

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES POROSOS DE
POLIURETANO/POLI(ÁCIDO LÁCTICO) PRODUZIDOS POR
FLUIDO SUPERCRÍTICO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE
TECIDOS

MICHELE SAVARIS

Caxias do Sul, 2016

Michele Savaris

**DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES POROSOS DE
POLIURETANO/POLI(ÁCIDO LÁCTICO) PRODUZIDOS POR
FLUIDO SUPERCRÍTICO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE
TECIDOS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientada por Dra. Rosmary Nichele Brandalise e coorientada por Dra. Venina dos Santos.

Caxias do Sul, 2016

S265d Savaris, Michele

Desenvolvimento de suportes porosos de poliuretano/poli(ácido láctico) produzidos por fluido supercrítico para aplicação em engenharia de tecidos / Michele Savaris. – 2016.

79 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2016.

Orientação: Rosmary Nichele Brandalise.

Coorientação: Venina dos Santos.

1. PU. 2. PDLLA. 3. Suporte poroso. 4. fluido supercrítico. 5. citotoxicidade. I. Brandalise, Rosmary Nichele, orient. II. Santos, Venina dos, coorient. III. Título.

**“DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES POROSOS DE
POLIURETANO/POLI(ÁCIDO LÁCTICO) PRODUZIDOS POR FLUIDO
SUPERCRÍTICO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS.”**

Michele Savaris

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 05 de setembro de 2016.

Banca Examinadora:

Dra. Rosmary Nichele Brandalise – Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Venina dos Santos – Coorientadora
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Ademir José Zattera
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Mariana Roesch Ely
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Rosane Angélica Ligabue
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

As professoras Rosmary Nichele Brandalise e Venina dos Santos pela orientação, dedicação e empenho durante a realização deste trabalho.

À professora Mariana Roesch Ely e à doutoranda Charlene Garcia pelo empenho e dedicação na realização dos testes *in vitro*.

À professora Rosane Angelica Ligabue pela análise de GPC.

Ao doutorando Matheus Zimmermann pela ajuda com o extrator supercrítico e nas análises de DMA.

Aos técnicos do Laboratório de Polímeros, em especial a Damiani Paludo Budcke pela execução das análises.

À técnica Sonia Blankenburg pela disponibilidade de materiais, reagentes e vidrarias.

À técnica Jocelei Duarte pelo empréstimo de materiais.

Aos colegas de mestrado pelos momentos de descontração, amizade e conhecimento compartilhado.

À Universidade de Caxias do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias e seu coordenador professor Ademir Zattera pela estrutura cedida.

Ao Ministério do Trabalho e Emprego pela bolsa de estudos.

Aos meus pais, Adelar e Marisete, e ao meu namorado Francisco pelo apoio na realização dos meus sonhos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABBREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 BIOMATERIAIS	18
3.2 POLIURETANO	21
3.3 POLI(ÁCIDO LÁCTICO).....	23
3.4 MISTURAS POLIMÉRICAS.....	25
3.5 SUPORTES POROSOS	27
3.6 FORMAÇÃO DE SUPORTE POROSO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....	30
3.7 ESTERILIZAÇÃO	33
3.8 TESTE <i>IN VITRO</i> PARA BIOMATERIAIS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAIS	36
4.2 MÉTODOS	36
4.2.1 Síntese de PU	37
4.2.2 Preparação dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA.....	38
4.2.3 Formação de suporte poroso com dióxido de carbono supercrítico	38
4.2.4 Citotoxicidade e adesão celular dos suportes porosos.....	39
4.2.5 Ensaios dos filmes e dos suportes porosos	40
4.2.5.1 Cromatografia de permeação em gel dos filmes	40
4.2.5.2 Reologia dos filmes	41

4.2.5.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos filmes	41
4.2.5.4	Termogravimetria dos filmes	41
4.2.5.5	Calorimetria exploratória diferencial dos filmes.....	42
4.2.5.6	Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo dos filmes e dos suportes porosos	42
4.2.5.7	Diâmetro de poros dos suportes porosos.....	42
4.2.5.8	Densidade aparente dos suportes porosos	43
4.2.5.9	Resistência à compressão dos suportes porosos.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PU, PDLLA E PU/PDLLA	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POROSOS DE PU, PDLLA E PU/PDLLA.....	54
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho de poro ideal para formação de tecidos e crescimento celular (Karande, Ong & Agrawal, 2004; Migliaresi & Motta, 2014).....	28
Tabela 2. Mn, Mw e IP do PU, PDLLA e PU/PDLLA.	45
Tabela 3. Frequência vibracional e atribuição no FTIR do PU e PDLLA (MI et al., 2013; PEREIRA et al., 2014).	49
Tabela 4. Temperatura das transições térmicas, entalpia de fusão e cristalinidade do PU, PDLLA e PU/PDLLA.	53
Tabela 5. Parâmetros de processo no extrator supercrítico para as amostras de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Nomenclatura e descrição das amostras em estudo	37
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicações e polímeros utilizados como biomateriais no corpo humano (Oréface, Pereira & Mansur, 2006).	20
Figura 2. Equação química de formação do grupo uretano (Chattopadhyay & Webster, 2009).	21
Figura 3. Estrutura química do mero do PLA (Rasal, Jonarkar & Hirt, 2010).	23
Figura 4. Estrutura do ácido láctico L e D (Rasal, Jonarkar & Hirt, 2010).....	24
Figura 5. Sequência da utilização de suporte poroso para engenharia de tecidos (adaptado de Nigam & Mahanta, 2014).	28
Figura 6. Morfologia de suporte poroso produzido por: (a) evaporação de solvente/lixiviação de partículas. (b) liofilização; (c) separação de fase termicamente induzida; (d) formação de espuma por gás; (e) eletrofiliação (Adaptado de Thavornyutikarn et al. 2014).	29
Figura 7. Ilustração do processo de expansão com CO ₂ supercrítico (Adaptado de Guanghong & Yue, 2012).	31
Figura 8. Fluxograma do processo de síntese do PU.....	38
Figura 9. Registro fotográfico do (a) extrator supercrítico (b) visualização do vaso de pressão e (c) porta amostra.	39
Figura 10. Comportamento da distribuição de massa molar do PU, PDLLA e PU/PDLLA. .	44
Figura 11. Viscosidade complexa em função da frequência angular para os filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA.	46
Figura 12. Morfologia no MEV-FEG com magnitude original de 200x e 5000x para os filmes de (a, b) PU, (c, d) PDLLA e (e, f) PU/PDLLA.	47
Figura 13. Micrografia no MEV-FEG do filme de PU com magnitude original de 1500x. ...	48
Figura 14. Espectro no FTIR dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA.....	49
Figura 15. (a) Curva TG das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA e (b) DTG das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA.....	50
Figura 16. Curva DSC do PU, PDLLA e PU/PDLLA (a) primeiro aquecimento (b) segundo aquecimento (c) resfriamento.	52
Figura 17. Micrografias no MEV-FEG do suporte poroso de (a) PUsp superfície, (b) PUsp transversal; (c) PDLLAsp superfície; (d) PDLLAsp transversal; (e) PU/PDLLAsp superfície; (f) PU/PDLLAsp transversal com magnitude original de 200x.	56

Figura 18. Micrografia no MEV-FEG do (a) PU/PDLLAsp com magnitude original de 50x; (b) PU na mistura PU/PDLLAsp com magnitude original de 200x e (c) PDLLA na mistura PU/PDLLAsp com magnitude original de 200x.....	58
Figura 19. Densidade aparente dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp. .	59
Figura 20. Tensão <i>versus</i> deformação no modo compressão por DMA com força controlada a 37°C dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp.....	60
Figura 21. Citotoxicidade dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp em comparação ao controle negativo (meio DMEM, 10% SFB e 1% P/S) sobre a viabilidade de células L929 tratadas durante 1, 4 e 6 dias, obtido pela realização de ensaio indireto de acordo norma ISO 10993-5-2009-2.....	61
Figura 22. Células L929 em suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp coradas com DAPI e visualizadas em microscópio fluorescência com aumento de 100x; (a) PUsp 1 dia, (b) PUsp 6 dias; (c) PDLLAsp 1 dia; (d) PDLLAsp 6 dias; (e) PU/PDLLAsp 1 dia; (f) PU/PDLLAsp 6 dias.	63
Figura 23. Células L929 em suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp por MEV-FEG com aumento de 500x; (a) PUsp 1 dia, (b) PUsp 6 dias; (c) PDLLAsp 1 dia; (d) PDLLAsp 6 dias; (e) PU/PDLLAsp 1 dia; (f) PU/PDLLAsp 6 dias.	64
Figura 24. Adesão das células L929 em suporte poroso de PDLLAsp com aumento de 3000x em 6 dias de exposição.	65

LISTA DE ABBREVIATURAS E SIGLAS

ATR	Refletância Total Atenuada
BDO	Butano-1,4-diol
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HDI	Hexametileno diisocianato
L929	Células de fibroblastos de camundongo
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
MTT	Brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCO/OH	Razão isocianato e poliols
PCL	Policaprolactona diol
PDLLA	Filme de poli(DL-ácido láctico)
PDLLA _{sp}	Suporte poroso de poli(DL-ácido láctico)
PU	Filme de poliuretano
PU _{sp}	Suporte poroso de poliuretano
PU/PDLLA	Filme da mistura de poliuretano e poli(DL-ácido láctico)
PU/PDLLA _{sp}	Suporte poroso da mistura de poliuretano e poli(DL-ácido láctico)
P/S	Penicilina/Estreptomicina
SBF	Soro fetal bovino
T _c	Temperatura de cristalização
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _m	Temperatura de fusão
TG	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
X _c	Índice de cristalinidade

RESUMO

O desenvolvimento de biomateriais com características necessárias para auxiliar na recuperação de tecidos danificados por acidente ou doença é um dos maiores desafios no meio científico que envolve as áreas da medicina e da engenharia. Esses biomateriais podem ser aplicados na engenharia de tecidos como suporte poroso (*scaffolds*) que se assemelham a matriz extracelular, funcionando como uma estrutura temporária para a proliferação de células e reconstrução de novos órgãos e tecidos. Visando avaliar o potencial uso de suportes porosos como biomaterial, este trabalho propõe o desenvolvimento e caracterização de suportes porosos de poliuretano (PU), poli(ácido lático) (PDLLA) e poliuretano/poli(ácido lático) (PU/PDLLA) produzidos por fluido supercrítico pela técnica de formação de espuma por gás (*gas foaming*). Os polímeros puros e a mistura foram caracterizados, na forma de filmes, por cromatografia de permeação de gel (GPC), análise reológica, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG). Após a expansão, na forma de suportes porosos, as amostras foram caracterizadas por MEV-FEG, tamanho de poros, densidade, propriedades mecânicas e testes *in vitro* de citotoxicidade e adesão celular com 1, 4 e 6 dias de exposição. Na caracterização dos filmes, a amostra PU/PDLLA apresentou características intermediárias aos polímeros puros, evidenciando o comportamento dos dois polímeros na amostra, sem separação de fases na micrografia por MEV-FEG e distribuição bimodal de massa molar por GPC. Os suportes porosos apresentaram interconectividade e tamanho de poros de $141 \mu\text{m} \pm 108 \mu\text{m}$ para o PU e $52 \mu\text{m} \pm 32 \mu\text{m}$ para o PDLLA. A amostra PU/PDLLA apresentou uma estrutura bimodal, na qual o PU na mistura possui poros de $75 \mu\text{m} \pm 57 \mu\text{m}$, enquanto que, para o PDLLA, o tamanho de poros foi de $19 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$. Os testes *in vitro* comprovaram a adesão das células L929 nos suportes porosos de PUsp, PDLLA_{sp} e PU/PDLLA_{sp} e os mesmos não apresentaram efeito citotóxico. Por fim, conclui-se que é possível produzir suportes porosos de PU, PDLLA e PU/PDLLA por fluido supercrítico, os quais podem ser aplicados como biomateriais.

Palavras-chave: PDLLA, PU, suporte poroso, fluido supercrítico, citotoxicidade.

ABSTRACT

The development of biomaterials with specific features to aid in tissue recovery damaged by accident or disease is one of the challenges in the scientific field that involves the areas of medicine and engineering. These biomaterials can be applied in tissue engineering as scaffolds that resemble the extracellular matrix functioning as a temporary structure for cell proliferation and reconstruction of new organs and tissues. To evaluate the potential use of scaffolds as biomaterial, this work proposes the development and characterization of polyurethane (PU), poly(lactic acid) (PDLLA) and polyurethane/poly(lactic acid) (PU/PDLLA) scaffolds produced by gas foaming technique. The pure polymers and the mixture were characterized, in films form, by gel permeation chromatography (GPC), rheological analysis, thermogravimetric (TG), differential scanning calorimetry (DSC) and field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM). After expansion, in scaffolds shape, the samples were characterized by FEG-SEM, pore size, density, mechanical properties and *in vitro* cytotoxicity and cell adhesion with 1, 4 and 6 days of exposure. For films characterization, the sample PU/PDLLA presented intermediate characteristics to the pure polymers, showing the behavior of the two polymers in the sample without phase separation in the micrograph FEG-SEM and bimodal molar mass distribution by GPC. The scaffolds showed interconnectivity and pore size of $141 \mu\text{m} \pm 108 \mu\text{m}$ for the PU and $52 \mu\text{m} \pm 32 \mu\text{m}$ for PDLLA. The sample PU/PDLLA had a bimodal structure in which the PU in the mixture presented pores of $75 \mu\text{m} \pm 57 \mu\text{m}$, while for the PDLLA, the pore size was $19 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$. In vitro tests confirmed the adhesion of L929 cells in PUsp, PDLLAsp and PU/PDLLAsp scaffolds, showing no cytotoxic effect. Finally, it can be concluded that it is possible to produce PU, PDLLA and PU/PDLLA scaffolds by supercritical fluid, which may be applied as biomaterials.

Key words: PDLLA, PU, scaffolds, supercritical fluid, cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Doenças, lesões, traumas e o envelhecimento natural podem provocar danos e degeneração nos tecidos do corpo humano, tornando necessário o tratamento para promover a reparação, substituição ou regeneração dos mesmos (O'BRIEN, 2011).

A ciência regenerativa e a engenharia de tecidos buscam alternativas para desenvolver substitutos biológicos com a função de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (CHAN & LEONG, 2008; NIGAM & MAHANTA, 2014; O'BRIEN, 2011; REPANAS, ANDRIOPOULOU & GLASMACHER, 2016).

O modelo de biomaterial para engenharia de tecidos deve se assemelhar a matriz extracelular que é responsável por fornecer suporte físico, organização espacial e um ambiente bioativo para promover as funções celulares (KEANE & BADYLAK, 2014). Estes biomateriais, conhecidos como suportes porosos (*scaffolds*) são estruturas tridimensionais biocompatíveis que podem apresentar propriedades semelhantes à matriz extracelular e são capazes de fornecer suporte para o crescimento de células e formação de tecido (AGARWAL, WENDORFF & GREINER, 2008; BARBANTI e ZAVAGLIA, 2005; BOSE, VAHABZADEH & BANDYOPADHYAY, 2013; CHAHAL et al., 2016). Podem ser produzidos pelas técnicas de lixiviação de partículas, separação de fase induzida pela temperatura, inversão de fase na presença de um líquido não solvente, liofilização, eletrofiação, prototipagem rápida, formação de espuma por gás (fluido supercrítico), entre outras (OKAMOTO & JOHN, 2013).

A formação de espuma por gás utilizando dióxido de carbono supercrítico é uma das técnicas utilizadas para produção de suportes porosos permitindo a obtenção de poros com distribuição estreita de tamanho, alta difusividade do gás, além de ser um processo limpo e sem utilização de solventes e pode ser aplicado a uma variedade de polímeros (SAUCEAU et al., 2011; SALERNO, FANOVICH & PASCUAL, 2014).

O poliuretano (PU) é um polímero de fácil processamento, podendo apresentar características de material rígido ou flexível, boas propriedades mecânicas e propriedades que podem ser melhoradas com diferentes reagentes de síntese. O PU para aplicação como biomaterial possui biocompatibilidade com o sangue e tecido, taxa de degradação lenta e os produtos gerados na degradação são inofensivos e metabolizados pelo organismo (SIVAKUMAR et al., 2012; NIU et al., 2014).

O poli(ácido láctico) (PLA) é um polímero biodegradável e biocompatível que pode ser obtido a partir de fontes naturais, tais como o amido de milho e a cana-de-açúcar. Devido às características de biorreabsorção e biocompatibilidade, o PLA tem sido amplamente estudado para aplicações biomédicas como suturas, suporte para engenharias de tecidos, aparelhos ortopédicos e sistemas de liberação de fármacos (TENASE & SPIRIDON, 2014).

A combinação das características do PU e PLA em misturas com diferentes proporções é capaz de fornecer propriedades adequadas para uma ampla variedade de aplicações dos suportes porosos, bem como para adequar as características de biocompatibilidade (MI et al., 2013).

Diante do exposto, este trabalho se propõe a desenvolver suportes porosos a partir de poliuretano e poli(ácido láctico) por fluido supercrítico visando aplicação na engenharia tecidual, caracterizando-os por suas propriedades morfológicas, mecânicas, dinâmico-mecânicas, citotóxicas e de adesão celular.

Trabalhos vêm sendo estudados na área de biomateriais para o desenvolvimento de suportes porosos, no entanto, poucos trabalhos reportam o emprego de fluido supercrítico para produção desses materiais. E ainda mais restrito é o número de estudos que relatam o desenvolvimento de suportes com PU ou PU com PLA, identificando parâmetros processuais que influenciam no desenvolvimento do suporte poroso, bem como a variação da composição dos polímeros para ajustar a aplicação para testes *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver suportes porosos a partir de poliuretano, poli(ácido láctico) e poliuretano com poli(ácido láctico) por fluido supercrítico, identificando parâmetros de processo de expansão, bem como propriedades morfológicas, mecânicas, citotóxicas e de adesão celular dos suportes desenvolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral proposto neste trabalho, os seguintes objetivos devem ser alcançados:

- Investigar a influência de policaprolactona diol (PCL), hexametileno diisocianato (HDI) e butano-1,4-diol (BDO) com diferentes razões entre segmentos rígidos e flexíveis, no processo de obtenção do PU e nas propriedades do mesmo;
- Avaliar a influência da incorporação de PDLLA na mistura com PU na proporção 50/50 (m/m) nas propriedades morfológicas, térmicas, químicas e reológicas da mistura formada;
- Avaliar a influência dos parâmetros de processo com fluido supercrítico (pressão, temperatura, tempo de saturação e despressurização) na expansão dos suportes porosos;
- Determinar as mudanças morfológicas, físicas e mecânica dos suportes porosos em relação a incorporação de PDLLA na mistura com PU (50/50);
- Avaliar a citotoxicidade e a adesão celular dos suportes porosos com células L929 com diferentes tempos de exposição.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOMATERIAIS

O uso de implantes médicos teve um incremento nas últimas décadas devido ao envelhecimento da população, aumento da expectativa e estilo de vida e melhorias da tecnologia de implantes (HOLZAPFEL et al., 2013).

O desenvolvimento de biomateriais com características necessárias para auxiliar na recuperação de tecidos danificados por acidente ou doença é um dos maiores desafios no ramo científico que envolve as áreas da medicina e engenharia (LASPRILLA et al., 2012).

Na área de biomateriais, de engenharia de tecidos e na medicina regenerativa, entende-se por biomaterial uma substância projetada para assumir uma forma em que sozinha ou parte de um sistema complexo é utilizada para direcionar e controlar as interações com componentes do sistema vivo (CHEN, LIANG & THOUAS, 2013).

Na Conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais, realizada em março de 1987, em virtude do desenvolvimento de novos materiais e tecnologias que possibilitaram novas fronteiras de uso biológico, foi proposto um conceito mais amplo para biomateriais, como sendo um material desenvolvido com o propósito de interagir com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente (NICHOLSON, 2002; WILLIAMS, 2008).

O fator mais importante que diferencia um biomaterial de outro material qualquer é a capacidade de permanecer em contato com tecidos do corpo humano sem causar danos de magnitude inaceitável a esse corpo. Por conta disso, a biocompatibilidade foi definida como a capacidade que um material possui de promover uma resposta biológica apropriada em uma situação específica (WILLIAMS, 2008).

A superfície do biomaterial, diretamente exposta ao organismo vivo, desempenha um papel crucial em relação à biocompatibilidade. Considerando este fator, as características químicas, físicas, morfológicas e biológicas podem ser adaptadas para promover uma melhoria na interação entre o biomaterial e o tecido (BAUER et al., 2013).

Para garantir o sucesso de um biomaterial, o mesmo não deve induzir inflamação, reações tóxicas e sintomas alérgicos no corpo, ser de fácil esterilização e não apresentar modificações nas propriedades após processo de esterilização, ser biocompatível, além de ser durável e funcional (DOMANSKA & BOCZKOWSKA, 2014).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Além das características necessárias que regem a utilização e o sucesso de um biomaterial, existem ainda as características que devem ser respeitadas quando em contato com tecido vivo. Segundo Hench (1999) o biomaterial em presença com tecido vivo deve ser biotolerável, bioativo e bioinerte:

- Biotolerável é a designação feita para os materiais que provocam respostas inflamatórias toleradas pelo organismo, sendo separados por uma camada de tecido fibroso;
- Bioinerte é a característica dos materiais que também são tolerados pelo organismo, o material libera componentes de forma insignificante ou não os libera e a formação de envoltório fibroso é mínima;
- Bioativos são materiais que podem realizar ligações químicas com o tecido ósseo, caracterizado como um processo de osteointegração.

A escolha do biomaterial está relacionada à função a qual irá atuar e o tempo em que ficará em contato com o corpo humano em relação às combinações de suas propriedades físicas, químicas e biológicas (KAWACHI et al., 2000; ZULETA, VELASQUEZ & AZA, 2010).

Dentre a classificação dos materiais utilizados como biomateriais, destacam-se os metais, cerâmicos, polímeros e os compósitos.

Os materiais poliméricos são utilizados como biomateriais por apresentarem características físico-químicas, versatilidade estrutural, facilidade de obtenção diferente de outros materiais, aliada a possibilidade de ajuste das propriedades para cada aplicação específica por síntese, modificações químicas ou misturas poliméricas. Os polímeros utilizados como biomateriais podem ser de origem natural ou sintética e apresentar características de materiais biodegradáveis ou estáveis quando expostos ao ambiente corpóreo (ORÉFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006).

A Figura 1 apresenta a aplicação de alguns polímeros utilizados em tecidos e partes do corpo, entre eles o polietileno, polipropileno, poli(tetrafluoretileno) e em especial o poliuretano e poli(ácido láctico), polímeros que serão abordados neste trabalho para aplicações na engenharia de tecidos.

