AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Estudo das propriedades biocompatíveis de arcabouços poliméricos derivados de óleos vegetais para aplicação na engenharia de tecidos

Fernando José Costa Baratéla

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientadora:
Profa. Dra. Olga Zazuco Higa**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo das propriedades biocompatíveis de arcabouços poliméricos derivados de
óleos vegetais para aplicação na engenharia de tecidos**

Fernando José Costa Baratéla

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Olga Zazuco Higa**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

à minha companheira, Ana Eduarda, por sua essência ímpar.
à meus pais, pela dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cleuza e Braz, por acreditarem plenamente em meu potencial e ensinarem-me os valores éticos e morais que regem um ser humano justo.

À minha irmã, Daniela, meu cunhado, Emerson, e meu sobrinho, Felipe, por oferecerem suporte e companheirismo em todos os momentos.

À minha mulher, Ana Eduarda, pela dedicação, paciência e companheirismo, tornando-me uma pessoa mais justa e plena.

À minha orientadora, Dra. Olga Zazuco Higa, pela oportunidade, tempo e credibilidade empreendidos em minha formação.

Ao meu coorientador, Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, pelo apoio e orientação imprescindíveis.

À Nadja, amiga e companheira íntegra e singular.

À Dra. Andrea Cecilia Dorión Rodas, por compartilhar seu conhecimento.

À Arlete e à Rute, do Centro de Biotecnologia do IPEN, pela atenção e carinho.

Ao Dr. Daniel Perez e ao João, do Centro de Biotecnologia do IPEN, pelo auxílio singular.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia do IPEN, pelo apoio e assistência.

À Bete e ao Carlos, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN (Irradiador Gama), pela paciência, ajuda e contribuição de importância inestimável.

Ao IPEN, pela oportunidade de crescimento e investimento profissional.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelo apoio financeiro.

Eu não sei como eu posso parecer ao mundo, mas para mim, pareço ser apenas como uma criança brincando na beira do mar, divertindo-me e encontrando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita do que o ordinário, enquanto o grande oceano da verdade permanece todo indescoberto diante de mim.

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração genérica de uma reação para a obtenção de um polímero derivado do ácido oleico destinado ao preparo de arcabouços moleculares.....	30
Figura 2 - Ilustração da montagem do reator de epoxidação/polimerização utilizado nesse trabalho.....	34
Figura 3 - Ilustração da distribuição em uma placa de cultura de 96 poços do branco, dos controles e das diluições do extrato de uma amostra em um teste de citotoxicidade.....	36
Figura 4 - Ilustração da reação de epoxidação do óleo de soja via perácido.....	40
Figura 5 - Espectro FTIR do óleo de soja (OS)(A) e óleo de soja epoxidado (OSE)(B).....	40
Figura 6 - Espectro ^1H -RMN (Bruker, 300 MHz) do óleo de soja (OS) (A) e óleo de soja epoxidado (OSE) (B). O padrão interno foi tetrametilsilano (TMS) e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3).....	41
Figura 7 - Curvas de DSC do OSE (A) e do POSE (B).....	42
Figura 8 - Curvas de TGA do OSE (A) e POSE (B) obtidas em atmosfera de N_2	43
Figura 9 - Dependência do conteúdo de gel dos polímeros POSE em função do conteúdo de HEMA.....	44
Figura 10 - Curva de absorção de água pelo polímero POSE. As medidas foram realizadas à 37°C em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Os conteúdos de HEMA no polímero POSE são: 20% (A), 10% (B) e 5% (C).....	45
Figura 11 - Espectro por difração de raios-X do polímero do óleo de soja epoxidado (POSE) contendo 5% de HEMA como agente reticulante.....	46
Figura 12 - Espectro gerado pelo óleo de soja quando analisado na região do infravermelho.....	47
Figura 13 - Espectro gerado pelo OSE quando analisado na região do infravermelho.....	47
Figura 14 - Gráficos gerados pela análise de OSE (vermelho) e OS (Preto) na região do infravermelho.....	48

