Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais





Letícia Tasca dos Reis Corrêa

Desenvolvimento e Caracterização *de Scaffolds* 3D de Alginato de Sódio e Goma Gelana

Belo Horizonte Agosto de 2018



Letícia Tasca dos Reis Corrêa

Desenvolvimento e Caracterização de Scaffolds 3D de Alginato de Sódio e Goma Gelana

Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Belo Horizonte Agosto de 2018

Corrêa, Letícia Tasca dos Reis.
Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* 3D de alginato de sódio e goma gelana / Letícia Tasca dos Reis Corrêa. - 2018. 112 f. : il., fotos, grafs.
Orientador: Hermes de Souza Costa.
Dissertação (mestrado) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2018. Bibliografia.
1. Disco intervertebral. 2. Hidrogéis. 3. Polissacarídeos bacterianos. 4. Alginatos. I. Costa, Hermes de Souza. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca - Campus I / CEFET-MG Bibliotecária: Rosiane Maria Oliveira Gonçalves - CRB/6-2660



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO "DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS 3D DE ALGINATO DE SÓDIO E GOMA GELANA"

Autora: Letícia Tasca dos Reis Corrêa Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Hermes de Souza Costa (ORIENTADOR) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Claudinei Rezende Calado Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

orcello Permont

Prof. Dr. Marcello Rosa Dumont Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Belo Horizonte, 14 de Agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha saúde, disposição e determinação para a realização de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais Cláudio e Silvana por todo amor, que diante de todos os desafios estiveram incondicionalmente ao meu lado apoiando minhas decisões.

Ao meu irmão Marcelo pelo incentivo e irmão Maurício pela leitura atenciosa, correção do texto e grande ajuda durante essa etapa.

Ao Felipe, pelo companheirismo, por me ajudar em todos os momentos, por apoiar minhas escolhas e sempre torcer por mim.

Aos meus familiares, tios, primos e minha querida vó Glória por suas orações e pelo grande incentivo.

Ao meu orientador Hermes de Souza Costa, pelos ensinamentos, compreensão, tempo e paciência, a mim dedicados. Meus sinceros agradecimentos por todo direcionamento, conselhos e dicas. Sua preciosa ajuda, foi fundamental para realização deste trabalho.

À querida professora Maria Celeste Monteiro de Souza Costa pelo carinho e por me mostrar o caminho da pesquisa, colaborando para o meu crescimento acadêmico. Agradeço também pelos conselhos que foram importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do CEFET- MG que contribuíram para minha formação acadêmica e aprendizagem em especial agradeço a professora Ivete Peixoto Pinheiro Silva, Ezequiel de Souza Costa Júnior e Sidney Nicodemos. Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo apoio prestado durante a realização dos meus experimentos e por dividir dúvidas e angústias nesta jornada.

Às colegas de laboratório: Ana Flávia, Raissa, Wânia, Ana Esther e Franciele pela ajuda, amizade e agradável convivência ao longo do curso.

Ao colega Francisco por ceder seu horário no laboratório de caracterizações para que eu pudesse finalizar meus ensaios.

Ao Centro Federal de Educação tecnológica de Minas Gerais – CEFET – MG pelo apoio financeiro e ao Departamento de Engenharia de materiais - DEMAT.

Agradeço a todos aqueles que estiveram envolvidos de alguma forma na realização deste trabalho.

RESUMO

O disco intervertebral (IVD) é uma complexa e especializada estrutura fibrocartilaginosa que fica entre os corpos vertebrais ósseos possuindo as funções de fornecer estabilidade, absorver e dissipar uniformemente as cargas mecânicas e permitir movimentos articulares à coluna vertebral Ele é formado pelo Núcleo Pulposo (NP), circunferencialmente rodeado pelo Anel Fibroso (AF). A degeneração do IVD é um problema clínico desafiador que demanda medidas para regenerações do disco lesionado. Os hidrogéis apresentam propriedades elásticas potencialmente viáveis para tratar lesões do IVD. Atualmente, hidrogéis a base de goma gelana e alginato têm sido cada vez mais utilizados na engenharia de tecidos. A goma gelana (GG) é um polissacarídeo extracelular secretado pela bactéria Pseudomonas elodea, que dependendo do processamento é capaz de formar um gel firme e transparente com características que permitem sua aplicação como matriz para crescimento de células, bem como para suporte e sustentação celular. O alginato, um polissacarídeo natural extraído de algas marinhas, possui propriedades mucoadesivas, além de ser biocompatível e biodegradável. A Engenharia de Tecidos constitui uma área promissora na reparação da lesão pela restauração ou reconstrução viável de um tecido ou órgão por meio do desenvolvimento de matrizes tridimensionais porosas, habitualmente designadas por scaffolds. Nesse trabalho, foram preparadas matrizes tridimensionais de hidrogél através da mistura de suspensões aquosas de poli (ácido algínico) 1%(m/v) e suspensões aquosa 1%(m/v) de goma gelana (massa molar = 1.000.000), seguidas por reticulação com solução aquosa de CaCl₂ 2%(m/v). As estruturas das blendas AS-GG-(CaCl₂) foram caracterizadas por meio de MEV, TGA, DRX e FTIR. Foi realizado ensaio de compressão nas blendas, com a finalidade de se obter a resistência a compressão e o módulo de elasticidade das amostras estudadas. Os resultados indicam estratégia com potencial para produção de hidrogéis que contribuam na regeneração de discos intervertebrais.

Palavras-chaves: Disco intervertebral. Hidrogéis. Alginato de sódio. Goma gelana. Scaffolds.

ABSTRACT

The intervertebral disc (IVD) is a complex and specialized fibrocartilaginous structure which is located between the vertebral bodies providing stability and the function of retain and dissipate mechanical loads evenly and allow the spine joint movements, , It consists of the nucleus pulposus (NP), circumferentially surrounded by the fibrous ring (AF). Degeneration of the IVD is a challenging clinical problem that requires measures for regenerating the injured disc. Hydrogels have potentially viable elastic properties to treat IVD injuries. Currently hydrogels based on alginate and gellan gum are being increasingly used in tissue engineering. Gellan gum (GG) is an extracellular polysaccharide secreted by the bacterium *Pseudomonas elodea*, which depending on the processing is capable of forming a firm, transparent gel with characteristics that allow its use as matrix for cell growth as well as support and cellular sustainability. Alginate which is a natural polysaccharide extracted from seaweed, has mucoadhesive properties, and is biocompatible and biodegradable. The Tissue Engineering is a promising area to repair the damage by restoring viable or reconstruction of a tissue or organ through the development of three-dimensional porous matrices, commonly known as scaffolds. The aim of this study is to develop and characterize scaffolds 3D of Sodium Alginate (AS) and gellan gum (GG) to assess the possibility of its use as a biomaterial and assist in the tissue regeneration process, providing another treatment option to injuries associated with the spine. In this work, three-dimensional hydrogel matrices were prepared by mixing 1% (m / v) aqueous poly (alginic acid) suspensions and 1% (w / v) aqueous suspensions of gellan gum (molar mass = 1,000,000), followed by crosslinking with aqueous 2% CaCl 2 (w / v) solution. The structures of the AS-GG- (CaCl2) blends were characterized by means of MEV, TGA, DRX and FTIR. A compression test was carried out on the blends in order to obtain the compressive strength and the modulus of elasticity of the samples studied. The results indicate a strategy with potential for the production of hydrogels that contribute to the regeneration of intervertebral discs.

Keywords: Intervertebral disc. Hydrogels. Sodium alginate. Gellan gum. Scaffolds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da engenharia de tecidos para a criação de um novo tecido	21
Figura 2- Exemplos das diferentes formas de scaffolds poliméricos em engenhar	ia
de tecidos	23
Figura 3- Estrutura disco intervertebral	27
Figura 4- Representação esquemática da distribuição de pressões do disco quar	ndo
sujeito a uma carga compressiva	28
Figura 5- Disco Intervertebral humano	29
Figura 6- Comportamento mecânico dos discos durante e após a aplicação de	
Cargas compressivas	30
Figura 7- Efeito do envelhecimento e degeneração sobre a morfologia do disco	
intervertebral	30
Figura 8- Tensão-Deformação para Cartilagem	31
Figura 9- Representação de uma fissura anular	32
Figura 10- Tipos de hérnia	33
Figura 11- Representação esquemática de um hidrogel interagindo com a água.	35
Figura 12- Estrutura química do Alginato de sódio	37
Figura 13- Mecanismo de Formatação de micropartículas de alginato de sódio vi	а
interação com ions de cálcio	40
Figura 14- Estrutura química da goma gelana	40
Figura 15- Representação da dupla hélice formada pela Gelificação da goma	
gelana	41
Figura 16- Representação da Goma Gelana em forma de discos	42
Figura 17- Imagem de um esquema básico de funcionamento de um MEV	43
Figura 18- Ensaio de compressão	47
Figura 19- Comportamento da porosidade nas 3 zonas de uma matriz	49
Figura 20- Fluxograma das etapas do trabalho	50
Figura 21- Representação esquemática da obtenção dos scaffolds	54
Figura 22 - Difratograma de Raios X - Goma Gelana em pó	58
Figura 23- Espectro FTIR e estrutura química da GG	59
Figura 24- Termogravimetria e DTA para Goma Gelana em pó	61
Figura 25- Difração de Raios X – Ácido Algínico em pó	62
Figura 26- Espectro FTIR e estrutura química do AS em pó	63

Figura 27- Curvas da TGA de AS em pó sob atmosfera de N2 (30 a 9000C)64
Figura 28- Imagem de amostras (a) 0A-100G-S, hidrogel de GG e (b) 100A-0G-S,
hidrogel de poli(ácido algínico), ambas amostras imersas em solução de CaCl ₂ para
conformar os géis65
Figura 29- Matrizes obtidas de soluções de AS e GG, seguidas de mistura em
solução de CaCl ₂ 67
Figura 30- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 0A-100G-N; (b) 0A-100G-S;
(c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S69
Figura 31- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 0A-100G-N; (b) 0A-100G-S;
(c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S, em maior ampliação
Figura 32- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 50A-50G-N; (b) 50A-50G-S;
(c) 70A-30G-N; (d) 70A-30G-S; (e) 90A-10G-N e (f) 90A-10G-S72
Figura 33- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 50A-50G-N; (b) 50A-50G-S;
(c) 70A-30G-N; (d)70A-30G-S; (e)90A-10G-N e (f) 90A-10G-S, em maior ampliação
Figura 34- DRX das matrizes de goma gelana com e sem CaCl ₂ 77
Figura 35 - FTIR Matriz de Goma Gelana Preparadas (a) sem CaCl ₂ e (b) com CaCl ₂
Figura 36 - Curvas da TGA das Matrizes de Goma gelana com e sem a presença
de CaCl ₂ 79
Figura 37- DRX das matrizes de ácido algínico com e sem CaCl ₂ 80
Figura 38 - FTIR de Matrizes de Poli(ácido algínico) Preparadas (a) sem CaCl ₂ e (b)
com CaCl ₂
Figura 39- Curvas da TGA das Matrizes Poli(ácido algínico) com e sem a presença
de CaCl ₂
Figura 40- Espectro FTIR das Blendas sem CaCl ₂ 83
Figura 41- Espectro FTIR das Blendas com CaCl ₂ 84
Figura 42 - Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a)
0A-100G-N; (b) 0A-100G-S; (c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S85
Figura 43- Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a) 0A-
100G-N; (b) 50A-50G-N; (c) 70A-30G-N; (d) 90A-10G-N e (e) 100A-0G-N86
Figura 44-Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a) 0A-
100G-S; (b) 50A-50G-S; (c) 70A-30G-S; (d) 90A-10G-S e (e) 100A-0G-S87

Figura 45- Curvas da TGA das Matrizes de poli(ácido algínico) sem presença de
CaCl ₂
Figura 46- Resumo dos valores de intumescimento de hidrogéis de goma gelana e
poli(ácido algínico) para os tempos de 30, 60 e 120 minutos de imersão90
Figura 47- Perfil de intumescimento de hidrogéis de goma gelana e poli(ácido
algínico) sem adição de CaCl ₂ , para os tempos de 30, 60 e 120 minutos de imersão.
91
Figura 48- Perfil de intumescimento de hidrogéis de goma gelana e poli(ácido
algínico) sem adição de CaCl ₂ , para os tempos de 30, 60 e 120 minutos de imersão.
Figura 49- Molde para ensaio de compressão93
Figura 50- Imagem representativa de (a) tomada das medidas dos hidrogéis e (b)
amostras de hidrogéis preparadas sem adição de CaCl ₂ 94
Figura 51- Curvas Típicas Tensão x Deformação obtidas para amostras de Blendas
(a) 50A-50G-N, (b) 70A-30G-N e (c) 90A-10G-N, de Hidrogéis de Goma Gelana e
Poli(ácido algínico) sem adição de CaCl ₂ 95
Figura 52- Curvas Típicas Tensão x Deformação obtidas para amostras de Blendas
(a) 50A-50G-S, (b) 70A-30G-S e (c) 90A-10G-S, de Hidrogéis de Goma Gelana e
Poli(ácido algínico) com adição de CaCl ₂ 96
Figura 53- Fotografia mostrando aspecto de amostras após realização de ensaio de
compressão para: (a) amostra sem CaCl ₂ b) amostra com CaCl ₂ e c) destaque da
espessura das amostras após realização do ensaio de compressão100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais propriedades químicas (XG e XM) e físicas (µ, Mn, dp) do	
alginato	38
Tabela 2- Principais bandas de absorção de infravermelho para o AS	45
Tabela 3- Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG	45
Tabela 4 - Matriz Experimental	52
Tabela 5- Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG	50
Tabela 6- Resultado da TGA da GG em pó	51
Tabela 7- Bandas encontradas no espectro de infravermelho do AS em pó e seus	
respectivos grupos	33
Tabela 8- Resultado da TGA de AS em pó	54
Tabela 9- Características principais dos hidrogéis preparados	38
Tabela 10- Resultado do Ensaio de Fluorescência de Raios X de amostras de	
Hidrogéis após Liofilização	75
Tabela 11- Resultado do Ensaio de EDS de amostras de Hidrogéis após Liofilizaçã	0
	76
Tabela 12- Sumário da Análise Térmica para a Goma Gelana com e sem adição de	Э
CaCl ₂	79
Tabela 13- Sumário da Análise Térmica para Blendas Goma Gelana /Poli(ácido	
algínico) com e sem adição de CaCl ₂	39
Tabela 14- Resumo das propriedades mecânicas: Módulo de Elasticidade, % de	
alongamento e Limite de escoamento de hidrogéis de blendas de Goma Gelana e	
Poli(ácido algínico) com e sem adição de CaCl ₂	97
Tabela 15- Comparação do efeito da adição de CaCl ₂ nos valores de deformação	
das amostras dos hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) nas	
concentrações 50/50, 70/30 e 90/10	98
Tabela 16- Comparação do efeito do aumento na concentração de poli(ácido	
algínico) nos valores de deformação das amostras dos hidrogéis de goma gelana e	;
poli(ácido algínico) nas concentrações 50/50, 70/30 e 90/10 sem adição de CaCl ₂ .	98

Tabela 17- Comparação do efeito do aumento na concentração de poli(ácido algínico) nos valores de deformação das amostras dos hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) nas concentrações 50/50, 70/30 e 90/10 com adição de CaCl₂.98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF = Anel Fibroso

AS = Alginato de sódio

 $Ba^{2+} = Bário$

 $Ca^{2+} = Cálcio$

Ca = Cálcio

 $CaCl_2 = Cloreto de Cálcio$

DRX = Difração de raios X

DSC = Differential Scanning Calorimetry - Calorimetria Diferencial Exploratória

FDA = *United States Food and Drug Administration* – Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

FTIR = *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

GG = Goma Gelana

IC50 = Concentração com capacidade de inibição 50%

IVD = Disco Intervertebral

IVDs = Discos Intervertebrais

MEC= Matriz extracelular

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT= Ensaio de citotoxicidade - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NP = Núcleo Pulposo

TGA = Thermogravimetric Analysis – Termogravimetri

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos Gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO PRELIMINAR DA LITERATURA	19
3.1 Biomateriais	19
3.2 Scaffolds	21
3.3 Técnicas de preparação de estruturas porosas	23
3.3.1 Evaporação do solvente	24
3.3.2 Eletrofiação ou eletrospinning	24
3.3.3 Prototipagem rápida	24
3.3.4 Separação de fases termicamente induzida (TIPS)	25
3.4 A importância da estrutura tridimensional (3D)	26
3.5 Disco Intervertebral	26
3.5.1 Degeneração do disco intervertebral	28
3.5.2 Hérnia Discal	31
3.5.3 Tipos de hérnia de disco	32
3.5.4 Estratégias de tratamento para lesões do disco intervertebral	33
3.6 Matriz Extracelular	34
3.7 Hidrogéis	34
3.7.1 Degradação de hidrogéis	35
3.7.2 Propriedades mecânicas dos hidrogéis	36
3.7.3 Grau de intumescimento	36
3.8 Alginato de sódio	36
3.8.1 Interação com cloreto de cálcio (CaCl ₂)	38
3.9 Goma Gelana	40
3.10 Caracterização	42
3.10.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
3.10.2 Difração de raios X (DRX)	44
3.10.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTI	R44

3.10.4 Termogravimetria (Thermogravimetric Analysis – TGA)	45
3.10.5 Intumescimento de Hidrogéis	46
3.10.6 Propriedades mecânicas (Ensaios de Tração e Compressão)	46
3.10.7 Análise da atividade antimicrobiana e Teste de citotoxicidade	48
3.11 Aspectos da Porosidade x Liofilização	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Etapas do desenvolvimento do trabalho	50
4.2 Preparação dos Scaffolds	50
4.2.1 Materiais	50
4.3 Preparo das soluções	51
4.3.1 Preparo de suspensão de sal de sódio de ácido algínico (susp.AS)	51
4.3.2 Preparo de suspensão de goma gelana (susp.GG)	51
4.3.3 Preparo da solução de Cloreto de cálcio (Sol. CaCl ₂)	51
4.4. Preparo de Blendas AS e GG	51
4.5 Identificação das amostras	52
4.6 Obtenção dos Scaffolds Alginato / Goma Gelana	53
4.6.1 Caracterização das Matérias primas	54
4.6.2 Difração de Raios-X	54
4.6.3 Análise dos grupos químicos dos polímeros em pó	55
4.6.4 Análise térmica dos polímeros em pó	55
4.7 Caracterização das matrizes 3D	55
4.7.1 Aspectos das matrizes 3D	55
4.7.2 Espessura das matrizes	55
4.7.3 Caracterização morfológica dos scaffolds	55
4.7.4 Avaliação da presença de grupos químicos e cristalinidade	56
4.7.5 Fluorescência de Raio X	56
4.7.6 Grau de Intumescimento	56
4.7.7 Avaliação das propriedades mecânicas	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Caracterização das matérias primas	58
5.1.1 Caracterização da Materia prima Goma gelana	58
5.1.2 Caracterização da Matéria Prima Ácido Algínico	62
5.2 Caracterização das matrizes 3D	65

7 PERSPECTIVAS FUTURAS	3
6. CONCLUSÕES)1
5.2.11 Estudo de Compressão de Hidrogéis GG/AG9)3
5.2.10 Estudo de Intumescimento de Hidrogéis GG/AG9)0
5.2.9 Análise Termogravimétrica de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)8	8
5.2.8 Análise por DRX de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)8	35
5.2.7 Análise dos grupos químicos de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)8	32
Cloreto de Cálcio8	30
5.2.6 Caracterização de Amostras de Poli (ácido algínico) Avaliando adição de	
5.2.5 Caracterização de Amostras de GG Avaliando adição de Cloreto de Cálcio7	7
5.2.4 Avaliação de Espectroscopia por Energia de Elétrons de Hidrogéis AS +GG .7	'5
5.2.3 Avaliação por Fluorescência de Raios X de Hidrogéis AS +GG7	'4
5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) - x50 e x1006	8
5.2.1 Aspectos das matrizes 3D (Morfologia macroscópica)6	5

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado um fenômeno de envelhecimento da população mundial, refletido pelo aumento da expectativa de vida (SZPALSKI et al, 2003). A falência de órgãos e tecidos humanos causados por doenças degenerativas e traumas acarretam diversos tipos de lesões e/ou complicações tidas como um dos mais dispendiosos problemas da saúde humana na atualidade (PUPPI, 2010). Decorre desse evento o fato de que o processo de envelhecimento está associado com um aumento na ocorrência de problemas na coluna vertebral. Dentre estas intercorrências clínicas, as lesões do sistema esquelético têm sido reconhecidas como expressiva causa de morbidade nos últimos dois séculos (LEWIS, 2006).