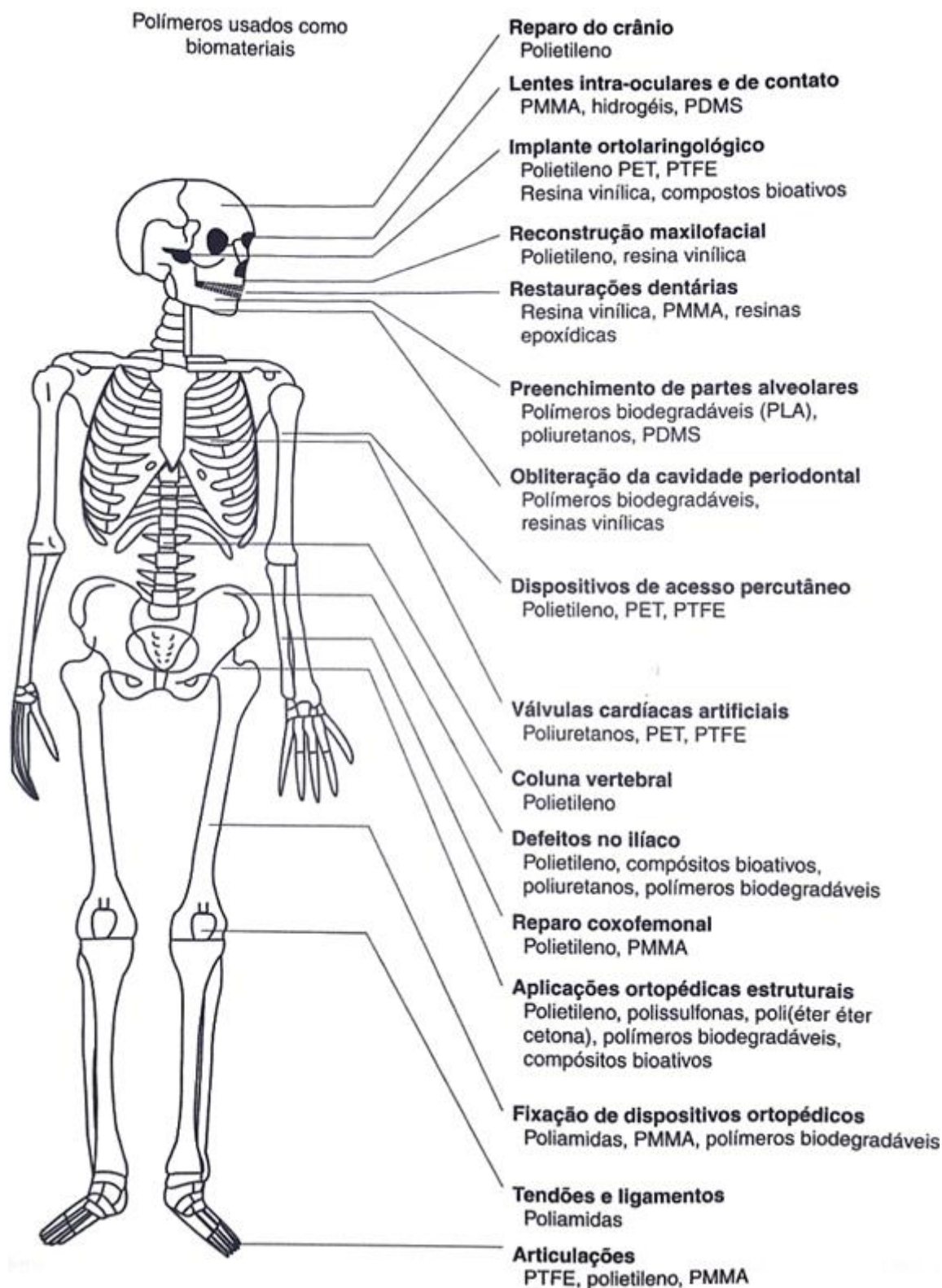


Figura 1. Aplicações e polímeros utilizados como biomateriais no corpo humano (Oréfice, Pereira & Mansur, 2006).

3.2 POLIURETANO

Para Oertel (1993), a denominação “poliuretano” designa diversos polímeros preparados a partir de reação que ocorre com isocianatos polifuncionais e origina materiais que apresentam diferentes composições e propriedades. O poliuretano (PU) é um polímero sintético que apresenta uretano ou carbamato em sua cadeia principal e foi descrito pela primeira vez em trabalhos realizados por Otto Bayer (CHERNG et al., 2013).

As ligações uretano resultam da reação de polimerização por condensação de um isocianato ($R-N=C=O$) com um álcool ($R'-OH$). O átomo de hidrogênio do grupo hidroxila é transferido ao nitrogênio do grupo isocianato (Figura 2), não liberando subprodutos, tornando-se uma exceção a esse tipo de polimerização. Segundo a classificação proposta por Carothers em 1929, polímeros de condensação são formados a partir de reações de condensação da química orgânica com a eliminação de pequenas moléculas, como água, ácido clorídrico e água. Uma das imperfeições do critério de Carothers está relacionada à classificação dos poliuretanos que se enquadrariam como polímeros de adição, pois não apresentam eliminação de moléculas pequenas, no entanto, esses polímeros são estruturalmente mais próximos dos polímeros de condensação do que adição (AKCELRUD, 2007; FU et al., 2015).

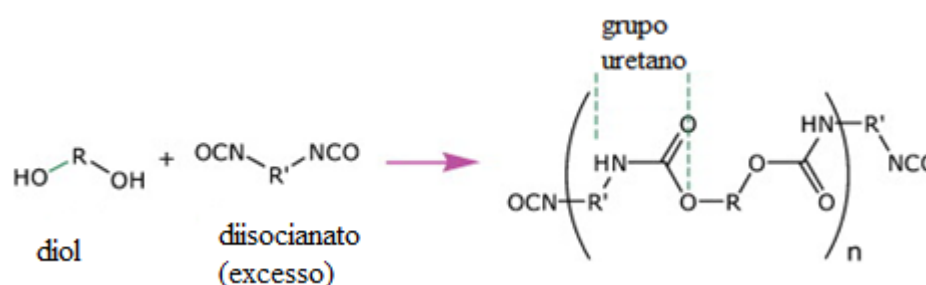


Figura 2. Equação química de formação do grupo uretano (Chattopadhyay & Webster, 2009).

O polioli é responsável pelo segmento flexível, enquanto o isocianato e o extensor de cadeia pelo segmento rígido. O segmento flexível fornece o caráter elastomérico à cadeia do polímero e o segmento rígido é responsável pela estabilidade dimensional devido às ligações de hidrogênio que envolve as ligações de uretano (DOMANSKA e BOCZKOWSKA, 2014).

O processo de formação do PU pode ser realizado em uma única etapa em que todos os reagentes são misturados (polioli, isocianoato, extensor de cadeia ou agente de ligação cruzada e catalisador, se necessário), ou processo em duas etapas, onde tem-se a formação de um pré-polímero, com excesso de grupos isocianatos (NCO) em relação aos grupos OH, e na segunda

etapa ocorre a reação de NCO com adição de extensor de cadeia, grupo com terminação OH ou NH₂ (AKCELRUD, 2007). Para a síntese em duas etapas, a literatura aborda diferentes tempos e temperaturas de reação. Barrioni et al. (2015) utilizaram 55°C com 2 h de reação para a formação do pré-polímero. Alishiri et al. (2014) mantiveram o sistema a 85°C até diminuição do índice de NCO. Domanska e Boczkowska (2014) obtiveram o pré-polímero utilizando temperatura de 100°C por 40 min.

Diferentes propriedades físico-químicas e de biodegradabilidade de PUs podem ser obtidas com mudanças na composição química, massa molar e proporções de segmentos rígidos e flexíveis (SILVA et al., 2010; BARRIONI et al., 2015). As propriedades variam em relação à rigidez e flexibilidade, dureza, densidade, propriedades físicas e mecânicas, podem ser termoplásticos ou termorrígidos, estável ou degradável, hidrófilo ou hidrófobo de acordo com o procedimento da síntese e da composição (BENHAMOU et al., 2015; JANIK & MARZEC, 2015).

Quando se busca por polímeros com estrutura parcialmente definida e requisitos específicos para determinada aplicação, critérios como a escolha dos monômeros e suas proporções, técnica de polimerização, variáveis reacionais (tempo, temperatura, pressão, agitação, atmosfera, catálise) e dos processos de formação do poliuretano (uma etapa ou duas etapas) devem ser cuidadosamente analisados (KLOSS, 2007).

A aplicação do PU varia de espumas flexíveis para móveis estofados, espumas rígidas para isolamento de paredes, calçados, revestimentos, adesivos e até mesmo para aplicações como dispositivos médicos (ZIA, BHATTI & BHATTI, 2007).

Os PUs são utilizados em aplicações médicas principalmente pelas suas características elastoméricas, ocasionando o sucesso ou a longevidade do biomaterial. As primeiras aplicações do PU foram para dispositivos cardiovasculares, nos quais a flexibilidade para o bombeamento, capacidade de expandir e contrair em resposta a uma mudança de pressão sem falhas por fadiga ou de flexionar sem fraturar foram características cruciais para o bom desempenho do material e o sucesso em longo prazo (JOHN, 2014). Outras aplicações dos PUs incluem cateteres permanentes, implantes mamários, enxertos vasculares, materiais para engenharia de tecidos e liberação de fármacos (XU, RUNT & SIEDLECKI, 2010; MISHRA et al., 2014; GRZESIAK et al., 20015).

PUs como biomateriais apresentam boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade com o sangue e tecido e são amplamente utilizados em dispositivos médicos devido a sua biocompatibilidade e capacidade de promover a adesão celular (SIVAKUMAR et al., 2012; NIU et al., 2014).

A estabilidade do PU pode ser afetada por vários fatores em um ambiente biológico. O caminho mais comum para degradação se dá por hidrólise, ataque enzimático, oxidação e *stress cracking* (SARKAR & LOPINA, 2007).

A taxa de degradação do PU depende da estrutura do segmento flexível formado pelos polióis. Os polióis mais utilizados para PU biodegradável incluem polipropilenoglicol (PPG), polietilenoglicol (PEG) e poli(caprolactona diol) (PCL). A PCL é um polímero biocompatível com ligações éster alifático, capaz de ser hidrolisado. O produto da degradação da PCL é o ácido 6-hidroxi-hexanóico, um metabólito que ocorre naturalmente no corpo humano (ALISHIRI et al., 2014; BARRIONI et al., 2015).

A preocupação relatada na literatura referente à toxicidade de PUs e seus produtos de degradação está associada a PUs derivados de isocianatos aromáticos (segmentos rígidos) que ao biodegradar podem gerar produtos tóxicos como compostos de diaminas aromáticas (SILVA et al., 2010).

Entre os segmentos rígidos utilizados para síntese de PU, incluem o butano-1,4-diisocianato (BDI), diisocianato de isoforona (IPDI) e hexametileno diisocianato (HDI) que são diisocianatos alifáticos com produtos de degradação não tóxicos (BARRIONI *et al.*, 2015).

Extensores de cadeia também são frequentemente utilizados na síntese de PU e por meio deles é possível aumentar a taxa de degradação do produto final. Os principais extensores de cadeia são butano-1,4-diol (BDO), etano-1,2-diol e etano-1,2-diamina (BARRIONI *et al.*, 2015).

3.3 POLI(ÁCIDO LÁCTICO)

O poli(ácido láctico) (PLA) (Figura 3) é um polímero biodegradável e biocompatível que pode ser obtido a partir de fontes naturais tais como o amido de milho e a cana-de-açúcar. É um poliéster alifático, termoplástico, sintetizado a partir da polimerização por abertura do lactide e de monômeros do ácido láctico (NOFAR & PARK, 2014; UZUN et al., 2015).

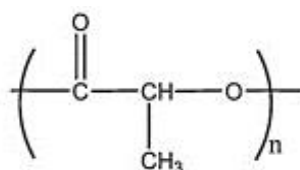


Figura 3. Estrutura química do mero do PLA (Rasal, Jonarkar & Hirt, 2010).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O ácido láctico é uma molécula quiral onde seus estereoisômeros se apresentam nas formas D (dextrôgero) poli(D-ácido láctico) (PDLA) e L (levógero) poli(L-ácido láctico) (PLLA) (Figura 4) ou a mistura racêmica gerando o poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) (RASAL, JANORKAR & HIRT, 2010).

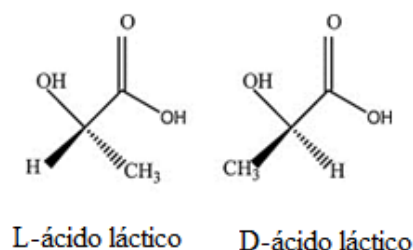


Figura 4. Estrutura do ácido láctico L e D (Rasal, Jonarkar & Hirt, 2010).

A arquitetura do PLA, determinada pelas diferentes proporções de L, D ou meso-lactide, altera propriedades como ponto de fusão, resistência mecânica e cristalinidade. O PLA pode ser totalmente amorfo [poli(D-L-ácido láctico) (PDLLA)] ou semicristalino [poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(D-ácido láctico) (PDLA)]. O PLA apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) variando entre 50 a 80°C e temperatura de fusão cristalina (T_m) entre 130 a 180°C. A temperatura de processamento não deve exceder 190°C, pois temperaturas acima de 200°C provocam degradação térmica do material (AURAS et al., 2003; BELGACEM, GANDINI, 2008).

Devido às características de biorreabsorção e biocompatibilidade, o PLA tem sido amplamente estudado para aplicações biomédicas, tais como suturas biodegradáveis, matriz para liberação de fármacos, implantes ortopédicos e na engenharia de tecidos (RASAL, JANORKAR & HIRT, 2010; TENASE & SPIRIDON, 2014).

O processo de degradação em fluidos corpóreos é descrito com uma sucessão de eventos. Primeiramente ocorre a hidratação do material, seguido da hidrólise das ligações ésteres, que como consequência origina produtos na forma de oligômeros ou monômeros. Posteriormente, a degradação evolui por um processo biologicamente ativo, realizado por enzimas ou por um processo de clivagem hidrolítica passiva. Essa etapa é evidenciada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média e perda das suas propriedades mecânicas (BARBANTI, ZAVAGLIA & DUEK, 2005). Os produtos gerados na degradação do PLA são facilmente eliminados pelo organismo, pois o monômero ácido láctico se encontra naturalmente no metabolismo humano e é transformado em CO_2 e água (SIMÕES, EINLOFT & PEZZIN, 2010).

Jong et al. (2001) relataram que a degradação hidrolítica do PLA amorfo (PDLLA) tende a acontecer de maneira heterogênea ocorrendo mais rapidamente no interior da matriz do que na superfície, isto porque a saída dos produtos de degradação (oligômeros) do interior da matriz é dificultada e acaba contribuindo para a autocatálise e, conseqüente, aceleração da degradação no seu interior.

Mudanças nas propriedades dos polímeros, inclusive do PLA, buscando atender exigências de aplicações, podem ser obtidas pelo desenvolvimento de misturas poliméricas.

3.4 MISTURAS POLIMÉRICAS

Mistura polimérica é o termo utilizado para definir o sistema originário da mistura física de dois ou mais polímeros sem que ocorra um elevado grau de reações químicas entre eles. Sua utilização está relacionada a possibilidade de combinar propriedades dos polímeros individuais buscando a obtenção de um material com novas características. As formas mais comuns de produzir misturas poliméricas são pela junção dos polímeros no estado fundido ou pela dissolução dos mesmos em solvente (SIONKOWSKA, 2011).

Polímeros que apresentam afinidade química dão origem a misturas homogêneas, ao passo que polímeros com pouca ou nenhuma afinidade química originam misturas heterogêneas, que tendem a apresentar separação de fases. A mistura polimérica pode ser caracterizada como uma mistura miscível, imiscível ou parcialmente miscível. A miscibilidade está relacionada com a mistura dos componentes em nível molecular, ou seja, formando uma mistura homogênea, sem separação de fase. Em misturas imiscíveis, por outro lado, ocorre separação de fase (UTRAKI, 1990; PAUL, BARLOW & KESKKULA, 1998; PAUL & BUCKNALL, 2000).

A imiscibilidade é mais facilmente alcançada devido às razões termodinâmicas, que também podem apresentar incompatibilidade decorrente da baixa dispersão de uma das fases e da baixa adesão entre elas. Para melhorar a adesão e a dispersão em misturas imiscíveis são utilizados compatibilizantes que atuam na interface diminuindo a tensão interfacial (LUNA et al., 2015).

Misturas poliméricas vêm sendo amplamente estudadas com o intuito de melhorar propriedades que poderiam limitar aplicações de biomateriais e também com o objetivo de obter materiais melhorados (PIRES, BIERHALZ & MORAES, 2015). No campo biomédico, misturas de polímeros naturais e sintéticos podem formar um novo material com melhores propriedades mecânicas e de biocompatibilidade quando comparado com os polímeros

separadamente, tendo em vista que os polímeros naturais são, geralmente, biocompatíveis e os polímeros sintéticos apresentam boas propriedades mecânicas (SIONKOWSKA, 2011). Para engenharia de tecidos, polímeros com estrutura celular bimodal, de diferentes tamanhos de poros, podem combinar as vantagens de células pequenas que apresentam boas propriedades mecânicas e células grandes de menor densidade aparente (XU & HUANG, 2016).

O PLA pode formar misturas com outros polímeros para permitir o ajuste de propriedades, tais como a velocidade de degradação, permeabilidade, taxa de liberação de fármacos, bem como propriedades térmicas e mecânicas da mistura final (SACCHETIN et al., 2016).

O PU apresenta características de flexibilidade, biocompatibilidade, estabilidade biológica e dependendo da sua estrutura química a mistura com outros polímeros pode gerar uma mistura parcialmente ou totalmente degradável (GRZESIAK et al., 2015; OLIAEI, KAFFASHI & DAVOODI, 2015).

Misturas de PU/PLA foram estudadas por diferentes autores para diversas aplicações, entre elas, as apresentadas na sequência, que serão abordadas com mais detalhes no decorrer deste estudo. Feng e Ye (2010) utilizaram misturas nas proporções em massa de 90/10, 80/20 e 70/30 (PLA/TPU) obtidas em reômetro de torque e moldadas por compressão a quente com o intuito de ajustar a característica de dureza oriunda do PLA para aplicações como polímero de uso geral. Oliaei, Kaffashi & Davoodi (2015) com a mesma finalidade de Feng e Ye (2010), obtiveram misturas na proporção de 10/90, 25/75, 40/60 em massa (PLA/TPU), fundidas em um misturador para aplicação como biomaterial. Mi et al. (2013) com a finalidade de conciliar as características de propriedades mecânicas e rigidez do PLA com as propriedades mecânicas e de flexibilidade do TPU produziram misturas nas proporções de 75/25, 50/50 e 25/75 (PLA/PU) por processo de extrusão e moldados por injeção microcelular para utilização como suportes porosos. Song et al. (2014) estudaram misturas de TPU/PLA nas proporções de 80/20, 65/35 e 50/50 (m/m) em relação a característica de memória de forma. Grzesiak et al. (2015) prepararam mistura na proporção de 50/50 em massa dissolvendo os polímeros em dimetilformamida e avaliaram as características de adesão e proliferação celular para utilização como biomaterial.

Entre as diversas aplicações para misturas de PU com PLA, destaca-se a produção de suportes porosos, como descrito por Mi et al. (2013), utilizados para aplicações na engenharia de tecidos.

3.5 SUPORTES POROSOS

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que compreende os princípios da engenharia e ciências da vida para desenvolver substitutos biológicos com a função de restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos (CHAN & LEONG, 2008; NIGAM & MAHANTA, 2014; O'BRIEN, 2011).

O modelo de biomaterial para engenharia de tecidos deve se assemelhar a matriz extracelular que é responsável por fornecer suporte físico, organização espacial e um ambiente bioativo para promover as funções celulares (KEANE & BADYLAK, 2014).

Estes biomateriais, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes, arcabouços, estruturas), são estruturas tridimensionais biocompatíveis que podem apresentar propriedades semelhantes à matriz extracelular, no que se refere ao comportamento mecânico, atividade celular e produção de proteínas por meio de interações bioquímicas e mecânicas, também são capazes de fornecer suporte para o crescimento de células e formação de tecido ósseo (AGARWAL, WENDORFF & GREINER, 2008; BARBANTI e ZAVAGLIA, 2005; BOSE, VAHABZADEH & BANDYOPADHYAY, 2013).

O suporte poroso ideal baseia-se na escolha do material adequado, com características biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxico para as células, tanto na forma original quanto degradada (CHAHAL et al., 2016). Devem promover adesão e proliferação celular e manter a atividade metabólica das células (SIVASHANKARI & PRABAHARAN, 2016), atuando de forma temporária como suporte para transferência de tensões em regiões do corpo lesionadas, facilitando e guiando o crescimento celular até a completa regeneração tecidual (Figura 5) (CHEUNG et al., 2007; NAIR & LAURENCIN 2007).

Durante a adesão a um substrato, as células respondem aos sinais extracelulares detectados. Desta forma, os sinais químicos e físicos presentes em suportes celulares devem se adaptar para promover respostas celulares específicas (IDASZEK et al., 2016).

As principais características dos suportes porosos estão relacionadas às características estruturais e químicas. O biomaterial deve apresentar uma arquitetura tridimensional com tamanho, forma e rugosidade definidos, poros abertos para permitir a proliferação de células e crescimento do tecido, resistência mecânica, composição química em que os produtos da superfície e de degradação sejam biocompatíveis e uma taxa de degradação que dê tempo suficiente para que ocorra o crescimento completo do tecido danificado (CHUNG & PARK, 2007; IDASZEK et al., 2016).

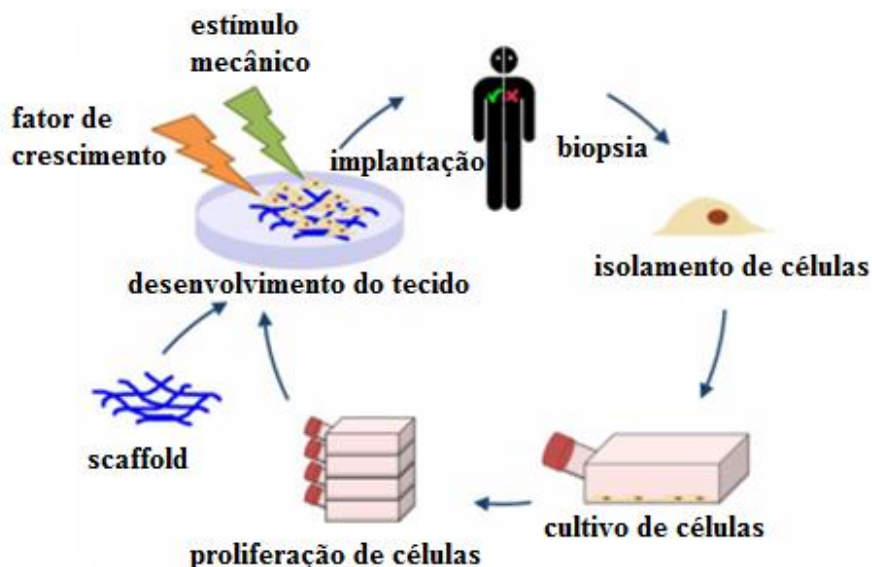


Figura 5. Sequência da utilização de suporte poroso para engenharia de tecidos (adaptado de Nigam & Mahanta, 2014).