Figura 15 – Espectro gerado pelo HEMA quando analisado na região do infravermelho.....	48
Figura 16 – Espectros gerados pela análise de POSE – HEMA 10%, 50 KGy (Preto), POSE – HEMA 10% , 100kGy (Vermelho) POSE – HEMA 35% , 50 kGy (Azul) e POSE – HEMA 35% , 100 kGy (Rosa) na região do infravermelho.....	50
Figura 17 – Gráficos gerados pela análise de OSE (Azul) e POSE-HEMA (Vermelho) e HEMA (Preto) na região do infravermelho.....	52
Figura 18 – Gráfico obtido pela análise via DSC do POSE-HEMA 10%-50kGy....	53
Figura 19 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 50kGy em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A), 15 (B)°C/min.....	54
Figura 20 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 50kGy em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B)°C/min.....	55
Figura 21 – Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 10% à 50kGy.....	57
Figura 22 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B) °C/min.....	58
Figura 23 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B)°C/min.....	59
Figura 24 – Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 10% à 100kGy.....	60
Figura 25 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 50kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B)°C/min.....	61
Figura 26 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-	

HEMA 35% à 50kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B)°C/min.....	62
Figura 27 - Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 35% à 50kGy.....	63
Figura 28 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B)°C/min.....	64
Figura 29 – Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30°C/min (B).....	65
Figura 30 – Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 35% à 100kGy.....	66
Figura 31 – Difração de raios-X gerada por PEOS-HEMA, contendo 10% de HEMA, com 50kGy de irradiação durante a síntese.....	68
Figura 32 – Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 10% de HEMA, com 100kGy de irradiação durante a síntese.....	69
Figura 33 – Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 35% de HEMA, com 50kGy de irradiação durante a síntese.....	70
Figura 34 – Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 35% de HEMA, com 100kGy de irradiação durante a síntese.....	70
Figura 35 – Gráfico do teste de citotoxicidade das amostras de óleo de soja, do óleo de soja epoxidado, do metacrilato de 2-hidroxietila e dos polímeros do óleo de soja epoxidado antes da lavagem dos polímeros para retirada de resíduos tóxicos das etapas de processamento.....	72
Figura 36 – Gráfico do teste de citotoxicidade das amostras de óleo de soja, do óleo de soja epoxidado, do metacrilato de 2-hidroxietila e dos polímeros do óleo de soja epoxidado.....	73
Figura 37 - Microscopia Eletrônica de Varredura: Controle Positivo (vidro); (A) POSE (50kGy); (B) POSE (100kGy); (C) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (E) POSE-HEMA	

(65%:35 – 50kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).....75

Figura 38 - Adesão celular observada por microscopia de fluorescência no aumento de 200x e corante fluorescente alaranjado de acridina: (A) Controle Positivo; (B) POSE (50kGy); (C) POSE (100kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (E) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 50kGy); (G) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).....77