O disco intervertebral é uma das principais estruturas envolvidas na etiologia das dores lombares (KUSLICH,1991). A degeneração do disco intervertebral (IVD) é patologia desafiadora que, devido à ineficiência dos tratamentos atuais, demanda urgentemente o desenvolvimento de novas abordagens e técnicas terapêuticas (SILVA-CORREIA et al., 2011).

Uma das abordagens no tratamento de estruturas danificadas se baseia na engenharia de tecidos, que envolve aplicações dos princípios e métodos das engenharias nos vários campos da ciência da vida, compreendendo as relações entre estruturas-funções em tecidos normais e patológicos e tem o objetivo de desenvolver técnicas de manipulação específica em ambiente de laboratórios para crescimento de moléculas, células, tecidos ou órgãos visando restaurar, manter ou aprimorar as funções de partes do corpo.

Scaffolds são matrizes tridimensionais temporárias que desempenham o papel de guiar o crescimento celular *in vitro* ou *in vivo*. Os primeiros polímeros usados como *scaffold* foram os polímeros de origem natural. Atualmente, hidrogéis a base de alginato, quitosana e goma gelana, que são exemplos de polímeros de origem natural, têm sido cada vez mais utilizados na engenharia de tecidos (SHALABY; BURG, 2004).

Materiais de implante viáveis para regeneração do IVD ainda necessitam ser identificados, porém, acredita-se que materiais baseados em hidrogéis biodegradáveis são candidatos promissores (SILVA-CORREIA et al., 2011).

Hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas hidrofílicas capazes de reter diferentes quantidades de água ou fluidos biológicos dentro de sua estrutura sem que ocorra solubilização. Em função de suas características estruturais, os hidrogéis apresentam propriedades que os tornam interessantes como biomateriais e aplicados em diversos segmentos, tais como suportes para reparo de diferentes tecidos. (MANSUR et al, 2004)

Materiais poliméricos apresentam grande semelhança aos componentes de tecido poliméricos naturais, onde a combinação de células e biomateriais pode resultar em reparo tecidual rápido, previsível e controlado (PARK; LAKES, 2010).

Os materiais Alginato e Goma Gelana demonstram importância no auxílio da recuperação de lesões no IVD. Neste trabalho foi observada a interação entre poli(ácido algínico) e goma gelana, buscando rota de processamento com avaliação da influência do pH, temperatura e razão dos polímeros, de forma à obter estruturas 3D, na ordem de grandeza associada ao crescimento celular, bem como modulando o controle da degradação e da resistência mecânica para sua utilização como biomaterial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver rota de processamento de scaffolds 3D de Alginato de sódio (AS) e Goma gelana (GG), modulando o perfil de sua degradação e resistência mecânica, bem como realizar caracterização física, química e morfológica para a sua utilização como biomaterial.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer metodologia experimental para a obtenção de blendas de hidrogéis em estrutura tridimensional e scaffolds à base de alginato de sódio (AS) e goma gelana (GG);
- Caracterizar fisicamente, quimicamente e morfologicamente os Scaffolds empregando as técnicas necessárias.
- Avaliar o comportamento mecânico através de ensaio de compressão dos materiais obtidos

3 REVISÃO PRELIMINAR DA LITERATURA

3.1 Biomateriais

Biomaterial pode ser definido como qualquer tipo de material utilizado para fabricação de dispositivos para substituição de uma parte ou de uma função do corpo. Essa substituição deve ser realizada de forma segura, confiável e econômica. Os biomateriais são amplamente usados, principalmente para aplicações médicas. Seu uso envolve crescimento celular em cultivo, ensaios em laboratórios clínicos, matrizes de diagnósticos genéticos e diversos tipos de implantes (RATNER et al., 2004).

A área de biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até as funções biológicas. A evolução atual dos biomateriais depende dos avanços tecnológicos, da biotecnologia e da ciência dos materiais. (OLIVEIRA, 2013).

O sucesso de um biomaterial ou de um implante depende de três fatores principais: as propriedades de biocompatibilidade do implante, o estado de saúde do paciente beneficiário e a competência do cirurgião que implanta e monitora seu progresso. (PARK; LAKES, 2010).

A biocompatibilidade dos materiais está diretamente associada ao comportamento das células em contato com o material e particularmente pela adesão na superfície. As características da superfície do material, topografia, composição química e energia de superfície, são parâmetros importantes em estudos de biocompatibilidade e citocompatibilidade in vitro e correspondem à primeira fase na interação célula/ material, que irá influenciar na capacidade das células se diferenciarem em contato com o implante, promovendo a reconstituição inicial do tecido original (ANSELME, 2000; VAN KOOTEN; SPIJKER; BUSSCHER, 2004).

Cada biomaterial possui uma classificação, devido seu comportamento fisiológico variável. Biotoleráveis são materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo

isolados dos tecidos adjacentes através de uma camada fibrosa. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor é a tolerabilidade dos tecidos naturais ao material. Os materiais biotoleráveis mais conhecidos são os polímeros sintéticos e a maioria dos metais. (HENCH,1993)

Bioativos são materiais que em sua superfície desenvolvem ligações químicas com o tecido. Quando esse processo ocorre no osso é conhecido como osteointegração. (Os biomateriais bioativos mais conhecidos são os vidros bioativos e vitrocerâmicas a base de fosfato de cálcio, hidroxiapatita e o trifosfato de cálcio. Atualmente, pesquisadores estão tentando desenvolver polímeros que sejam bioativos. (HENCH,1993)

Bioinertes são materiais tolerados pelo organismo, com a mínima formação do tecido fibroso como envoltório. Os materiais mais conhecidos são: alumina, zircônia, titânio e suas ligas e materiais carbonosos.

Reabsorvíveis ou biorreabsorvíveis são materiais que atuam por determinado período junto aos tecidos biológicos, e são degradados gradativamente, solubilizados ou fagocitados por células do organismo. Este material, após atuar no organismo, é eliminado por vias naturais, sem necessidade de intervenção cirúrgica (HENCH; WILSON, 1993).

São mostradas na figura 1, as etapas da engenharia de tecidos para a criação de um novo tecido que consiste no isolamento de células específicas, através de uma biópsia do paciente com o objetivo de cultivá-las em uma matriz tridimensional porosa, natural ou sintética, sob condições de cultura precisamente controladas. Com a presença de fatores de crescimento e diferenciação, o sistema construído é implantado no paciente onde ocorre direcionamento, crescimento e remodelação *in vivo* e ao mesmo tempo, a matriz se degrada e passa ser eliminada do organismo sem causar efeitos tóxico. (ZHANG; ZHANG, 2004)



Figura 1- Etapas da engenharia de tecidos para a criação de um novo tecido



3.2 Scaffolds

Os *scaffolds* ou estruturas 3D são formados por matrizes porosas, que fornecem um suporte físico e ambiente apropriado para as células proliferarem e adquirirem uma conformação semelhante à que têm nos órgãos e tecidos do organismo.(IKADA, 2006).

Esses suportes celulares permitem a ligação e migração celular de forma guiada, e devido aos poros interconectados, acaba por facilitar também o acesso dos fatores bioquímicos até as células localizadas no interior do *scaffold*. A estrutura tridimensional com poros interconectados dos *scaffolds* permite a difusão de nutrientes celulares vitais (KRUGER, et al.; 2011).

As propriedades mecânicas e de degradação estão diretamente relacionadas com o material que compõe o *scaffold*. Dessa forma, as principais interações biológicas, como adesão entre proteínas e peptídeos, adesão celular, migração, proliferação e diferenciação, são funções primárias das propriedades de superfície do material em questão (HUTMACHER et al., 2007).

O scaffold deve ter taxa de degradação sincronizada com a taxa de crescimento do

novo tecido, de modo que, quando o local da lesão estiver todo regenerado, o scaffold também esteja totalmente degradado (THOMSON et al., 1995 e IKADA, 1994).

As propriedades mecânicas, tais como, módulo de elasticidade e resistência à tração devem ser as mais próximas possíveis do tecido substituído. Se a resistência mecânica do *scaffold* for inferior à do tecido lesionado pode ocorrer deformação do material implantado. Tecidos como cartilagens e ossos requerem propriedades mecânicas diferentes dos tecidos moles. O *scaffold* deve ser capaz de suportar tração, compressão e tensões elásticas, que cada tecido está submetido quando no exercício da função orgânica específica (MIKOS et al., 1993; HIRAOKA et al., 2003).

O scaffold deve possuir microestrutura porosa capaz de aumentar a superfície de fixação e facilitar a distribuição uniforme das células dos tecidos adjacentes. A interconectividade dos poros proporciona microambiente hidrodinâmico favorável à infiltração de células e vasos sanguíneos, bem como difusão fisiológica de oxigênio e nutrientes para proliferação celular, eliminação dos metabólitos e dos subprodutos que adentram os poros. Essas propriedades permitirão a deposição da nova matriz extracelular (MEC) nos espaços de interconexão entre os poros, favorecendo a regeneração do tecido lesionado (SPAANS et al., 1998;TABATA, 2009).

A interação entre as células é dependente das características físico-químicas da superfície dos biomateriais. A hidrofilicidade da superfície do *scaffold* é um fator importante, que influencia a biocompatibilidade do material com a matriz extracelular (MEC) adjacente. Essa característica facilita a penetração dos nutrientes para o interior do *scaffold* e a exsudação dos metabólitos. Uma forma de melhorar a hidrofilicidade é envolver a superfície dos poros do *scaffold* com componentes naturais da MEC. Entre esses componentes o colágeno do tipo I é um dos mais utilizados (LI et al., 2005).

Polímeros são importantes materiais empregados em aplicações biomédicas. São materiais escolhidos para serem aplicados em dispositivos cardiovasculares, bem como para substituição e acréscimo de diversos tecidos moles (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

Os polímeros naturais e sintéticos são os mais utilizados na preparação destas matrizes em estruturas 3D. Existem diferentes formas de matrizes (Figura 2) destacando-se os típicos *scaffolds* porosos na forma de espuma sólida, os hidrogéis, os *scaffolds* fibrosos à base de nanofibras e os *scaffolds* constituídos por microesferas (DHANDAYUTHAPANI *et al.* 2011).

Figura 2- Exemplos das diferentes formas de scaffolds poliméricos em engenharia de tecidos



Fonte: PARK, 2007

Compostos de origem natural normalmente são empregados na área da engenharia de tecidos na construção de *scaffolds* aplicáveis a vários tecidos (por ex. osso, cartilagem, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais), devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, com o intuito de suportarem o crescimento e proliferação celular (MORENO, 2014).

3.3 Técnicas de preparação de estruturas porosas

A seleção da técnica de processamento de *scaffolds*, deve buscar garantir que todas as características do *scaffold* são cumpridas. Portanto, a técnica escolhida deverá atender aos seguintes critérios:

- o processamento não pode afetar as propriedades dos materiais, mais precisamente a biocompatibilidade;

- a técnica deve ser a mais precisa possível, para permitir a obtenção adequada de propriedades, sobretudo porosidade, tamanho e distribuição dos poros, além da interconectividade entre os poros;

- a reprodutibilidade do processamento e das propriedades deve ser garantida.

Várias técnicas de processamento foram desenvolvidas com o objetivo de produzir *scaffolds* com propriedades adequadas para a engenharia de tecido ósseo, entre as mais utilizadas podem ser citadas: a técnica baseada na evaporação do solvente, electrofiliação ou *electrospinning*, prototipagem rápida, e a técnica de separação de fases termicamente induzida (TIPS) combinada com a liofilização (SALGADO *et al.*, 2004).

3.3.1 Evaporação do solvente

A técnica realizada por evaporação do solvente é a mais utilizada para a preparação de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo. O polímero é solubilizado através de um solvente adequado, podendo adicionar-se à solução partículas inorgânicas (por exemplo: cloreto de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio) ou partículas orgânicas (por exemplo: sacarose). Depois a mistura é vazada em moldes, com a forma desejada, ocorrendo posteriormente a remoção do solvente, quer por evaporação ou liofilização, e a consequente obtenção da estrutura porosa pretendida. (MIKOS, et al.,1994).

3.3.2 Eletrofiação ou eletrospinning

O *eletrospinning* é um método simples e vantajoso, no qual é criado um jato de uma solução polimérica eletricamente carregada, que depois de seco ou solidificado forma uma fibra. O *eletrospinnin*g produz estruturas porosas com elevada porosidade e elevada área superficial, imitando a estrutura de uma matriz extracelular, o que torna esta técnica muito promissora para engenharia de tecidos. Os principais desafios associados são o controle da uniformidade do diâmetro das fibras e da sua orientação, além da necessidade de aumentar a taxa de produção (AGARWAL et al., 2008)

3.3.3 Prototipagem rápida

A prototipagem rápida é uma técnica que usa o desenho assistido por computador (CAD) ou outros dados digitais produzidos por equipamentos de imagiologia médica,

como por exemplo a ressonância magnética, para construir estruturas tridimensionais complexas. Numa das técnicas de prototipagem mais comuns, os *scaffolds* são fabricados por deposição de camada por camada, de materiais em forma de pó (RATNER *et al.*, 2004).

Uma das principais vantagens desta técnica é a possibilidade de introduzir proteínas e células e produzir estruturas porosas da medida do tecido hospedeiro (Aoki, 1994). Como desvantagens podem ser apontados: o fato do tamanho dos poros dos *scaffolds* fabricados ser dependente do tamanho do pó do material e a necessidade de usar solventes orgânicos (SALGADO *et al.*, 2004).

3.3.4 Separação de fases termicamente induzida (TIPS)

Este processo consiste na separação em duas fases de uma suspensão polimérica, tendo uma fase rica em polímero e outra pobre em polímero. A separação ocorre devido à adição de um solvente à solução polimérica, devendo o polímero ser imiscível no solvente. Posteriormente, o solvente é extraído e independentemente do sistema ou condições de separação de fases usadas, podem obter-se diferentes morfologias. Os *scaffolds* produzidos a partir desta técnica são altamente porosos (acima de 95%), com uma morfologia tubular e uma extensa interconectividade dos poros. Existem dois tipos de separação de fases: separação de fases solído-líquido e separação de fases líquido-líquido. O mecanismo de separação de fases sólido-líquido pode ser alcançado através da diminuição da temperatura da separação de fases para induzir a cristalização de solventes a partir de uma solução de polímero. Esta técnica é frequentemente usada para fabricar suportes de vários tipos de polímeros e materiais compósitos poliméricos. A partir desta técnica podem obter-se dois tipos de estruturas, anisotrópicas ou isotrópicas. (CHEN et al., 2008).

Nas estruturas anisotrópicas são formados canais tubulares abertos com pequenas divisões ou poros. Esta estrutura é obtida usando temperaturas de separação de fases muito baixas, ou seja, -196°C, por exemplo, quando utilizado o polímero PLLA (ZHANG *et al.*, 1999).

Em contrapartida estruturas isotrópicas apresentam geralmente poros ovais a esféricos e são obtidas com temperaturas não tão baixas, como por exemplo 0°C, e previsivelmente taxas de arrefecimento menores ou concentrações baixas de polímero (TU *et al.*, 2003).

No mecanismo de separação de fases líquido-líquido, a morfologia das estruturas porosas dos *scaffolds*, que é conseguida após a remoção do solvente, depende do estado termodinâmico do sistema quando da separação. O processo está assim sujeito à temperatura selecionada (MARTINEZ *et a*l.,2011)

3.4 A importância da estrutura tridimensional (3D)

Os órgãos e tecidos são estruturas tridimensionais em termos espaciais. As células como unidades estruturais básicas do organismo, organizam-se a partir do nível molecular e celular até tecidos ou ao nível do órgão. No corpo humano estas estruturas experimentam um microambiente tridimensional que é regulado por fatores solúveis, pelas células circundantes e pelas moléculas da matriz extracelular (LANZA, R.et al,2007).

Alguns testes *in vitro* permitiram concluir que o comportamento celular e as características fenotípicas das células são completamente diferentes, quando estas são cultivadas em suporte tridimensional (3D). O suporte 3D contextualiza a célula no espaço similar aquele encontrado *in vivo* (LIU,C. et al .,2007)

3.5 Disco Intervertebral

O disco intervertebral (Figura 3) é uma estrutura altamente especializada, consistindo de organizada rede de fibras de colágeno embebida em um gel de proteoglicanos e água, de modo que o fluido amorfo do núcleo pulposo é limitado pelas fibras do ânulo fibroso (WATKINS, 2001).

O núcleo pulposo e o ânulo fibroso interno comportam-se como um fluido pressurizado, enquanto que o ânulo fibroso externo atua como uma camada elástica, propiciando as características viscoelásticas dos discos intervertebrais (ADAMS; DOLAN, 1995).



Figura 3- Estrutura disco intervertebral

Fonte: (Anatomy and Physiology. The vertebral column, 2004)

O núcleo pulposo é uma massa gelatinosa oval que ocupa a região central do disco e é composto por 90% de água e o restante por proteoglicanas e colágeno do tipo II. O colágeno tipo II possui a capacidade de absorver forças compressivas que são importantes para a distribuição das cargas compressivas da coluna vertebral. As proteoglicanas são proteínas unidas por uma cadeia de polissacarídeos (glicosaminas) que agregam condroiditina-sulfato (MOSKOVICH, 2001).