A arquitetura dos poros dos suportes é uma variável importante para engenharia de tecidos e é influenciada pelas propriedades mecânicas e propriedades de transporte de massa. A alta permeabilidade pode produzir uma difusão superior no interior do suporte, facilitando a entrada de nutrientes e a eliminação dos produtos de degradação. Além disso, a arquitetura é responsável pela capacidade das células em aderir e proliferar no suporte (COSTANTINI et al., 2016).

Existem relatos de tamanho de poro ótimo para a fixação e proliferação das células e regeneração de tecidos. A Tabela 1 apresenta o tamanho ideal de poros para a formação de tecidos e crescimento celular.

Tabela 1. Tamanho de poro ideal para formação de tecidos e crescimento celular (Karande, Ong & Agrawal, 2004; Migliaresi & Motta, 2014).

Formação de tecido/crescimento celular	Tamanho de poros (μm)
Neovascularização	5
Crescimento interno de fibroblastos	5-15
Regeneração de pele	20-125
Fibroblastos de ligação	40-150
Migração celular	40-200
Formação de cartilagem	90-120
Regeneração do osso	100-350
Tecido fibrovascular	500

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A aplicação dos suportes porosos abrange a regeneração para inúmeros tecidos e órgãos, tais como, pele, cartilagem, osso, válvulas do coração, artérias, nervos, córneas, ligamentos, tecidos vasculares e neurais (NIGAM e MAHANTA, 2014).

Os suportes porosos podem ser produzidos pelas técnicas de lixiviação de partículas, separação de fase induzida pela temperatura, inversão de fase na presença de um líquido não solvente, liofilização, eletrofição, prototipagem rápida, formação de espuma por gás (fluido supercrítico), entre outras (OKAMOTO & JOHN, 2013). A Figura 6 apresenta a morfologia de algumas técnicas de produção de suporte poroso.

An et al. (2013) produziram suportes de PLA/PU pelo processo de eletrofição e PLA/PU com adição de óxido de grafeno (PLA/PU/GO) e avaliaram a biocompatibilidade. Os resultados foram positivos, o que indica que os suportes apresentaram boa biocompatibilidade e a adição de GO não prejudicou a adesão e proliferação das células.

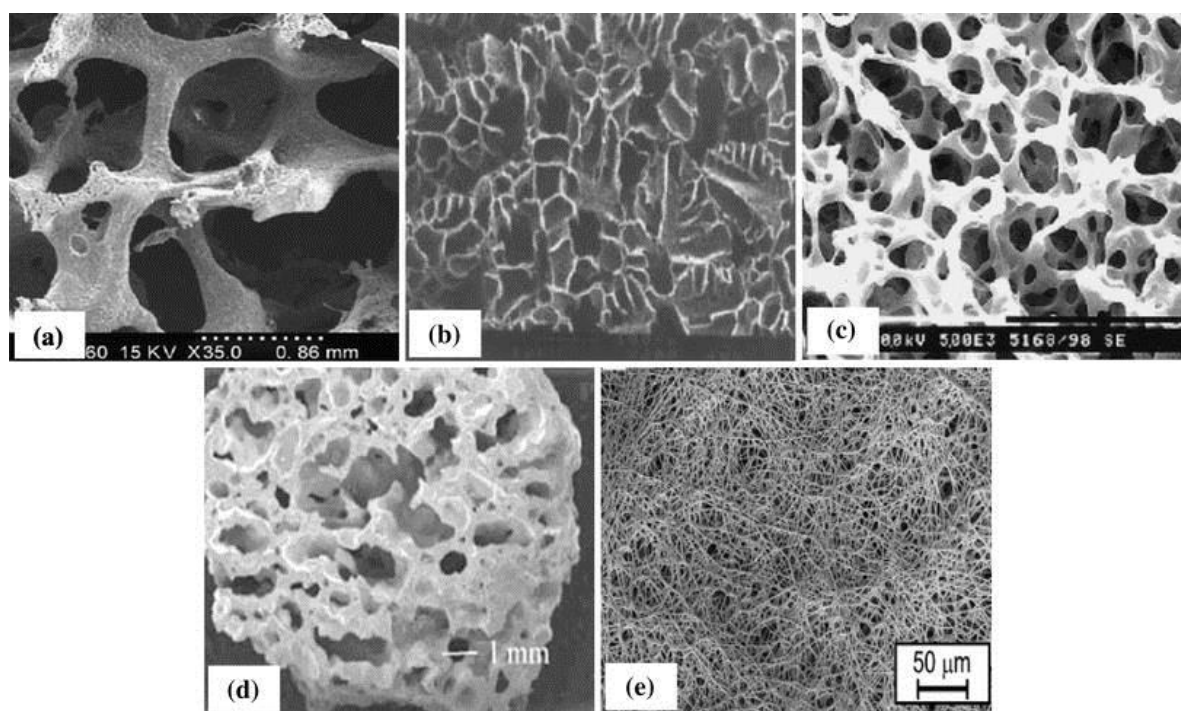


Figura 6. Morfologia de suporte poroso produzido por: (a) evaporação de solvente/lixiviação de partículas. (b) liofilização; (c) separação de fase termicamente induzida; (d) formação de espuma por gás; (e) eletrofição (Adaptado de Thavornyutikarn et al. 2014).

Mi et al. (2013) produziram suportes porosos de PLA/TPU com diferentes proporções (75/25; 50/50; 25/75) pelo processo de moldagem por injeção microcelular utilizando CO₂ e avaliaram a miscibilidade, morfologia, propriedades mecânicas e biocompatibilidade. A análise química das misturas confirmou a existência de características dos dois polímeros, sem

formação de novas bandas química observadas no FTIR; a análise térmica e dinâmico-mecânica comprovou a imiscibilidade da mistura PLA/TPU; a morfologia apresentou o PLA disperso como esferas ou ilhas na matriz de TPU e poros maiores para maiores concentrações de TPU; propriedades mecânicas com boas propriedades de resistência à tração e compressão e aumento do alongamento na ruptura com adição de TPU; biocompatibilidade para todos os suportes porosos e melhores resultados de viabilidade celular para a mistura com maior proporção de PLA.

Jing et al. (2014) prepararam suportes porosos de PLA/TPU pelo processo de separação de fase induzida termicamente utilizando 1,4-dioxano e água como solventes e avaliaram as propriedades morfológicas, térmicas e de degradação da mistura e dos polímeros puros. A adição de água como um não solvente ao 1,4-dioxano promoveu um aumento da porosidade dos suportes, acelerou a taxa de degradação devido a microestrutura mais interligada e aumentou o módulo de compressão. Os suportes porosos de TPU e PLA apresentaram boa biocompatibilidade e a mistura PLA/TPU favoreceu a migração celular e a proliferação no interior do suporte poroso.

Song et al. (2014) avaliaram as propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e de memória de forma de suportes porosos de TPU/PLA nas proporções de 80/20, 65/35 e 50/50 fabricados pelo processo de formação de espuma. Os resultados confirmaram que o suporte poroso de 80/20 (TPU/PLA) apresentou melhores resultados de resistência à tração, percentual de alongamento e tenacidade, bem como a menor densidade e estrutura com poros uniformes em escala micrométrica.

Para produzir um suporte poroso com as características necessárias para cada aplicação é importante que os parâmetros sejam rigorosamente controlados, tanto nas propriedades da macroestrutura (forma espacial, resistência mecânica, densidade, porosidade), como na microestrutura (tamanho, distribuição e interconexão de poros) (LEONG, CHEAH & CHUA, 2003).

3.6 FORMAÇÃO DE SUPORTE POROSO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

A formação de suporte poroso com fluido supercrítico pela técnica de formação de espuma por gás é utilizada para produção de materiais microcelulares, que são matrizes poliméricas porosas que podem apresentar diâmetro médio de poros inferior a 10 μm (KUMAR & SUH, 1990; TSIVINTZELIS et al., 2016).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Os fluidos supercríticos, principalmente o dióxido de carbono (CO_2) e nitrogênio (N_2), atuam como agente de expansão físico para a produção de polímeros porosos. O CO_2 possui propriedade não tóxica, não inflamável, relativamente barato e disponível em alta pureza. Quando submetido a temperatura e pressão acima do seu ponto crítico ($T_C = 31,1^\circ\text{C}$ e $P_C = 73,8$ bar), o CO_2 é um fluido supercrítico com propriedades intermediárias entre líquidos (alta densidade) e gases (baixa viscosidade) (SALERNO & PASCUAL, 2015; WHITE et al., 2012).

Na exposição ao fluido supercrítico, a matriz polimérica é saturada com CO_2 dissolvido e quando submetida a redução da pressão, ocorre a formação de uma estrutura com morfologia porosa. Essa estrutura é formada devido a redução da pressão que diminui a solubilidade de CO_2 no polímero, a qual o CO_2 sobressaturado nucleia e cresce na forma de bolhas na matriz polimérica, formando uma rede porosa (Figura 7). A morfologia formada é determinada pelo nível de saturação que é atingido com os parâmetros de pressão e temperatura em que o polímero é exposto ao CO_2 , dinâmica de nucleação e crescimento das células e taxa de despressurização (LIAO ZHANG & HE, 2012; KIRAN, 2016).

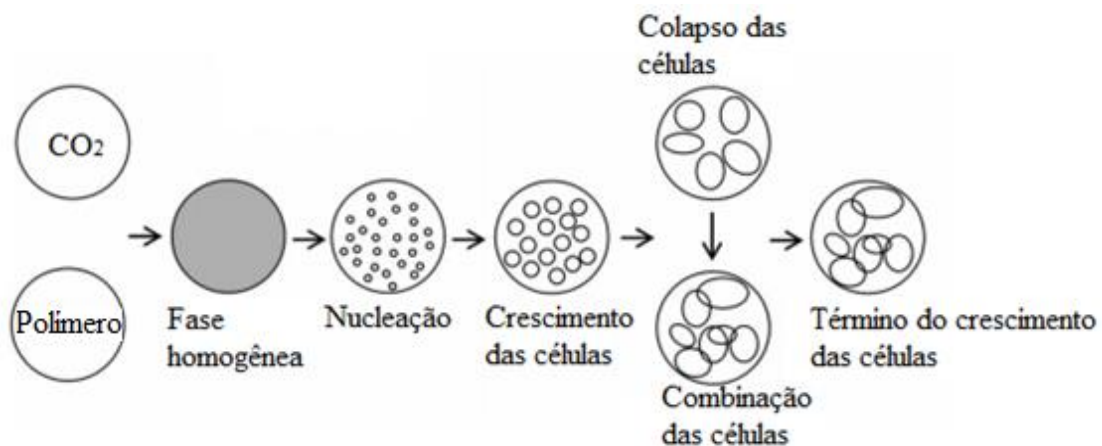


Figura 7. Ilustração do processo de expansão com CO_2 supercrítico (Adaptado de Guanghong & Yue, 2012).

Na formação de espuma com gases ou fluido supercrítico, as propriedades do polímero-gás que definem a estrutura porosa são o grau de cristalinidade da matriz polimérica, gás dissolvido, o grau de saturação que é induzido a partir da despressurização ou o aquecimento do sistema, a energia de superfície entre os núcleos do gás e a matriz polimérica e o perfil de plastificação do sistema polímero-gás (TSIVINTZELIS et al., 2016).

A absorção de CO₂ em materiais poliméricos pode resultar em redução da temperatura de transição vítrea, viscosidade, tensão interfacial e aumento da flexibilidade da cadeia polimérica devido ao aumento da fração de volume livre (LIAO, ZHANG & HE, 2012).

O método de formação de espuma geralmente é aplicado para polímeros amorfos, no caso de polímeros semicristalinos, a morfologia final pode não ser uniforme devido à dificuldade da penetração do fluido nos cristalitos do polímero (TSIVINTZELIS et al., 2016).

Dai et al. (2005) estudaram a influência dos parâmetros do processo de formação de espuma com CO₂ supercrítico na morfologia do PU e verificaram que o tamanho e a distribuição dos poros podem ser controlados alterando as condições de processamento. O aumento da pressão (9 MPa, 12 MPa, 15 MPa, 18 MPa) promoveu diminuição do tamanho médio das células de 10 µm (9 MPa) para 4 µm (18 MPa), aproximadamente, e amostras mais uniformes. A diminuição da temperatura (60°C, 45°C, 35°C) gerou amostras com diâmetro de poros menores, em torno de 8 µm para 35°C enquanto que para 60°C o diâmetro médio de poros foi de aproximadamente 50 µm. O tempo foi fixado em 160 minutos e despressurização de 2 segundos.

White et al. (2012) produziram suportes porosos de PDLA de diferentes massas molares (15 kDa, 25 kDa, 57 kDa) e avaliaram a taxa de despressurização (23,3 bar·min⁻¹; 7,7 bar·min⁻¹; 5,2 bar·min⁻¹; 3,9 bar·min⁻¹) na morfologia final dos suportes. A taxa de despressurização rápida (23,4 bar·min⁻¹) produziu suportes porosos com distribuição homogênea de poros e alguns poros fechados. Diminuindo a taxa de despressurização (3,9 bar·min⁻¹), os poros apresentaram distribuição de tamanho mais larga e maior, com poros mais interconectados.

A estrutura porosa em misturas poliméricas é dificultada devido as diferentes características de formação de espuma e mecanismos dos diferentes componentes. A estrutura porosa é afetada pela viscosidade dos polímeros, morfologia de fase, áreas interfaciais, solubilidade e difusividade do agente de expansão em diferentes polímeros. No entanto, existe a possibilidade de criar diferentes estruturas celulares pela mistura de polímero (TAKI et al., 2005; WANG et al., 2016).

Além de servir como fluido de expansão, o CO₂ supercrítico é utilizado como agente esterilizante e classificado como uma tecnologia de esterilização a frio, devido a sua baixa temperatura crítica, tornando-se uma opção tentadora para esterilização de dispositivos médicos e biomateriais sensíveis ao calor (ZHANG et al., 2006).

Yavuz et al. (2016) avaliaram os parâmetros de processo de esterilização com CO₂ supercrítico (P, T, t) e processos de esterilização convencionais (luz ultravioleta, autoclave,

óxido de etileno e peróxido de hidrogênio) em microchips de poli(metilmacrilato). As condições de processo de esterilização com CO₂ supercrítico de 120 bar, 40°C e 60 minutos de exposição ao gás promoveram completa esterilidade sem alterações adversas nas propriedades morfológicas, químicas e térmicas.

3.7 ESTERILIZAÇÃO

A esterilização é um processo que elimina todas as formas de vida microbiana, tais como, fungos, bactérias e vírus decorrentes do processamento e manuseio (RAI et al., 2013). No entanto, a esterilização pode afetar a superfície do material e induzir mudanças nas características físico-químicas, morfológicas, mecânicas, químicas e biológicas (MUNARIN et al., 2013).

A maioria dos biomateriais poliméricos apresenta temperatura de fusão relativamente baixa e são suscetíveis à degradação e/ou degeneração morfológica em altas temperaturas, esse fato impede a utilização de métodos de esterilização que requerem altas temperaturas (HOFMANN et al., 2014).

O óxido de etileno é compatível com inúmeros materiais, no entanto, resíduos tóxicos podem permanecer no material após esterilização (ZAJKO & KLIMANT, 2013). A esterilização a vapor não pode ser usada para polímeros termicamente sensíveis, devido à sua temperatura elevada (DEMPSEY & THIRUCOTE, 1989). Os radicais livres gerados durante o processo de plasma de peróxido de hidrogênio podem reagir com as cadeias do polímero e provocar degradação (DUFFY et al., 2000). A esterilização com radiação pode modificar as propriedades físicas e químicas de polímeros (DORATI et al., 2008; SAEID, SAMPA & CHMIELEWSKI, 2007).

Rainer et al. (2010) realizaram um estudo comparativo com diferentes técnicas de esterilização (autoclave, radiação UV, plasma de peróxido de hidrogênio e imersão em etanol) aplicadas ao PLLA. Os resultados mostraram que as técnicas de esterilização por radiação UV e plasma de peróxido de hidrogênio não comprometeram as características morfológicas e químicas do PLLA.

Savaris, dos Santos e Brandalise (2016) avaliaram a influência de diferentes técnicas de esterilização (óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio, autoclave, radiação por raios gama e radiação por feixe de elétrons) nas propriedades morfológicas, físicas, químicas e térmicas do PLA. A resposta do PLA frente as diferentes esterilizações comprovaram que a técnica por autoclave não pode ser aplicada, devido as modificações morfológicas, térmicas,

químicas e físicas causadas no material e os demais processos podem ser aplicados para esterilização do PLA.

Segundo Ratner et al. (2013) não há um método específico para esterilização de suportes porosos sem prejudicar o crescimento e proliferação das células. Por conta disso, uma opção viável seria a produção desses materiais em ambientes estéreis com tempo reduzido de utilização após fabricação.

A escolha pelo método de esterilização é de fundamental importância para o sucesso dos biomateriais sob vários aspectos a serem considerados, entre eles a integridade de suas propriedades e das características de superfície que estão diretamente relacionadas a performance do biomaterial e antecede os testes *in vitro* e *in vivo*.

3.8 TESTE *IN VITRO* PARA BIOMATERIAIS

A avaliação adequada da segurança dos biomateriais é considerada um critério de grande importância, uma vez que estes materiais estão em contato com os tecidos humanos e permanecem por um longo período de tempo (FOURNIER et al., 2003; RAMOT et al., 2016).

O desempenho de um biomaterial é avaliado por dois conjuntos de características que determinam a capacidade do material em realizar as funções específicas a qual foi designado e aquelas que determinam a compatibilidade do material dentro do corpo – biofuncionalidade e biocompatibilidade. A biocompatibilidade do material envolve a avaliação dos efeitos do ambiente biológico sobre os materiais e dos efeitos do material no ambiente (MARQUES, REIS & HUNT, 2002).

Avaliação da biocompatibilidade é um processo complexo que visa testes *in vitro* e *in vivo* direcionados para avaliar a citotoxicidade, respostas alérgicas, irritação, inflamação e a toxicidade sistêmica e crônica (KATTI et al., 2002). A citotoxicidade é geralmente realizada utilizando linhagens de células imortalizadas, podendo ser analisadas de forma qualitativa, com base em exame morfológico de danos em células e crescimento quando em contato direto ou indireto com os materiais (MARQUES, REIS & HUNT, 2002).

De acordo com a ISO 10993 – 5 “*Biological Evaluation of Medical Devices*” (2009), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* pode ser realizado por três categorias de testes: teste de extrato, teste de contato direto e teste de contato indireto. A escolha da categoria de teste depende da natureza, local e finalidade da utilização do material. E a partir da escolha, seguem-se os métodos de preparação da amostra, células de cultura e a maneira em que as células são expostas ao material ou ao extrato.

A adesão celular é outro fator importante e está relacionada a avaliação da superfície para determinar a adequação para o uso como biomateriais na engenharia de tecidual. A capacidade da célula em aderir e proliferar sobre a superfície do material é a primeira fase de interação célula - material (EL-AMIN et al., 2003).

Mi et al. (2013) avaliaram a biocompatibilidade e viabilidade celular em suportes porosos de PLA, TPU e PLA/TPU utilizando NIH 3T3 como linhagem celular e verificaram que os biomateriais promoveram a migração e proliferação celular e as amostras com PLA apresentaram uma elevada viabilidade celular.

Grzesiak et al. (2015) estudaram o comportamento *in vitro* de filmes de PU, PLA e PU/PLA utilizando células tronco mesenquimais e da glia. A análise da adesão e proliferação celular mostrou que a mistura (PU/PLA) apresentou resultados positivos para a cultura celular e a adição de PLA aumentou a adesão e proliferação celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais que foram utilizados para a realização do estudo, a metodologia de preparação dos filmes e dos suportes porosos, os ensaios de caracterização morfológica, física, química, térmica e mecânica, bem como os testes *in vitro* dos suportes porosos para avaliar a utilização como biomaterial na engenharia de tecidos

4.1 MATERIAIS

Os reagentes usados na síntese do PU foram: policaprolactona diol (PCL) ($M_n = 2.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), hexametileno diisocianato (HDI) com 99 % de pureza e butano-1,4-diol (BDO) com 99% de pureza. Todos reagentes são da Sigma-Aldrich.

O PDLLA de grau médico é da marca Purasorb, da empresa Purac Biomaterials.

Os reagentes usados na titulação para calcular o índice de isocianato (ASTM D 2572 - 97) da marca Dinâmica foram: indicador azul de bromofenol, di-n-butilamina (99 %), tolueno (99,8 %), ácido clorídrico (0,1 mol/L) e álcool isopropílico.

Para solubilizar as amostras foi utilizado tetrahidrofurano (THF) com pureza de 99% da marca Dinâmica.

O fluido supercrítico utilizado foi o dióxido de carbono, com pureza de 99% da *White Martins*.

Para os testes de citotoxicidade e adesão celular foram utilizados meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (P/S), brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) e glutaraldeído. Todos reagentes são da marca Sigma-Aldrich.

As células L929 de fibroblasto de camundongo foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil.

4.2 MÉTODOS

O Quadro 1 apresenta a nomenclatura e a descrição das amostras utilizadas neste estudo.

Quadro 1. Nomenclatura e descrição das amostras em estudo

Nomenclatura	Descrição
PU	Filme de poliuretano
PDLLA	Filme de poli(DL-ácido láctico)
PU/PDLLA	Filme da mistura de poliuretano e poli(DL-ácido láctico)
PUsp	Suporte poroso de poliuretano
PDLLAsp	Suporte poroso de poli(DL-ácido láctico)
PU/PDLLAsp	Suporte poroso da mistura de poliuretano e poli(DL-ácido láctico)

4.2.1 Síntese de PU

Para a síntese do PU foram variados parâmetros de tempo de síntese (1 h, 2 h, 2 h 30 min e 4 h), temperatura de síntese (50°C, 60°C, 90°C), tempo de cura em estufa (24 h, 48 h), temperatura da estufa (40°C, 60°C, 100°C) e razão NCO/OH (1; 1,1; 1,2; 1,25; 1,5; 2; 2,5).

Os intervalos de tempo e temperatura foram testados, tendo em vista que a literatura relata diferentes tempos e temperaturas de reação para síntese do PU pelo processo em duas etapas e as diferentes razões de NCO/OH para otimizar a expansão do PU com fluido supercrítico, devido ao fato de algumas razões NCO/OH não promoverem expansão nas amostras de PU.

A síntese do PU para o desenvolvimento dos filmes foi realizada pelo processo de pré-polímero, com razão NCO/OH de 1,25, conforme fluxograma apresentado na Figura 8.

Inicialmente, PCL e HDI foram submetidos a agitação magnética durante 1 h 30 min a 60°C (banho de óleo) em um béquer fechado com entrada de N₂ para formação do pré-polímero. Transcorrido o tempo de síntese do pré-polímero, foi realizada a titulação com di-n-butilamina para determinar o teor de isocianato (ASTM D 2572-97). Na sequência foi adicionado BDO e a mistura permaneceu em agitação durante 30 min para formação do poliuretano. Após, o material foi transferido para formas de silicone, acondicionado em estufa durante 24 h a 60°C e na sequência, colocados em dessecador durante 24 h. Antes da síntese, a PCL foi seca em estufa a 100°C durante 12 h e o HDI foi purificado por filtração com membrana porosa.