Figura 39 - Adesão celular observada por microscopia de fluorescência no aumento de 200x e corante fluorescente DAPI: (A) Controle Positivo; (B) POSE (50kGy); (C) POSE (100kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (E) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 50kGy); (G) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atribuição de bandas de HEMA, OS e OSE.....	49
Tabela 2 -	Atribuição de bandas para o polímero POSE-HEMA.....	51
Tabela 3 -	Energias de ativação calculadas para o POSE com diferentes concentrações de HEMA e sintetizados frente à diferentes intensidades de radiação.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATCC	American Type Culture Collection
DBS	Donor bovine serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ECM	Membrana extracelular
ET	Engenharia de tecidos
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietila
^1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
ISO	International Organization for Standardization
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazólico
OS	Óleo de soja
OSE	Óleo de soja epoxidado
PBS	Tampão fosfato-salino
PMS	Fenazina metassulfato
POSE	Polímero do óleo de soja epoxidado
POSE-HEMA	Polímero do óleo de soja epoxidado enxertado com metacrilato de 2-hidroxietila
TERM	Tissue engineering and regenerative medicine
TGA	Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa.....	18
1.2	Biocompatibilidade.....	20
1.3	Biomateriais.....	22
1.4	Biopolímeros.....	23
1.5	Polímeros derivados da Oleoquímica (Polímeros Verdes).....	24
1.6	Copolímeros obtidos por enxertia via Radiação Ionizante.....	26
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivos Específicos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Síntese do Óleo de Soja Epoxidado (OSE) - Rota Oleoquímica.....	29
3.2	Síntese dos Polímeros de Óleo de Soja Epoxidado (POSE).....	30
3.2.1	Formulação A (Polímeros com 100% OSE).....	30
3.2.2	Formulação B (Polímeros com 90% OSE/10% HEMA).....	30
3.2.3	Formulação C (Polímeros com 65% OSE/35% HEMA).....	31
3.3	Purificação dos Polímeros.....	31
3.4	Caracterização Físico-Química do Óleo de Soja Epoxidado e dos Polímeros do Óleo de Soja Epoxidado.....	32
3.4.1	Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	32
3.4.2	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹ H-RMN).....	32
3.4.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	32
3.4.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	33
3.4.5	Reação de Polimerização.....	33
3.4.6	Absorção de Água.....	34
3.4.7	Difratometria de Raios-X (DRX).....	35
3.5	Avaliação Biológica dos Arcabouços.....	35
3.5.1	Citotoxicidade.....	35
3.5.2	Hemocompatibilidade.....	36
3.5.2.1	Adesão de Plaquetária.....	37
3.5.2.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
3.5.3	Adesão Celular nos Arcabouços.....	37
3.5.3.1	Cultura Celular.....	37

3.5.3.2	Microscopia Óptica de Fluorescência.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Síntese do Óleo de Soja Epoxidado.....	39
4.2	Caracterização Físico-Química do Óleo de Soja Epoxidado.....	39
4.2.1	Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	39
4.2.2	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹ H-RMN).....	41
4.2.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	42
4.2.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	43
4.2.5	Reação de Polimerização.....	44
4.2.6	Absorção de Água.....	44
4.2.7	Difratometria de Raios-X.....	45
4.3	Caracterização Físico-Química do Polímero do Óleo de Soja Epoxidado.....	46
4.3.1	Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	46
4.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	52
4.3.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	53
4.3.4	Difratometria de Raios-X (DRX).....	67
4.4	Avaliação Biológica dos Arcabouços.....	71
4.4.1	Citotoxicidade.....	71
4.4.2	Hemocompatibilidade.....	74
4.4.2.1	Adesão Plaquetária.....	74
4.4.3	Adesão Celular nos Arcabouços Poliméricos.....	75
5	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
	ANEXOS.....	88

RESUMO

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa possuem como objetivo principal o restabelecimento morfológico/funcional de tecidos e órgãos lesionados com a utilização de células, matrizes celulares e células tronco, controlando as respostas imunológicas/bioquímicas promovidas pelo organismo. Adicionalmente, a ciência dos materiais busca desenvolver biomateriais biocompatíveis que não promovam reações imunológicas indesejadas e proporcionem o reestabelecimento das funções do tecido/órgão. Polímeros de origem natural destacam-se como biomateriais por assemelharem-se a macromoléculas biológicas, similaridade com a matriz extracelular, menor possibilidade de estimulação de inflamação crônica e baixa ou ausência de toxicidade. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver matrizes macromoleculares originadas do óleo de soja epoxidado (OSE), analisando a relação estrutura química/atividade biológica das matrizes macromoleculares para uso como biomaterial na engenharia de tecidos. A síntese do OSE foi efetuada pela rota oleoquímica, cuja eficiência foi determinada por espectroscopia de infravermelho e o rendimento da reação de 85% determinado por ressonância magnética nuclear de prótons. A partir da análise por calorimetria exploratória diferencial, detectou-se uma diminuição da temperatura de transição vítrea do polímero do óleo de soja (POSE) em relação ao OSE, sugerindo aumento do crescimento das cadeias poliméricas do POSE. Através da análise termogravimétrica, foi possível definir o perfil de degradação do OSE, com degradação em duas etapas, e do POSE, que degrada em apenas uma etapa e demonstra maior estabilidade térmica do POSE pelo aumento das interações moleculares. A reticulação e a hidrofiliabilidade do POSE foram promovidas com a adição de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) à formulação por enxertia do monômero pela irradiação gama. Os resultados obtidos identificaram aumento da estabilidade mecânica, da gelificação e da absorção de água com o aumento do conteúdo de HEMA. Por fim, o grau de cristalinidade estimado para esses polímeros enxertados com HEMA de 27,5% foi definido através da difratometria de raios-X. A segunda etapa caracterizou-se pelo (i) desenvolvimento de POSEs com a enxertia de HEMA nas proporções OSE/HEMA 90:10 e 65:35 com irradiação por raios gama nas doses de 50 e 100kGy, (ii) caracterização físico-química dos POSE-HEMA e (iii) análise