O anel fibroso é composto por camadas de tecido colagenoso e fibrocartilagem e ancorado firmemente às vértebras adjacentes através das fibras de Sharpey. As fibras do anel fibroso são dispostas de forma oblíqua entre as vértebras de modo que sucessivas camadas perpendiculares sobrepõem-se umas sobre as outras. Numa vista horizontal, as fibras dos discos intervertebrais são posicionadas em forma helicoidal. Esta orientação garante a elasticidade do disco perante cargas de compressão (NORDIN e WEINER, 2001; PRESCHER, 1998).

A coluna vertebral está constantemente submetida a forças compressivas resultantes da ação da gravidade e cargas externas. Estas forças compressivas estão distribuídas ao longo da coluna vertebral que constitui um eficiente sistema biomecânico (WEIDLE, 2004).

Os discos intervertebrais são capazes de distribuir e atenuar os estresses compressivos entre as vértebras adjacentes. A capacidade de deformação dos discos intervertebrais quando submetidos a condições de estresse e de retornar ao seu estado inicial denomina-se elasticidade e viscoelasticidade (WEIDLE,2004). Na figura 4 pode-se observar a distribuição de pressões do disco quando sujeito à cargas compressivas.

A função do núcleo pulposo (absorção de cargas) é mais efetiva devido ao seu elevado grau de hidratação. Todavia, a quantidade de água contida no interior do disco depende diretamente da integridade dos discos intervertebrais, mais precisamente da integridade das proteoglicanas. Quando o disco é achatado, suportando elevadas cargas de trabalho, o seu fluído é absorvido (WEIDLE,2004).





Fonte: NEVES, 2015

3.5.1 Degeneração do disco intervertebral

O processo de envelhecimento pode ocasionar alterações degenerativas (bioquímicas, morfológicas e mecânicas) sobre os discos intervertebrais. Uma das modificações mais severas decorrentes do envelhecimento refere-se à redução na altura dos discos intervertebrais .Também podemos observar que, com o avanço da idade, podem ocorrer modificações no padrão de vascularização e nutrição dos discos intervertebrais, os quais podem resultar em diminuição na concentração de oxigênio e glicose e aumento de ácido lático intradiscal (BIBBY et al, 2001).

Desta forma, as alterações funcionais e estruturais que ocorrem em função do processo de envelhecimento e degeneração podem alterar o comportamento mecânico dos discos intervertebrais, e ocasionar problemas na coluna, resultando em dor.

Figura 5- Disco Intervertebral humano



Fonte: (SOBOTTA,2000)

Acredita-se que o disco intervertebral pode absorver até nove vezes o seu volume de fluido. Devido ao estado hidrofílico do disco intervertebral, o qual sempre apresenta certa pressão osmótica negativa no núcleo pulposo, proporciona ao disco um estado de pré-tensão que aumenta a capacidade deste em resistir às forças de compressão (KAPANDJI, 2000).

Quando as cargas sobre a coluna vertebral são minimizadas, ocorre imediato retorno elástico dos tecidos deformados dos discos e ocorre um influxo gradativo de fluido para o interior do núcleo pulposo e ânulo fibroso, ocasionando em recuperação na altura dos discos (KAPANDJI, 2000). Este efeito de "almofada" é referido como uma absorção do choque e está presente durante a oscilação da carga e na mudança de postura e forças produzidas pelo corpo em movimento (exemplo: caminhada e exercícios).

Na Figura 6 é ilustrado o comportamento mecânico dos discos intervertebrais submetidos à um ciclo de carga/descarga.



Figura 6- Comportamento mecânico dos discos durante e após a aplicação de Cargas compressivas

Fonte: DEZAN, 2005

Os discos intervertebrais degenerados apresentam incapacidade de recuperar a altura perdida após a aplicação das cargas e uma menor capacidade do núcleo pulposo em resistir ao estresse, ocorrendo redução no módulo de elasticidade. A Figura 7 demonstra o efeito do envelhecimento e degeneração sobre a morfologia do disco intervertebral

Figura 7- Efeito do envelhecimento e degeneração sobre a morfologia do disco intervertebral



A: Disco intervertebral normal; B: Disco intervertebral degenerado; NP: Núcleo pulposo; AF: ânulo fibroso Fonte: modificado de GOWER e PEDRINE,1969 apud DEZAN,2005

Na Figura 8 é apresentada a curva tensão-deformação para cartilagem. Na parte linear do gráfico E atinge 16 MPa. Os valores são de equilíbrio, extraídos após 60 min de tensão constante. (OLIVEIRA 2013)





Fonte: OLIVEIRA 2013

3.5.2 Hérnia Discal

O ânulo fibroso pode degenerar e sofrer rupturas ou fissuras, que pode ocorrer de forma crônica ao longo do tempo, ou até mesmo de forma aguda, após sobrecarga súbita. Na forma aguda, geralmente é referida como ruptura do disco.

Na ocorrência de fissura do ânulo fibroso pode haver dor local intensa ou até mesmo dor irradiada para algum membro. Tudo irá depender da localização e extensão dessa ruptura. A ruptura pode ser um evento isolado ou estar associada ao deslocamento do núcleo pulposo. Patologia conhecida como hérnia de disco. A hérnia de disco é considerada uma patologia extremamente comum, que causa séria incapacidade funcional em seus portadores. Estima-se que 2 a 3 % da população sejam acometidos desse processo, cuja prevalência é de 4,8% em homens e 2,5% em mulheres, acima de 35 anos (NEGRELLI, 2001). A Figura 9 ilustra fissura anular em disco intervertebral.

Figura 9- Representação de uma fissura anular



Fonte:VAN UDEN,2014

3.5.3 Tipos de hérnia de disco

Protrusas: O disco se alarga, mas contém o líquido gelatinoso no seu centro. A base do disco se avoluma e fica mais larga que o diâmetro de origem. As paredes do disco poderão tocar em regiões e áreas de grande sensibilidade nervosa, gerando dores e incapacidades. (ITC vertebral, 2017)

Extrusas: A hérnia de disco lombar extrusa é uma condição ortopédica muito frequente e importante, que afeta os discos intervertebrais da coluna. A patologia se dá quando há rompimento desse anel fibroso e o conteúdo gelatinoso interno ou núcleo pulposo sai por meio de uma fissura na membrana, havendo perda de contato dos fragmentos extravasados com o seu meio interno. (ITC vertebral, 2017)

Sequestradas: A hérnia de disco sequestrada é aquela que rompe a parede do disco e o líquido gelatinoso migra para dentro do canal medular, para cima ou para baixo. Além da pressão na raiz nervosa, provoca inflamação e compressão contínua. É o tipo de hérnia que provoca a chamada dor química, pois esse núcleo pulposo, quando fora do seu ambiente natural, tem propriedades químicas ácidas e provoca dores de elevada intensidade. (ITC vertebral, 2017)

O paciente se apresenta com postura antálgica, inclinando o tronco para o lado até atingir posição que lhe dê conforto. Neste caso, a melhora só será possível com medicamentos, repouso ou até mesmo cirurgia. Na figura 10 observa-se os diferentes tipos de hérnia discal.



Fonte: (NURSING, 2017)

3.5.4 Estratégias de tratamento para lesões do disco intervertebral

Abordagens conservadoras para tratamento da degeneração do IVD são baseadas principalmente na administração de droga, mas vários problemas requerem intervenções cirúrgicas, tais como discectomia, fusão da coluna e substituição do disco intervertebral (SILVA-CORREIA et al, 2012).

A maioria desses tratamentos reduz a dor do paciente enquanto a degeneração do disco continua progredindo. Discectomia é um procedimento cirúrgico para remoção de fragmentos do núcleo pulposo, é um tratamento eficaz no alívio de dor radicular causada por um disco herniado, porém, esse procedimento sozinho não é capaz de restaurar o núcleo na sua capacidade original de distribuição de cargas, o que à longo prazo pode causar recidiva da hérnia. Além disso, a discectomia pode acelerar a progressão da degeneração discal, danificando o ânulo fibroso. (VAN UDEN, 2014).

Encontrar o material certo para reproduzir as complexas propriedades mecânicas do AF não é uma tarefa fácil, pois é um tecido muito eficiente. E a síntese da matriz extracelular deve ser estimulada em conformidade com a taxa de degradação apresentada pelo scaffold (VAN UDEN,2014).

Durante a última década, a implantação de *cage espinhal ganhou muita atenção*. Este procedimento melhora a fusão e a estabilidade da coluna cervical, garantindo, ao mesmo tempo, um aumento adequado da altura e ajudando a corrigir a cifose cervical, isto é, uma curvatura na área cervical da coluna vertebral Atualmente, os *cages* são utilizados na cirurgia cervical, pois proporcionam força e rigidez no espaço intervertebral. Uma grande vantagem desses implantes é a sua compatibilidade à ressonância magnética, que é tradicionalmente utilizada na visualização da medula espinhal. Uma vez que o polímero é radiolúcido, a visualização no método acima mencionado pode ser realizado sem a geração de artefatos de implante nas imagens resultantes (VAN UDEN, 2014).

3.6 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como um aglomerado tridimensional complexo de macromoléculas biológicas, que interagem entre si e se ligam a receptores celulares. Está localizada no espaço intercelular e é constituída por quatro grandes famílias de moléculas. Os colágenos, os componentes do sistema elástico, as proteínas multifuncionais e os proteoglicanos / glicosaminoglicanos. Estas moléculas, que compõem a matriz extracelular, são sintetizadas, depositadas e degradadas pelas células de um modo muito bem controlado. A presença da (MEC) é crucial no nosso organismo, uma vez que desempenha multiplicidade de funções entre as quais se destacam, suporte nutricional, estrutural e regulação comportamental das células (AZEVEDO C, et al, 1999, BROHEM, C. et al, 2010).

3.7 Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais que contêm grande quantidade de água. Geralmente são materiais obtidos através da copolimerização entre monômeros ou polímeros hidrofílicos com comonômeros polifuncionais, promovendo ligações cruzadas (BEJARANO et al., 2008).

A presença destas ligações cruzadas proporciona aos hidrogéis a capacidade de absorver elevada quantidade de água ou fluidos biológicos sem perder sua estrutura (BEKIN et al., 2014; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Isso permite que os hidrogéis sejam usados na preparação de formas farmacêuticas, permitindo a liberação do fármaco após sua difusão em contato com o meio de dissolução ou em resposta a estímulos fisiológicos, tais como: temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (como exemplo, a glicose, a uréia e a insulina), força iônica e oxidação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).
Os hidrogéis podem absorver até milhares de vezes o seu peso seco em água ou fluidos biológicos (MOHAMED; SABAA, 2014). São usados como adsorventes eficazes para várias aplicações, incluindo agricultura, horticultura, produtos de cuidados pessoais, como veículos carreadores de fármacos, na adsorção de íons de metais pesados e em moléculas corantes de água (MANDAL e RAY, 2013).

Figura 11- Representação esquemática de um hidrogel interagindo com a água



Fonte: MOURA, 2005

Os hidrogéis de alginato de sódio, bem como os hidrogéis de goma gelana promovem hidratação, não permitindo reações citotóxicas ao organismo, promovendo restauração funcional do tecido lesionado, uma vez que promovem o ambiente ideal para a recuperação de lesões (CURATEC, 2013),

A combinação destes biopolímeros permite a modulação de suas propriedades de modo a serem utilizadas como alternativa para aplicações biomédicas.

3.7.1 Degradação de hidrogéis

O termo amplamente usado para "degradação" pode ser definido como processo onde a deterioração nas propriedades de um polímero acontece devido a fatores de diferentes origens tais como: radiação, química, térmica, mecânica, entre outras. Portanto, a degradação pode ser o resultado de atividades químicas tais como: solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise, bem como, atividades físicas que podem erodir a matriz de blenda polimérica devido à: difusão, abrasão, trinca, descamação, quebra mecânica ou combinação de qualquer umas dessas atividades físicas ou químicas. Uma das formas mais simples de se avaliar o efeito dessas atividades é através da avaliação da perda de massa que normalmente ocorre por dois fenômenos, a solvatação e a despolimerização da cadeia polimérica (COSTA JR et al., 2008; OREFICE, 2003; PANEVA, 2003; ZHANG, 2001). Entretanto, quando o colapso de ligações químicas do material acontece devido à ação de organismos vivos que conduzem à mudanças nas propriedades físicas do mesmo, pode-se dizer que ocorre a biodegradação (COSTA, JUNIOR,2008).

3.7.2 Propriedades mecânicas dos hidrogéis

As propriedades mecânicas de um hidrogel polimérico podem ser caracterizadas pelo seu comportamento de resposta a aplicação de uma carga. Polímeros, como as borrachas, são macios e com grande capacidade de recuperação elástica, ou seja, a retirada da carga promove seu retorno à forma original. A liberdade de movimento das cadeias do polímero é mantida no nível local, enquanto que a estrutura de rede, resultante da reticulação química ou do emaranhado da cadeia, dificulta o movimento em grande escala ou o fluxo. Assim, os polímeros dessa classe tendem a apresentar menor módulo de elasticidade ou rigidez e grande capacidade de deformação (COSTA, JUNIOR, 2008).

3.7.3 Grau de intumescimento

As características físico-químicas de um hidrogel são determinadas pelo seu grau de intumescimento. Esse processo depende da composição química dos polímeros que formam o hidrogel, do pH e da força iônica do meio em que ele está inserido. Assim, enquanto o gel se hidrata, as cadeias poliméricas interagem com as moléculas do solvente e se expandem, enquanto isso, a área reticulada oferece uma força de retração para conter a expansão dos polímeros. Esse movimento de retração e expansão ocorre até que se atinja o equilíbrio em uma dada temperatura (BAJPAI e BATTHARAI, 2010).

3.8 Alginato de sódio

O alginato é um polissacarídeo natural e é usado amplamente em pesquisas relacionadas à engenharia de tecidos (BEKIN et al., 2014; SHALABY; BURG, 2004) É composto pela repetição de duas diferentes unidades, a (1,4)-α-L-guluronato ou unidade G e a (1,4)-β-D-manuronato ou unidade M (STEVENS, 2009). (Figura 12).



Figura 12- Estrutura química do Alginato de sódio

O alginato é extraído de algas, solúvel em água, onde sua principal função é estrutural, conferindo resistência e flexibilidade ao tecido (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014). Devido à sua habilidade de reter água e suas propriedades estabilizantes, gelificantes e espessantes, o alginato é comumente utilizado em alimentos, cosméticos, como também encontra aplicações em indústrias de papel, têxtil e farmacêuticas (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014; CHAN; LEE; HENG, 2002). Considerado biocompatível e biodegradável, o Alginato possui capacidade de formar matrizes porosas de gel com propriedades mucoadesivas (PAUL; SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

A estrutura do gel de alginato é governada não somente pela concentração e estrutura química do material do gel, mas também pela cinética de formação do mesmo, que depende da concentração de cátions, da força iônica e do pH. A viscosidade de soluções de alginato depende dos arranjos dos blocos M e G. Na Tabela 1 são apresentadas as características de alginatos obtidos com os dois principais tipos de algas, uma rica em grupos M e outra em grupos G. Comercialmente eles são divididos em três classes, de acordo com a viscosidade: baixa viscosidade (LV), média viscosidade (MV) e alta viscosidade (HV). (TURBIANI, 2007).

Alga	Tipo	N°	X _G (%)	X _M (%)	μ (dL/g)	M _n (kDa)	dp
Macrocystis pyrifera	Alto-M	LV	0,38	0,62	5,9	72,7	367
		MV	0,35	0,65	9,6	119,9	606
		HV	0,37	0,63	10,7	134,5	679
Laminaria hyperborea	Alto-G	LV	0,63	0,37	5,9	73,1	369
		MV	0,57	0,43	6,8	84,6	427
		HV	0,63	0,37	17,0	217,7	1099

Tabela 1- Principais propriedades químicas (XG e XM) e físicas (µ, Mn, dp) do alginato

Fonte: (TURBIANI, 2007)

A composição molecular específica de uma amostra de alginato depende da alga de onde o mesmo é extraído, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G). Os Alginatos com a maior porcentagem de grupos G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinérese, o que significa a expulsão de líquido da matriz. Géis de Alginato com maior porcentagem de grupos M são mais elásticos e dificilmente sofrem sinérese (SABADINI,2015). A viscosidade das soluções de AS aumenta à medida que o pH diminui, no limite de 3,0 a 3,5. A manipulação da massa molecular pode controlar a viscosidade do hidrogel por meio da combinação do AS de baixa e alta massa molecular (KONG; LEE; MOONEY, 2002).

3.8.1 Interação com cloreto de cálcio (CaCl₂)

Uma propriedade importante do alginato é sua habilidade de interagir e formar gel quando em contato com cátions divalentes, tais como o Ba²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ (BEKIN et al., 2014; GEORGE e ABRAHAM, 2006). A formação do gel é resultado das ligações cruzadas que ocorrem com os cátions divalentes, onde estes se alojam entre as cadeias do polímero, formando uma estrutura de rede. A quantidade de íons Ca²⁺ presente no sistema interfere na estabilidade destas redes poliméricas, formando associações intercadeias temporárias ou permanentes. Se os níveis de

cálcio na rede de gel são pequenos, observam-se formações na rede de cadeias tipo temporária, que se transformam posteriormente em soluções altamente viscosas e tixotrópicas Contudo, se as quantidades de íons cálcio são elevadas na rede de gel, observa-se formações na rede das cadeias tipo permanente, com formação de precipitado no gel. Existem estudos demonstrando que a estrutura química e o tamanho da molécula de alginato, assim como a cinética de formação do gel coligado ao tipo de íon empregado, são fatores determinantes das propriedades do mesmo, como capacidade de intumescimento, porosidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, resistência do gel e suas características imunológicas (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Existem dois métodos para gelificação do alginato de sódio com cálcio. No primeiro método, íons de cálcio bivalentes são homogeneamente liberados dentro de uma solução de alginato para causar gelificação uniforme, que pode ser alcançada através da dispersão prévia de um sal de cálcio de baixa solubilidade. À medida que o cálcio ionizado na solução interage com polímeros de ácido algínico, mais sal será solubilizado, resultando eventualmente na formação de um gel homogêneo. Alterações no pH ou temperatura também podem ser utilizadas para controlar a liberação de íons de cálcio por toda a solução de alginato (KESTER e FENNEMA, 1986).

Ao se adicionar diretamente íons cálcio em uma solução de alginato de sódio, a gelificação ocorre instantaneamente na região de contato e o gel formado não pode mais ser manuseado e vertido em um molde para a formação de filme homogêneo.