O índice de NCO residual do pré-polímero após 1 h 30 min de reação foi de 1,26%.

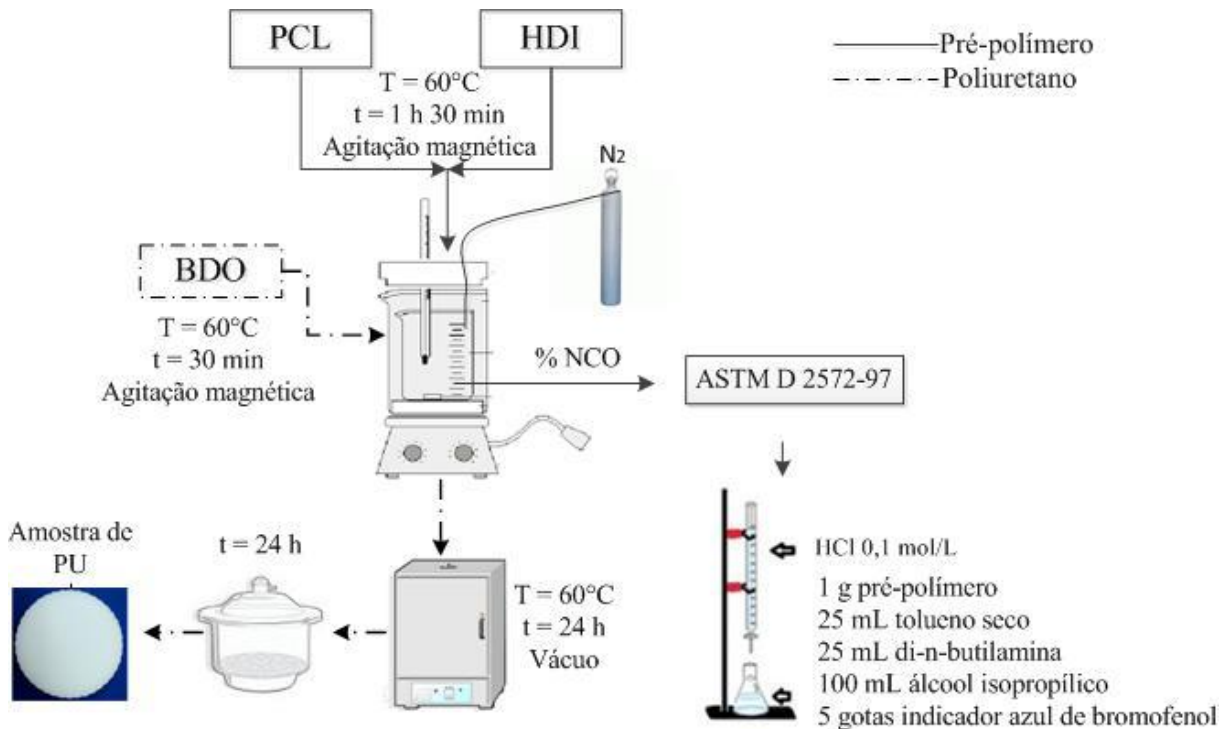


Figura 8. Fluxograma do processo de síntese do PU.

4.2.2 Preparação dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA

O PU na forma de pequenos pedaços oriundos de uma amostra cilíndrica, e o PDLLA em *pellets* foram preparados, na forma de filmes, pela dissolução em THF na proporção de 20% m/m sob agitação por 4 h a 50°C . Após, foram transferidos para placas de vidro e acondicionados em estufa a 50°C por 24 h e em dessecador por mais 48 h para formação de filmes com espessura de aproximadamente 2,5 mm. Este procedimento foi adotado considerando estudos de Grzesiak et al. (2015).

A escolha da relação 50/50 (m/m) da mistura PU/PDLLA foi selecionada para verificar a influência da mistura no material final, sem prevalência de um dos polímeros, tendo em vista que são materiais com características distintas.

4.2.3 Formação de suporte poroso com dióxido de carbono supercrítico

Para a obtenção do suporte poroso foi utilizado o extrator de fluidos supercríticos SFT – 150 (Figura 9), da empresa *Supercritical Fluid Technologies* (Estados Unidos).

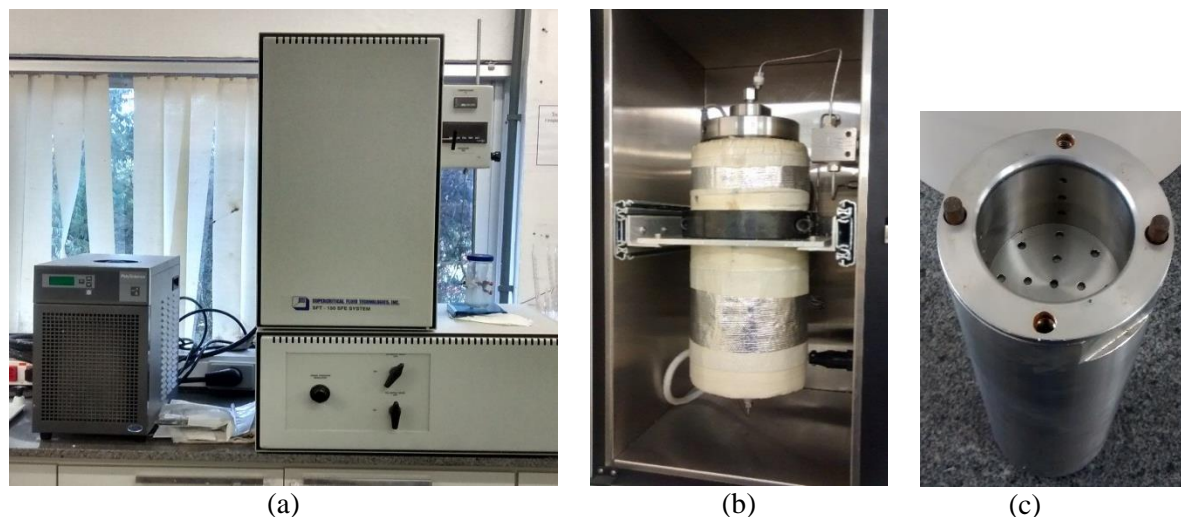


Figura 9. Registro fotográfico do (a) extrator supercrítico (b) visualização do vaso de pressão e (c) porta amostra.

Os filmes foram colocados em um recipiente adaptado de 60 mL de volume interno dentro do extrator supercrítico e as condições de processo foram analisadas com variações de pressão de 1300 a 3500 psi, temperatura de 35 a 60°C, tempo de saturação de CO₂ de 2 a 5 h e depressurização de 2,5 a 60 min.

A expansão das amostras para produção dos suportes porosos foi realizada no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul (LPOL/UCS).

4.2.4 Citotoxicidade e adesão celular dos suportes porosos

Para determinar a citotoxicidade e a adesão celular dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp foi realizada análise de contato indireto, conforme método descrito na norma ISO 10993-5 (2009), com células da linhagem L929 de fibroblastos de camundongos. A solução de extrato foi preparada utilizando três suportes porosos de cada amostra (PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp) na forma cilíndrica com diâmetro de 12 mm, espessura de 1,5 mm e aproximadamente 30 mg, previamente esterilizados com radiação UV, e foram adicionados 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). O meio de cultura (DMEM) em contato com os suportes porosos foi incubado durante 24 h a 37°C em 5% de CO₂ para a obtenção da solução de extração.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método indireto do ensaio de MTT. O método MTT é baseado na redução do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) pela enzima desidrogenase mitocondrial, na formação de cristais de formazan (DENIZOLT & LANG, 1986). Resumidamente, as células foram semeadas a uma densidade

de 5×10^4 células·mL⁻¹ em 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após 24 horas, as células foram tratadas com a solução de extração dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp durante 1, 4 e 6 dias. Para o controle negativo foi utilizado meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S) e incubado a 37°C em 5% de CO₂, no mesmo tempo citado acima. O meio foi removido e 1 mg·mL⁻¹ de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 2 h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Subsequentemente, retirou-se a solução de MTT e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A leitura espectrofotométrica a 570 nm foi realizada em um leitor de microplacas (espectros Max190, Molecular Devices, EUA) e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle. As alterações na viabilidade celular analisadas pelo método indireto foram observadas e documentadas após 1, 4 e 6 dias de exposição ao tratamento da amostra. O grupo de controle negativo foi tratado com meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S).

Para avaliação morfológica e de adesão celular, os suportes porosos foram colocados em contato direto com as células L929 por 1, 4 e 6 dias. Procedeu-se testes em microscopia óptica de fluorescência com solução de 4',6'-diamidino-2-phenilindole (DAPI) e imagens com ampliação de 100x e MEV-FEG com fixação das células sobre os suportes porosos com glutaraldeído 3%, desidratação por congelamento e posterior liofilização e imagens com aumento de 500x (LEE & CHOW, 2012; SANTANA et al., 2015).

A significância estatística foi avaliada utilizando t-teste e análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição normal. Significância foi aceita para p inferior a 0,05 utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, versão 19.0) para Windows.

Os testes de citotoxicidade e adesão celular foram realizados no Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA da Universidade de Caxias do Sul.

4.2.5 Ensaios dos filmes e dos suportes porosos

4.2.5.1 Cromatografia de permeação em gel dos filmes

A análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA foi realizada em um cromatógrafo líquido Waters Instruments (Estados Unidos)

equipado com bomba isocrática (modelo 1515) e detector de índice de refração (modelo 2414), utilizando THF grau HPLC como eluente com fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, *set* de coluna Styragel e curva de calibração com padrões de poliestireno. As amostras foram solubilizadas em THF ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e filtradas com membrana de politetrafluoretileno de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Os parâmetros foram adotados considerando o estudo de Mi et al. (2013).

A análise de GPC dos filmes foi realizada na Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS).

4.2.5.2 Reologia dos filmes

Análise reológica foi realizada para verificar a viscosidade complexa dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA. O equipamento utilizado foi um reômetro oscilatório do tipo placa-placa da marca Anton Paar, modelo MCR-301 (Áustria). A análise foi realizada com frequência angular de $0.1\text{-}300 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, distância entre as placas de 1 mm e temperatura de 70°C para o PU, 170°C para o PDLLA e para a mistura PU/PDLLA foi realizada nas duas temperaturas (70 e 170°C). A variação da temperatura foi avaliada devido as distintas características térmicas dos polímeros puros.

O ensaio reológico foi realizado no LPOL/UCS.

4.2.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos filmes

Amostras dos filmes foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no modo *Attenuated Total Reflectance* (ATR), em um equipamento Nicolet IS10, modelo *Thermo Scientific* (Estados Unidos), no intervalo de $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$, 32 varreduras e com resolução de 4 cm^{-1} .

O ensaio de FTIR foi realizado no LPOL/UCS.

4.2.5.4 Termogravimetria dos filmes

A análise de termogravimetria (TG) foi realizada por equipamento Shimadzu TGA-50 (Japão) em atmosfera de N_2 com fluxo de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ com faixa de temperatura de 23 a 700°C .

O ensaio de TG foi realizado no LPOL/UCS.

4.2.5.5 Calorimetria exploratória diferencial dos filmes

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada no equipamento DSC-50 da Shimadzu (Japão) em atmosfera de N₂ com fluxo de 50 mL·min⁻¹, taxa de aquecimento de 10°C·min⁻¹ e faixa de temperatura de - 50 a 120°C para as amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA. O ensaio de DSC foi realizado no LPOL/UCS.

O índice de cristalinidade (X_c) das amostras de PU foi calculado com base nos resultados de entalpia de fusão (ΔH_m), obtidos na análise de DSC e entalpia de fusão da PCL 100% cristalina (ΔH_m^o = 139,5 J·g⁻¹) (ALISHIRI et al., 2014). O PDLLA por ser amorfo não foi calculado o X_c e para a mistura utilizou-se a fração de PU na amostra, representado por *n* (0,5), conforme Equação 1.

$$X_c (\%) = \frac{(\Delta H_m)}{n \times (\Delta H_m^o)} \times 100 \quad (1)$$

4.2.5.6 Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo dos filmes e dos suportes porosos

A morfologia dos filmes e dos suportes porosos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV-FEG) em um equipamento da marca Tescan, modelo MIRA 3 (República Checa), com aumentos de 50x, 200x, 1500 x e 5000x, elétrons secundários, tensão de aceleração de 5 e 15 kV. As amostras foram recobertas com ouro e as micrografias dos filmes foram obtidas na superfície e dos suportes porosos foram obtidas na superfície e na seção transversal.

O ensaio de MEV-FEG foi realizado no Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol (LCMic/UCS).

4.2.5.7 Diâmetro de poros dos suportes porosos

Para o cálculo do diâmetro de poros dos suportes porosos foi utilizado o software *ImageJ*. Micrografias de MEV-FEG dos suportes porosos com ampliação de 200 vezes passaram por calibração da escala, conversão da imagem para 8 *bits*, aplicação de um sistema binário e foram definidas as bordas, limites e contraste para proceder ao cálculo. Foi utilizado o valor médio de diâmetro de poro e desvio padrão fornecido pelo *software*.

4.2.5.8 Densidade aparente dos suportes porosos

A densidade aparente (ρ) dos suportes porosos foi calculada pela relação entre a massa (m) em gramas e o volume (v) em centímetros cúbicos da amostra. A medida das amostras para o cálculo do volume foi realizada com um paquímetro digital da marca Mitutoyo com resolução de 0,01 mm e a massa em balança analítica Ohaus com precisão de 0,0001 g. O cálculo foi realizado com 15 corpos de prova, conforme Equação 2.

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (2)$$

4.2.5.9 Resistência à compressão dos suportes porosos

A determinação da resistência à compressão dos suportes porosos foi determinada em equipamento Q800 AT DMA, marca *TA Instruments* (Estados Unidos). Os testes foram realizados na temperatura de 37°C, utilizando corpos de prova de 10 x 10 mm, com espessura de aproximadamente 4 mm, 3 N·min⁻¹ até a força de 18 N (limite máximo de força estática do equipamento).

O ensaio de resistência à compressão foi realizado no LPOL/UCS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados e discussão da caracterização dos filmes e dos suportes porosos de poliuretano, poli(ácido lático) e poliuretano/poli(ácido lático), bem como os testes de citotoxicidade e adesão celular dos suportes porosos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PU, PDLLA E PU/PDLLA

Para a síntese do PU a variação dos parâmetros de tempo e temperatura de síntese, tempo e temperatura de cura em estufa e razão NCO/OH foram realizadas para obter um produto final com reação completa dos grupos isocianato em uretano, aumentar a temperatura de fusão cristalina e possibilitar a expansão do polímero no extrator supercrítico. Entre os parâmetros testados foi possível obter PU sem presença de grupos isocianato remanescentes, temperatura de fusão variando de 35 a 52°C e uma estrutura porosa após submeter o polímero a condições supercríticas. Os parâmetros que possibilitaram os melhores resultados foram: tempo de síntese de 2 h, temperatura de síntese de 60°C, tempo de cura em estufa de 24 h, temperatura de cura em estufa de 60°C e razão NCO/OH de 1,25. A caracterização do PU com os parâmetros mencionados acima é apresentada no decorrer deste capítulo.

A cromatografia de permeação em gel foi utilizada para determinar a massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e índice de polidispersão (IP) do PU, PDLLA e PU/PDLLA. A distribuição de massa molar é apresentada na Figura 10 e os valores de M_n , M_w e IP na Tabela 2.

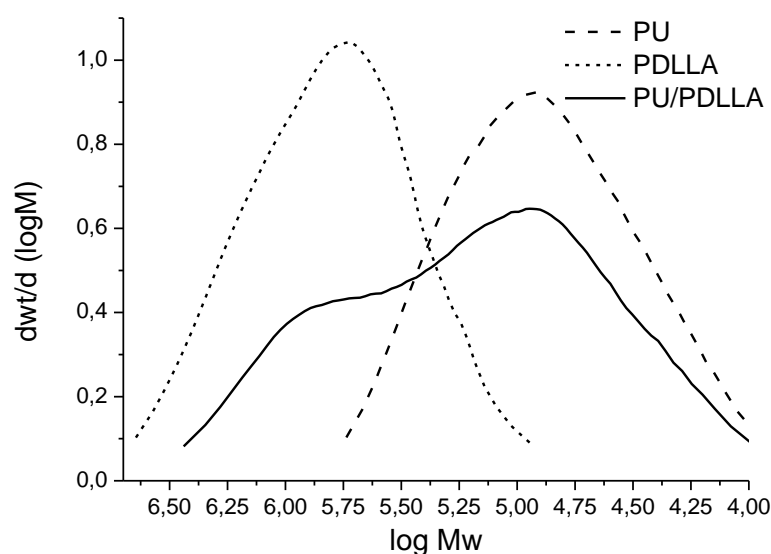


Figura 10. Comportamento da distribuição de massa molar do PU, PDLLA e PU/PDLLA.

Tabela 2. Mn, Mw e IP do PU, PDLLA e PU/PDLLA.

Amostra	M_n (g·mol⁻¹)	M_w (g·mol⁻¹)	IP
PU	49.587	117.502	2,4
PDLLA	437.286	929.302	2,1
PU/PDLLA	68.170	375.500	5,5

O PU sintetizado a partir de PCL, HDI e BDO resultou em um polímero com Mn de 49.587 g·mol⁻¹ e Mw de 117.502 g·mol⁻¹. O valor de IP de 2,4, juntamente com a imagem do comportamento da distribuição de massa molar (Figura 10) representam as diferentes faixas de massas molares presentes no polímero. Viezzer et al. (2009) sintetizaram PU partindo dos mesmos reagentes usados neste estudo, no entanto, com utilização de solvente, processo em uma etapa, relação NCO/OH de 1 e obtiveram Mn de 31.908 g·mol⁻¹, Mw de 67.617 g·mol⁻¹ e IP de 2,1. Os valores encontrados neste trabalho são superiores e podem estar relacionados as diferenças no processo de síntese e na razão NCO/OH.

O PDLLA apresentou Mn de 437.286 g·mol⁻¹, Mw de 929.302 g·mol⁻¹ e IP de 2,1. A distribuição de massa molar apresenta faixa de tamanho de cadeia mais uniforme quando comparado com o PU, por isso o menor valor de IP.

A amostra PU/PDLLA apresentou Mn de 68.170 g·mol⁻¹, Mw de 375.500 g·mol⁻¹ e IP de 5,5. Os valores de Mn e Mw são superiores ao PU e muito inferior ao PDLLA e a distribuição de massa molar apresenta uma característica bimodal em que é possível diferenciar a região característica de cada polímero na mistura. A distribuição bimodal e o alto valor de IP estão relacionados a elevada diferença de massa molar dos polímeros que constituem a amostra.

Os polímeros sintéticos, devido à natureza do processo de polimerização, costumam apresentar distribuição de massa molar ampla e esses valores influenciam propriedades físicas, mecânicas e reológicas dos polímeros. Analisando o IP, do ponto de vista tecnológico, o aumento do IP confere boas características de processabilidade e propriedades no produto final, no entanto, do ponto de vista termodinâmico, valores altos de IP dificultam a compreensão do comportamento de polímeros, principalmente em misturas, devido à complexidade dos resultados obtidos (TURCHETTE & FELISBERTI, 2000).

A viscosidade complexa em função da frequência angular dos polímeros puros e a mistura foi avaliada em um reômetro oscilatório e as curvas estão representadas na Figura 11.

Para a amostra PU/PDLLA foi verificada a viscosidade na temperatura de 70 e 170°C, devido ao comportamento distinto, em relação a temperaturas de fusão, dos polímeros que constituem a mistura.

A viscosidade é influenciada pelas condições de processamento, tais como taxa de cisalhamento, temperatura e pressão; tipo de material utilizado, como estrutura química, massa molar, polidispersão, presença de ramificações de cadeia curta e longa e pela presença de cargas e aditivos (COUTINHO et al., 2007).

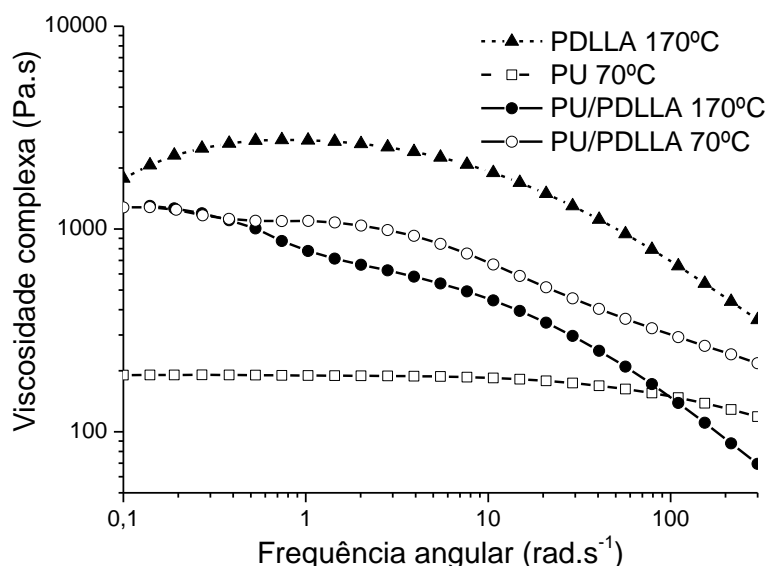


Figura 11. Viscosidade complexa em função da frequência angular para os filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA.

Os polímeros puros e a mistura apresentaram diminuição da viscosidade complexa com o aumento da frequência angular. Para o PDLLA foi constatado o maior valor de viscosidade entre as amostras testadas neste estudo, com viscosidade de 1800 Pa.s, enquanto que a viscosidade do PU foi de 190 Pa.s, sendo perceptível sua diminuição após 10 rad.s⁻¹.

A viscosidade inicial da mistura PU/PDLLA apresentou valores intermediário aos polímeros puros e comportamento similar para as temperaturas de 70°C e 170°C, com viscosidade de 1300 Pa.s. Com o aumento da frequência foi possível observar uma variação na viscosidade da mistura PU/PDLLA em relação as temperaturas analisadas, sendo a maior queda de viscosidade para a temperatura de 170°C, podendo estar relacionada a característica do PU na mistura que apresenta menor resistência térmica.

A análise de viscosidade deste estudo corrobora com os valores de GPC, comprovando o maior valor de viscosidade complexa para o PDLLA que possui massa molar consideravelmente superior à do PU e a mistura PU/PDLLA.

