** (1990) 3171-3182.
- [116] REN, L.; TOKURA, S.; Structural aspects of poly(methyl metacrylate)-grafted- $\beta$ -Chitin copolymers initiated by ceric salt. *Carbohydrate Polymers*, **23** (1994) 19-25.
- [117] CHEN, B.; SUN, K.; REN, T.; Mechanical and Viscoelastic properties of chitin fiber reinforced poly( $\epsilon$ -caprolactone). *European Polymer Journal*, **41** (2005) 453-457.
- [118] HONMA, T.; ZHAO, L.; ASAKAWA, N.; INOUE, Y.; Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitin and Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan films with compositional gradients: fabrication and their biodegradability. *Macromolecular Bioscience*, **6** (2006) 241-249.
- [119] INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION ISO 10993-5(E). Biological evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, (1992).
- [120] KIRKPATRICK, C.J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Regulatory Affairs*, **4** (1992) 13-32.
- [121] LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates. *Cytobios*, **101** (2000) 115-122.
- [122] GENARI, S.C.; DOLDER, M.A.H. e WADA, M.L.F. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology*, **28** (1996) 565-572.

- [123] ANGELOVA, N. e HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Tibtech*, **17** (1999). 409-421.
- [124] CHATELET, C.; DAMOUR, O. e DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, **22** (2001) 261-268.
- [125] PRASITSILP, M.; JENWITHISUK, R.; KONGSUWAN, K.; DAMRONGCHAI, N. e WATTS, P. Cellular responses to chitosan *in vitro*: the importance of deacetylation. *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, **11** (2000) 773-778.
- [126] VON RECUM, A.F.; CAMPBELL, C.E.; Microtopography and soft tissue response. *Journal of Investigative Surgery*, **2** (1989) 51-74.
- [127] LOKE, W.K.; LAU, S.K.; YONG, L.L.; KHOR, E. e SUM, C.K. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. *Journal of Biomedical Materials Research. Applied Biomaterials*, **53** (2000) 8-17.