Um segundo método de formação de géis de alginato envolve a difusão de íons de cálcio no interior da solução. Quando o cálcio ionizado entra em contato com o alginato em solução, um gel desenvolve-se instantaneamente na interface. A gelificação prossegue quando os íons de cálcio difundem através da interface gelmembrana (GLICKSMAN, 1983). A figura 13 mostra o mecanismo de Formatação de micropartículas de alginato de sódio via interação com ions de cálcio.





Mecanismo de formação de micropartículas de alginato de sódio via interação com íons cálcio

Fonte: MACIEL, 2013

3.9 Goma Gelana

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo aniônico produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea* através da fermentação aeróbica (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). A GG pode ser usada para a obtenção de géis emulsificantes, os quais são amplamente utilizados em cosméticos, indústria alimentícia e indústria farmacêutica (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). A GG possui um esqueleto linear de unidades repetidas dos monossacarídeos 1,3 β -D-glucose, 1,4 β -D-ácido glucurônico, 1,4 β -D-glucose, 1,4 α -L-ramnose, ilustrados na Figura 14.

Figura 14- Estrutura química da goma gelana



Fonte: PRAJAPATI et al, 2013.

A obtenção de polissacarídeos de origem microbiana apresenta algumas vantagens em relação a outros tipos de gomas e, por isso, esses polissacarídeos têm sido os mais estudados nos últimos anos. A preferência se deve às suas características e propriedades funcionais, que estão relacionadas à capacidade de espessar, capacidade de retenção de água e capacidade de manter partículas em suspensão, dentre outras (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004 apud LIMA, 2011, p. 105).

A Goma gelana proporciona géis muito claros o que é vantajoso em análses microscópicas de células e tecidos. A sua gelificação ocorre pela formação de dupla hélices no sentido antihorário resultando em uma rede tridimensional (figura 15). (SABADINI,2015). A GG é estável em temperaturas mais elevadas, preservando sua força em 90°C. A fusão do gel pode variar em temperaturas abaixo ou acima de 100°C (GIAVASSIS et al, 2000).

Ambientes mais ácidos ou mais alcalinos podem reduzir o crescimento celular e consequentemente reduzir a produção da goma gelana (PRAJAPATI et al., 2013).



Figura 15- Representação da dupla hélice formada pela Gelificação da goma gelana.

Fonte: SABADINI,2015

Uma propriedade importante exibida pela GG é demonstrar excelente estabilidade em vasta faixa de pH, que pode ser de 3,5 a 8,0 (CANILHA et al., 2006), mas o valor ótimo para a produção de goma gelana varia de 6,5 a 7,0.

A produção da GG tem sido relacionada ao crescimento celular (CANILHA et al., 2006). O hidrogel de GG tem mostrado sustentar eficientemente a distribuição e o crescimento de condrócitos humanos articulares e suportam a deposição da hialina como ME, conduzindo à formação de cartilagem funcional (SILVA-CORREIA et al., 2012; SILVA-CORREIA et al., 2011).

Nesse contexto, a avaliação de blendas dos polímeros alginato de sódio e goma gelana, deverão ser processadas e submetidas à caracterização para avaliar sua funcionalidade no cumprimento dos requisitos para uso humano, através de ensaios pré—clínicos. Na Figura 16a e 16b é possível observar a versatilidade deste material para obter diferentes formas geométricas que podem ser usadas em ampla gama na engenharia de tecidos e aplicações biomédicas.



Figura 16- Representação da Goma Gelana em forma de discos.

A) Discos de GG (B) Scaffolds 3D após liofilização.Fonte: OLIVEIRA, 2010

3.10 Caracterização

3.10.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura possui diversas aplicações na bioengenharia tecidual: visualizar arcabouços porosos de forma adequada, possibilitando,

inclusive, observar as interconexões entre os poros. (OLIVEIRA, 2010)

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente maiores que outros instrumentos. As imagens possuem alta profundidade de foco, permitindo a análise de diferentes relevos da superfície da amostra simultaneamente em foco. (GONÇALVES, 2007).

São imagens tridimensionais, sem perda de nitidez. A coluna do microscópio consiste de fonte de elétrons, lentes eletromagnéticas e bobinas de varredura operando sob o vácuo. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios X) os quais são captados por detectores apropriados. As lentes eletromagnéticas juntamente com os diafragmas são usados para reduzir o diâmetro do feixe de elétrons e focalizá-los sobre a superfície da amostra, uma vez que o diâmetro do feixe produzido diretamente pela fonte de elétrons convencional é muito grande para gerar a imagem definida em alta definição. Ao atingir a amostra o feixe de elétrons deve então ter tamanho menor que 10nm e corrente suficiente para formar uma imagem definida. As bobinas de varredura têm função de refletir o feixe e controlar sua varredura sobre a superfície da amostra (GONÇALVES, 2007).





Fonte: ALAVARSE,2015

3.10.2 Difração de raios X (DRX)

A interação entre a radiação X e a matéria que a radiação atravessa resulta no espalhamento dos raios. No instante em que os raios X são espalhados pelo ambiente ordenado do material, chamado cristal, ocorre a interferência, tanto construtiva quanto destrutiva da radiação espalhada, pois a distância entre os centros espalhadores são da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda da radiação, resultando assim na difração da mesma (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

Quando um feixe de raios X atinge a superfície de um cristal em um ângulo θ, parte é espalhada pela camada dos átomos da superfície. O espalhamento ocorre como consequência da interação da radiação com os átomos cuja distância interplanar é d, onde os feixes refletidos através do cristal apresentarão o fenômeno da difração

Assim, podemos escrever que se a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá superposição construtiva; caso contrário haverá superposição destrutiva. Esta condição é descrita pela Lei de Bragg (Equação 1).

$2dsen\theta = n\lambda$

onde λ é o comprimento de onda da radiação, n é o número inteiro, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência do feixe de raios X.

3.10.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho compreende a região de radiação com número de onda com intervalo de aproximadamente 12800 a 10cm⁻¹ ou comprimento de onda de 0,78 a 1000µm. Segundo Skoog, Holler e Nieman (2002), o espectro infravermelho é dividido em faixas de radiação que compreendem o infravermelho próximo, médio e distante.

A espectroscopia de reflexão no infravermelho tem apresentado inúmeras

aplicações, especialmente para amostras sólidas que são de difícil manipulação, como filmes de polímeros por exemplo (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

A tabela 2 mostra as principais bandas de absorção associadas aos respectivos grupos químicos do alginato de sódio em pó.

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos químicos
3360-3380	Estiramento de O-H
2930-2532	Estiramento de C-H
1608-1611	Estiramento assimétrico de COO
1413-1414	Estiramento de COO ⁻ e estiramento de C-O
1176	Estiramento de C-C
1087-1088	Estiramento de C-O-C
947	Estiramento de C-O
892	Estiramento de C-C-H e estiramento de C-C
781	Estiramento de C-C-O

Tabela 2- Principais bandas de absorção de infravermelho para o AS

Fonte: ABREU et al., 2008.

A tabela 3 mostra as principais bandas de absorção associadas aos respectivos grupos químicos da goma gelana em pó.

Tabela 3- Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG.

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos químicos
3420	Estiramento de O-H
2920	Estiramento de C-H
1618	Estiramento assimétrico de COO
1412	Estiramento de COO ⁻
1037	Estiramento de C-O

Fonte: SILVA-CORREA et al., 2011.

3.10.4 Termogravimetria (Thermogravimetric Analysis – TGA)

É uma das técnicas de análise térmica na qual a variação da massa da amostra, que pode ser tanto o ganho quanto a perda dessa massa, é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a variação controlada de temperatura (IONASHIRO; GIOLITO, 1980; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). Os experimentos são executados por meio de termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). Esta técnica permite conhecer as reações ocorridas pela massa da substância provocadas pelo aquecimento, permitindo correlacionar a faixa de temperatura em que elas ocorrem, a temperatura em que a massa da substância começa a se decompor e, assim, realizar o acompanhamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição etc. (MATOS; MACHADO, 2007).

3.10.5 Intumescimento de Hidrogéis

O grau de intumescimento é importante para analisar o comportamento do material estudado mediante a sua absorção de fluido, pois desde o início o material deve ser mantido em contato para que sua estrutura de rede solvatada possa se deformar (COSTA JÚNIOR, 2008). A proporção de ligações cruzadas existente é um fator importante que afeta diretamente o grau de intumescimento, sendo definida como a razão entre a quantidade de matéria do agente reticulante e a quantidade de matéria das unidades de repetição do polímero. Quanto maior a razão de ligações cruzadas maior quantidade de agente reticulante é incorporada à estrutura do hidrogel, no qual a estrutura ficará mais rígida. Porém, o grau de intumescimento será maior quando este apresentar menor razão de ligação cruzada (PEPPAS apud COSTA JÚNIOR, 2008). O grau de intumescimento também pode ser afetado pela composição química de um polímero. Os polímeros que contêm grupos hidrofílicos absorvem maior quantidade de fluidos quando comparados àqueles que contém grupos hidrofóbicos, pois estes minimizam a exposição dos mesmos à água (PEPPAS apud COSTA JÚNIOR, 2008).

3.10.6 Propriedades mecânicas (Ensaios de Tração e Compressão)

O ensaio de tração é considerado um dos ensaios mecânicos de tensãodeformação mais comuns. Nesse ensaio uma carga de tração é aumentada de maneira gradativa e uniaxialmente ao longo do eixo do corpo de provas. A amostra é deformada, geralmente até a sua fratura. Normalmente a configuração do corpo de provas é em forma de uma "gravata borboleta". Essa configuração do corpo de provas é escolhida porque, durante os ensaios, a deformação fica confinada à região central mais estreita (que possui uma seção transversal uniforme ao longo de seu comprimento) e, ainda, para produzir a probabilidade de fratura nas extremidades do corpo de provas.

Em um ensaio de tração o corpo de prova tende a aumentar seu comprimento ao longo da direção da tensão aplicada. A máquina de ensaios de tração é projetada para alongar o corpo de provas em uma taxa constante, ao mesmo tempo em que mede contínua e simultaneamente a carga que está sendo aplicada. O resultado de um ensaio de tração é registrado como carga ou força em função de um alongamento (CALISTER; RETHWISCH, 2012).

Um ensaio de compressão é conduzido de uma maneira semelhante à de um ensaio de tração, exceto pelo fato de que força é compressiva e o corpo de prova se contrai ao longo da direção da tensão. É a aplicação de carga compressiva uniaxial em um corpo-de-prova. Nos ensaios de compressão, os corpos de prova são submetidos a uma força axial para dentro, distribuída de modo uniforme em toda seção transversal do corpo de prova. Este ensaio pode ser executado na máquina Universal, com adaptação de duas placas lisas, uma fixa e outra móvel. É entre elas o corpo de prova é apoiado. Um corpo submetido à compressão sofre uma deformação elástica e a seguir uma deformação plástica. (CALISTER apud DALCIN, 2007) (Figura 18).

Figura 18- Ensaio de compressão



Fonte: DALCIN, 2007

3.10.7 Análise da atividade antimicrobiana e Teste de citotoxicidade

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas. Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade. (ROGERO et al, 2003)

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana. Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia clínica, utilizase rotineiramente o método de disco-difusão em ágar para testar os patógenos mais comuns e de crescimento rápido (ANVISA M2-A8).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization, o ensaio de citotoxicidade in vitro é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessá- rios em animais de laboratório (ROGERO et al, 2003).

Citotoxicidade pelo método MTT Utiliza-se cultura de células da linhagem celular derivada da córnea do coelho ou outras, adicionadas do corante vital MTT [ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Este método mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazolium. O parâmetro final de avaliação é o estabelecimento da IC50 (i.e. a concentração da substância-teste que inibe 50% do crescimento celular). (ANVISA, 2003)

3.11 Aspectos da Porosidade x Liofilização

A importância do uso desse método em matrizes porosas seria uma opção de método de secagem no qual tem possibilidade de manter as características estruturais mais intactas, ou seja, não afetaria muito as propriedades mecânicas e também manteria os poros formados pelos cristais após a sublimação da solução. A porosidade nas amostras não ocorre de forma homogênea, pois sua estrutura, tanto interna, quanto externa depende diretamente do processo ao qual estas são submetidas. No processo de liofilização a microestrutura das amostras pode claramente ser dividida em três zonas distintas, cada uma delas caracterizada por um tipo de morfologia e com dimensões de poros distintos (LEMOS,2013).



Figura 19- Comportamento da porosidade nas 3 zonas de uma matriz

Fonte: LEMOS,2013

Na primeira zona (zona1), a mais próxima da área de contato com o frio, nenhuma porosidade é observada e o material, é denso. Na segunda zona, o material é caracterizado por uma morfologia celular. Finalmente, na zona superior (zona 3), o material é lamelar, com longos poros paralelos alinhadas na direção de crescimento do cristal de gelo. A predominância das zonas, assim como a morfologia dos poros, dependerá do tipo de material, da temperatura, da taxa de resfriamento e também do material que acondiciona as A Figura 16 é somente uma ilustração esquemática da morfologia de poros predominantes em matrizes compostas por material polimérico, obtidas pela técnica de liofilização. (LEMOS,2013)

4 METODOLOGIA

4.1 Etapas do desenvolvimento do trabalho

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas etapas de caracterização das matérias primas, preparação e caracterização dos *scaffolds* (Figura 20). As análises de caracterização foram baseadas na identificação de propriedades físicas e físico-químicas de *scaffolds* destinados à regeneração do disco intervertebral.



Figura 20- Fluxograma das etapas do trabalho

Fonte: Elaborado pela própria autora

4.2 Preparação dos Scaffolds

4.2.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram: poli(ácido algínico) em pó da Sigma-Aldrich[®] (massa molar (MW) = 100.000 g/mol, com aproximadamente 61% de ácido manurônico e 39% de ácido gulurônico, correspondendo a relação M/G de 1,56); goma gelana em pó da marca Sigma-Aldrich[®] (GelzanTM CM, $F_W = 1.000.000$); cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂ da marca Vetec, PM igual a 147,01); ácido acético na concentração de 1% (v/v) (CH₃COOH - Cat.#49199, da marca Sigma-Aldrich[®]).

4.3 Preparo das soluções

4.3.1 Preparo de suspensão de sal de sódio de ácido algínico (susp.AS)

A suspensão de sal de sódio de ácido algínico (AS) foi preparada a partir de 1% (m/v) em água deionizada e mantida por 24 horas sob agitação de 100rpm. Posteriormente, sob agitação, foi adicionada gota-a-gota, solução aquosa de ácido acético para correção do pH à 5,3±0,1. Em seguida o sistema foi mantido por mais 30 minutos sob agitação. A suspensão resultante foi desaerada em baixo vácuo com pressão de 350mmHg, por 120 minutos.

4.3.2 Preparo de suspensão de goma gelana (susp.GG)

A GG, conforme fornecida pelo fabricante, foi dissolvida em água destilada sob constante agitação para obter uma suspensão de 1% (m/v). A suspensão foi mantida por 24 horas sob agitação de aproximadamente 100rpm. Sob essa agitação foi adicionada, em seguida, gota-a-gota solução de ácido acético para correção do pH à 5,3±0,1. O sistema foi mantido por mais 30 minutos sob a mesma agitação e posteriormente desaerado em vácuo com uma pressão de aproximadamente 350mmHg por 120 minutos.

4.3.3 Preparo da solução de Cloreto de cálcio (Sol. CaCl₂)

A solução de CaCl₂ foi preparada com uma concentração de 2% (m/v). e mantida por 1 hora sob agitação de 100rpm.

4.4. Preparo de Blendas AS e GG

Para a obtenção das blendas, as concentrações por massa foram pré-determinadas, juntamente com a massa a ser pesada de cada polímero. Inicialmente as suspensões dos polímeros puros foram produzidas separadamente. Após a completa dispersão, as suspensões (susp. AS) e (susp. GG) foram misturadas e mantidas sobre agitação magnética por mais 12 horas. Após esse período a mistura

foi vertida em placa de petri e em Microplaca, seis poços, fundo plano, buscando a formação de hidrogel. Parcela das suspensões, após vertidas nos moldes, foram resfriadas até a temperatura de 0°C e mantida por período de 12 horas, quando foram preenchidas ou não, com solução de cloreto de cálcio 2%(m/v) em água, e mantidas por mais 24 horas. Posteriormente todas essas amostras foram submetidas ao processo de liofilização durante 8 horas, realizado no equipamento modelo Terroni LT600.

4.5 Identificação das amostras

As amostras dos hidrogéis foram preparadas misturando as suspensões poliméricas e a solução de agente reticulante (CaCl₂) em diferentes proporções, como apresentado na tabela 4. As concentrações por massa foram pré-determinadas, juntamente com a massa a ser pesada de cada polímero e os procedimentos para obtenção das blendas foi descrito na tabela 5.

Massas Utili (g)	CaCla	Descrição	
Poli(ácido algínico) Goma Gelana			
0	100	Não	0A-100G-N
0	100	Sim	0A-100G-S
۶O	FO	Não	50A-50G-N
50	50 -	Sim	50A-50G-S
70	00	Não	70A-30G-N
70	- 30	Sim	70A-30G-S
	10	Não	90A-10G-N
90	10	Sim	90A-10G-S
	_	Não	100A-0G-N
100	0	Sim	100A-0G-S

Tabela 4 -	Matriz E	xperimental.
------------	----------	--------------

Fonte: Elaborado pela própria autora

Material	Composição das Suspensões Iniciais	Procedimento para Preparo dos Hidrogéis (Mesmo para todas as Blendas)
Blenda 50:50	1,0g de Alginato em 100mL de água destilada. 1,0 de Goma Gelana	- Solubilização do
	em 100mL de água destilada.	Alginato em água destilada sob agitação magnética;
Blenda 70:30	1,4g de Alginato em 140mL de água destilada	- Solubilização da Goma Gelana em água destilada sob agitação magnética constante
	0,6g de Goma Gelana em 100mL de água destilada.	- Após completa solubilização dos polímeros, as soluções foram misturadas:
Blenda 90:10	1,8g de Alginato em 180mL de água destilada.	- Agitação magnética por mais 12 horas na temperatura de 22ºC.
	0,2g de Goma Gelana em 100mL de água destilada.	

Tabela 5 - Procedimentos para obtenção das blendas

Fonte: Elaborado pela própria autora

4.6 Obtenção dos Scaffolds Alginato / Goma Gelana

As matrizes obtidas a partir dos vários hidrogéis foram preparadas através da transferência das suspensões para moldes de poliestireno, permitindo sua geleificação na temperatura de 0°C. Em seguida foram imersas ou não, em solução de cloreto de cálcio 1%(m/v) e congeladas em freezer por 24 horas, posteriormente as amostras foram liofilizadas com a finalidade de se remover toda a água, dando

origem a estruturas porosas.

Para o processo de liofilização foi utilizado o equipamento Terroni LT600 por cerca de 8 horas conforme mostrado na figura 21..