A morfologia dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA foi analisada por MEV-FEG e as micrografias são apresentadas na Figura 12.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

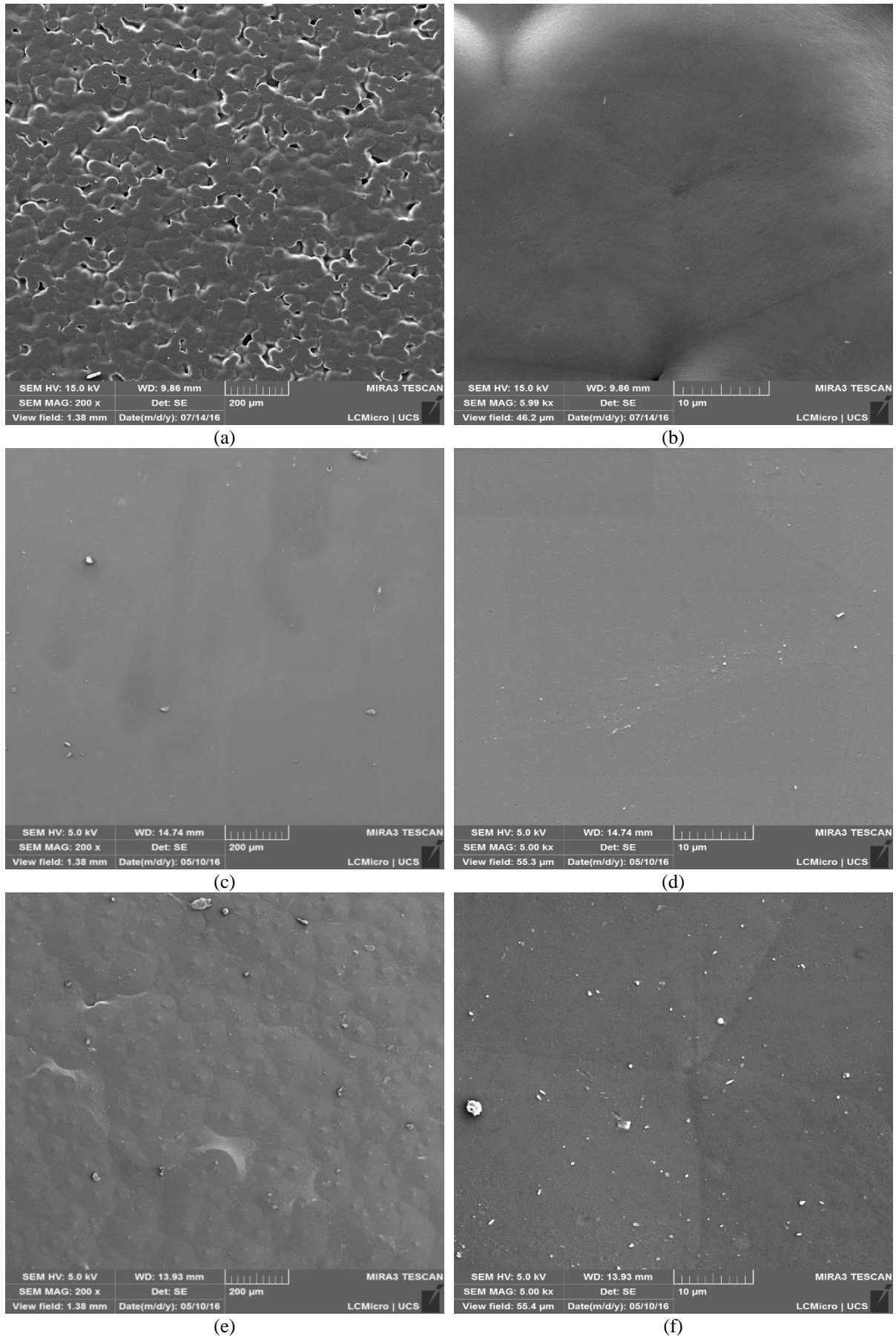


Figura 12. Morfologia no MEV-FEG com magnitude original de 200x e 5000x para os filmes de (a, b) PU, (c, d) PDLLA e (e, f) PU/PDLLA.

Na morfologia dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA (Figura 11) foi possível observar diferentes características na superfície das amostras. Para o PU foi observado uma superfície com regiões circulares, oriundas da geometria dos esferulitos, e o PDLLA apresentou uma superfície lisa com algumas irregularidades. Na mistura PU/PDLLA foi constatada uma morfologia com características intermediárias das amostras puras, com presença de esferulitos característicos do PU, no entanto com forma mais lisa, devido à presença do PDLLA, e alguns pontos brancos que podem ser resíduos do próprio material durante a corte para preparação do filme.

Os esferulitos encontrados na amostra de PU e PU/PDLLA são agregados esféricos de cristais simétricos que crescem radialmente até o choque com outros esferulitos (CRIST & SCHULTZ, 2016). A Figura 13 apresenta a organização e geometria dos esferulitos da amostra de PU.

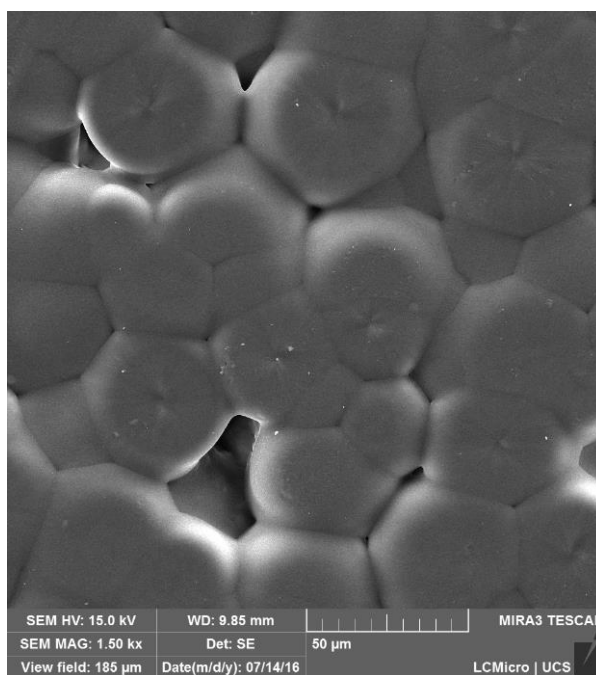


Figura 13. Micrografia no MEV-FEG do filme de PU com magnitude original de 1500x.

Os esferulitos presentes na amostra de PU apresentaram tamanho médio de $42,25 \mu\text{m} \pm 7,3 \mu\text{m}$, enquanto que na mistura PU/PDLLA o tamanho dos esferulitos foi de $99,96 \mu\text{m} \pm 20,3 \mu\text{m}$. Saralegi et al. (2012) observaram esferulitos em amostras de PU com polióis de diferentes massas molares e concluíram que os esferulitos eram formados principalmente por cadeias de segmento flexível e variavam de tamanho em relação a massa molar do polioliol e razão NCO/OH. Pizzato et al. (2009) também observaram esferulitos em micrografias de amostras de TPU.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No espectro de FTIR do PU, PDLLA e PU/PDLLA (Figura 14) foi possível observar as frequências vibracionais características para cada material e suas atribuições são apresentadas na Tabela 3.

A presença de bandas de absorção típicas do PU foi observada em 3322 cm^{-1} associada ao estiramento N–H do grupo uretano; $2936 - 2865\text{ cm}^{-1}$ estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 ; 1724 cm^{-1} estiramento da carbonila (C=O) do grupo uretano e éster do polioliol referente a formação da ligação uretano (grupo $-\text{NHCOO}-$); 1524 cm^{-1} estiramento do grupo CN (MI et al., 2013; JING et al., 2014).

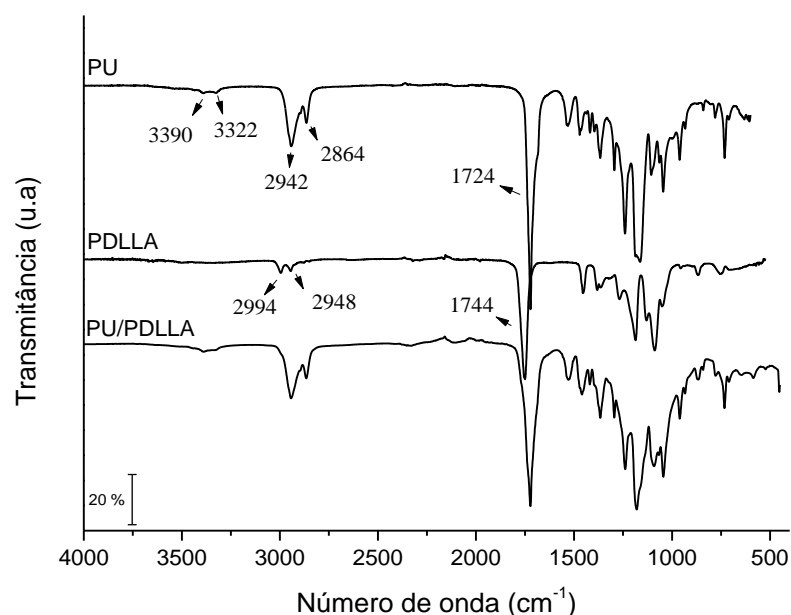


Figura 14. Espectro no FTIR dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA.

Tabela 3. Frequência vibracional e atribuição no FTIR do PU e PDLLA (MI et al., 2013; PEREIRA et al., 2014).

Polímero	Frequência vibracional (cm^{-1})	Atribuição
PU	3388 - 3322	ν_{NH}
	2936 - 2865	ν_{CH_2}
	1724	$\nu_{\text{C=O}}$
	1524	ν_{CN}
PDLLA	3000 – 2943	$\nu_{\text{C-H}}$
	1744	$\nu_{\text{C=O}}$
	1458	δ_{CH_3}
	1382	δ_{CH_3}
	1261	$\nu_{\text{CO-O}}$

Nota: ν = estiramento; δ = deformação

A caracterização da estrutura química comprovou a obtenção do PU, visto que as bandas estão de acordo com a literatura para o polímero e houve a conversão completa dos grupos

isocianato em uretano, caracterizado pela ausência de uma banda na região de $2270 - 2250 \text{ cm}^{-1}$ (BARRIONI et al., 2015), confirmando que o tempo de reação (2 h) e tempo de cura em estufa (24 h) adotados neste estudo foram suficientes.

O espectro no FTIR do PDLLA apresentou as bandas características do material que estão situadas na região de $2995 - 2945 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento do grupo C-H; em 1744 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C=O; 1458 cm^{-1} relacionada à deformação assimétrica do grupo CH_3 ; 1382 cm^{-1} deformação simétrica do grupo CH_3 e em 1261 cm^{-1} está relacionado ao estiramento do grupo éster $-\text{CO}-\text{O}$ (PEREIRA et al., 2014). A ausência de uma banda de absorção na região de $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, que está relacionada ao estiramento do grupo OH, indica a inexistência de subprodutos da hidrólise do PLA (DRUMOND, WANG & MOTHE, 2004).

O espectro da amostra PU/PDLLA apresentou todas as bandas características do PU e do PDLLA, sem evidências de novas bandas. O mesmo comportamento foi verificado por Mi et al. (2013) e Jing et al. (2014) em estudos com TPU/PLA.

Nas curvas TG (Figura 15a) e da derivada primeira (DTG) (Figura 15b) foi possível observar os eventos de perda de massa das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA.

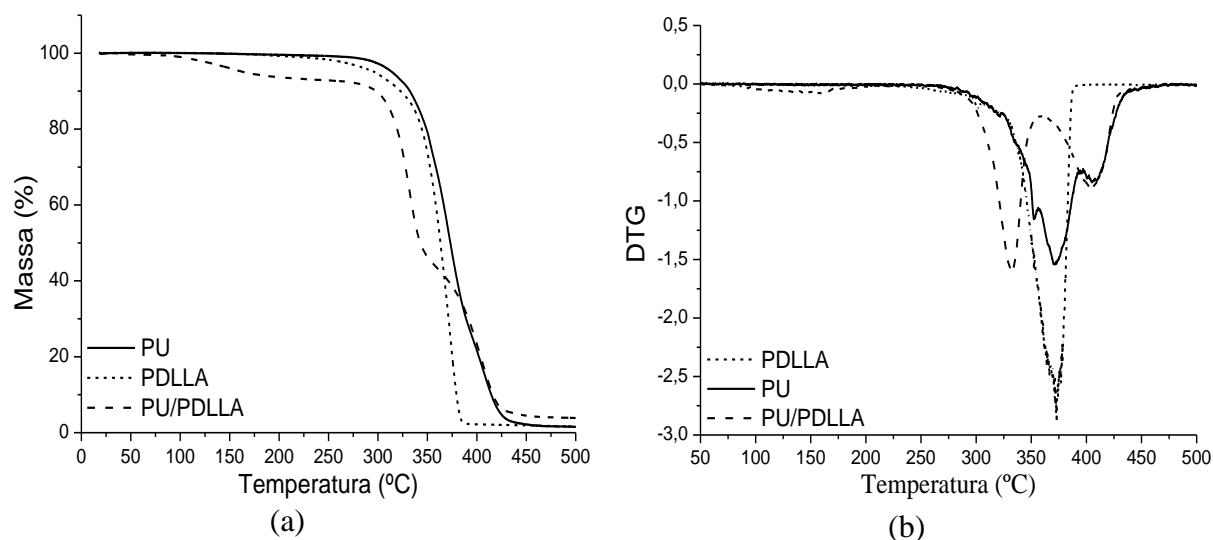


Figura 15. (a) Curva TG das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA e (b) DTG das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA

O PU apresentou três eventos de perda de massa com temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$) para cada um dos eventos de $353,1^\circ\text{C}$, $371,4^\circ\text{C}$ e $405,1^\circ\text{C}$, respectivamente. A avaliação da degradação térmica para poliuretanos é complexa devido à possibilidade de utilizar diferentes reagentes na síntese para gerar uma variedade de produtos. A decomposição do grupo uretano

inicia em torno de 250°C e apresenta um perfil bimodal, sendo o primeiro evento de perda de massa relacionado aos segmentos rígidos que são caracterizados por possuírem baixa energia de ligação. Quando a taxa de aquecimento é baixa, podem ser observados vários picos na curva de DTG, o que também indica a complexidade da degradação (CHANG et al., 1995; COUTINHO & DELPECH, 2000).

O primeiro evento de perda de massa do PU, representado pela curva TG e DTG, apresenta $T_{m\acute{a}x}$ de 353,1°C (T_{onset} de 336°C e T_{endset} de 359,1°C) que corresponde a 29,9% de perda de massa. A maior perda de massa (43,1%) ocorre em 371,4°C (T_{onset} de 364,4°C e T_{endset} de 383,8°C) e em 405,1°C (T_{onset} 393,3°C e T_{endset} de 421,7°C) com perda de massa de 26%.

Quando submetido a uma excitação térmica, as ligações covalentes da cadeia do PU podem sofrer vibrações complexas e rotações dentro do seu próprio eixo. Com mais excitação, essas ligações podem romper formando uma variedade de fragmentos ou pequenas moléculas, as quais podem se recombinar ou serem submetidas a uma maior fragmentação. A decomposição térmica de PUs pode acontecer por vias de cisão aleatória de cadeia, cisão de cadeia-final ou reticulação ou a combinação dos mesmos, sendo a cisão aleatória de cadeia e reticulação as rotas predominantes para a decomposição de PU (CHATTOPADHYAY & WEBSTER, 2009).

Para Król (2007) e Barrioni et al. (2015), o primeiro evento de decomposição do PU está relacionado aos segmentos rígidos e os demais eventos decorrentes do segmento flexível, que apresentam maior estabilidade térmica. Segundo Cauich-Rodríguez et al. (2013), os PUs são termicamente degradados por três mecanismos básicos. No primeiro evento de degradação ocorre a dissociação da ligação uretano para formar alcoóis e isocianatos (componentes de partida). No segundo evento, a cisão da ligação uretano com a formação de aminas primárias, dióxido de carbono e olefinas. E por fim, no terceiro evento, rompimento da ligação uretano em amina secundária e dióxido de carbono. Berta et al. (2006), além dos eventos descritos por Cauich-Rodríguez et al., relata que na última etapa de degradação, em elevadas temperaturas, as estruturas mais estáveis podem produzir produtos voláteis.

O PDLLA apresentou um único evento de perda de massa com $T_{m\acute{a}x}$ de 373,2°C, (T_{onset} de 344,4°C e T_{endset} de 381,4°C), representando 97,8% da massa total. O valor de $T_{m\acute{a}x}$ está de acordo com dados da literatura (PAULA, MANO & PEREIRA, 2011).

A amostra PU/PDLLA apresentou três eventos de perda de massa representados por $T_{m\acute{a}x}$ de 136,5°C, 332,2°C e 406,5°C, respectivamente. O primeiro evento em 136,5°C (T_{onset} de 88,1°C e T_{endset} de 160,1°C), que representa 4,6% de perda de massa, pode ser atribuído ao resíduo de solvente utilizado na preparação do filme ou umidade da amostra. O evento em

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

332,2°C (T_{onset} de 315,1°C e de T_{endset} 341,4°C) que representa 47,7% de perda de massa pode estar relacionado ao deslocamento das temperaturas de decomposição do PDLLA (373,2°C) e do PU (353,1°C, 371,4°C) e em 406,5°C (41,1%) referente à decomposição do PU.

A presença de mais de um evento de perda de massa observados na curva de TG e DTG das amostras de PU e PU/PDLLA também pode estar relacionada a massa molar e a polidispersão dos polímeros, apresentados na Tabela 2. Cadeias menores, de menor massa molar se decompõem em temperaturas inferiores, ao passo que cadeias de maior massa molar necessitam de maior temperatura. O IP com valor acima de 2, encontrados na caracterização por GPC das amostras, indica que existem cadeias de diferentes tamanhos na estrutura polimérica, e essas influenciam na decomposição térmica.

As transições térmicas do primeiro e segundo aquecimento e resfriamento por DSC das amostras de PU, PDLLA e PU/PDLLA são apresentadas na Figura 16 e as temperaturas, energia de entalpia de fusão e cristalinidade são apresentadas na Tabela 4.

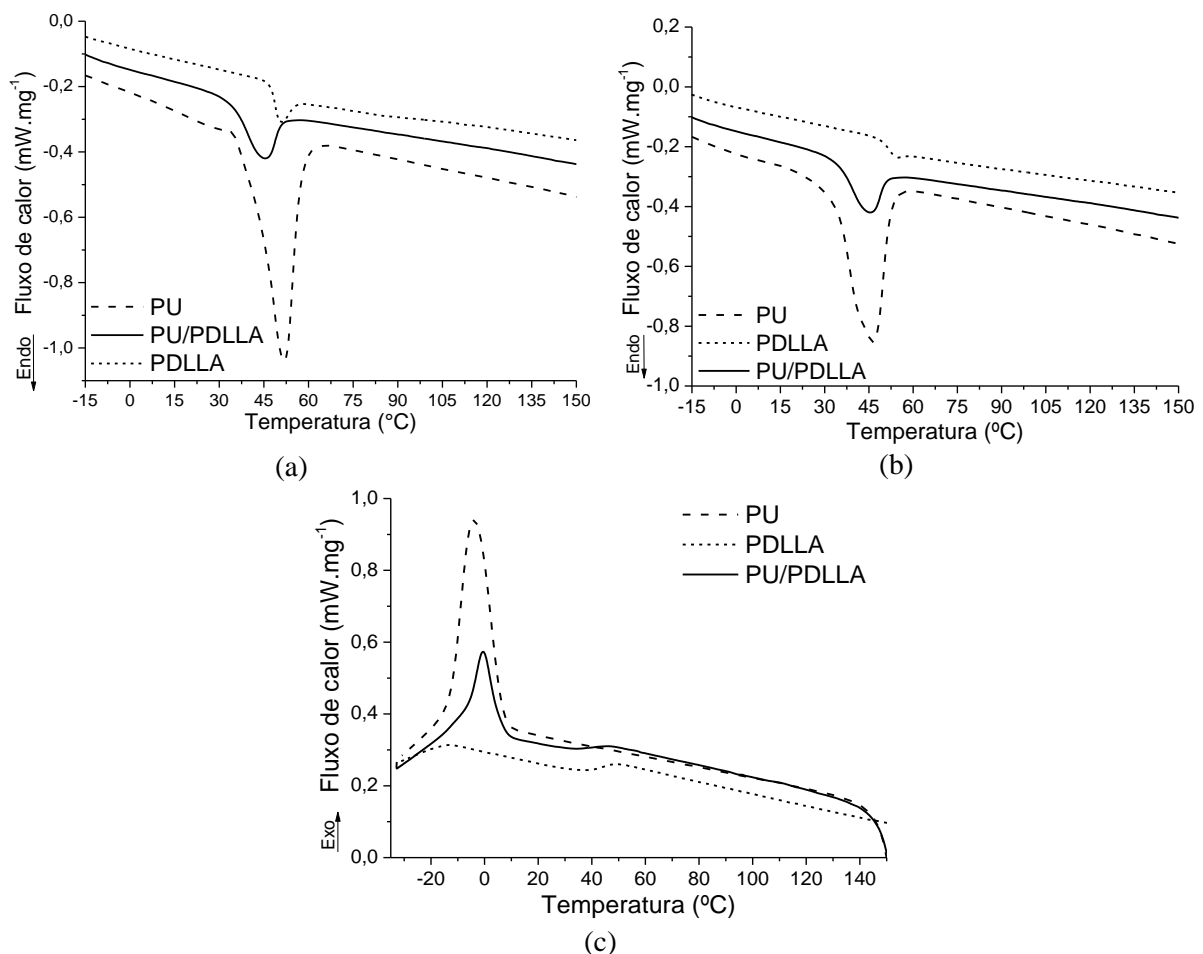


Figura 16. Curva DSC do PU, PDLLA e PU/PDLLA (a) primeiro aquecimento (b) segundo aquecimento (c) resfriamento.

Tabela 4. Temperatura das transições térmicas, entalpia de fusão e cristalinidade do PU, PDLLA e PU/PDLLA.

	1º Aquecimento				2º Aquecimento				Resfriamento
	T _m (°C)	ΔH _m (J·g ⁻¹)	T _g (°C)	X _c (%)	T _m (°C)	ΔH _m (J·g ⁻¹)	T _g (°C)	X _c (%)	T _c (°C)
PU	51,8	46,9	NI	33,6	46,4	43,12	NI	30,9	- 4,1
PDLLA	-	-	49	-	-	-	51,8	-	- 12,8/49,5
PU/PDLLA	44,0	17,1	NI	24,5	45,4	12,9	NI	18,5	- 0,5/45,9

NI = não identificado.

Todas as amostras apresentaram eventos endotérmicos no primeiro e segundo aquecimento na análise de DSC. O PDLLA apresentou apenas T_g, com valor de 49°C para o primeiro aquecimento e 51,8°C no segundo aquecimento, valor próximo ao encontrado por Lejardi et al. (2013).

O PU apresentou, na análise do primeiro aquecimento, um evento de fusão com temperatura (T_m) de 51,8°C e cristalinidade de 33,6%. A T_g, segundo Xu et al. (2015) para PU com PCL/HDI/BDO foi de -58°C, nas análises de DSC realizadas neste trabalho não foi possível verificar o valor da T_g.

A amostra PU/PDLLA apresentou evento de fusão com temperatura de 44°C, valor menor do que o encontrado para o PU e X_c de 24,5%. A T_{endset} do PU/PDLLA é em torno de 51°C, ficando dentro da faixa da T_g do PDLLA, por isso não foram observados dois eventos para a mistura.

Os valores de entalpia de fusão (ΔH_m) para o PU e PU/PDLLA corroboram com o tamanho dos esferulitos visualizados nas micrografias de MEV-FEG da Figura 12a e Figura 12e, respectivamente. A amostra de PU apresentou uma morfologia com maior quantidade de esferulitos de menor tamanho, quando comparado com a amostra de PU/PDLLA, justificando o maior valor de ΔH_m.