biológica desses materiais. Através da espectroscopia de infravermelho, pode-se detectar as regiões epoxidadas do POSE, assim como o sucesso da enxertia do monômero HEMA em todas as concentrações e doses de radiação utilizadas. Através da calorimetria exploratória diferencial, calculou-se a energia de ativação (E_a) dos polímeros. A cristalinidade dos materiais foi definida por difratometria de raios-X, mostrando caráter amorfo do material, bem como um pequeno incremento na porcentagem da cristalinidade com o aumento da intensidade das doses de radiação durante a síntese e um decréscimo dessa cristalinidade com o aumento na concentração de HEMA. A análise da citotoxicidade das amostras mostrou a ausência de toxicidade dos POSE-HEMA, confirmando a eficiência das lavagens dos polímeros para retirada de resíduos do processamento. A análise da hemocompatibilidade mostrou ausência de adesão de plaquetas e os testes de crescimento celular nas matrizes foram positivos. Através dos resultados obtidos nesta pesquisa, pôde-se concluir pelo potencial de utilização dos POSE-HEMA na engenharia de tecidos.

Palavras chave: Engenharia tecidual. Suportes teciduais poliméricos. Polímeros verdes. Oleoquímica. Raios gama.

ABSTRACT

Tissue engineering and regenerative medicine have as main objective the morphologic/functional reestablishment of injured tissues and organs using cells, scaffolds, stem cells and control of immunological/biochemical responses promoted by the body. In addition, materials science seeks to develop biocompatible biomaterials that do not promote unwanted immune responses and provide the re-establishment of the functions of the tissue/organ. Polymers of natural origin stand out as biomaterials to resemble biological macromolecules, similarity to the extracellular matrix, reduced chance of inflammation and chronic toxicity or low or no toxicity. This study aimed the development of macromolecular arrays originated from epoxidized soybean oil (OSE), analyzing the relationship between the chemical structure/biological activity of the macromolecular arrays for use as biomaterials in tissue engineering. The synthesis of OSE was performed through the oleochemical route, whose efficiency was determined by infrared spectroscopy and the reaction yield of 85%, determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. From the analysis by differential scanning calorimetry, it was detected a decrease of the glass transition temperature of the epoxidized soybean oil polymer (POSE) compared with OSE, suggesting an increase of the growth of polymer chains of POSE. Thermogravimetric analysis was performed to define the OSE degradation profile, which degrades in two steps. The POSE degrades in just one step and shows higher thermal stability by the increased molecular interactions. The hydrophilicity and crosslinking of POSE was promoted by the addition of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) with the monomer grafting by gamma irradiation. The results showed an increased mechanical stability, gelation and water absorption with the HEMA content increasing. Finally, the degree of crystallinity for such polymers grafted with HEMA was 27.5%, estimated by X-ray diffractometry. The second stage was characterized by (i) developing POSEs with the grafting of HEMA in the proportions OSE / HEMA 90:10 and 65:35 irradiated by gamma rays at doses of 50 and 100kGy, (ii) physico-chemical characterization of POSE-HEMA and (iii) analysis of biological materials. By infrared spectroscopy, it was detected the epoxidized regions of POSE, as well as the successful grafting of the monomer HEMA concentrations with all radiation doses. By differential scanning calorimetry, the activation energy was calculated