Figura 21- Representação esquemática da obtenção dos scaffolds

Fonte: REBELO, 2015

4.6.1 Caracterização das Matérias primas

O poli(ácido algínico) e a goma gelana em pó foram caracterizados empregando as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), espectroscopia de absorção na região do infravermelho(FTIR) e difração de raios X (DRX).

4.6.2 Difração de Raios-X

Para a determinação dos parâmetros de cristalinidade do polímero GG foi realizada a técnica de difração de raios-X (DRX) no equipamento SHIMADZU XRD 7000 com 20 variando de 4,00 a 90,00° e passo de 0,06°.

4.6.3 Análise dos grupos químicos dos polímeros em pó

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho - *FTIR* para o AS e GG realizada em um espectrofotômetro da Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21 equipado com transformada de Fourier, *FTIR*-8400S e acessório ATR. A técnica foi conduzida com 68 varreduras entre 4000cm⁻¹ e 400cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalo de 2cm⁻¹.

4.6.4 Análise térmica dos polímeros em pó

A análise térmica do poli(ácido algínico) e goma gelana em pó foi realizada através da termogravimetria (*TGA*) para o AS e GG obtida através do equipamento SII EXSTAR, modelo *TG/DTA* 7200, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 90 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento à razão de 10°C min⁻¹, em suporte de alumina na temperatura compreendida entre 10°C a 900°C.

4.7 Caracterização das matrizes 3D

4.7.1 Aspectos das matrizes 3D

As matrizes obtidas foram avaliadas qualitativamente quanto aos aspectos macro morfológicos e macro homogêneo a olho nu e registrados em fotografias. As análises visuais e táteis foram realizadas de forma subjetiva.

As matrizes foram avaliadas levando em consideração parâmetros como continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem), flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e facilidade de manuseio.

4.7.2 Espessura das matrizes

A espessura das matrizes foi mensurada através de paquímetro universal

4.7.3 Caracterização morfológica dos scaffolds

Para a caracterização morfológica dos *scaffolds*, foi utilizada a microscopia electrónica de varredura (MEV), o que possibilita determinar o tamanho médio dos poros e, ainda, a presença ou não de interconectividade entre os poros. Matrizes

reticuladas com e sem CaCl₂ em sua formulação foram cortadas com auxílio de um estilete e, em seguida, recobertas com uma espessura fina de ouro, utilizando um metalizado, tiveram a morfologia de sua superfície e da seção transversal analisadas por microscopia eletrônica de varredura

4.7.4 Avaliação da presença de grupos químicos e cristalinidade

As técnicas de FTIR e DRX foram utilizadas para avaliação da presença de grupos químicos e cristalinidade das matrizes respectivamente. Os espectros de FTIR foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada) A técnica foi utilizada com 68 varreduras entre 4000cm⁻¹ e 500cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalo de 2cm^{-1.}

4.7.5 Fluorescência de Raio X

Foi realizado ensaio por fluorescência de raio X nas amostras contendo CaCl₂ para avaliar os elementos presentes nas amostras, bem como a presença de impurezas.

4.7.6 Grau de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado a fim de se avaliar a absorção de fluido para tempos de imersão de 0,5h, 1 h e 2h em água destilada. As amostras em triplicatas de cada proporção de blenda foram preparadas, pesadas em balança analítica e colocadas em recipiente de imersão. Foram mantidas à temperatura ambiente e após seus respectivos períodos de tempo imersas, foram retiradas e pesadas novamente. (COSTA, JUNIOR,2008).

O intumescimento das matrizes foi calculado em função da massa total inicial da amostra (Equação 2), onde m_u é a massa úmida e m_0 e massa seca final.

$$I = \frac{m_u - m_0}{m_0}$$

4.7.7 Avaliação das propriedades mecânicas

Para se caracterizar os *scaffolds*, as amostras foram submetidas a ensaios de compressão para a determinação do módulo de elasticidade e da tensão de ruptura. A resistência à compressão dos hidrogéis foi realizada de maneira confinada nas amostras em formato cilíndrico, com 25 mm de diâmetro e 5 mm de altura. O teste foi realizado à temperatura ambiente. Foi utilizada taxa de compressão de 0,2 mm/s.

Os ensaios mecânicos de compressão foram realizados nos hidrogéis hidratados de forma a entender melhor a influência da concentração dos polímeros e CaCl₂ na resistência mecânica do material em estudo. A presença de água na rede também determina o comportamento mecânico da amostra. Para amostras secas, não existe uma relação linear entre a tensão e a deformação, no entanto, é necessário testar o seu comportamento mecânico no estado em que se prevê a sua aplicação, isto é, hidratado. (BORGES, 2015)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das matérias primas

5.1.1 Caracterização da Materia prima Goma gelana

5.1.1.1 Difração de raios X

O difratograma obtido referente ao pó da GG, é mostrado na figura 22. Observa-se padrão de difração típico daqueles observados em materiais semicristalinos, definido por uma longa faixa amorfa que se estende entre os valores de ângulos iguais a 7,0° e 55,0°, e dois picos largos posicionados nos valores do ângulo em torno de 9,5° e 19,0°, semelhante aos valores verificados em Yang et al. (2013), Pereira et al. (2014) e Cardoso et. al. (2017). Foi observada também a presença de alguns picos cristalinos posicionados em 28,5°, 31,5°, 32,8° e 36,0° sugestivos de materiais inorgânicos à base de potássio, utilizados no beneficiamento do polímero.



Figura 22 - Difratograma de Raios X - Goma Gelana em pó

Fonte: Elaborado pela própria autora

5.1.1.2 A espectroscopia de absorção na região do infravermelho - FTIR

O espectro de infravermelho da Goma Gelana em pó é apresentado na Figura 23.



Figura 23- Espectro FTIR e estrutura química da GG

Fonte: Elaborado pela própria autora

O espectro de infravermelho da goma gelana exibiu uma banda larga entre 3000 e 3600cm⁻¹, que pode ser associado às vibrações O-H, além da banda observada em torno de 2886 cm⁻¹, relacionada ao estiramento dos grupos C-H e das bandas em 1590cm⁻¹e 1394cm⁻¹, relacionados respectivamente às vibrações de estiramento

assimétrico e simétrico dos ânios carboxilato. Em 1020cm⁻¹é identificado um pico que pode ser associado ao estiramento da ligação C-O. Esses resultados e grupos químicos, também foram observados nos estudos de Pereira et al. (2014). A tabela 5 apresenta as principais bandas associadas aos respectivos grupos químicos da goma gelana.

Bandas	Grupos Químicos
3320cm ⁻¹	Estiramento de O-H
2886cm ⁻¹	Estiramento de C-H
1590cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de COO
1394cm ⁻¹	Estiramento simétrico de COO
1020cm ⁻¹	Estiramento de C-O

Tabela 5- Principais bandas de absorção de infravermelho para a GG.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.1.3 Análise térmica do polímero em pó

A Figura 24 e a tabela 6 mostram os resultados de TGA para o pó de goma gelana pura. O material apresentou perda de massa de 16% na faixa de temperatura até cerca de 240°C, o que pode ser devido à perda de água. A temperatura de degradação começa em 242°C. Um primeiro evento de degradação promoveu perda em peso de 35% e outro evento se inicia com uma perda de peso gradual de 41% até 900°C. O resíduo remanescente foi de 8% do peso inicial da amostra. Durante o estágio de degradação, a amostra sofre reações endotérmicas de oxidação, seguidas por reações exotérmicas de pirólise (MACHADO at. al., 2003).

Também na figura 24 a curva de DTA, na faixa de temperatura de 20 a 900°C mostra pico endotérmico em 82°C associado ao processo de desidratação da amostra. Foi observado também pico exotérmico em 247°C que pode estar associado ao processo de degradação do polímero. Um pico discreto posicionado em 108°C pode ser atribuído a fusão da porção cristalina da goma gelana

(SUDHAMANIA at. al., 2003) e o pico endotérmico a 247°C deve-se ao processo inicial de degradação, confirmando os resultados da TGA mostrados na figura.



Figura 24- Termogravimetria e DTA para Goma Gelana em pó

Fonte: Elaborado pela própria autora

Tabela 6- Resultado da	TGA da	GG e	em pó.
------------------------	--------	------	--------

Evento térmico	Temperatura (^⁰ C)	Perda de massa (%)
Desidratação	22 a 240	16
Decomposição térmica da Goma Gelana	240 a 594	62
Degradação da Goma Gelana	594-900	16
Resíduo final	900	6

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.2 Caracterização da Matéria Prima Ácido Algínico

5.1.2.1 Difração de raios X





São observados dois picos de difração em valores 20, o primeiro pico em 20=13,5⁰ (d=0,228nm) associado ao plano cristalográfico (110), refletindo o plano da unidade do poliguluronato. O segundo pico de menor intensidade em 20=21,8⁰ (d=0,141nm) associado ao plano cristalográfico (200), refletindo o plano da unidade do polimanuronato. O terceiro pico é considerado um halo amorfo. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Sundarrajan et al. (2012).

5.1.2.2 A espectroscopia de absorção na região do infravermelho – FTIR

O espectro FTIR de amostra do pó de poli(ácido algínico) utilizado como matéria prima, que é mostrado na figura 26, apresenta absorção das principais bandas em 3320cm⁻¹ associada ao estiramento do grupo O-H, a banda de 2886cm⁻¹ associada ao estiramento do grupo C-H, em 1590cm⁻¹ e 1393cm⁻¹, ao estiramento assimétrico de COO⁻, em 1297cm⁻¹ e 1020cm⁻¹, ao estiramento de C-O, em 1079cm⁻¹, ao estiramento de C-C, em 1021cm⁻¹, ao estiramento de C-O-C, em 945cm⁻¹, ao estiramento de C-O e em 912cm⁻¹ ao de C-C-H, em 841cm⁻¹, ao de C-C e em 778

cm⁻¹ associada ao C-C-O. Os valores verificados estão em conformidade com aqueles encontrados por Fan et al. (2006) e Abreu et al. (2008).



Figura 26- Espectro FTIR e estrutura química do AS em pó

Fonte: Elaborada pela autora

A tabela 7 apresenta as principais bandas associadas aos respectivos grupos químicos do poli(ácido algínico).

Tabela 7- Bandas encontradas no espectro de infravermelho do AS em pó e seus respectivos grupos

Bandas	Grupos químicos
3243cm ⁻¹	Estiramento de O-H
2926cm ⁻¹ a 3000cm ⁻¹	Estiramento de C-H
1592cm ⁻¹ e 1413cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de COO ⁻
1297cm ⁻¹ e 1021cm ⁻¹	Estiramento de C-O
1079cm ⁻¹	Estiramento de C-C
1021cm ⁻¹	Estiramento de C-O-C
945cm ⁻¹	Estiramento de C-O
912cm ⁻¹	Estiramento de C-C-H
841cm ⁻¹	Estiramento de C-C
778 cm ⁻¹	Estiramento de C-C-O

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.1.2.3 Análise térmica do polímero em pó

Na tabela 8 estão apresentados os valores da *TGA* do alginato de sódio correspondentes aos eventos térmicos de desidratação e decomposição.

Evento térmico	Temperatura (ºC)	Perda de massa (%)
Desidratação	22 a 228	23
Decomposição térmica da Goma Gelana	228 a 582	44
Degradação da Goma Gelana	582-900	20
Resíduo final	900	13

Tabela 8- Resultado da TGA de AS em pó.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na figura 27 é possível observar a curva de *TGA* do AS conforme fornecido pelo fabricante, onde são evidenciadas três etapas de perda de massa.





Fonte: Elaborado pela própria autora

5.2 Caracterização das matrizes 3D

5.2.1 Aspectos das matrizes 3D (Morfologia macroscópica)

Durante o preparo das suspensões de goma gelana, foi observada elevada viscosidade em pH ácidos, sugestivo de maior associação entre as cadeiais e consequentemente influenciando sobre as propriedades da suspensão e na capacidade de sua mistura para o preparo de blendas na forma de gel. O estudo de Franco (2011) mostra resultados que revelaram aumento na dureza e elasticidade do gel com a redução no valor do pH.

As imagens da figura 28 apresentam amostras de hidrogéis de poli(ácido algínico) e hidrogéis de goma gelana preparados após resfriamento, seguido de imersão em solução de CaCl₂. As imagens mostram matrizes com manutenção do volume das suspensões utilizadas durante o preparo. O volume das matrizes se mostrou maior, mesmo após secagem pelo método de liofilização, resultando em scaffold mais espessos, se comparado com a espessura de filmes obtidos no estudo de Laia (2015), preparados com o mesmo volume de suspensão.





Fonte: Elaborado pela própria autora

A imersão em solução de CaCl₂ tem limitação para modular propriedades físicas e químicas, uma vez que o cálcio diminui a mobilidade das cadeias poliméricas,

promove seu travamento e limita seu rearranjo, sendo sua atuação presente preferencialmente na superfície. De outra forma, a diminuição da temperatura levou à quelação com menor cinética e resultou em hidrogéis mais volumosos (Figura 29), favoráveis às matrizes de próteses articulares.

A imagem 28(a) mostra o hidrogel contendo apenas a GG pura obtida a partir de solução aquosa 1% (m/v) e misturada com a solução 2% (m/v) de CaCl₂- matriz 0A-100G-S. A imagem 28(b) mostra o hidrogel preparado com a solução 1% (m/v) de AS misturada com a solução 2% (m/v) de CaCl₂ - 100A-0G-S. Pelas imagens podemos observar que o hidrogel 28(a) parece ser mais opaco e menos irregular quando comparado ao hidrogel mostrado na figura 28(b). Essa irregularidade e rugosidade podem ser associadas ao resultado das ligações cruzadas que ocorrem entre o AS e o CaCl₂, como relatado nos estudos de Yang, Xie e He (2010).

As amostras permaneceram por mais de 24 horas em contato com a solução de CaCl₂, segundo Bierhalz (2010), o tempo de contato dos hidrogéis com a solução reticuladora deve ser suficiente para que todas as zonas de junção disponíveis sejam reticuladas, promovendo ligações efetivas as quais resultam em hidrogéis fortes e resistentes.

As blendas nas concentrações de 50/50; 70/30 e 90/10 de poli(ácido algínico) por goma gelana, foram fotografadas e identificadas de acordo com as concentrações por massa. As imagens da figura 30 evidenciam os aspectos macro morfológicos observados nessas matrizes preparadas a partir de soluções de AS e GG seguidas de mistura em solução de CaCl₂.

A figura 29(a) mostra matriz 50A-50G-S obtida através da mistura das soluções de GG e AS com adição de solução de CaCl₂. Essa blenda apresentou aspecto mais opaco que pode estar associado à presença de goma gelana que possui a cor branca opaca e à presença de CaCl₂ em maior proporção, ou seja, devido à presença de CaCl₂ na solução, que deve ter reagido na estrutura dos polímeros.

A figura 29(b) mostra matriz 70A-30G-S com adição de CaCl₂. Essa proporção de blenda apresentou opacidade e textura mais lisa com rugosidade menor se

comparada com as demais amostras. A blenda apresentou-se integra, sem defeitos, fissuras ou descontinuidades ao aspecto visual. A rugosidade apresentada nas demais amostras pode ser associada ao resultado das ligações cruzadas que ocorrem entre os polímeros e o CaCl₂, como relatado nos estudos de Yang, Xie e He (2010)

Figura 29- Matrizes obtidas de soluções de AS e GG, seguidas de mistura em solução de CaCl₂.



A- Amostra - 50A-50G-S; B- Amostra - 70A-30G-S; C- Amostra - 90A-10G-S Fonte: Elaborado pela própria autora.

A imersão em CaCl₂ pode contribuir para aumento na rugosidade observada no exame visual, compatível com o acúmulo de cristais de CaCl₂ presentes na superfície, também observado na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A figura 29(c) mostra matriz 90A-10G-S também obtida através da mistura das soluções com CaCl₂. A Blenda 90:10 apresentou maior transparência, isso pode evidenciar que com o aumento da quantidade de ácido algínico, a interação dos polímeros pode ser mais completa, portanto a matriz fica mais homogênea. Os hidrogéis são de natureza hidrofílica e costumam apresentar pobre barreira à transferência de água, o que é amenizado pela formação de fortes redes tridimensionais com os íons cálcio (SANTANA,2010). Amostras contendo CaCl₂ se mostraram menos úmidas, ou seja forneceram maior barreira à umidade se comparado com as amostras sem cloreto de cálcio. Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Turbiani (2007).

O uso do CaCl₂ como agente compatibilizante foi necessário para se conseguir uma adequada manipulação das amostras. As amostras sem cloreto de cálcio, por serem fluidas não se conformaram no molde e após o processo de secagem, se armazenadas por longo período de tempo absorviam água do ambiente.

TIPO	AS	GG	BLENDA
RETICULAÇÃO	CaCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂
COR	Amarelo translúcido	Branco opaco	Amarelo translúcido
ASPECTO	Pouco viscosa	Pouco viscosa	Muito viscosa

Tabela 9- Características principais dos hidrogéis preparados

Fonte: Elaborado pela própria autora

5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) - x50 e x100

Materiais a base de goma gelana, sem adição de cloreto de cálcio, apresentaram uma morfologia mais fusiforme, com aspecto de lâminas em camadas, sendo que nessas amostras pôde ser observada elevada densidade de tais estruturas laminares, agrupadas em maior número de camadas, dando a impressão de materiais mais denso, compatível com o comportamento da suspensão de preparo, que demonstrou maior resistência ao fluxo em concentração de 1% (m/v) e demandou cuidado adicional quando da mistura do pó do polímero em volume de água, sendo necessária a adição de pequenos incrementos para evitar a formação de grumos. As mesmas suspensões, tendo a adição de cloreto de cálcio, resultaram em estruturas também laminares, mas nesse caso, com um aspecto mais plano e de maior área, dando a impressão de estarem as lâminas do polímero mais afastadas, com presença de poros maiores delimitados por essas lâminas. É importante destacar que o preparo das amostras para a obtenção das imagens de MEV contemplou processo de secagem, o que inevitavelmente ocasionou contração da estrutura, mas que pela aparência das amostras preparadas com cloreto de cálcio, há forte indicativo da interação do cálcio com a estrutura do polímero, dando uma conformação mais estruturada e presença do mesmo padrão tanto para as regiões externas, como nas regiões mais internas das blendas.

Figura 30- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 0A-100G-N; (b) 0A-100G-S; (c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S



Fonte: Elaborado pela própria autora.

As amostras preparadas com alginato de sódio, sem adição de cloreto de cálcio mostram uma morfologia mais reticular, com presença de aberturas nas camadas de polímero, conforme pode se observado na figura 30(c). Esse aspecto difere sobremaneira daquele observado para amostras preparadas com goma gelana, também sem adição de cálcio, pois aparenta ter menos volume de material e estrutura mais dispersa, compatível com a característica de maior dispersão do polímero no meio aquoso de processamento, que resultou em suspensões de menor resistência ao fluxo, indicativo claro da menor viscosidade das suspensões a base de alginato. A adição de cloreto de cálcio nas suspensões de alginato promoveu alteração na morfologia, que se aproximaram da forma de lâminas observadas na amostras preparadas com cem por cento de goma gelana, reticuladas com cálcio. Entretanto, para as amostras de alginato reticuladas com cálcio, as laminas se apresentaram com menos textura, sugestivo pela ausência dos pequenos defeitos superficiais observados nas amostras de goma.