Analisando o resfriamento (Figura 16c) é possível observar que o PU e o PDLLA solidificam em temperaturas diferentes a partir do estado fundido. O PU apresentou um único evento exotérmico no resfriamento, com temperatura de - 4,1°C, enquanto que o PDLLA apresentou dois eventos no resfriamento, com temperaturas de 49,5°C e - 12,8°C, ambos os eventos do PDLLA se mostraram pouco expressivos quando comparado ao PU, devido a característica amorfa do PDLLA.

A amostra PU/PDLLA apresentou dois eventos exotérmicos com temperaturas de 45,9°C e -0,5°C. A temperatura de - 0,5°C está relacionada a cristalização do PU e a de 45,9°C, a solidificação do PDLLA.

Jing et al. (2015) estudaram misturas de TPU/PLA e também observaram eventos característicos dos dois polímeros no resfriamento por DSC. O mesmo foi observado por Mi et al. (2013) que, além disso, concluíram que o PLA semicristalino favorecia a cristalização do TPU, com picos de maior energia quando a proporção de PLA aumentava.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POROSOS DE PU, PDLLA E PU/PDLLA

A arquitetura da estrutura dos poros por CO₂ supercrítico pode ser controlada a partir da seleção apropriada das condições de processamento, especialmente a pressão de saturação, temperatura de formação de espuma e tempo de despressurização.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros de processo testados para a produção dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp. Em alguns testes, foi adotada uma única temperatura e pressão durante todo tempo de saturação de CO₂, enquanto que em outros testes, a temperatura foi reduzida depois de 60 minutos de saturação e, conseqüentemente, a pressão diminuiu.

Tabela 5. Parâmetros de processo no extrator supercrítico para as amostras de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp.

Amostra	Temperatura (°C)	Pressão (psi)	Tempo de saturação (min)	Tempo de despressurização (s)
PUsp	40	1780	165	3600
	40	1320	180	600
	40	1320	180	180
	40	2300	120	255
	50/30	2800/1670	60/105	145
	50/35	2800/1800	60/120	145
PDLLAsp	35	1700	120	3000
	40	2800	120	180
	45	2800	120	840
	50	3200	120	1140
	50/40	2800/2580	60/60	145
	50/35	2800/1800	60/120	145
PU/PDLLAsp	50/30	2800/1670	60/120	145
	50/30	2800/1670	60/120	255
	50	2800	180	145
	35	2800	180	145
	35	2800	180	255

Salerno et al. (2011) avaliaram a influência do tempo de despressurização na morfologia dos poros de amostras de PCL e observaram que com tempos baixos de despressurização (2 e 15 s) a morfologia apresentou poros uniformes e com diâmetro na faixa de 40 µm, ao passo

que despressurização com 900 s, resultou em tamanho de poros na faixa de 100 a 250 μm . White et al. (2012) verificaram a distribuição de tamanho de poros com diferentes tempos de despressurização para amostras de PDLLA e concluíram que com despressurização de 10 min a distribuição de tamanho de poros foi mais larga e para 60 min a distribuição de tamanho de poros foi homogênea e com maior quantidade de poros conectados.

A utilização de fluido supercrítico é importante quando a viscosidade do polímero é elevada, como é o caso de polímeros com alta massa molar. Viscosidades altas exigem temperaturas elevadas para o processamento, o que pode induzir a processos de degradação térmica e modificações nas propriedades físicas em alguns materiais. Nesses casos, o fluido supercrítico atua como um solvente, reduzindo as interações intermoleculares e aumentando a separação de cadeias (JENKINS et al., 2006).

A Figura 17 apresenta a morfologia da superfície e da seção transversal dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp com parâmetros de processo para o PUsp e o PU/PDLLAsp de 50°C a 2800 psi por 60 min, redução da temperatura para 30°C, pressão de 1670 psi por mais 120 min e despressurização de 145 s. Para o PDLLAsp a temperatura foi de 35°C, pressão de 2800 psi, tempo de saturação de 180 min e despressurização de 255 s.

Os suportes porosos apresentaram poros abertos, distribuídos homogênea em toda extensão da amostra e bastante interconectados, como pode ser visto na seção transversal das micrografias. A boa interconexão é crucial para a utilização como suportes porosos pois permite que as células penetrem no interior dos suportes porosos e favoreçam a biocompatibilidade e o crescimento de tecidos.

O comportamento morfológico do PUsp e do PDLLAsp, em relação a tamanho de poros foi diferente para as condições de processamento adotadas com CO₂ supercrítico. No cálculo de diâmetro de poros calculados a partir das micrografias de MEV-FEG da superfície, o PUsp apresentou uma estrutura com diâmetro de poros com valor médio de 141 $\mu\text{m} \pm 108 \mu\text{m}$, enquanto que o PDLLAsp apresentou tamanho de poros de 52 $\mu\text{m} \pm 32 \mu\text{m}$. A amostra PU/PDLLAsp apresentou uma estrutura heterogênea, com poros pequenos, oriundos do PDLLAsp e poros maiores, característicos do PUsp.

A diferença no tamanho dos poros do PUsp e PDLLAsp pode estar relacionada à solubilidade do CO₂ na estrutura polimérica que é dependente da cadeia molecular e morfologia dos polímeros. Estudos relataram que a solubilidade do CO₂ é menor em polímeros semicristalinos do que em polímeros amorfos devido ao efeito dos cristais que podem restringir a mobilidade da cadeia na fase amorfa, reduzindo o volume de penetração de CO₂ (OLIVEIRA et al., 2006; TAI et al., 2007).

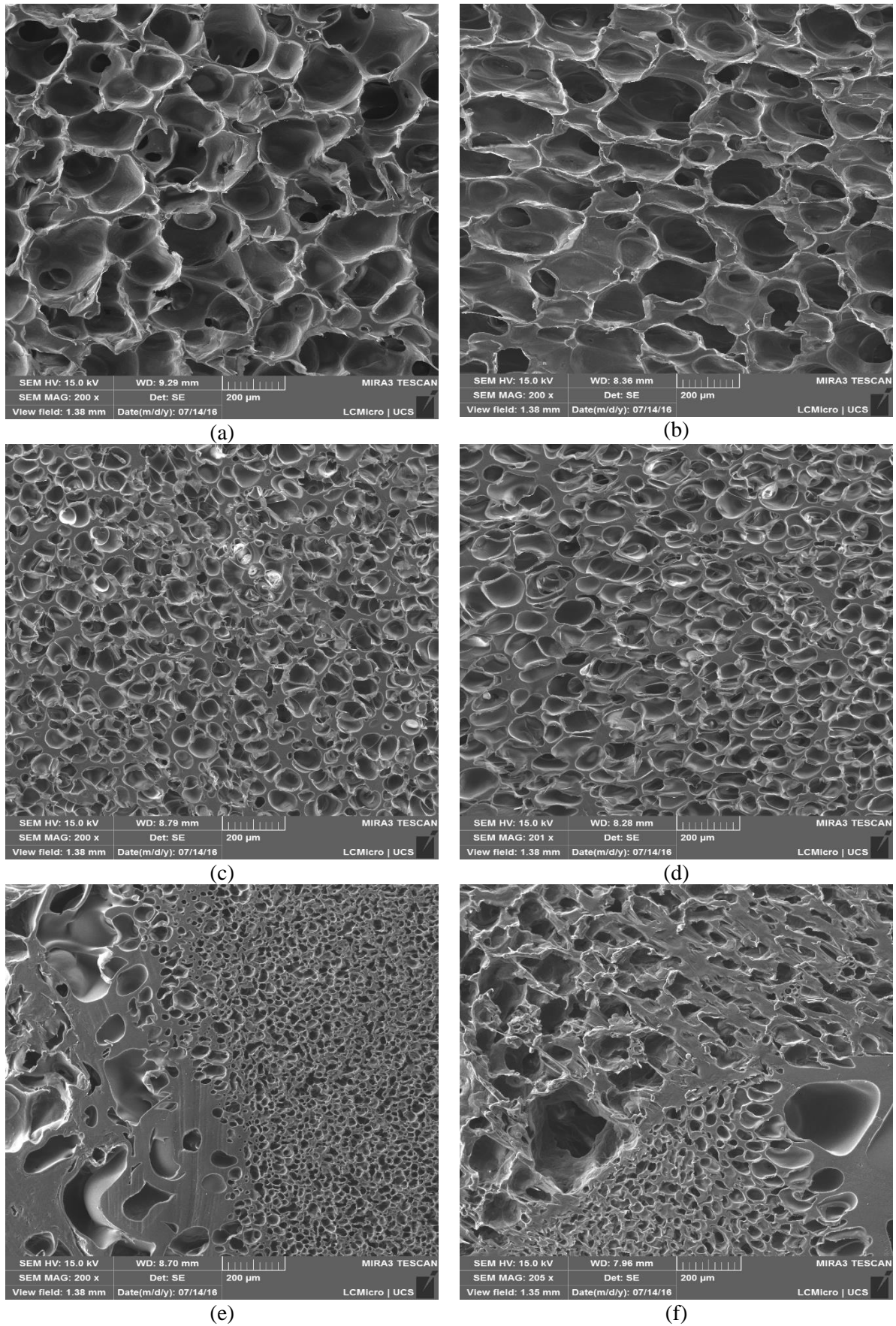


Figura 17. Micrografias no MEV-FEG do suporte poroso de (a) PUsp superfície, (b) PUsp transversal; (c) PDLLAsp superfície; (d) PDLLAsp transversal; (e) PU/PDLLAsp superfície; (f) PU/PDLLAsp transversal com magnitude original de 200x.

As características relacionadas à viscosidade, massa molar e polidispersão também podem influenciar na estrutura dos poros. Polímeros com cadeias longas, de elevada massa molar, dificultam a saída de CO₂, enquanto que em cadeias menores, de baixa massa molar, o CO₂ encontra menos barreiras para sair e essa maior facilidade provoca um rápido crescimento de poros de maior tamanho (TAI et al., 2007).

O PDLLAsp é um polímero amorfo, portanto a solubilidade do CO₂ é favorecida em sua estrutura quando comparado ao PUsp, que é um polímero semicristalino. No entanto, a massa molar do PDLLA é aproximadamente 9 vezes maior que o PU, o que dificulta a liberação de CO₂ no interior da estrutura. Analisando a morfologia e o menor tamanho de poros do PDLLAsp, pôde-se observar que a massa molar, por apresentar maior valor, teve maior influência no tamanho de poros do que a cristalinidade, visto que a cristalinidade do PU é baixa, cerca de 33,6%.

Analisando minuciosamente a amostra PU/PDLLAsp (Figura 18), foi possível observar que a mesma apresentou fases bem distintas, com características de tamanho de poros diferente quando comparado aos polímeros puros.

A Figura 18a apresenta a morfologia do PU e do PDLLA na mistura. O PDLLA apresentou, predominantemente, poros pequenos que tendiam a aumentar de tamanho quando se aproximavam da interface com o PU, com tamanho de poros de $19 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$ (Figura 18c). O PU na mistura apresentou tamanho de poros de $75 \mu\text{m} \pm 57 \mu\text{m}$ (Figura 18b). Quando comparado com as micrografias do PUsp (Figura 17a) e PDLLAsp (Figura 17c) foi possível verificar que o PU e o PDLLA expandiram de forma diferente em relação ao tamanho de poros.

A diferença na morfologia e tamanho de poros da amostra PU/PDLLAsp pode estar relacionada às características térmicas dos materiais quando submetidos ao resfriamento durante a formação da estrutura porosa. Na caracterização por DSC (Figura 16c), dos polímeros puros e da mistura, foi possível observar que as temperaturas de cristalização e solidificação do PU e PDLLA são diferentes. O PDLLA solidifica em 49,5°C, com um segundo evento em -12,8°C, enquanto que o PU cristaliza em -4,1°C. O resfriamento durante o processo para formação de estrutura porosa no extrator supercrítico iniciou em 50°C e decresceu lentamente até 30°C, após, com o início da despressurização, de forma abrupta e devido a elevada pressão, a temperatura diminuiu até cerca de 15°C. Essa variação de temperatura durante o processo de expansão pode ter provocado uma separação de fase na mistura. O PDLLA por iniciar a solidificação em temperatura superior, solidifica antes que o PU e pode promover a separação no estado sólido devido a diferentes movimentos moleculares, decorrentes da massa molar e estrutura dos polímeros, sendo a interface mantida devido a um determinado grau de

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

miscibilidade, como pôde ser visto na análise morfológica dos filmes de PU/PDLLA (Figura 12e, Figura 12f), o qual não apresentou separação de fase. Com o PDLLA em estado sólido, o PU apresenta limitações de mobilidade molecular, prejudicando a formação de cristais, visto na menor entalpia de cristalização da mistura (Tabela 4). Desta forma, pode-se inferir que o PDLLA exerceu influência na cristalização do PU, limitando sua expansão.

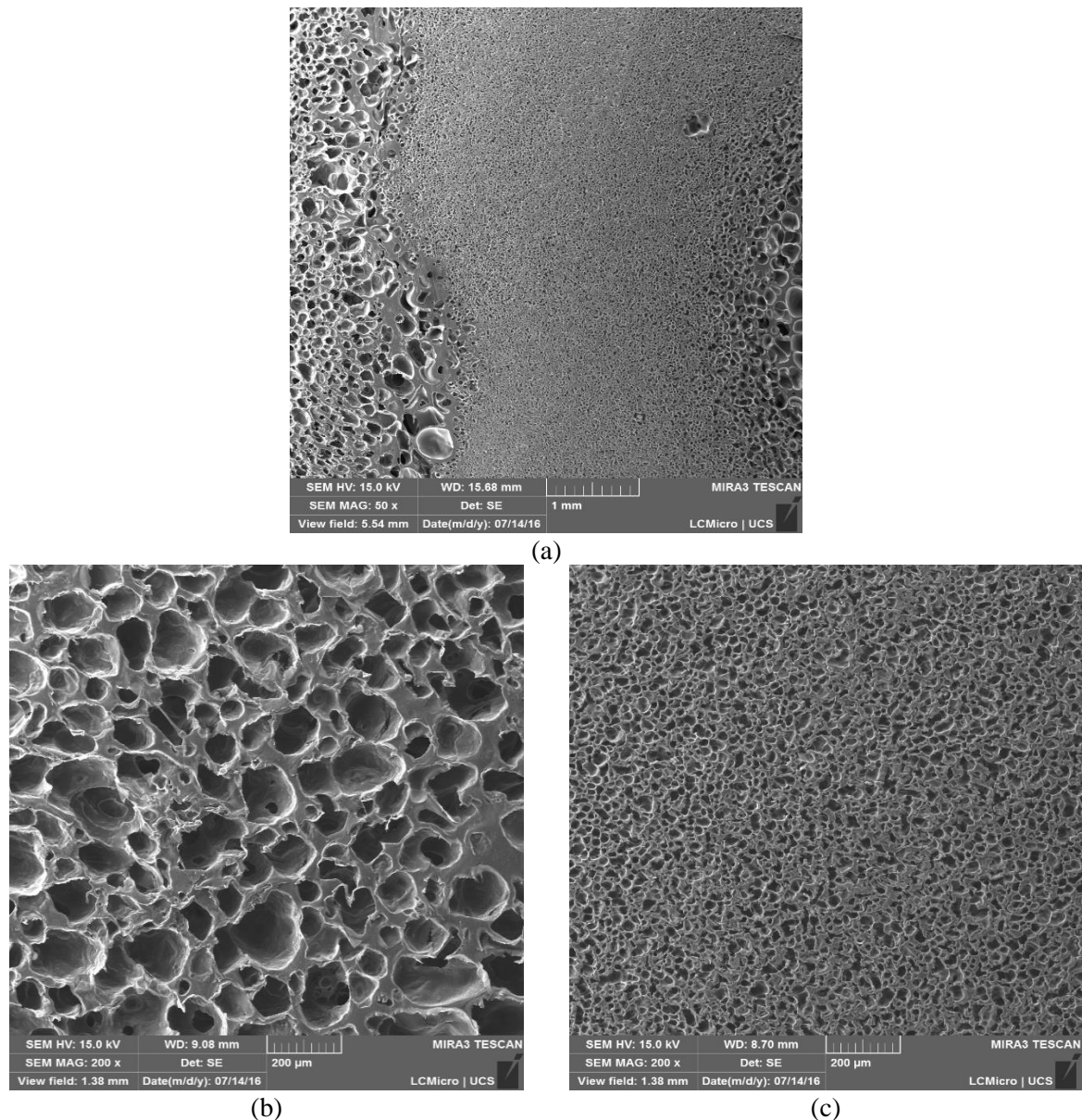


Figura 18. Micrografia no MEV-FEG do (a) PU/PDLLA_{sp} com magnitude original de 50x; (b) PU na mistura PU/PDLLA_{sp} com magnitude original de 200x e (c) PDLLA na mistura PU/PDLLA_{sp} com magnitude original de 200x.

Taki et al. (2004) avaliaram estruturas porosas a partir da mistura de poliestireno/polietilenoglicol (PS/PEG) com fluido supercrítico e observaram diferentes tamanhos de poros para a mistura. Os autores não encontraram uma explicação clara para os

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

resultados, porém, justificaram que a estrutura bimodal pode estar relacionada a solubilidade do CO₂, que reduz a viscosidade dos polímeros e desta forma os poros maiores, oriundas do PEG, consomem CO₂ mais rapidamente e captam o CO₂ dissolvido na fase PS mais rápido. A menor viscosidade conduz para coalescência das bolhas e uma separação de duas fases no PEG e ao passo que a temperatura diminui, a estrutura porosa estabiliza.

Na engenharia de tecidos é necessário que a arquitetura do suporte poroso apresente tamanho de poros precisos e interconectados para permitir a migração celular e transporte de nutrientes (SHARIFI et al., 2016). Essas características foram alcançadas para as amostras de PU_{sp} e PDLLA_{sp}, no entanto, para amostra PU/PDLLA_{sp} na proporção adotada neste estudo (50/50) a arquitetura foi de poros de diferentes tamanhos. Segundo Xu e Huang (2016) estruturas porosas com poros bimodais apresentam maior grau de interligação celular, favorecendo algumas aplicações no campo da biomedicina para engenharia de tecidos.

A caracterização da densidade aparente dos suportes porosos é apresentada na Figura 19.

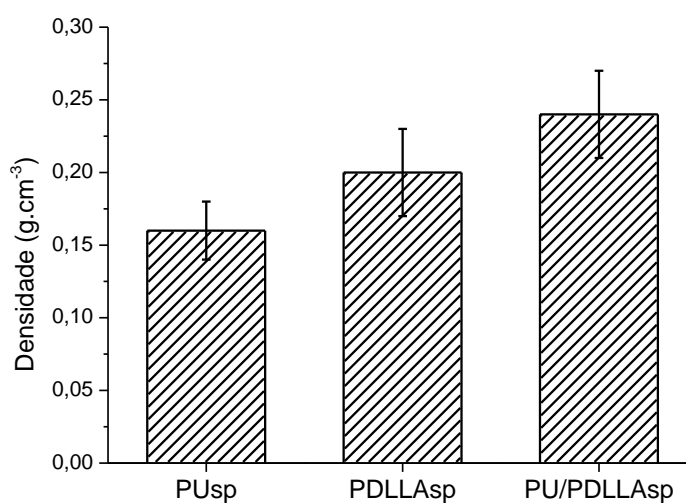


Figura 19. Densidade aparente dos suportes porosos de PU_{sp}, PDLLA_{sp} e PU/PDLLA_{sp}.

A densidade aparente de materiais porosos caracteriza a razão entre o conteúdo sólido e gasoso e tem influência direta nas propriedades físicas, mecânicas, térmica, acústicas e elétricas dos materiais porosos (CARVALHO & FROLLINI, 1999).

Os suportes porosos apresentaram diferentes valores de densidade devido a morfologia e tamanho dos poros, com densidade variando entre 0,16 e 0,24 g·cm⁻³. O valor de densidade aparente foi de 0,16 ± 0,02 g·cm⁻³ para o PU_{sp}, 0,20 ± 0,03 g·cm⁻³ para o PDLLA_{sp} e 0,24 ± 0,03 g·cm⁻³ para PU/PDLLA_{sp}. A menor densidade da amostra PU/PDLLA_{sp} está relacionada ao menor tamanho de poros, observado nas micrografias da Figura 18.

Na avaliação da resistência à compressão dos suportes porosos, pelo método de força controlada, foi possível observar diferentes comportamentos nos suportes porosos (Figura 20).

A curva de tensão *versus* deformação no modo compressão para uma espuma (material poroso) de baixa densidade e células abertas costuma apresentar três regiões distintas: regime elástico linear com deformação entre 0 e 10% causada pela flexão dos poros internos, regime de platô entre 10 e 60%, devido a deformação ou colapso dos poros e um regime de densificação entre 60 e 100%, causado pelo colapso total dos poros ao longo do material (HARLEY et al., 2007; SWEETMAN, MOULTON & WALLACE, 2008).

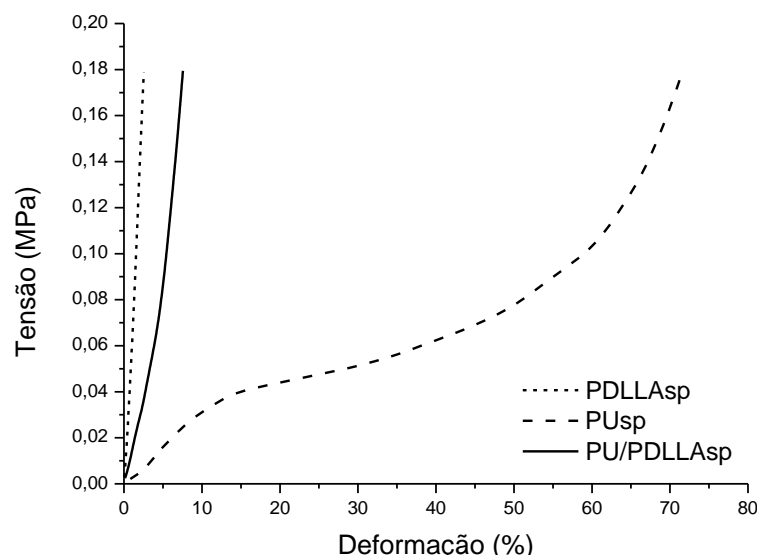


Figura 20. Tensão *versus* deformação no modo compressão por DMA com força controlada a 37°C dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp.

O PUsp apresentou as três regiões citadas anteriormente, com deformação de aproximadamente 10% na região elástica, 50% na região de platô e 70% na densificação. Analisando as três regiões, a densificação foi a que apresentou maior variação de tensão, isso se deve ao fato de que nesta fase o material é praticamente um sólido, devido ao colapso dos poros que expulsam o gás do seu interior fazendo com que o esforço para comprimir a amostra torne-se maior.

O PDLLAsp e PU/PDLLAsp apresentaram apenas comportamento na região elástica com deformação de 2,5% e 7,5%, respectivamente.