(E_a) of the polymers. The crystallinity of the material was defined by X-ray diffraction, showing tendency of amorphous material as well as a small percentage of the increase in crystallinity with increasing intensity of radiation doses during this synthesis and a decrease in crystallinity with the increasing concentration of HEMA. The analysis of the samples did not show cytotoxicity on POSE-HEMA and confirmed the efficiency of polymer washings to remove the processing waste. The analysis of hemocompatibility showed any platelet adhesion and the cell growth on the scaffolds was positive. From the results obtained in this research, we concluded by the potential use of POSE-HEMA in tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering. Polymer tissue scaffolds. Green polymers. Oleochemical. Gamma rays.

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos (ET), formalmente definida somente no final da década de 80, busca a regeneração de novos tecidos e substituição de tecidos/órgãos através do uso de células, fatores de crescimento e de biomateriais. Há três estratégias principais para tratamento de doenças e injúrias teciduais: (i) a implantação de culturas celulares previamente isoladas e amplificadas *in vitro*, colocadas diretamente na região danificada; (ii) implantação de tecidos desenvolvidos *in vitro* a partir de células cultivadas sobre matrizes, posteriormente implantados no órgão-alvo e (iii) a regeneração tecidual *in situ*, com ou sem o uso de matrizes celulares, promovendo a reparação do tecido pelo próprio organismo. As técnicas e pesquisas podem utilizar células autólogas, alogênicas e/ou xenogênicas e mais atualmente as células tronco, buscando o melhor custo-benefício, determinando as melhores condições e resultados, gerando o mínimo prejuízo ao paciente (Griffith, 2002; Lanza, 2013).

As aplicações da engenharia de tecidos são muito amplas. Áreas bastante difundidas e em expansão são a ciência dos materiais e a engenharia química, buscando principalmente o desenvolvimento de novos biomateriais.

A ciência dos biomateriais é um campo que procura através de métodos terapêuticos e diagnósticos promover a mimetização, substituição e suporte à vida celular. Engloba o campo das ciências básicas, das engenharias e da medicina. Necessita da integração entre as diversas áreas do conhecimento, como a bioinformática, biologia sintética, biologia computacional, nanobiologia, além do trabalho conjunto de seus profissionais para que o sucesso e contínuo progresso possam ser alcançados (Ratner, 2012).

Um dos gargalos enfrentados pela engenharia de tecidos e pela ciência dos materiais está no desenvolvimento de biomateriais adaptados, totalmente biocompatíveis e que devem ser degradáveis após um tempo pré-determinado. Desta forma, biomateriais e matrizes poliméricas deveriam possuir características muito específicas quanto ao seu funcionamento, desempenhando seu papel principal de ser um molde temporário para a adesão, crescimento, migração e diferenciação celular (Rocha, 2014).

1.1 Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa

A engenharia de tecidos (ET) é um campo relativamente novo que procura desenvolver estruturas teciduais e matrizes extracorpóreas de suporte a cultura celular a partir do uso de células vivas, biomateriais, fatores físicos e bioquímicos. As conquistas atuais envolvem a reparação de tecidos ou órgãos danificados a partir daqueles tecidos desenvolvidos. Adicionalmente, à ET incluem outras aplicações como o teste de drogas quanto à eficácia e toxicologia a partir do desenvolvimento e morfogênese celular, o que culminou em vários avanços da biologia celular e molecular e da engenharia de micro e nano sistemas nos últimos 30 anos (Berthiaume, 2011).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar da pesquisa que requer a participação dos princípios de engenharia e das ciências da vida na busca por substitutos biológicos que restaurem, mantenham e/ou melhorem as funções de tecidos/órgãos (Langer, 1993; Vacanti, 1999; Saxena, 2005). Desde esta concepção em 1993, a engenharia de tecidos tem se desenvolvido de forma ímpar, trazendo novos entendimentos sobre os biomateriais. Em contraste com a abordagem clássica de biomateriais, que trata somente da implantação dos biomateriais, a engenharia de tecidos baseia-se também na compreensão da formação e regeneração dos tecidos, objetivando indução de novos tecidos (Petruzzo, 2012). Na ET, as células do indivíduo doador, após processamento, são cultivadas e proliferam-se sobre suportes (matriz, arcabouço, *scaffolds*), de origem natural ou sintética, com as condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento dessas células. Desta forma, as células secretam componentes de matriz extracelular e dá-se início a formação de um tecido vivo que pode ser reinserido no paciente (Rocha, 2014).