Figura 31- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 0A-100G-N; (b) 0A-100G-S; (c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S, em maior ampliação.



Fonte: Elaborado pela própria autora.
Nas amostras (100GG e 100ALG, com e sem CaCl₂) apresentadas na figura 31, referentes à imagem de MEV obtidas com maior aumento, podemos verificar que amostras preparadas sem utilização de cloreto de cálcio, tanto à base de goma gelana com à base de poli(ácido algínico) apresentaram a superfície mais regular e aspecto homogêneo. Em contrapartida, as amostras goma gelana das figuras 31b, preparadas com a adição de cloreto de cálcio, percebemos aspecto que indica estrutura alongadas, compatíveis com as hélices da goma gelana, sendo observada também algumas regiões mais claras, com aspecto de aglomerados cobrindo parte das cadeias.

As amostras da figura 31d preparadas com alginato e imersas em solução de cloreto de cálcio apresentam ao fundo um aspecto claramente reticulado com presença de elevado número de particulados dispersos por toda a superfície e distribuídos de maneira regular.

5.2.2.1 Blendas AS +GG e cloreto de cálcio

As amostras preparadas com as misturas de alginato e goma gelana são mostradas na figura 32 e indicam morfologia compatível com o comportamento intermediário ao das amostras preparadas com cada um dos polímeros somente. É importante destacar que as blendas desse estudo, sempre tiveram 50% ou mais de alginato, o que tende a resultados com maior influencia para os resultados observados nos hidrogéis de alginato. Entretanto, o preparo de blendas com os dois polímeros alterou o padrão das morfologias, onde algumas adições de goma promoveram a formação de estruturas de materiais reticulados com a adição de cloreto de cálcio, tendeu a aumentar as porosidades apresentadas, quando comparadas com as blendas obtidas sem utilização do reticulante estudado.

Amostras 90/10, sem adição de cloreto de cálcio, apresentam particulado precipitado na estrutura, que são vistos em menor quantidade nas amostras preparadas com a adição de cálcio. Sugestivo de que a adição da goma apresenta dificuldade de homogeneização dos polímeros, mas que o cálcio pode ter reagido com ambos, inclusive fazendo interação entre eles.



Figura 32- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 50A-50G-N; (b) 50A-50G-S; (c) 70A-30G-N; (d) 70A-30G-S; (e) 90A-10G-N e (f) 90A-10G-S.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na figura 33 é possível verificar através de imagens de MEV, diferentes aspectos nas superfícies dos materiais preparados com blendas de poli(ácido algínico) e goma gelana, com e sem utilização de cloreto de cálcio. Observa-se que as diferentes concentrações influenciam na morfologia dos diferentes hidrogéis obtidos.



Figura 33- Imagem obtidas por MEV de amostras: (a) 50A-50G-N; (b) 50A-50G-S; (c) 70A-30G-N; (d)70A-30G-S; (e)90A-10G-N e (f) 90A-10G-S, em maior ampliação

. Fonte: Elaborado pela própria autora.

Amostras 50A-50G-N apresentaram região compacta na superfície e textura regular, sendo identificada a presença de finas estrias distribuídas em orientação aleatória, sugerindo que o tempo de secagem permitiu a organização da mistura dos polímeros e uma densificação elevada.

Amostras 50A-50G-S indicaram a presença, em sua maior parte, de região com estruturas alongadas que se mostraram organizadas e com regularidade em um eixo definido paralelamente ao longo de seu comprimento (seta preta localizada à direita). Entretanto pode ser observada uma segunda região que mostra aspecto mais corrugado (seta branca à esquerda). Além dessas duas regiões, se destacam na imagem estruturas em forma de hélice torcidas entre si e presença de elevado número de particulado depositado na superfície das cadeias, sendo que em algumas regiões há uma cobertura densa sobre áreas mais abrangentes.

As amostras 70A-30G-N e 90A-10G-N apresentaram um tendência para estruturas mais regulares e organizadas com o aumento da concentração de poli(ácido algínico) tendendo para os resultados indicados para amostras 100A-0G-N. Já as amostras 70A-30G-S e 90A-10G-S, das misturas do polímeros com adição de cloreto de cálcio, mostraram presença de particulado depositado na superfície, dando aspecto texturizado, que foi menos intenso para as amostras 100A-0G-S que apresentaram presença muito maior do particulado.

5.2.3 Avaliação por Fluorescência de Raios X de Hidrogéis AS +GG

Foram realizados ensaios de fluorescência de raios X em algumas amostras dos hidrogéis de goma gelana/poli(ácido algínico) e os resultados, considerando os principais elementos químicos presentes nas amostras, são mostrados na tabela 10. Os valores encontrados indicam que as amostras de goma gelana sem adição de cloreto de cálcio apresentam em sua maioria o elemento potássio, que deve estar associado à produção das formulações comercializadas pelo fornecedor da matéria prima. São observadas concentrações menores de cálcio e sódio.

Nas amostras à base de poli(ácido algínico) é verificada a presença mais pronunciada de sódio, que por sua vez é o estabilizante mais utilizado para os sais desse polímero. Além do sódio é verificada a presença de concentração de cálcio e de potássio.

Amostras	Porcentagem dos Elementos Cálcio, Sódio e Potássio em Relação ao Total de Cátions				
	Са	Na	К		
0A-100G-N	$13 \pm 0,7$	2 ± 0,1	85 ± 4,2		
50A-50G-N	-	-	-		
70A-30G-N	-	-	-		
90A-10G-N	-	-	-		
100A-0G-N	23 ± 1,2	75 ± 3,8	2 ± 0,1		
0A-100G-S	$89 \pm 4,5$	0	11 ± 0,5		
50A-50G-S	73 ± 3,6	22 ± 1,1	5 ± 0,3		
70A-30G-S	$74 \pm 3,7$	6 ± 0,3	20 ± 1,0		
90A-10G-S	$84 \pm 4,2$	12 ± 0,6	4 ± 0,2		
100A-0G-S	$92 \pm 4,6$	8 ± 0,4	0		

Tabela 10- Resultado do Ensaio de Fluorescência de Raios X de amostras de Hidrogéis após Liofilização

Fonte: Elaborado pela própria autora

Os hidrogéis preparados com utilização do cloreto de cálcio são verificadas concentrações elevadas do cálcio, proveniente do agente reticulando e valores menores para os elementos sódio e potássio, sendo que os valores de sódio são maiores, na medida que os materiais foram preparados em sua maioria com concentrações elevadas de poli(ácido algínico).

As blendas sem utilização de cloreto de cálcio não tiveram as analises realizadas, por fluorescência de raios X.

5.2.4 Avaliação de Espectroscopia por Energia de Elétrons de Hidrogéis AS +GG

Análises de EDS foram realizadas para caracterização química qualitativa. Os resultados são apresentados na tabela 11 e são expressos em termos das concentrações dos elementos presentes em relação à massa dos hidrogéis, considerando parcela associada à estrutura orgânica, que não foi detectada pela

análise de FRX, dada a limitação da técnica. Essa analise visa indicar um parâmetro comparativo da ação dos agentes de reticulação utilizados no processamento dos hidrogéis, mas sempre considerando que a análise puntual do EDS representa fator limitante para definição real das concentrações da estrutura do material como um todo.

	% Cátions em R	% Cátions em Relação à Fase Orgânica		
Amostras	Adição de CaCl ₂			
	Não	Sim		
0A-100G	1 ± 0,1	22 ± 1,1		
50A-50G	19 ± 1,0	17 ± 0,8		
70A-30G-	10 ± 0,5	10 ± 0,5		
90A-10G	15 ± 0,8	20 ± 1,0		
100A-0G	17 ± 0,9	20 ± 1,0		

Tabela 11- Resultado do Ensaio de EDS de amostras de Hidrogéis após Liofilização

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os valores encontrados indicam um panorama que as amostras de goma gelana sem adição de cloreto de cálcio apresentam concentração muito baixa do cátions em sua estrutura e que as amostras com adição de cloreto de cálcio aumentaram de 1% para 22% a concentração dos cátions. Quando são avaliadas as amostras de poli(ácido algínico), verificamos que as amostras sem adição de cloreto de cálcio já apresentam razões elevadas de cátions, em torno 17% e a adição do reticulante promoveu um incremento nesses valores para as concentrações em torno de 20%.

Os resultados apresentados para as blendas indicam que as concentrações de cátions aumentam para amostras sem reticulação, à medida que aumenta a concentração de poli(ácido algínico), com exceção para as amostras 50A-50G, que devem ter tido influencia importante associada às elevadas concentrações dos dois polímeros utilizados. Comparando amostras com e sem a utilização do reticulante, verificamos que as amostras, após receberem adição de cloreto de cálcio, têm valores muito próximos aos valores observados para as amostras sem adição de cloreto de cálcio, entretanto pelas analises de fluorescência, há um indicativo que esses valores de sódio e potássio das amostras sem reticulação possam ter sido substituídos por cálcio, o que ajudam a estruturar os hidrogéis. 5.2.5 Caracterização de Amostras de GG Avaliando adição de Cloreto de Cálcio

5.2.5.1 Difração de raios X

A figura 34 mostra difratogramas de raios X de amostras de matrizes obtidas a partir de suspensões de goma gelana com e sem adição de CaCl₂. Pode-se observar que embora presentes algumas regiões cristalinas o material apresenta uma fração amorfa considerável. Apresenta pico de maior intensidade em 2θ=28,85⁰.



Figura 34- DRX das matrizes de goma gelana com e sem CaCl₂

Fonte: elaborado pela autora

5.2.5.2 Análise dos grupos químicos das Matrizes de Goma Gelana

Os espectros de FTIR referentes às amostras 0A-100G-N e 0A-100G-S, obtidos para hidrogéis preparados somente com goma gelana, com e sem reticulação com CaCl₂, são mostrados na figura 35. Pelo gráfico verifica-se que as amostras 0A-100G-N seguem um padrão muito próximo daquele observado para amostras do pó de goma gelana, utilizado como matéria prima, que foram mostrados na figura 23, com discreta diferença relacionada à banda centrada em 2350cm⁻¹, indicativo para a

presença de ligações C=O dos grupos ácido carboxílico, presentes para os pós, e que não estão presentes nos hidrogéis 0A-100G-N. As amostras 0A-100G-S mostram diferenças evidentes em relação as amostras preparadas sem CaCl₂, onde os hidrogéis reticuladas mostram a banda centrada em 3350cm⁻¹ com maior intensidade e englobando parte da banda localizada em 2920cm⁻¹, sugestivo da presença de complexo dos cátions Ca²⁺ com os grupos carboxilato (PAVIA, 2013). Corroborando nessa direção, verificamos a diminuição na intensidade do pico posicionado em 1020cm⁻¹ e aumento na intensidade dos picos posicionados em 1603cm⁻¹ e em 1408cm-1.



Figura 35 - FTIR Matriz de Goma Gelana Preparadas (a) sem CaCl₂ e (b) com CaCl₂

Fonte: elaborado pela autora

5.2.5.3. Análise térmica das matrizes de Goma Gelana (com e sem CaCl₂)

As curvas de TGA das matrizes de goma gelana com e sem cloreto de cálcio são mostradas na figura 36.



Figura 36 - Curvas da TGA das Matrizes de Goma gelana com e sem a presença de CaCl₂

A tabela 12 apresenta os valores de temperatura e perda de massa associados a cada evento térmico das matrizes de goma gelana com e sem cloreto de cálcio obtidos através das técnicas de TGA. É possível observar que a amostra com a presença de CaCl₂ apresentou maior percentual de perda de massa nas três etapas.

Tahela	12-	Sumário	da Análise	Térmica	nara a	Goma	Gelana	com	م د م س	adicão	d۵	CaCl
i abela	12-	Sumano	ua Analise	rennica	para a	Goma	Gelalia	COIII	e sem	aulçau	ue	

		Perda de ma	issa (%)	
Identificação da Amostra	De 30ºC até 112ºC	De 112°C até 279°C	De 279°C até 900 °C	Resíduo
0A-100G-N	14	41	37	8
0A-100G-S	34	22	26	18

Fonte: Elaborado pela própria autora

5.2.6 Caracterização de Amostras de Poli (ácido algínico) Avaliando adição de Cloreto de Cálcio

5.2.6.1 Difração de raios X

A figura 37 mostra os difratogramas de raios X de amostras de matrizes obtidas a partir de suspensões de ácido algínico preparados com e sem adição do agente reticulante CaCl₂.



Figura 37- DRX das matrizes de ácido algínico com e sem CaCl₂

Fonte: Elaborado pela própria autora

Na análise do difratograma é possível observar que a adição de CaCl₂ produz um material mais amorfo, apesar de aparecerem picos de estrutura cristalina em 2 θ = 32,07⁰, 2 θ = 38,76⁰ e 2 θ = 45,46⁰.

5.2.6.2 Análise dos Grupos Químicos das Matrizes de Poli(ácido algínico)

Os espectros de FTIR referentes às amostras 100A-0G-N e 100A-0G-S, obtidos para hidrogéis preparados somente com poli(ácido algínico), com e sem reticulação com CaCl₂, são mostrados na figura 38. Pelo espectro verifica-se que as amostras

100A-0G-N seguem um padrão muito próximo daquele observado para amostras do pó de poli(ácido algínico), entretanto é observado aumento na intensidade da banda localizada em 3320cm⁻¹, e aumento expressivo na vibração localizada em 1026cm⁻¹, compatível com protonação dos grupos carboxilato, que pode ser associado à utilização de ácido acético para a correção do pH da suspensões de preparo desses hidrogéis.

Quando são comparados os espectros dos hidrogéis de poli(ácido algínico) preparadas sem e com a utilização de CaCl₂, observamos aumento das vibrações associadas aos ânions COO⁻ e diminuição nas vibrações associadas ao COOH, indicativo da formação dos complexos entre as cadeias através dos íons Ca²⁺. Esses valores são semelhantes aos valores encontrados nos estudos de Nery (2014) e Laia (2015).





Fonte: elaborado pela autora

5.2.6.3 Análise térmica das matrizes de Poli(ácido algínico)

Na figura 39 é possível observar as curvas de TGA do ácido algínico em pó comparado às matrizes com e sem a adição de CaCl_{2.} As matrizes de AS apresentam três eventos térmicos, o primeiro relativo 'a desidratação, o segundo a decomposição e o terceiro a carbonização das amostras analisadas, sendo resultados semelhantes ao do polímero em pó. A amostra 100A-0G-S apresentou perda de massa percentual semelhante à amostra 100A-0G-N

Figura 39- Curvas da TGA das Matrizes Poli(ácido algínico) com e sem a presença de CaCl₂



Fonte: elaborado pela autora

5.2.7 Análise dos grupos químicos de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)

A figura 40 apresenta o espectro de infravermelho das blendas de Goma gelana e ácido algínico sem a adição de cloreto de cálcio. As bandas na região de 3400cm⁻¹ estão atribuídas aos estiramentos dos grupos – OH. O alargamento desta banda nos hidrogéis pode indicar a interação entre as cadeias de ácido algínico e goma gelana. O espectro mostra o aumento na intensidade de vibração das bandas na

região de estiramento COO e CO e redução da banda referente ao estiramento COC.



Figura 40- Espectro FTIR das Blendas sem CaCl₂

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A figura 41 apresenta o espectro de infravermelho das blendas de goma gelana e ácido algínico com a adição de cloreto de cálcio. Para as amostras 90:10, 70:30 e 50:50 observa-se a predominância dos picos semelhantes à forma de onda fundamental do ácido algínico puro nas faixas de estiramento C-H. provavelmente devido à maior proporção de AS presente nas amostras. A amostra 70A-30G-S está semelhante à amplitude de onda de 0A-100G-S. na faixa de estiramento O-H. A amostra 50A-50G-S apresentou redução da intensidade dos grupos-OH.

Figura 41- Espectro FTIR das Blendas com CaCl₂



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na analise das várias blendas preparadas nesse trabalho percebe-se que o aumento na concentração de poli(ácido algínico) e a consequente diminuição de goma gelana resultou em aumento nos picos posicionados em 1595cm⁻¹ e 1403cm⁻¹, e diminução no pico 1228cm⁻¹, sugerindo maior efeito da reticulação para amostras com maior concentração de poli(ácido algínico), o que já era de se esperar dada a conformação mais livre desse polímero, em comparação com a goma gelana que apresenta forma em hélice.

A adição de CaCl₂ nas blendas resultou em espectros com bandas localizadas em 3300cm⁻¹, de maior intensidade para as amostras 0A-100G-S, 70A-30G-S e 100A-0G-S, e alagamento nos picos posicionados em 1595cm⁻¹ e 1408cm⁻¹, além da

diminuição no pico 1228cm⁻¹, e da banda em 947cm⁻¹ associadas à grupos OH fora do plano.

5.2.8 Análise por DRX de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)

A figura 42 apresenta os difratogramas de amostras preparadas com goma gelana ou com poli(ácido algínico), com e sem utilização de CaCl₂, apresentando o caráter semi-cristalino dos polímeros e o efeito da adição do reticulante na estrutura desses polímeros, que promove a obtenção de estrutura amorfa.

Figura 42 - Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a) 0A-100G-N; (b) 0A-100G-S; (c) 100A-0G-N e (d) 100A-0G-S



Fonte: Elaborado pela autora

Os difratogramas mostrados na figura 43, referentes aos hidrogéis preparados na diferentes concentrações de goma gelana e poli(ácido algínico), sem utilização de CaCl₂, verificamos o padrão semi cristalino para as amostras 0A-100G-N e 100A-0G-N, como já destacado na figura 42, com identificação dos mesmos ângulos de

difração aos mostrados nas figuras associadas aos pós de goma gelana e de poli(ácido algínico) utilizados como matérias primas. As amostras 50A-50G-N e 90A-10G-N apresentaram um padrão prioritariamente amorfo, indicando que nas concentrações de 50/50 deve ter havido capacidade desses dois polímeros se associarem de maneira homogênea, de outra forma, a concentração de 90/10 indicou que, a adição de 10% de goma gelana também promoveu uma interação de forma aleatória com o poli(ácido algínico).

Na analise da figura 43, pode ser percebido também que, a concentração 70/30 deve ter promovido um excesso de um dos polímeros, que manteve parte da estrutura com característica semi cristalina, com destaque no pico posicionado em 20°, associado à região cristalina da goma gelana.