O comportamento distinto das amostras de PDLLAsp e PU/PDLLAsp em relação ao PUsp está relacionado a rigidez do material. Segundo dados da literatura, quando se busca por misturas de PU/PLA um dos objetivos é modificar a característica de flexibilidade do PU com

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

a utilização do PLA, devido as suas características de rigidez (FENG & YE, 2010; MI et al., 2013; OLIAEI et al., 2015).

A força de 18 N aplicada durante o ensaio provocou uma grande deformação no PUsp, por ser um material flexível e com propriedades inferiores ao PDLLAsp. Avaliando os resultados de compressão, pode-se inferir que o PDLLAsp e o PU/PDLLAsp são capazes de resistir a maiores tensões do que a aplicada neste estudo sem sofrer grandes deformações, no entanto, não foi possível a realização de testes de compressão com outros equipamentos, que fazem uso de células de carga com maior força, devido à baixa espessura das amostras.

Objetivando a obtenção de suporte poroso para utilização na engenharia de tecidos e conforme já explanado ao longo deste trabalho, avaliou-se a utilização de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp quanto as suas características de citotoxicidade e adesão celular.

A análise de citotoxicidade dos suportes porosos foi realizada pela metodologia de conversão de MTT em cristais de formazan por células viáveis. Este ensaio é amplamente utilizado para medir o potencial citotóxico de drogas em linhagens celulares estabelecidas ou em culturas primárias e secundárias (VAN MERLOO, KASPERS & CLOSS, 2011). A Figura 21 apresenta o resultado de citotoxicidade dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp.

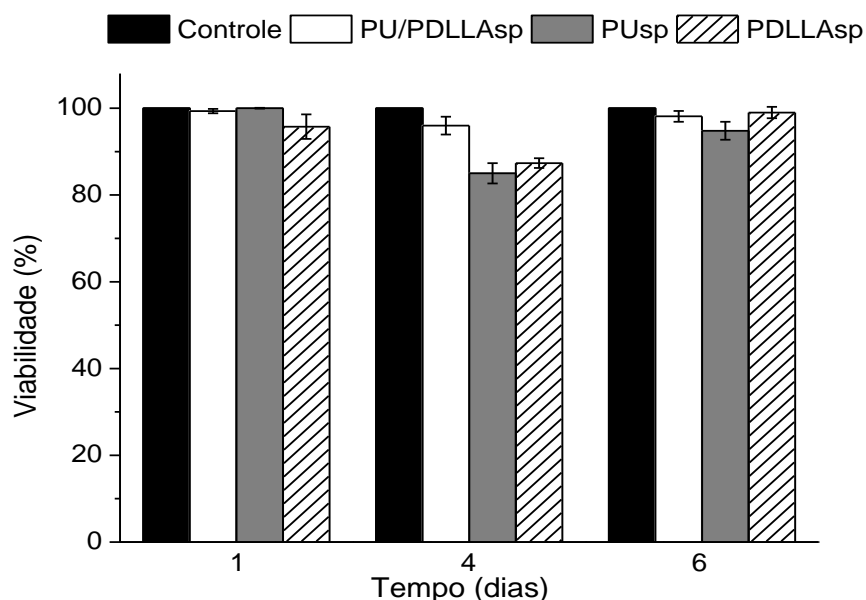


Figura 21. Citotoxicidade dos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp em comparação ao controle negativo (meio DMEM, 10% SFB e 1% P/S) sobre a viabilidade de células L929 tratadas durante 1, 4 e 6 dias, obtido pela realização de ensaio indireto de acordo norma ISO 10993-5-2009-2.

Segundo a ISO 10993-5 (2009), um material desencadeia efeitos citotóxicos quando provoca uma redução da viabilidade celular superior a 30%.

Ao comparar os resultados de viabilidade celular dos suportes porosos (Figura 21) e segundo a classificação da ISO 10993-5 (2009) foi possível observar que as amostras não apresentaram efeito citotóxico para as células L929 nos tempos testados neste estudo. Quando avaliado o tempo de exposição de 4 dias, observou-se uma maior redução da viabilidade celular para os suportes porosos de PUsp (85%) e PDLLAsp (87,3%), no entanto, essa redução não os caracteriza como citotóxicos.

No teste de citotoxicidade realizado com monocultura foi possível observar o tempo de adaptação das células, observado pelo decréscimo de viabilidade celular em 4 dias de exposição, no entanto com reversão do sistema, visto pelo aumento de viabilidade para o tempo de 6 dias de exposição.

Asefnejad et al. (2011) avaliaram a viabilidade celular de suportes porosos de PU com células de fibroblastos L929 com tempos de exposição de 7 e 14 dias. O PU foi produzido com diferentes proporções de NCO/OH e os resultados de viabilidade celular apresentaram valores superiores a 90% para todas as amostras. Os autores relataram que o aumento do grupo isocianato na composição do poliuretano não promoveu efeito tóxico sobre a viabilidade celular.

Pereira et al. (2016) avaliaram a viabilidade celular de suportes nanofibrosos de PLA com células L929 com 24 h de exposição e verificaram que o biomaterial não promoveu efeito tóxico com resultado de viabilidade celular superior a 90%.

Para aplicação dos suportes porosos na engenharia de tecidos, além do mesmo não apresentar efeito citotóxico, as características de superfície, estruturais, químicas e físicas são parâmetros fundamentais que influenciam na boa resposta de adesão e proliferação celular.

Wang et al. (2014) observaram, no estudo com suportes porosos de PLA-PEG, que a porosidade influencia de forma gradual na cultura de células, quanto mais poroso for o material mais eficiente é a adesão celular e a troca de nutrientes entre as células e o meio.

A adesão celular com células L929 nos suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp foi avaliada por microscopia óptica obtida por fluorescência e MEV-FEG.

Por meio da análise das imagens obtidas por fluorescência pela coloração de DAPI (Figura 22), observou-se que as células L929 estavam aderidas aos suportes poroso de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp. O mesmo comportamento foi observado nas micrografias de MEV- FEG (Figura 23).

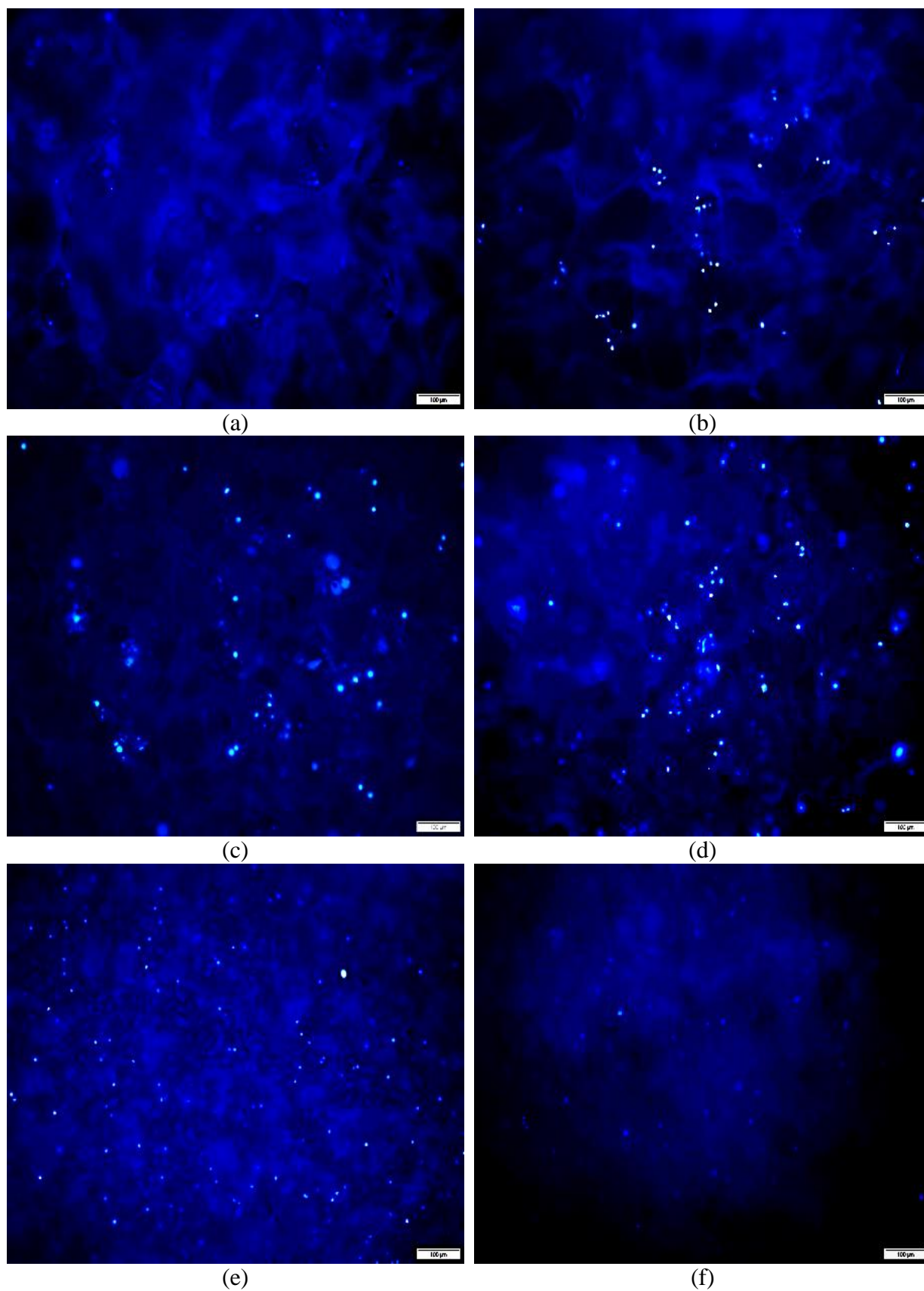


Figura 22. Células L929 em suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp coradas com DAPI e visualizadas em microscópio fluorescência com aumento de 100x; (a) PUsp 1 dia, (b) PUsp 6 dias; (c) PDLLAsp 1 dia; (d) PDLLAsp 6 dias; (e) PU/PDLLAsp 1 dia; (f) PU/PDLLAsp 6 dias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

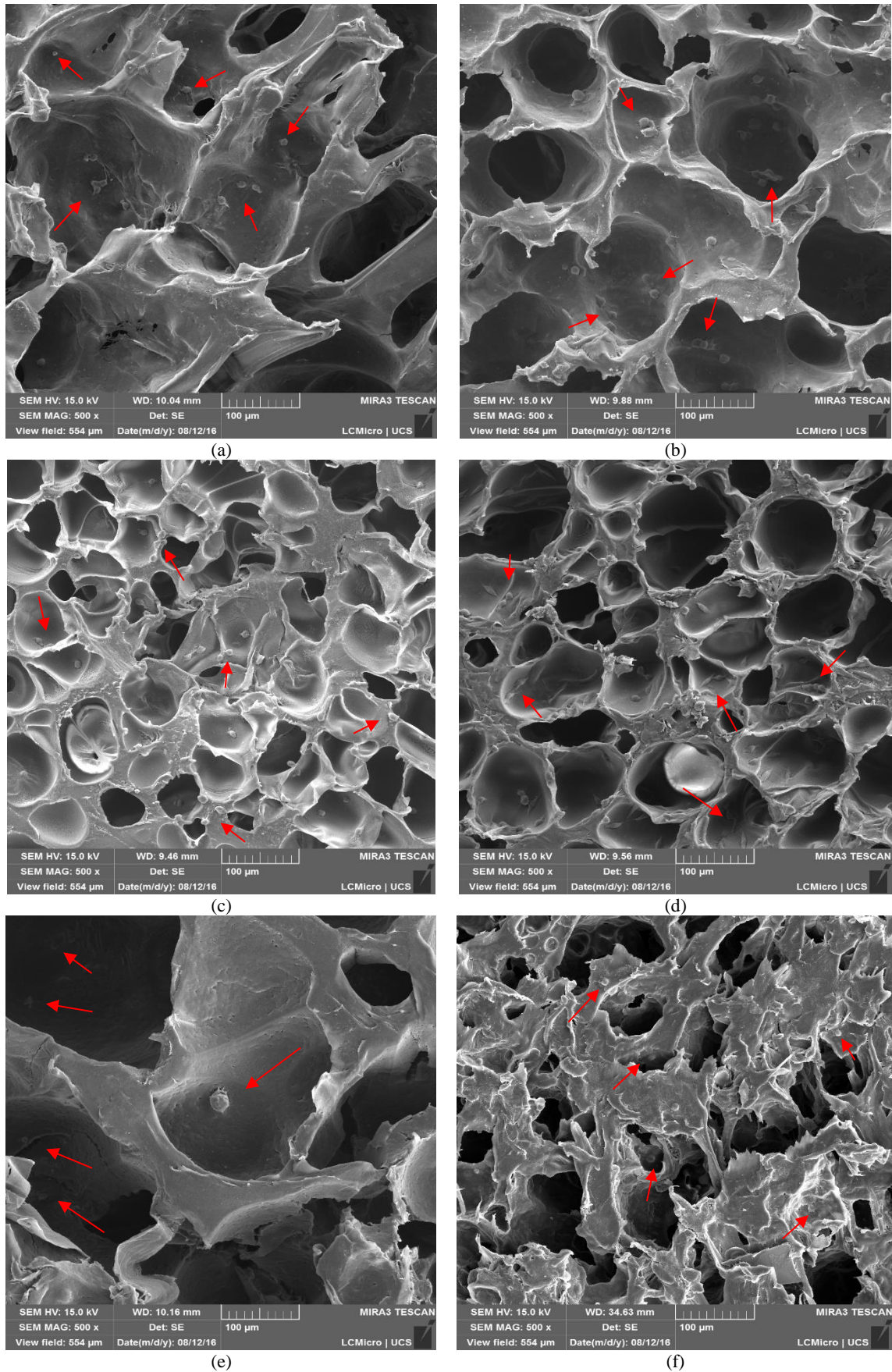


Figura 23. Células L929 em suportes porosos de PUsp, PDLLAsp e PU/PDLLAsp por MEV-FEG com aumento de 500x; (a) PUsp 1 dia; (b) PUsp 6 dias; (c) PDLLAsp 1 dia; (d) PDLLAsp 6 dias; (e) PU/PDLLAsp 1 dia; (f) PU/PDLLAsp 6 dias.

Nas micrografias de MEV-FEG dos suportes porosos com células L929 (Figura 23) foi possível observar que as células estavam aderidas no interior e nas paredes dos poros em todas as amostras. O mesmo comportamento foi observado por Wang et al. (2014) em suportes porosos de PLA-PEG e por Mi et al. (2013) em suportes porosos de TPU/PLA.

A boa adesão das células aos suportes porosos também pode ser verificada a partir da Figura 24, que apresenta o formato em que as células L929 se adaptaram à superfície do suporte poroso, com forma mais alongada quando comparado as amostras com 1 dia de exposição, visualizadas na Figura 23 (a, c, e).

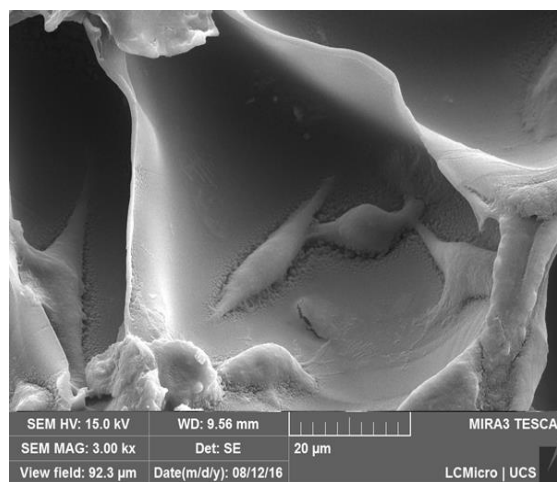


Figura 24. Adesão das células L929 em suporte poroso de PDLLAsp com aumento de 3000x em 6 dias de exposição.

A adesão das células é um processo complexo, afetado por vários fatores, entre eles o comportamento das células, propriedades de superfície do biomaterial e fatores ambientais. Em relação as propriedades de superfície, a rugosidade, hidrofobicidade, tensão superficial, composição química, porosidade e tamanho de poros são fatores cruciais para uma boa resposta das células (BAUER et al., 2013).

Existe uma grande variedade de células utilizadas para regeneração de tecidos e estas demandam diferentes tamanhos de poros para uma boa adesão e crescimento celular. Estudos indicam que poros muito pequenos, na faixa de 5-12 μm e poros muito grandes dificultam a migração celular (BAUER et al., 2013).

Segundo dados da Tabela 1 que relaciona tamanho de poro ideal para formação de diferentes tecidos e crescimento celular e os valores encontrados neste trabalho para os suportes porosos, é possível fazer uma previsão para as possíveis aplicações desses biomateriais. O PUs_p que apresentou tamanho de poro na faixa de $141 \pm 108 \mu\text{m}$ poderia ser utilizado para

regeneração óssea que delimita tamanho de poros ideal na faixa de 100-300 μm ou ainda para regeneração celular (40-200 μm). O PDLLAsp (52 ± 32) poderia ser utilizado para crescimento de fibroblastos de ligação (40-150 μm) e também para regeneração celular. O PU/PDLLAsp que apresentou uma morfologia diferenciada com tamanho de poros variando de $75 \pm 57 \mu\text{m}$ e $19 \pm 12 \mu\text{m}$ teria suas possíveis aplicações para regeneração de pele, por exemplo, em que o tamanho de poro ideal encontra-se na faixa de 20-125 μm e para crescimento de fibroblastos de ligação.

As características da mistura PU/PDLLAsp, assim como relatado em trabalhos de Xu e Huang (2016), pode ser um diferencial para aplicações como suportes porosos por apresentar diferentes tamanhos de poros na mesma amostra, o que possibilita a combinação de boas propriedades mecânicas e baixa densidade.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver suportes porosos a partir de poliuretano, poli(ácido láctico) e poliuretano com poli(ácido láctico) por fluido supercrítico, identificando parâmetros processuais de expansão, bem como as propriedades que permitiram comprovar o desenvolvimento. As principais conclusões deste estudo encontram-se a seguir.

Com relação à influência da policaprolactonadiol (PCL), hexametileno diisocianato (HDI) e butano-1,4-diol (BDO) nas propriedades do PU:

É possível sintetizar poliuretano utilizando PCL, HDI e BDO pelo processo em duas etapas, sem utilização de solvente. Os parâmetros de síntese que apresentam os melhores resultados de polimerização para a aplicação exigida é: tempo de síntese de 2h, temperatura de síntese 60°C, tempo de cura em estufa de 24 h, temperatura de cura em estufa de 60°C e razão NCO/OH de 1,25.

Com relação à influência da incorporação de PDLLA na mistura com PU (50/50):

O filme PU/PDLLA apresenta características dos dois polímeros, sem evidência de separação de fases na análise morfológica. A estrutura química não apresenta a formação de novas bandas no espectro de FTIR e as propriedades térmicas e reológicas para o PU/PDLLA exibem características intermediárias dos polímeros puros.

Com relação aos parâmetros de processo de produção de suportes porosos com fluido supercrítico:

Os parâmetros de processo adotados no extrator supercrítico para expansão dos filmes de PU, PDLLA e PU/PDLLA possibilitam a formação de uma estrutura porosa uniforme, com poros abertos, homogêneos e presentes em toda amostra, sendo os parâmetros de melhores resultados para o PU_{sp} e PU/PDLLA_{sp} (T = 50/30°C; P = 2800/1670 psi; t saturação = 60/120 min; t despressurização = 145 s) e PDLLA_{sp} (T = 35°C; P = 2800 psi; t saturação = 180 min; t despressurização = 255 s).

Com relação às propriedades de interesse do estudo para caracterizar suportes porosos:

Os suportes porosos apresentam morfologia similar no que diz respeito a poros abertos, no entanto, diferenciam no tamanho dos mesmos; o PU_{sp} com tamanho de poros de 141 µm ± 108 µm, PDLLA_{sp} com 52 µm ± 32 µm e PU/PDLLA_{sp} possui uma estrutura bimodal, com poros de 75 µm ± 57 µm oriundos do PU e 19 µm ± 12 µm do PDLLA. A densidade aparente

é maior para a amostra PU/PDLLAsp e a resistência à compressão evidencia a característica de rigidez do PDLLAsp com deformação elástica, o que influencia fortemente na resistência à compressão do PU/PDLLAsp.

Com relação à citotoxicidade e adesão celular dos suportes porosos:

Os suportes porosos não apresentam citotoxicidade com tempos de exposição de 1, 4 e 6 dias para as células L929, no entanto, com 4 dias de exposição as amostras de PUsp e PDLLAsp apresentam redução da viabilidade celular. A adesão celular é evidenciada em todas as amostras indicando que o material utilizado, por não apresentar efeito citotóxico, favorece a adesão das células L929.

Por fim, é possível desenvolver suportes porosos de PU, PDLLA e PU/PDLLA com fluido supercrítico pela técnica de formação de espuma por gás, com dimensões de poros que podem ser alterados para possibilitar diversas aplicações na engenharia de tecidos, tendo em vista que não apresentam citotoxicidade e possibilitam a adesão celular, atendendo, desta forma, ao objetivo geral desta proposta.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. **Polymer**, v. 49, p. 5603-5621, 2008
- AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. São Paulo: Manole, 2007
- ALISHIRI, M.; MSHOJAEI, A.; ABDEKHODAIE, M. J.; YEGANEH, H. Synthesis and characterization of biodegradable acrylated polyurethane based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,6-hexamethylene diisocyanate. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 763-773, 2014.
- AN, X.; MA, H.; LIU, B.; WANG, J. Graphene Oxide Reinforced Polylactic Acid/Polyurethane Antibacterial Composites. **Journal of nanomaterials**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- ASEFNEJAD, A.; KHORASANI, M. T.; BEHNAMGHADER, A.; FARSAZADEH, B.; BONAKDAR, S. Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2375-2384, 2011.
- AURAS, R. A.; HARTE, B.; SELKE, S.; HERNANDEZ, R. Mechanical, physical, and barrier properties of poly(lactide) films. **Journal of plastic film & sheeting**, v. 19, 2003
- BARRIONI, B. R.; DE CARVALHO, S. M.; OREFICE, R. L.; DE OLIVEIRA, A. A. R.; PEREIRA, M. DE M. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, n. 1, p. 22-30, 2015
- BAUER, S.; SCHMUKI, P.; VON DER MARK, K.; PARK, J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, p. 261-326, 2013.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005
- BELGACEM M. N.; GANDINI A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**, Amsterdam: Elsevier, 2008.
- BENHAMOU, K.; KADDAMI, H.; MAGNIN, A.; DUFRESNE, A.; AHMAD, A. Bio-based polyurethane reinforced with cellulose nanofibers: A comprehensive investigation on the effect of interface. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, n. 20, p. 202-211, 2015
- BERTA, M.; LINDSAY, C.; PANS, G.; CAMINO, G. Effect of chemical structure on combustion and thermal behaviour of polyurethane elastomer layered silicate nanocomposites. **Polymer degradation and stability**, v. 91, n. 5, p. 1179-1191, 2006.