De maneira complementar, a Medicina Regenerativa é definida como o processo de substituição ou regeneração de células humanas, tecidos ou órgãos com o objetivo de restauração ou estabilização da função normal (Mason, 2008).

A ET está fundamentada em três estruturas básicas: matrizes, células e fatores de crescimento. Já a Medicina Regenerativa utiliza estratégias como terapias celulares, células-tronco, terapias gênicas, nanomedicina e imunomodulação. A partir das semelhanças de objetivos entre os campos, essas

áreas da ciência foram unificadas e tem sido definidas através da sigla TERM (tissue engineering and regenerative medicine) (Salgado, 2013).

A baixa disponibilidade de tecidos e órgãos disponíveis para transplantes, somado a condições adversas como contaminação do tecido hospedeiro e problemas imunológicos resultaram em severas limitações às técnicas tradicionais de tratamento. Dessa forma, a TERM procura preencher essa lacuna e solucionar parte dessas limitações das técnicas tradicionais (Skalak, 1988; Langer, 1993; Vacant, 1997; Koh, 2004).

Um grande esforço tem sido despendido no desenvolvimento de matrizes artificiais, desde materiais inertes até materiais dinâmicos, que interagem com o organismo, a fim de se promover a recuperação do tecido ou órgão lesado. O foco é permitir ao organismo se apropriar dessas matrizes, reconhecendo-as e as utilizando no processo de recuperação da região lesada. Portanto, a concepção das matrizes artificiais é a de mimetizar a matriz extracelular (ECM), permitindo às células um ambiente propício aos seus desenvolvimentos. É um campo com muitos obstáculos e em permanente desenvolvimento, uma vez que essa mimetização envolve conceitos muito complexos (Zhang, 2009).

No entanto, diversas características devem ser consideradas durante o desenvolvimento de uma matriz. A biocompatibilidade é característica fundamental para o sucesso do biomaterial, porém outras como capacidade de dar suporte e otimização do tecido, devem ser consideradas. As características morfológicas do biomaterial também interferem diretamente nesse sucesso, assim a porosidade, permeabilidade e área disponível devem ser otimizadas a fim de permitirem adesão celular e transporte de gases e nutrientes através da matriz. Outras características de suma importância para o sucesso das matrizes, como permeabilidade de moléculas bioativas, espaço suficiente para reparação celular e condições de biodegradabilidade e bioabsorção, tempo e velocidade de degradação, são de importância única e particular para cada tipo de tecido e/ou aplicação. Outras condições secundárias, mas não menos importantes, são a reprodutibilidade do material, a escala e os fatores econômicos (Lutolf, 2005; Liao, 2006; Zhang, 2009).

Os biomateriais têm sido utilizados desde a antiguidade para a reposição de tecidos ou regiões do corpo danificadas por algum tipo de trauma. Somente no século XX materiais com desempenho, funcionalidade e reprodutibilidade

melhores passaram a ser utilizados. Isso promoveu um amplo desenvolvimento da área, o que possibilitou o desenvolvimento de dispositivos e materiais como lentes de contato, próteses de quadril, *stents*, beneficiando consequentemente milhões de pessoas (Huebsch, 2009; Ratner, 2012).