Figura 43- Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a) 0A-100G-N; (b) 50A-50G-N; (c) 70A-30G-N; (d) 90A-10G-N e (e) 100A-0G-N



Fonte: Elaborado pela autora

Os difratogramas mostrados na figura 44, referentes aos hidrogéis preparados na diferentes concentrações de goma gelana e ácido algínico, com utilização de CaCl₂, verificamos o padrão amorfo para todas as amostras, indicando que o reticulante deve ter formado complexos entre as cadeias de ambos os polímeros, o que manteve as cadeias com padrão mais aleatório. São observados alguns picos cristalinos, provavelmente sendo associados às precipitações de sais relativos aos elementos cálcio, sódio e potássio, associados ao cloro.

Figura 44-Difratograma de amostras de hidrogéis liofilizados de composição (a) 0A-100G-S; (b) 50A-50G-S; (c) 70A-30G-S; (d) 90A-10G-S e (e) 100A-0G-S



Fonte: Elaborado pela autora

5.2.9 Análise Termogravimétrica de Blendas Goma Gelana/Poli(ácido algínico)

Na figura 45 é possível observar a curva de *TGA* para os diferentes hidrogéis contendo poli(ácido algínico) e goma gelana. São destacadas no gráfico, três regiões, sendo que as regiões I e II podem estar associadas aos eventos envolvendo a desidratação de água retida nos macroporos e de água adsorvida na estrutura dos géis. Na região III podem ser observados dois eventos térmicos, sendo o primeiro relacionado à continuidade da desidratação e o segundo à decomposição. Os resultados da região III foram semelhantes aos resultados do observado no trabalho de Laia (2015), que trabalhou na obtenção de filmes com baixa hidratação.



Figura 45- Curvas da TGA das Matrizes de poli(ácido algínico) sem presença de CaCl₂

Fonte: Elaborado pela autora

A tabela 13 apresenta um resumo dos valores verificados na TGA. Pela tabela 13 pode ser verificado que a soma das perdas de massa nas regiões I e II mostraram valores muito semelhantes de perda de massa, quando são comparadas amostras com e sem reticulação.

		Perda de ma	issa (%)	
Identificação da Amostra	De 30°C até 112°C	De 112°C até 279°C	De 279°C até 900 °C	Resíduo
0A-100G-N	14	41	37	8
50A-50G-N	14	35	36	15
70A-30G-N	16	26	40	18
90A-10G-N	16	34	33	17
100A-0G-N	23	34	32	11

Tabela 13- Sumário da Análise Térmica para Blendas Goma Gelana /Poli(ácido algínico) com e sem adição de CaCl₂

	Perda de massa (%)					
Identificação da Amostra	De 30°C até	De 133°C	De 320°C	Resíduo		
	133°C	até 320°C	até 900 °C			
0A-100G-S	34	22	26	18		
50A-50G-S	19	30	20	31		
70A-30G-S	22	29	16	33		
90A-10G-S	16	29	34	21		
100A-0G-S	31	29	31	9		

Fonte: Elaborado pela própria autora

Podemos verificado também, que os resíduos das blendas apresentaram valores muito semelhantes, sendo que para as amostras sem reticulação na faixa de 17% e as blendas reticuladas na faixa de 30%, exceção para os hidrogéis 90A-10G-S, que ficaram na faixa de 21%, sugerindo menor reticulação nessas matrizes, sugerindo que amostras reticuladas e preparadas com maiores teores de alginato resultaram em menos resíduos.

5.2.10 Estudo de Intumescimento de Hidrogéis GG/AG

Os resultados do ensaio de intumescimento realizado nos hidrogéis à base dos polímeros poli(ácido algínico) e goma gelana, com e sem a reticulação com CaCl₂ são mostrados nas figuras 46, 47 e 48, e apresentaram um padrão inicial de rápido aumento de volume ao exame visual, como pode ser observado na figura 46. Deve ser salientado que, para o início do ensaio, as amostras foram submetidas a processo de liofilização buscando a remoção do volume de água associado à estrutura das matrizes, sem deformar ou contrair demasiadamente os materiais. É importante destacar também, que os hidrogéis 0A-100G-N não são mostrados nos gráficos do ensaio de intumescimento para os períodos de imersão iguais à 120 minutos, pois os mesmos se desestruturaram na água durante esse período de imersão.



Figura 46- Resumo dos valores de intumescimento de hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) para os tempos de 30, 60 e 120 minutos de imersão.

De maneira geral, conforme mostrado na figura 47, observa-se que os hidrogéis preparados sem a reticulação com CaCl₂, e que tiveram adição de goma gelana em sua composição apresentaram maior grau de intumescimento quando comparados com os hidrogéis 100A-0G-N que foram preparados somente com poli(ácido algínico).

Fonte: Elaborado pela autora





Pequenas adições de goma gelana no preparo das blendas, como aquela observada nos hidrogéis 90A-10G-N resultaram em valores de intumescimento entre 10.000 e 18.000 vezes a massa do matriz liofilizada, o que indica que as moléculas do solvente devem ter entrado na matriz polimérica hidratando os grupos hidrofílicos mais polares, ocorrendo o intumescimento da rede polimérica. Como consequência da hidratação devem ter sido expostos grupos hidrofóbicos, reorganizando as moléculas de água nas proximidades e ocasionando um segundo estágio de hidratação. Posteriormente, moléculas adicionais de água devem ter entrado nos interstícios da rede polimérica, ocupando o espaço existente entre as cadeias dessa rede, os microporos, macroporos abertos e fechados (HOFFMAN, 2002).

Fonte: Elaborado pela autora

Porém o aumento na adição de goma gelana e consequentemente a diminução nas concentrações de poli(ácido algínico), promoveram diminuição nos valores de intumescimento dos hidrogéis. Pode-se dizer que neste estudo a goma gelana contribuiu para gerar capacidade máxima de intumescimento para períodos de até 120 minutos, auxiliando na estrutura desses hidrogéis. Todos os hidrogéis preparados sem adição de CaCl₂, conforme mostrado na figura 45, tiveram valores de intumescimento estabilizados a partir de 30 minutos de imersão, a exceção fica para amostras 0A-100G-N, que como já comentado teve a sua degradação no período de estudo.

Figura 48- Perfil de intumescimento de hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) sem adição de CaCl₂, para os tempos de 30, 60 e 120 minutos de imersão.



Os hidrogéis mostrados na figura 48, preparados com adição de CaCl₂, tiveram valores de intumescimento muito próximos para todas as composições estudadas, na faixa de 1.700 vezes do valor da massa dos hidrogéis liofilizados. A exceção ficou a cargo dos hidrogéis 70A-30G-S, que atingiram valores na faixa de 6.000 vezes da massa dos hidrogéis.

Dessa forma percebe-se que os valores de intumescimento de amostras preparadas com CaCl₂ tiveram valores discretamente diminuídos, ou muito próximos aos valores observados para amostras preparadas sem CaCl₂, tendo como exceção as amostras preparadas nas concentrações de 90A-10G, que mostraram maiores valores sem adição do reticulante e para amostras nas concentrações de 100A-0G, cujos valores de intumescimento foram maiores para amostras com adição do reticulante. Esses resultados sugerem que a adição de CaCl₂ promoveu travamento da estrutura dos hidrogéis, limitando a capacidade da matriz se expandir e absorver mais volume de água na estrutura interna do polímeros. Apesar da imersão em CaCl₂ melhorar o aspecto dos hidrogéis e auxiliar, provavelmente nas propriedades mecânicas destes filmes, ela diminuiu no seu grau de intumescimento.

5.2.11 Estudo de Compressão de Hidrogéis GG/AG

Os ensaios de compressão foram realizados em triplicata, para corpos de prova hidratados de cada uma das blendas. Os resultados são expressos em termos de: (1) tensão máxima de compressão no limite de proporcionalidade (σmáx), (2) módulo de elasticidade (E) e deformação máxima no regime elástico (δ).



Figura 49- Molde para ensaio de compressão

Fonte: adaptado de VEDADGHAVAMI et al, 2017

1 +

Os ensaios foram conduzidos em velocidade de compressão de 0,2 mm.s⁻¹, tendo sido necessário realizar teste de compressão de maneira confinada, conforme

mostrado na imagem e no esquema, representados na figura 49. Isso se deveu às características de escoamento/viscosidade associadas às diversas composições dos hidrogéis estudados nesse trabalho. Portanto, não foi possível realizar teste de compressão não confinado, já que as condições de cada tipo de amostra seriam não comparativas.

A imagem da figura 50a mostra a tomada das medidas máximas das amostras utilizadas para os ensaios de compressão. A figura 50b apresenta em detalhe, uma das amostras obtidas sem a adição de cloreto de cálcio na sua estrutura, que diante da evidência de apresentarem escoamento à simples manipulação, foram congeladas e imersas em solução de CaCl₂. Dessa forma foi possível promover reticulação somente na superfície das amostras, adquirindo assim o formato do molde e permitindo o preparo para a realização do ensaio de compressão. Deve ser destacado que o tempo de reticulação foi o estritamente necessário para conformar as amostras, sem promover reticulação no interior das blendas estudadas.

Figura 50- Imagem representativa de (a) tomada das medidas dos hidrogéis e (b) amostras de hidrogéis preparadas sem adição de CaCl₂





Fonte: Elaborado pela autora

Curvas típicas tensão x deformação são mostradas nos gráficos das figuras 51 e 52 obtidas em ensaio de compressão realizados nas blendas de goma gelana / poli(ácido algínico). A figura 51 mostra amostras preparadas sem utilização de agente de reticulação e a figura 52 mostra amostras reticuladas com solução de cloreto de cálcio.

Figura 51- Curvas Típicas Tensão x Deformação obtidas para amostras de Blendas (a) 50A-50G-N, (b) 70A-30G-N e (c) 90A-10G-N, de Hidrogéis de Goma Gelana e Poli(ácido algínico) sem adição de CaCl₂.



Fonte: Elaborado pela autora

Nos gráfico tensão deformação verifica-se que, para as amostras nas concentrações 70/30 e 90/10 sem reticulação, como para as amostras 50/50 e 70/30 reticuladas com CaCl₂, há um comportamento inicial com enorme deformação associada à valores extremamente baixos de tensão, que pode ser associado à compressão da estrutura porosa e extravasamento de água de preenchimento dos hidrogéis. Essa água pode ser referida como a água que preenche os macroporos do hidrogel e que são responsáveis por grande parte do volume das matrizes.

Em seguida, para essas mesmas amostras, as curvas descrevem uma segunda região que pode ser definida no gráfico à partir de um aumento na inclinação das

curvas, que de acordo com as uma inclinação o aumento é mais pronunciado para amostras com maiores concentrações de poli(ácido algínico), além do seu início acontecer em menores valores de deformação para amostras de maiores concentrações de poli(ácido algínico).

Por fim, o gráfico mostra a tensão de compressão que aumenta rapidamente em função da deformação, devido à densificação dos hidrogéis, com as estruturas dos poros se apresentando densificadas. É conveniente ressaltar que as amostras não sofreram ruptura pela força de compressão, tendo os ensaios sido finalizados através dos limites de segurança da máquina de ensaios.

Figura 52- Curvas Típicas Tensão x Deformação obtidas para amostras de Blendas (a) 50A-50G-S, (b) 70A-30G-S e (c) 90A-10G-S, de Hidrogéis de Goma Gelana e Poli(ácido algínico) com adição de CaCl₂.



Fonte: Elaborado pela autora

Dentre as amostras que tiveram curvas de comportamento distinto, destacamos a curva 50A-50G-N, que teve um estágio inicial mais irregular, com oscilação da força em função da deformação, característico de materiais porosos, sendo os valores de resistência mais elevados do que aqueles apresentados pelas demais amostras sem

reticulação. Outra curva que merece destaque se refere à curva 90A-10G-S, que teve maior inclinação, já em valores mais baixos de deformação, seguido por patamar com grande oscilação da tensão durante a deformação e finalizando com o aumento brusco na faixa de densificação dos géis.

O resumo dos valores obtidos nos ensaios mecânicos é apresentado na tabela 14, onde podem ser comparados os valores obtidos de módulo de elasticidade, alongamento e limite de escoamento de hidrogéis das blendas estudadas. Como as amostras apresentaram valores de deformação elevados, foram avaliados dois módulo da tensão em função da deformação, definidos com E₁ e E₂, para as duas regiões de iniciais.

Tabela 14- Resumo das propriedades mecânicas: Módulo de Elasticidade, % de alongamento e Limite de escoamento de hidrogéis de blendas de Goma Gelana e Poli(ácido algínico) com e sem adição de CaCl₂.

Amostras	E ₁ (kPa)	E ₂ (kPa)	Deformação (%)	Limite de Escoamento (kPa)
50A-50G-N	$18,1\pm0,9$	-	$\textbf{62,7} \pm \textbf{3,1}$	$11,7\pm0,6$
50A-50G-S	$\textbf{4,7} \pm \textbf{1,1}$	85,9 ± 14,7	$\textbf{32,7} \pm \textbf{2,5}$	$\textbf{1,7} \pm \textbf{0,4}$
70A-30G-N	$\textbf{6,8} \pm \textbf{0,3}$	231,1 ± 11,6	$\textbf{44,3} \pm \textbf{2,2}$	$\textbf{3,2} \pm \textbf{0,2}$
70A-30G-S	$\textbf{7,0} \pm \textbf{3,1}$	64,0 ± 6,2	$\textbf{27.6} \pm \textbf{0,6}$	$\textbf{2,1} \pm \textbf{0,9}$
90A-10G-N	$10,\!2\pm0,\!5$	243,0 ± 12,2	29,0 ± 1,5	$\textbf{3,9} \pm \textbf{0,2}$
90A-10G-S	$\textbf{671,9} \pm \textbf{309,2}$	428,9 ± 159,2	$\textbf{21,2} \pm \textbf{16,1}$	$\textbf{73,8} \pm \textbf{27,5}$

Fonte: Elaborado pela autora

A análise dos valores de deformação e limite de escoamento é apresentada nas tabelas 15 e 16, que representam as variações, em termos porcentuais das amostras estudadas.

O cálculo foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$Delta = \left(\frac{Def_{N} - Def_{S}}{Def_{N}}\right) \times 100$$
(1)

onde Delta-1 é a variação verificada entre as amostras com adição de $CaCl_2$ em função das amostras sem adição de $CaCl_2$, Def_N é a deformação obtida para amostras sem adição de $CaCl_2$ e Def_N é a deformação verificada para amostras reticuladas com $CaCl_2$. Calculos similares foram feitos para avaliação da adição de poli(ácido algínico) para amostras sem e com reticulação com $CaCl_2$, apresentados nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 15- Comparação do efeito da adição de CaCl₂ nos valores de deformação das amostras dos hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) nas concentrações 50/50, 70/30 e 90/10.

Amostra	50A-50G-N	50A-50G-S	70A-30G-N	70A-30G-S	90A-10G-N	90A-10G-S
δ (%)	62,7	32,7	44,3	27,6	29,0	21,2
Delta -1 (%)	Delta	= 48%	Delta = 38%		Delta	= 27%

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 16- Comparação do efeito do aumento na concentração de poli(ácido algínico) nos valores de deformação das amostras dos hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) nas concentrações 50/50, 70/30 e 90/10 sem adição de CaCl₂.

Amostra	50A-50G-N	70A-30G-N	70A-30G-N	90A-10G-N
δ (%)	62,7	44,3	44,3	29,0
Delta - 2 (%)	Delta	= 29%	Delta	= 35%

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 17- Comparação do efeito do aumento na concentração de poli(ácido algínico) nos valores de deformação das amostras dos hidrogéis de goma gelana e poli(ácido algínico) nas concentrações 50/50, 70/30 e 90/10 com adição de CaCl₂.

Amostra	50A-50G-S	70A-30G-S	70A-30G-S	90A-10G-S
δ (%)	32,7	27,6	427,6	29,0
Delta - 3 (%)	Delta	= 16%	Delta =	= 23%

Fonte: Elaborado pela autora

Quanto maior a concentração de alginato, maior a redução nos valores de deformação, tanto para amostras sem CaCl₂, como para amostras preparadas com CaCl₂. Quando são comparadas amostra sem utilização de CaCl₂ com amostras preparadas com CaCl₂, verificamos menor redução nos taxas de deformação à medida que aumenta a concentração de alginato. Esses resultados sugerem que o alginato e o preparado de hidrogéis com cloreto de cálcio diminuem os valores de deformação das matrizes, sendo que o efeito da adição de cloreto de cálcio é mais pronunciado, que o aumento na concentração de alginato. Nesso ponto é importante destacar a importância da goma gelana, promovendo maiores deformações, além de desempenharem papel, em algumas concentrações, do aumento nos valores de intumescimento dos hidrogéis.

Avaliando o limite de escoamento, verificamos que nas amostras com 50% de alginato, sem adição de cloreto de cálcio, os valores são maiores, com redução e manutenção dos valores para amostras preparadas com maiores concentrações de alginato. De outra forma, para as amostras preparadas com adição de cloreto de cálcio, verificamos valores baixos para as menores concentrações de alginato e aumento substancial nos valores do limite de resistência para amostras preparadas na concentração de 90% de alginato, sugerindo a importância da ocorrência da reticulação associada ao alginato no controle da resitência dos hidrogéis.

Comparativamente a blenda com 70/30 é a que apresenta as melhores propriedades mecânicas quando comparada com os demais materiais processados neste estudo. Pode-se observar que o módulo de elasticidade aumenta com a concentração de CaCl₂. Esse aumento é atribuído à maior rigidez que o material adquire com a presença de maiores quantidades de CaCl₂ o que representa maior densidade de cadeias de polímeros.

Concentrações maiores de CaCl₂ fazem com que o hidrogel fique mais compacto devido à maior quantidade de cadeias poliméricas por unidade de volume do hidrogel. Assim, aumenta o número de interações e de entrelaçamentos entre cadeias. (MOURA, 2005)

Figura 53- Fotografia mostrando aspecto de amostras após realização de ensaio de compressão para: (a) amostra sem $CaCl_2$ b) amostra com $CaCl_2$ e c) destaque da espessura das amostras após realização do ensaio de compressão.



Fonte: Elaborado pela autora

Quanto maior o número de cadeias poliméricas na solução, mais próximas uma molécula se encontra da outra, facilitando assim as interações intermoleculares momentâneas, o que consequentemente resulta em maiores módulos elásticos e viscosos, precisando de mais energia para a deformação do material (XU et al., 2007).

Bertagnoli e colaboradores (2005) e Vedadghavami e colaboradores (2017) obtiveram hidrogéis com um comportamento mecânico semelhante aos obtidos neste estudo, e constataram que a absorção de água está relacionada com o enfraquecimento das cadeias de polímero. Portanto, as propriedades mecânicas das amostras hidratadas são influenciadas pelo comportamento de intumescimento do hidrogel.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi realizada rota de processamento para obtenção de hidrogéis a base de alginato e goma gelana, com estrutura apresentando elevado volume de hidratação. Foi realizada extensa caracterização das matrizes quanto ao comportamento químico, físico e mecânico das mesmas.