REFERÊNCIAS

- BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, 2013
- CARVALHO, G.; FROLLINI, E. Lignina em Espuma Fenólica. **Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, p. 66-75, 1999.
- CAUICH-RODRÍGUES, J. V.; CHAN-CHAN, L. H.; HERNANDEZ-SÁNCHEZ, F.; CERVANTES-UC, J. M. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications: Degradation of polyurethane for cardiovascular applications**, Editors Rosario Pignatello, p. 51-82, 2013
- CHAHAL, S.; HUSSAIN, F. S. J.; KUMAR, A.; RASAD, M. S. B. A.; YUSOFF, M. M. Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility of electrospun hydroxyethyl cellulose/poly (vinyl) alcohol nanofibrous composite biomaterial for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 144, p. 17-29, 2016
- CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, v. 17, p. S467-S479, 2008.
- CHANG, T. C.; CHIU, Y. S.; CHEN, H. B.; HO, S. Y. Degradation of phosphorus-containing polyurethanes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 47, p. 375-381, 1995.
- CHATTOPADHYAY, D. K.; WEBSTER, D. C. Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes. **Progress in polymer science**, v. 34, n. 10, p. 1068-1133, 2009.
- CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3-4, p. 584-671, 2013
- CHERNG, J. Y.; HOU, T. Y.; SHIH, M. B.; TALSMA, H.; HENNINK, W. E. Polyurethane-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, p. 145-162, 2013.
- CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites: Part B**, v. 38, p.291–300, 2007
- CHUNG, H. J.; PARK, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, p. 249-262, 2007
- COSTANTINI, M.; COLOSI, C.; MOZETIC, P.; JAROSZEWICZ, J.; TOSATO, A.; RAINER, A.; TROMBETTA, M.; SWIESZKOWSKI, W.; DENTINI, M.; BARBETTA, A. Correlation between porous texture and cell seeding efficiency of gas foaming and microfluidic foaming scaffolds. **Materials science and engineering: C**, v. 62, p. 668-677, 2016.
- COUTINHO, F. M. B.; DELPECH, M. C. Degradation profile of films cast from aqueous polyurethane dispersions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 70, p. 49-57, 2000.
- COUTINHO, F. M. B.; COSTA, M. P. M.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; SOARES, B. G. Estudo comparativo de diferentes tipos de polibutadieno na tenacificação de poliestireno. **Polímeros**, v. 17, n. 4, 200

REFERÊNCIAS

- CRIST, B.; SCHULTZ, J. M. Polymer spherulites: A critical review. **Progress in Polymer Science**, v. 56, p. 1-63, 2016
- DAI, X.; LIU, Z.; WANG, Y.; YANG, G.; XU, J.; HAN, B. High damping property of microcellular polymer prepared by friendly environmental approach. **Journal of supercritical fluids**, v. 33, p. 259-267, 2005.
- DEMPSEY, D. J.; THIRUCOTE, R. R. Sterilization of medical devices: a review. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 3, p. 454-523, 1989
- DENIZOT, F., LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986
- DOMANSKA, A.; BOCZKOWSKA, A. Biodegradable polyurethanes from crystalline prepolymers. **Polymer Degradations and Stability**, v. 108, p. 175-181, 2014.
- DORATI, R.; COLONNA, C.; TOMASI, C.; GENTA, I.; MODENA, T.; FAUCITANO, A.; BUTTAFAVA, A.; CONTI, B. γ -irradiation of PEGd,IPLA and PEG-PLGA Multiblock Copolymers: II. Effect of Oxygen and EPR Investigation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 1110-1118, 2008
- DRUMOND, W.S.; WANG, S.H.; MOTHÉ, C.G. Síntese e caracterização do copolímero Poli (ácido láctico-B-glicol etilênico). **Revista polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 2, p. 74-79, 2004
- DUFFY, R. E.; BROWN, S. E.; CALDWELL, K. L.; LUBNIEWSKI, A.; ANDERSON, N.; EDELHAUSER, H.; HOLLEY, G.; TESS, A.; DIVAN, H.; HELMY, M.; ARDUINO, M.; JARVIS, W. R. An epidemic of corneal destruction caused by plasma gas sterilization. The toxic cell destruction syndrome investigative team. **Archives of Ophthalmology**, v. 118, p. 1167-1176, 2000
- EL-AMIN, S. F.; LU, H. H.; KHAN, Y.; BUREMS, J.; MITCHELL, J.; TUAN, R. S.; LAURENCIN, C. T. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, n. 1213-1221, 2003
- FENG, F.; YE, L. Morphologies and Mechanical Properties of Polylactide/Thermoplastic Polyurethane Elastomer Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2778-2783, 2011.
- FENG, L.; BIAN, X.; CHEN, Z.; LI, G.; CHEN, X. Mechanical, aging, optical and rheological properties of toughening polylactide by melt blending with poly(ethylene glycol) based copolymers. **Polymer degradation and stability**, v. 98, n. 9, p. 1591-1600, 2013
- FOURNIER, E.; PASSIRANI, C.; MONTERO-MENEI, C. N.; BENOIT, J. P. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, p. 3311-3331, 2003.

FU, C.; LIU, J.; XIA, H.; SHEN, L. Effect of structure on the properties of polyurethanes based on aromatic cardanol-based polyols prepared by thiol-ene coupling. **Progress in Organic Coating**, v. 83, p. 19-25, 2015.

GRZESIAK, J.; MARYCZ, K.; SZAREK, D.; BEDNARZ, P.; LASKA, J. Polyurethane/polylactide-based biomaterials combined with rat olfactory bulb-derived glial cells and adipose-derived mesenchymal stromal cells for neural regenerative medicine applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 163-170, 2015

GUANGHONG, H.; YUE, W. **Some Critical Issues for Injection Molding**. Microcellular Foam Injection Molding Process. InTech: Rijeka, 2012

HARLEY, B. A.; LEUNG, J. H.; SILVA, E. C. C. M.; GIBSON, L. J. Mechanical characterization of collagen–glycosaminoglycan scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 4, p. 463-474, 2007

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. Advanced Series In Ceramics: Volume 1. Singapore: World Scientific Publishing, 1 ed., 1993.

HOFMANN, S.; STOK, K. S.; KOHLER, T.; MEINEL, A. J.; MULLER, R. Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 308-317, 2014

HOLZAPFEL, B. M.; REICHERT, J. C.; SCHANTZ, J. T.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NOTH, U.; JAKOB, F.; RUDERT, M.; GROLL, J.; HUTMACHER, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 581-603, 2013

IDASZEK, J.; KIJENSKA, E.; LOJKOWSKI, M.; SWIESZKOWSKI, W. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. **Applied surface science**, 2016

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **ISO 10993-5**, 2009

JANIK, H.; MARZEC, M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, n. 1, p. 586-591, 2015

JENKINS, M. J.; HARRISON, K. L.; SILVA, M. M. C. G.; WHITAKER, M. J.; SHAKESHEFF, K. M.; HOWDLE, S. M. Characterisation of microcellular foams produced from semi-crystalline PCL using supercritical carbon dioxide. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3145-3151, 2006

JING, X.; MI, H. Y.; SALICK, M. R.; CORDIE, T.; CRONE, W. C.; PENG, X. F.; TURNG, L. S. Morphology, mechanical properties, and shape memory effects of poly(lactic acid)/thermoplastic polyurethane blend scaffolds prepared by thermally induced phase separation. **Journal of cellular plastics**, p. 1-19, 2014

JING, X.; MI, H. Y.; PENG, X. F.; TURNG, L. S. Morphology, mechanical properties, and shape memory effects of poly(lactic acid)/thermoplastic polyurethane blend scaffolds prepared by thermally induced phase separation. **Polymer engineering and science**, 2015

- JOHN, K. R. S. The use of polyurethane materials in the surgery of the spine: a review. **The Spine Journal**, v. 14, p. 3038-3047, 2014.
- JONG, S. L.; ARIAS, E. R.; RIJKERS, D. T. S.; NOSTRUM, C. F. V.; KETTENES-VAN DER BOSCH, J. J.; HENNINK, W. E. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. **Polymer**, v. 42, n. 7, p. 2795-2802, 2001
- KARANDE, T. S.; ONG, J. L.; AGRAWAL, C. M. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 1728-1743, 2004
- KATTI, D. S.; LAKASHMI, S.; LANGER, R.; LAURENCIN, C. T. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. 933-961, 2002
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; DOS REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmics: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in pediatric surgery**, v. 23, p. 112-118, 2014
- KIRAN, E. Supercritical fluids and polymers – The year in review – 2014. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 126-153, 2016
- KLOSS, J. **Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de poli(ϵ -caprolactona)diol**. 231f. Tese (Doutorado em Ciência) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- KRÓL, P. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. **Progress in Polymer Science**, v. 52, p. 915-1015, 2007.
- KUMAR, V.; SUH, N. P. A process for making microcellular thermoplastic parts. **Polymer engineering and science**, v. 30, p. 1323-1329, 1990
- LASPRILLA, A. J. R.; MARTINEZ, G. A. R.; LUNELLI, B. H.; JARDINI, A. L.; MACIEL FILHO, R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012
- LEE, J. T. Y.; CHOW, K. L. SEM Sample Preparation for Cells on 3D Scaffolds by Freeze-Drying and HMDS. **Scanning**, v. 34, p. 12-25, 2012
- LEJARDI, A.; LOPEZ, A. E.; SARASUA, J. R.; SLEYTR, U. B.; TOCA-HERRERA, J. L. Making novel bio-interfaces through bacterial protein recrystallization on biocompatible polylactide derivative films. **The journal of chemical physics**, v. 139, 2013
- LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v. 24, p. 2363-2378, 2003.

- LIAO, X.; ZHANG, H.; HE, T. Preparation of porous biodegradable polymer and its nanocomposites by supercritical co₂ foaming for tissue engineering. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012
- LUNA, C. B. B.; SILVA, D. F. da.; BASÍLIO, S. K. T.; ARAÚJO, E. M.; SILVA, A. L. da.; BEZERRA, A. F. C. Desenvolvimento de blendas poliméricas visando a tenacificação dos polímeros: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 36, n. 1, p. 67-80, 2015
- MARQUES, A. P.; REIS, R. L.; HUNT, J. A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials**, v. 23, n. 6, p. 1471-1478
- MI, H. Y.; SALICK, M. R.; JACQUES, B. R.; CRONE, W. C.; PENG, X. F.; TURNG, L. S. Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 4767-4776, 2013
- MIGLIARESI, C.; MOTTA, A. **Scaffolds for Tissue Engineering: Biological Design, Materials and Fabrication**. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2014.
- MISHRA, A.; SINGH, S. K.; DASH, D.; ASWAL, V. K.; MAITI, B.; MISRA, M.; MAITI, P. Self-assembled aliphatic chain extended polyurethane nanobiohybrids: Emerging hemocompatible biomaterials for sustained drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 2133-2146, 2014.
- MUNARIN, F.; BOZZINI, S.; VISAI, L.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 74-84, 2013
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, 32, p. 762-798, 2007
- NICHOLSON, J. W. **The chemistry of medical and dental materials**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.
- NIGAM, R.; MAHANTA, B. An Overview of Various Biomimetic Scaffolds: Challenges and Applications in Tissue Engineering. **Journal of tissue science and engineering**, v. 5, 2014
- NIU, Y.; CHEN, K. C.; HE, T.; YU, W.; HUANG, S.; XU, K. Scaffolds from block polyurethanes based on poly(3-caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 35, p. 4266-4277, 2014.
- NOFAR, M.; PARK, C. B. Poly (lactic acid) foaming. **Progress in polymer science**, v. 39, p. 1721-1741, 2014
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Materialstoday**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011
- OERTEL, G. **Polyurethane Handbook**. New York: Hanser, 1993

- OKOMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in polymer science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013
- OLIAEI, E.; KAFFASHI, B.; DAVOODI, S. Investigation of structure and mechanical properties of toughened poly(L-lactide)/thermoplastic poly(ester urethane) blends. **Journal of Applied Polymer Science**, 2016
- OLIVEIRA, N. S.; DORGAN, J.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, A.; DARIDON, J. L.; MARRUCHO, I. M. Gas solubility of carbon dioxide in poly(lactic acid) at high pressures. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 44, p. 1010–1019, 2006
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Cultura Médica: Rio de Janeiro, 2006.
- PAUL, D. R.; BARLOW, J. W.; KESKKULA, H. Polymer blends In: Encyclopedia of polymer science and engineering. Wiley: New York, v. 12, p. 399, 1998
- PAUL, D. R.; BUCKNALL, C. B. **Polymer blends – V2 Performance**. John Wiley and Sons: New York, p. 588, 2000
- PAULA, E. L. DE.; MANO, V.; PEREIRA, F. V. Influence of cellulose nanowhiskers on the hydrolytic degradation behavior of poly(D,L-lactide). **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1631-1638, 2011.
- PEREIRA, F. A. S.; SALLES, G. N.; RODRIGUES, B. V. M.; MARCIANO, F. R.; PACHECO-SOARES, C.; LOBO, A. O. Diamond nanoparticles into poly (lactic acid) electrospun fibers: cytocompatible and bioactive scaffolds with enhanced wettability and cell adhesion. **Materials Letters**, 2016.
- PEREIRA, R. D. V.; SALMORIA, G. V.; MOURA, M. O. C. D.; ARAGONES, A.; FREDEL, M. C. Scaffolds of PDLLA/Bioglass 58S Produced via Selective Laser Sintering. **Materials research**, 2014.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957 – 971, 2015
- PIZZATTO, L.; LIZOT, A.; FIORIO, R.; AMORIM, C. L.; MACHADO, G.; GIOVANELA, M.; ZATTERA, A. J.; CRESPO, J. S. Synthesis and characterization of thermoplastic polyurethane/nanoclay composites. **Materials Science and engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 474-478, 2009.
- RAI, R.; TALLAWI, M.; ROETHER, J. A.; DETSCH, R.; BARBANI, N.; ROSELLINI, E.; KASCHTA, J.; SCHUBERT, D. W.; BOCCACCINI, A. R. Sterilization effects on the physical properties and cytotoxicity of poly(glycerol sebacate). **Materials Letters**, v. 105, p. 32-35, 2013
- RAINER, A.; CENTOLA, M.; SPADACCIO, C.; GHERARDI, G.; GENOVESE, J. A.; LICOCIA, S.; TROMBETTA, M. Comparative study of different techniques for the sterilization of poly-L-lactide electrospun microfibers: effectiveness vs. material degradation. **The International journal of artificial organs**, v. 33, 2010

- RAMOT, Y.; ZADA, M. H.; DOMB, A. J.; NYSKA, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016
- RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 3, p. 338-356, 2010
- RATNER B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- REPANAS, A.; ANDRIOPOULOU, S.; GLASMACHER, B. The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 137-146, 2016
- SACCHETIN, P. S. C.; SETTI, R. F.; ROSA, P. D. T. V.; MORAES, A. M. Properties of PLA/PCL particles as vehicles for oral delivery of the androgen hormone 17 α -methyltestosterone. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 870-881, 2016
- SAEID, M. H.; SAMPA, M. H. O.; CHMIELEWSKI, A. G. Radiation treatment for sterilization of packaging materials. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1535-1541, 2007
- SALERNO, A.; FANOVICH, M. A.; PASCUAL, C. D. The effect of ethyl-lactate and ethyl-acetate plasticizers on PCL and PCL-HA composites foamed with supercritical CO₂. **The journal of supercritical fluids**, v. p5, p. 394-406, 2014
- SALERNO, A.; MAIO, E. D.; IANNACE, S.; NETTI, P. A. Solid-state supercritical CO₂ foaming of PCL and PCL-HA nano-composite: Effect of composition, thermal history and foaming process on foam pore structure. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 158-167, 2011
- SALERNO, A.; PASCUAL, C. D. Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 826-838, 2015
- SANTAMA, B. P.; NEDEL, F.; FERRÚA, C. P.; SILVA, R. M.; DA SILVA, A. F.; DEMARCO, F. F.; CARRENO, N. L. V. Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, p. 553-561, 2015
- SARALEGI, A.; RUEDA, L.; FERNÁNDEZ-d'ARLAS, B.; MONDRAGON, I.; ECEIZA, A.; CORCUERA, M. A. Thermoplastic polyurethanes from renewable resources: effect of soft segment chemical structure and molecular weight on morphology and final properties. **Polymer International**, v. 62, n. 1, p. 106-115, 2012.
- SARKAR, D.; LOPINA, S. T. Oxidative and enzymatic degradation of L-tyrosine based polyurethanes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, p. 1994-2004, 2007.

- SAUCEAU, M.; FAGES, J.; COMMON, A.; NIKITINE, C.; RODIER, E. New challenges in polymer foaming: A review of extrusion processes assisted by supercritical carbon dioxide. **Progress in polymer science**, v. 36, p. 749-766, 2011
- SAVARIS, M.; DOS SANTOS, V.; BRANDALISE, R. N. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 661-667, 2016
- SHARIFI, E.; AZAMI, M.; KAJBAFZADEH, A. M.; MOZTARZADEH, F.; MAJIDI, R. F.; SHAMOUSHI, A.; KARIMI, R.; AI, J. Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering. **Materials science and engineering C**, v. 59, p. 533-541, 2016
- SILVA, G. R. DA; CUNHA JR, A. DA S.; COHEN, F. B.; AYRES, E.; OREFICE, R. L. Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 491-499, 2010.
- SIMÕES, M. S.; EINLOFT, S. M. O.; PEZZIN, A. P. T. Degradação in vitro de implante biorreabsorvível em poli(L-lactide) para artrodose de coluna lombar. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 21, n. 4, p. 208-214, 2010.
- SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers s new biomaterials: review. *Progress in Polymer Science*, v. 35, n. 9, p. 1254-1276, 2011
- SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, 2016
- SIVAKUMAR, P. M.; COMETA, S.; ALDERIGHI, M.; PRABHAWATHI, V.; DOBLE, M.; CHIELLINI, F. Chalcone embedded polyurethanes as a biomaterial: Synthesis, characterization and antibacterial adhesion. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 353-360, 2012.
- SONG, J. J.; SRIVASTAVA, I.; KOWALSKI, J.; NAGUIB, N. E. Fabrication and characterization of a foamed polylactic acid (PLA)/thermoplastic polyurethane (TPU) shape memory polymer (SMP) blend for biomedical and clinical applications. **Behavior and Mechanics of Multifunctional Materials and Composites**, 2014
- SWEETMAN, L. J.; MOULTON, S. E.; WALLACE, G. Characterisation of porous freeze dried conducting carbon nanotube–chitosan scaffolds. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, p. 5417-5422, 2008
- TAI, H.; MATHER, M. L.; HOWARD, D.; WANG, W.; WHITE, L. J.; CROWE, J. A.; MORGAN, S. P.; CHANDRA, A.; WILLIAMS, D. J.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M. Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing. **European Cells and Materials**, v. 14, p. 64-77, 2007
- TAKI, K.; NITTA, K.; KIHARA, S. I.; OHSHIMA, M. CO₂ foaming of poly(ethylene glycol)/polystyrene blends: relationship of the blend morphology, CO₂ mass transfer, and cellular structure. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, p. 1899-1906, 2005

REFERÊNCIAS

- TENASE, C. E.; SPIRIDON, L. PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 242-247, 2014
- THAVORNYUTIKARN, B.; CHANTARAPANICH, N.; SITTHISERIPRATIP, K.; THOUAS, G. A.; CHEN, Q.; Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. **Progress in Biomaterials**, v. 3, n. 2-4, p. 61-102, 2014
- TSIVINTZELIS, I.; SANXARIDOU, G.; PAVLIDOU, E.; MPANAYIOTOU, C. Foaming of polymers with supercritical fluids: A thermodynamic investigation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, P. 240-250, 2016
- TURCHETTE, R.; FELISBERTI, M. I. Avaliação da influência da massa molar e da composição de poli(epicloridrina-co-óxido de etilo) sobre a miscibilidade de suas blendas com o poli(metacrilato de metila. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 14, 2000, São Pedro. **Anais...** São Pedro, 2000.
- UTRAKI, L. A. **Polymer alloys and blends – Thermodynamics and Rheology**. Hanser Publishers: New York, 1990.
- UZUN, N.; MARTINS, T. D.; TEIXEIRA, G. M.; CUNHA, N. L.; OLIVEIRA, R. B.; NASSAR, E. J.; SANTOS R. A. DOS. Poly(L-lactic acid) membranes: absence of genotoxic hazard and potential for drug delivery. **Toxicology letters**, v. 232, p. 513-518, 2015
- VAN MERLOO, J. V.; KASPERS, G. J. L.; CLOSS, J. Cell sensitivity assay: The MTT assay. **Methods in molecular biology**, v. 731, p. 237-245, 2011
- VIEZZER, C.; CARVALHO, N. A. de.; JAHNO, V. D.; MACHADO, D. C.; EINLOFT, S. M. O.; DULLIUS, J. E. L.; LIGABUE, R. A. Síntese e caracterização de poliuretanos para uso como biomaterial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2009.
- WANG, N.; ZANG, Y.; REN, G.; WU, Q. Fabrication and properties of porous scaffolds of pla-peg biocomposite for bone tissue engineering. **Materials Science Forum**, v. 789, p. 130-135, 2014
- WANG, K.; PANG, Y.; WU, F.; ZHAI, W.; ZHENG, W. Cell nucleation in dominating formation of bimodal cell structure in polypropylene/polystyrene blend foams prepared via continuous extrusion with supercritical CO₂. **The journal of supercritical fluids**, v. 110, p. 65-74, 2016
- WHITE, L. J.; HUTTER, V.; TAI, H.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M. The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering. **Acta Biomaterialis**, v. 8, n. 1, p. 61-71, 2012
- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, p. 2941-2953, 2008
- XU, L. Q.; HUANG, H. X. Formation mechanism and tuning for bi-modal cell structure in polystyrene foams by synergistic effect of temperature rising and depressurization with supercritical CO₂. **The journal of supercritical fluids**, v. 109, p. 177-185, 2016.

XU, C.; HUANG, Y.; WU, J.; TANG, L.; HONG, Y. Triggerable Degradation of Polyurethanes for Tissue Engineering Applications. **ACS Applied Materials & interfaces**, v. 3, 2015

XU, L. C.; RUNT, J.; SIEDLECKI, C. A. Dynamics of hydrated polyurethane biomaterials: Surface microphase restructuring, protein activity and platelet adhesion. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1938-1947, 2010

YAVUZ, C.; OLIAEI, S. N. B.; CETIN, B.; YESIL-CELIKTAS, O. Sterilization of PMMA microfluidic chips by various techniques and investigation of material characteristics. **The journal of supercritical fluids**, v. 107, p. 114-121, 2016

ZAJKO, S.; KLIMANT, I. The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 86-93, 2013.

ZHANG, J.; BURROWS, S.; GLEASON, C.; MATTHEWS, M. A.; DREWS, M. J.; LABERGE, M.; AN, Y. H. Sterilizing Bacillus pumilus spores using supercritical carbon dioxide. **Journal of microbiological methods**, v. 66, p. 479-485, 2006.

ZIA, K. M.; BHATTI, H. N.; BHATTI, I. A. Methods for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: A review. **Reactive and Functional Polymer**, v. 67, n. 8, p. 675-692, 2007.

ZULETA, F. A.; VELASQUEZ, P.; AZA, P. N. de. Effect of various sterilization methods on the bioactivity of laser ablation pseudowollastonite coating. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 94B, n. 2, p. 399-405, 2010