1.2 Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade tem sido utilizado extensivamente pela ciência dos materiais, mas ainda não há um consenso sobre seu significado, assim como dos mecanismos biocompatíveis. A seleção dos critérios necessários de um biomaterial envolve uma lista de eventos a ser evitada, a maioria desses associados a aspectos como corrosão, degradação, aditivos ou contaminantes relacionados ao biomaterial e suas relações com consequentes respostas biológicas locais ou sistêmicas (Williams, 2008). A relação biocompatibilidade/material está intimamente ligada às profundas diferenças físico-químicas entre os tecidos vivos e os biomateriais. A tradicional ideia de biocompatibilidade restringe-se essencialmente no efeito do material sobre o sistema biológico, porém a questão realmente válida não é se há reações adversas, mas sim a relação entre a resposta obtida e aquilo que é considerado satisfatório para um uso específico, levando-se em consideração as características físicas e químicas do material e a resposta biológica do órgão/tecido em questão (Black, 2006). A seleção e o desenvolvimento de biomateriais devem estar estreitamente ligados às características que definem sua biocompatibilidade, como ausência de toxicidade, não imunogenicidade, ausência de trombogenicidade, não serem carcinogênicos e não estimularem respostas irritantes (Williams, 2008).

O cerne da questão para o entendimento da biocompatibilidade é a determinação e entendimento dos mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos e físicos que tornam o biomaterial operativo em relação às condições específicas de implantação nos tecidos do corpo, assim como a definição das consequências dessa interação (Williams, 2008). Tais consequências podem ser exemplificadas por injúria, inflamação aguda e crônica, desenvolvimento de cápsulas de tecido conjuntivo (fibrose) e destruição do tecido ou órgão

hospedeiro. Nos processos de implante, as respostas iniciam-se pela interação sangue-biomaterial, que desencadeia um processo de adsorção proteica pela superfície do biomaterial e a formação de uma camada de trombo/sangue ao redor de toda a superfície do biomaterial. Essa camada estimula a ativação de processos complexos no organismo como a coagulação sistêmica intrínseca e extrínseca e dos sistemas complemento, fibrinolítico e cinina. Essas sequências de reações pela interação sangue/biomaterial, sua extensão e sua intensidade podem ser controladas pela extensão da injúria dos procedimentos cirúrgicos, pelo órgão ou tecido alvo, pela extensão da camada sangue/biomaterial e pelas características do biomaterial utilizado, que deve mimetizar o ambiente natural, assegurando a migração e aderência de células apropriadas à resposta de reparação tecidual e garantir sua sobrevivência (Anderson, 2008).

A padronização de métodos capazes de assegurar segurança e proteção quanto aos riscos biológicos oferecidos pelo uso dos biomateriais e dispositivos médicos tem sido amplamente discutidos e produzidos nas últimas décadas. Um dos principais grupos regulamentadores neste contexto é a International Organization for Standardization (ISO). Uma das normas vigente e que orienta a avaliação de biomateriais e dispositivos médicos para uso humano, garantindo proteção frente aos potenciais riscos biológicos é a ISO 10993. Essa norma procura orientar o planejamento da avaliação biológica, e consequentemente o desenvolvimento do biomaterial, baseado nos mecanismos de resposta biológica, minimizando o uso de animais nos testes *in vivo*, dando preferência à análises químicas a partir de testes *in vitro* naquelas experimentações cujas características permitem essa substituição, conferindo segurança para uso em seres humanos. A norma não procura prover um rígido sistema de testes, ou resultar garantia de ausência de efeitos não desejáveis, aconselhando dessa forma a possibilidade de avaliações adicionais quando houver necessidade ou a critério dos pesquisadores (ISO 10993 – parte 1).

A ISO 10993 é composta por 20 partes (Anexo A) que descrevem de forma individual as avaliações exigidas de acordo com o grau de interação do biomaterial/dispositivo biológico com o tecido biológico (Anexo B). A parte 1 define os conceitos gerais da norma, a parte 2 orienta quanto ao cuidado com os animais nas avaliações *in vivo*, a parte 12 discute as metodologias de preparação das amostras e o restante das partes discorre sobre técnicas de avaliação e/ou

detecção de características químicas, físicas ou biológicas nos biomateriais e dispositivos médicos.