Foram verificados que amostras de hidrogéis preparadas exclusivamente por goma gelana ou por poli(ácido algínico), tiveram maior hidratação, quando comparados com as blendas, tanto para amostras com ou sem reticulação com CaCl₂.

Nas análises de FTIR das Blendas preparadas sem e com CaCl₂, o aumento na concentração de AS e a conseqüente diminuição de GG, sugere maior efeito da reticulação para amostras com maior concentração de AS.

Nas análises de MEV observa-se que as amostras imersas em solução de cloreto de cálcio apresentam na sua maioria, um aspecto claramente reticulado com presença de elevado número de particulados dispersos por toda a superfície.

Nas anáise de DRX as amostras com a adição do reticulante, alteraram para o padrão amorfo, sugerindo que o reticulante deve ter formado complexos entre as cadeias de ambos os polímeros. Os picos cristalinos são associados à precipitação de sais de cálcio, sódio e potássio, das matérias primas utilizadas.

Amostras de blendas preparadas nas concentrações 70/30-N se mostraram mais cristalinas e com menos hidratação, mas apresentaram mais resistentes que amostras 70/30-S

A adição de goma gelana se mostrou importante, resultando em hidrogéis com maiores deformações, além de desempenharem o papel, em algumas formulações, de aumentar os valores de intumescimento dos hidrogéis.

A blenda com 70/30 apresenta condições intermediarias, associadas à combinação do limite de resistência e da deformação.

Alem disso, as matrizes obtidas neste trabalho apresentaram propriedades potenciais para sua utilização na área biomédica e possam contribuir para estudos da aplicação de biomateriais destinados ao tratamento de lesões no disco intervertebral.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir para estudos mais profundos desses materiais destinados ao tratamento de lesões no disco intervertebral

Sugestões para trabalhos futuros podem basear-se no aprimoramento das características do hidrogel:

- Tratamento térmico associado à autoclavagem destes hidrogéis

 Avaliação do comportamento quanto à adesão e proliferação celular *in vitro* e avaliação da interação material/hospedeiro *in vivo* para verificar o comportamento desses materiais mais próximo ao real.

Avaliar possibilidade de esterilização por radiação gama dos hidrogéis
Estudar os principais efeitos de diversos métodos de esterilização nas propriedades dos hidrogéis

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling of alginate-chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, Brazil, n. 74, p. 283-289, 2008.

ADAMS, M. A.; DOLAN, P.; HUTTON, W. C. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 68, n. 1, p. 3641,1986.

ADAMS, M. A.; DOLAN, P. Recent advances in lumbar spinal mechanics and their clinical significance. **Clinical Biomechanics**, v. 10, n. 1, p. 3-19, 1995.

AGARWAL, S., et al. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **49**: 5603–5621, 2008.

ANATOMY AND PHYSIOLOGY, The vertebral column, 2004. Disponível em: : https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@6.27:4CMef3D9@4/The-Vertebral-Column

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21, n.7, p.667-681, 2000.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **M2-A8**: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão – Norma aprovada, 8^ª edição. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>,

AZEVEDO,C. et al. Matriz extracelular. In:Azevedo,C.(Ed). **Biologia cellular e Molecular**. 3^a Edição. Lousa, LIDEL, pp. 65-79,1999.

BAJPAI, A. K; ANJALI, G. "Water sorption behaviour of highly swelling (carboxymethylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical". **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 271-279, 2003.

BEJARANO, L. et al. Síntesis y estudio de hidrogeles obtenidos a partir de acrilamida, poli(ácido acrílico) y ácido maleico como potenciales remediadores de contaminantes metálicos en aguas residuals. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 207-312, 2008.

BEKIN, S. et al. Synthesis, characterization and bending behavior of electroresponsive sodium alginate/poly (acrylic acid) interpenetrating network films under an eletric field stimulus. **Sensors and Actuators B**, v. 202, p. 878-892, 2014.

BERTAGNOLI, et al. Mechanical testing of a novel hydrogel nucleus replacement implant. **The Spine Journal**, 5(6), 672-681,2005

BIBBY, S.; JONES D. A.; LEE, R. B.; JING, Y. U.; URBAN, J. The pathophysiology of the intervertebral disc. **Joint Bone Spine**, v. 68, p. 537-542, 2001.

BIERHALZ, A. C. K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e de pectina BTM/alginato reticulados com cálcio**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, 2010.

BORGES, A. C.et al. A COMPOSITE HYDROGEL FOR THE REPLACEMENT OF THE NUCLEUS PULPOSUS., Laboratoire de Technologie des Composites et Polymères (LTC), **Research gate**, 2015

BROHEM, C. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications, **Pigment Cell &Melanoma research**, 24, pp. 35-50, 2010.

CALLISTER JÚNIOR, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais**: uma introdução. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos LTDA, 2012, 817p.

CANILHA, L. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 20, p. 32-41, jan. 2006.

CARDOSO, Valéria Maria de Oliveira; CURY, Beatriz Stringhetti Ferreira; EVANGELISTA, Raul Cesar; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. v.65, p.317-33, 2017

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, Singapore, v. 242, p. 259-262, Aug. 2002. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176259. Acesso em: 23 abr. 2016.

CHEN, Q, ROETHER, J, BOCCACCINI, A.R. 2008. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. **Topics in Tissue Engineering** 4: 1-27, 2008

CLEMENTI, F., CRUDELE, M. A., PARENTE, E., MANCINI, M., MORESI, M. Production and characterization of alginate by azotobacter vinelan, *J.* **Science Food** *Agr.*, v. 79, n. 4, p. 602-610, 1999.

COSTA JÚNIOR, E. S. C. **Desenvolvimento de matriz de quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 151f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica) - Faculdade de Engenharia Metalúrgica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

COSTA JÚNIOR, E. S. C.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para

aplicação em engenharia de tecido. Química Nova, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, set. 2008.

CURATEC. Curatec hidrogel com Alginato. **Net**. Disponível em: <http://curatec. com.br/loja/hidrogeis/hidrogel-com-alginato/hidrogel-com-alginato-25-g.html>. Acesso em 11 fev.2016.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. An introduction to tissue-biomaterial interactions. New Jersey: Willey-Liss, 2002, 228p.

DHANDAYUTHAPANI,; YOSHIDA, MAEKAWA, T; KUMAR. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International Journal of Polyme**r Science, 2011, pp. 290602-290620, 2011

FAN, L. et al. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, Wuhan, v. 65, p. 447- 452, 2006.

FERNANDES, D. M. S. **Volumetria de complexação**: determinação de dureza de água. Ceará: Ed. do IFCE, 2014, 14p.

FIGUEIRA, F. C.; HOTZA, D.; BERNARDIN, A. M. Obtenção de granilhas por gelificação de suspensões cerâmicas. **Cerâmica**, p. 457-464, 2014.

FRANCO PICONE, CAROLINA SIQUEIRA; CUNHA, ROSIANE LOPES. Influence of pH on formation and properties of gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 662-668, FEB 11 2011.

GEORGE, M.; ABRAHAM T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, Trivandrum, v. 114, p. 1–14, May 2006

GIAVASSIS, i; HARVEY, LM.; McNEIL, B. Gellan Gum. Critical Reviews in **Biotecjnology**, v.20,n3,p.177-211,2000.

GLICKSMAN, M., Red seaweed extracts, Food Hydrocolloids, Ed. M. Glicksman., CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, v. 2, p.73, 1983.

GONÇALVES, M. C. Microscopia eletrônica de varredura. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 165-175.

GRANER, C. A. F.; TAMBURINI JUNIOR, R. **Roteiros de aulas práticas**: disciplina de química analítica quantitativa. Belo Horizonte: Ed. da UFMG, 2013, 41p.

HATTARAI, N; GUNN, J; ZHANG, M. "Chitosan-based hydrogel from controlled, localized drug delivery". **Advanced Drug Release Reviews**, v. 62, p. 83-99, 2010.

HENCH, L.L; WILSON, J. Introduction to bioceramics. Singapore. Advanced series in bioceramics, v.1, 1993
HIRAOKA, Y. et al. Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly(glycolic acid) fiber. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 6, p. 1101-1112, 2003.

HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; LAM, C. X.; TAN. K. C.; LIM. T. C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **Journal of tissue 28 engineering and regenerative medicine**, Chinchester, v.1, n.4, p.245- 260, 2007

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. Journal of the Royal Society Interface, 3, pp. 589-601,2006

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, São Paulo, v. 26, n. 121, p. 17-24,1980.

KAPANDJI, A. **Fisiologia Articular: tronco e coluna vertebral**. São Paulo: Maloine, 2000.

KESTER, J. J., FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review, **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986..

KONG, H.-J.; LEEA, K. Y. M. D. J. Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. **Polymer**, Hyun-Joon Konga,b, Kuen Yong Leea, David J. Mooney, v. 43, p. 6239-6246, 2002

KUSLICH, S.; ULSTROM, C.; MICHAEL, C. The tissue origin of low back pain and sciatica: a report of pain response to tissue stimulation during operations on the lumbar spine using local anesthesia. **Orthopedic Clinics of North American**, v. 22, n. 2, p.181-187, 1991.

LANZA,R.et al .The challenge ofimitating Nature. In: Lanza, R (Ed). Principles of tissue engeneering. 3^a edição. China, Academic Press, pp. 7-14.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEMOS, E. M. F. Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro Bioativo. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2013. 123 p.

LÉVY, É., Diccionario Akal de física. Akal, 1992. 846p.

LEWIS, P. B. et al. Basic science and treatment options for articular cartilage injuries. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v.36, p.717-727, 2006. Disponível em: <<u>http://www.jospt.org/doi/pdf/10.2519/jospt.2012.3673</u>>. Acesso em: 13 jun 2016

LIMA, G. F. Aditivos alimentares: definições, tecnologias e reações adversas. **Veredas Favip**, Pernambuco, v. 4, n. 2, p. 101-107, jul. 2011.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3919-3918, 2005.

LIU, C et al. Desing and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, **Chemical Engineering Research and Desing** 85, pp.1051-1064, 2007

LORENZO, G.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. **Food Hidrocolloids**, Argentina, v. 30, p. 672-680, 2013.

MACHADO, A. M. O.; GALES, A. C. Interpretação de dados microbiológicos. **In**: Uso racional de antimicrobianos e resistência microbiana – ATMracional, 2008.

MACHADO, L. D. B., MATOS, J. R. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 229-261.

MACHADO, Gilmara de Oliveira; REGIANI, Anelise Maria; PAWLICKA, Agnieszka. Carboxymethylcellulose derivatives with low hydrophilic properties. **Polimery**, v.48, p.273-279, 2003.

MANDAL, B.; RAY, S. K. Synthesis of interpenetrating network hydrogel from poly (acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate) and sodium alginate: modeling and kinetics study for removal of synthetic dyes from water. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 257-269, 2013

MANSUR, H. S. et al. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and pva-derived hybrids by small-angle x-ray scattering and ftir spectroscopy. **Polymer**, v.45, p.7193-7202, 2004.

MATOS, J. R; MACHADO, L. D. B. Análise térmica - termogravimetria. In: CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 209-228.

MARTINEZ-PEREZ, C. A., et al. Scaffolds for Tissue Engineering Via Thermally Induced Phase Separation. 275-294 pp. In: **Advances in Regenerative Medicine** (Sabine Wislet-Gendebien), InTech Europe, México, 2011

MAYSER, M.J. Air layers under water on the fern Salvinia. **Stability and biomimetic applications**, 2013.

MIKOS, A. G. et al. Prevascularization of porous biodegradable polymers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 716-723, 1993.

MOHAMED, R. R.; SABAA, M. W. Synthesis and characterization of antimicrobial crosslinked carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with silver. **International Journal of Biological Macromolecules**. Egypt, v. 69, p. 95-99, 2014.

MORENO, M. Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014

MOSKOVITH, R. Biomechanics of the cervical spine. In: **Basis Biomechanics of the Musculoskletal System**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkings, 2001. p. 287-314.

MOURA, M. R. de, Aouada, F. A., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Synthesis of Thermosensitive hydrogels constituted of alginate-Ca2+ (CA) / PNIPAAm and evaluation of the LCST through different techniques. Apresentado no X **International Macromolecular Colloquium**, Gramado – RS, 2005

NEGRELLI, W.F. Hérnia discal: procedimentos de tratamentos. Acta Ortopédica Brasileira v.9 n.4 p.39-45 São Paulo out./dez. 2001.

NEVES, I. Estudo do comportamento biomecânico do segmento L4-L5 da coluna Humana, utilizando o Método dos Elementos Finitos. Dissertação de mestrado (Engenharia Mecânica) - Universidade do Porto, Julho de 2015

NORDIN, M. WEINER, S. S. Biomechanics of the lumbar spine. In: **Basis Biomechanics of the Musculoskletal System**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkings, 2001. p. 257-281.

NURSING, 2017. Disponível em :(http://www.nursing.com.br/hernia-de-disco/)

OLIVEIRA, J.T, et al. Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 93(3):852-63, Jun, 2010.

OREFICE, R. L. et al. *In vitro* bioactivity of polymer matrices reinforced wit a bioactive glass phase. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.11, n.11, p.78-85, 2000.

OREFICE, R. L. et al. *In situ* evaluation of polymerization kinetics and corresponding evolution of the mechanical properties of dental compolites. **Polymer testing**, v.22, p.77-81, 2003.

PANEVA, D. et al. Degradation of chitosan in the presence of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) by a crude enzyme complex from *trichoderma viride*. **e-Polymers**, v.19, p.1-9, 2003.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials**: an introduction. 3. ed. New York: Springer, 2010, 561p.

PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**. Trivandrum, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. Introdução à Espectroscopia. **4.ed. Stamford: Editora Cengage Learning, 2013. 716p.**

PAVLATH, A. E. et al. lonomeric films of alginic acid. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, p. 61-63, 1999. Disponível em: http://naldc.nal.usda.gov/download/14861/ PDF>. Acesso em: 06 jun. 2016.

PEPPAS, N.A. Preface: Hydrogels in medicine and pharmacy, in:, N.A. PEPPAS (Ed.), Fundamentals, v.1 CRC Press, 1986 apud BERGER, J. et al. Structure and interaction in quitosana hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.35-52, 2004.

PETITE, H. Tissue-engineered bone regeneration. **Nature Biotechnology**. New York, v. 18, n. 9, p. 959-963, 2000.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, India, v. 93, p. 670-678, Jan. 2013.

PRESHER, A. Anatomy and pathology of the aging the spine. **European Journal of Radiology**. V. 27 p. 181-195, 1998

PUPPI, D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science,** v.35, p.403-440, 2010.

RATNER, B. D. et al. Biomaterials science. 2. ed. USA: Califórnia, 2004. 867p.

REITMAIER, S. et al. Hydrogels for nucleous replacement-facing the biomechanical challenge. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Germany, n. 14, p. 67-77, 2012.

REBELO, M. A. **Desenvolvimento e caracterização de scaffold com potencial para aplicação na regeneração de tecido ósseo.** Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2015.

SABADINI,R;MARTINS,V.A,PAWLICKA,A. Synthesis and characterization of gellan gum: chitosan biohydrogels for soil humidity control and fertilizer release .cellulose, v.22,n.2,p.1-10,2015

SALGADO, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Bioscience 4**: 743–765, 2004.

SANTANA, A. A. Influência de características físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, 2010.

SHALABY, S. W.; BURG, K. J. L. **Absorbable and biodegradable polymers**. USA: Florida, 2004. 289p.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Terapêuticas**. São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007.

SILVA, R. V. P.; MOTA, L. O.; MORAES, R. S. Volumetria de complexação: dosagem de cálcio e magnésio com EDTA. Bahia: Ed. da UFBA, 2010, 6p.

SILVA-CORREIA, J. et al. Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissueengineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Guimarães, n. 5, p. 97-107, 2011.

SILVA-CORREIA, J. et al. Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: in vritro and in vivo study. **Adv. Healthcare Mater**, Guimarães, p. 1-8, 2012.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002, 836p.

SPAANS, C. J. et al. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on1,4-butanediisocyanate and epsilon-caprolactone. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 9, n. 12, p. 675-678, 1998.

STEVENS, M. P. **Polymer chemistry**: an introduction. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2009, 551p.

SUDHAMANIA, S. R.; PRASADA, M. S.; SANKAR, K. U. DSC and FTIR studies on Gellan and Polyvinyl alcohol (PVA) blend films. **Food Hydrocolloids**., v.17, p.245-250, 2003.

SZPALSKI, M.; GUNZBURG, R.; MÉLOT, C.; AEBI, M. The aging of the population: a growing concern for spine care in the twenty-first century. **European Spine Journal**, v. 12, p. S81-S83, 2003.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 2, p. S311-S324, 2009.

THOMSON, R. C., YASZEMSKI, M. J., Powers, J. M., Mikos, A. G. 1995. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. **Journal Biomater Sci Polym** 7:23

TU, C, CAI, Q, YANG, J, WAN, Y, BEI, J 2003. The fabrication and characterization of poly(lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. **Polymers for Advanced Technologies** 14: 565-573.,2003

TURBIANI, F. R. B. Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Ativos de Alginato de Sódio Reticulados com Benzoato de Cálcio. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

UDEN, S.N.D.V, Reverse engineering and rapid prototyping in intervertebral disc tissue engineering (tese de doutorado), 2014

VAN KOOTEN, T.G.; SPIJKER, H.T.; BUSSCHER, H.J. Plasma-treatedpolysterene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterialinteractions. **Biomaterials**, v.25, n.10, p.1735-1747, 2004.

VEDADGHAVAMI, Armin; MINOOEI, Farnaz; MOHAMMADI, Mohammad Hossein; KHETANI, Sultan; REZAEI, Ahmad ; MASHAYEKHAN, Shohreh; SANATI-NEZHAD, Amir. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**. v. 62, p.42,63, 2017.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Belo Horizonte, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010

WATKINS, J. Estrutura e Função do Sistema Musculoesquelético. Porto Alegre: Artmed, 2001

WEIDLE, C.M. **O comportamento da coluna veetebral sob tração mecânica**. Dissertação de mestrado. Universidade federal do paraná. Curitiba, 2004

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterias. **Biomaterials**, EUA, n. 30, p. 5897-5909, Aug. 2009.

XU, J. B.; BARTLEY, J. P.; JOHNSON, R. A. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water soluble carbodiimide (WSC). Journal of Membrane Science, v. 218, p. 131-146, 2003.

YANG, Fei; XIA, Shugin; TAN, Chen; ZHANG, Xiaoming. Preparation and evaluation of chitosancalcium-gellan gum beads for controlled release of protein. **European Food Research and Technology**. v. 237, p.467-79., 2013.

ZHANG, R, MA, P.X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. Journal of Biomedical Materials Research 45: 285-293, 1999.