1.3 Biomateriais

Os biomateriais são inerentes a diversas áreas, pertencendo a um campo multidisciplinar como química, engenharia química, engenharia mecânica, ciência dos materiais, bioengenharia, biologia, medicina e com diversas considerações, como ética, bioética e regulação governamental (Ratner, 2012).

A revolução produzida na década de 70 com a Biologia Molecular e os avanços adquiridos nas décadas de 90 e 2000 com a genômica e a proteômica produziram efeitos decisivos no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais. Até o início dos anos 2000, o sucesso dos implantes, condicionado às respostas biológicas induzidas após o procedimento, eram estocásticos e não planejados. Dessa forma, o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais passou a ser empreendida baseada nos conhecimentos sobre os processos de cicatrização e inflamação e de controle das respostas biológicas (Huebsch, 2009; Ratner, 2012).

Os materiais convencionalmente utilizados na prática clínica são os metais, as cerâmicas e os polímeros. Para os implantes metálicos, diversas ligas são utilizadas, como as de cromo-cobalto, titânio e aço. Devido a sua resistência a tração e impacto, são comumente utilizados em regiões que necessitam de suporte estrutural ou de alta resistência. Possuem algumas desvantagens como menor biocompatibilidade e suscetibilidade à corrosão (Bhat, 2012). São geralmente inertes, porém diversas metodologias de ativação de superfície têm sido empregadas a partir da manipulação física ou química desses materiais. Já as cerâmicas, vidros e vitro cerâmicas, por serem extremamente duras e quebradiças e com alto módulo elástico, são comumente utilizadas na odontologia e na fixação, regeneração e restauração óssea. Normalmente são muito biocompatíveis, resistentes a corrosão e baixa condutibilidade térmica e elétrica, o que lhes conferem bons materiais para uso em implantes. Alguns materiais comumente utilizados são a hidroxiapatita (HA), a alumina (Al_2O_3) e a zircônia (ZrO_2) (BHAT, 2012). Os polímeros possuem ampla aplicação na engenharia de

tecidos e na medicina regenerativa. Características como biocompatibilidade, degradabilidade, resistência ao desgaste, resistência à pressão e toxicidade podem ser manipuladas durante a síntese e o processamento. Podem ser subdivididos em sintéticos (polipropileno, polietileno, poli metil metacrilato) e naturais (alginato, colágeno, ácido hialurônico, óleos vegetais). Os naturais frequentemente mimetizam o ambiente natural celular, além de possuírem substâncias como colágeno, importantes para o desenvolvimento e crescimento celular. Já os materiais sintéticos possuem a vantagem de serem produzidos com estrutura e inserção de substâncias pré-definidos (Vacanti, 1999; Bhat, 2012; Holzapfel, 2013). Ainda podemos citar os compósitos, estruturas resultantes da mistura das três classes acima na tentativa de fundir características benéficas à pesquisa ou ao dispositivo em questão levando-se em consideração os objetivos de uso e os tecidos/órgãos alvos.

Os polímeros são amplamente utilizados na área biomédica e podem ser obtidos a partir de fontes naturais ou sintéticas. Diversos materiais têm sido propostos para a produção de matrizes, mas os polímeros de fontes naturais estão entre aqueles que ofertam as melhores características. Assemelham-se a macromoléculas biológicas, proporcionam maior facilidade de manipulação, boa biodegradabilidade, similaridade com a matriz extracelular (ECM), menor possibilidade de estimulação de inflamação crônica e baixa ou ausência de toxicidade (Mano, 2007). Aqueles de origem sintética possuem a facilidade de manipulação e podem ser produzidos com estrutura e inserção de substâncias pré-definidos. A combinação entre essas duas classes é intensamente utilizada, procurando assim obter uma mescla das melhores características oferecidas por cada classe, potencializando assim a melhora das propriedades mecânicas, de biocompatibilidade, de toxicidade e de estabilidade térmica (Vacanti, 1999; Sionkowska, 2011).

1.4 Biopolímeros

Biopolímeros são aqueles originados de fontes renováveis, como milho, celulose, cana-de-açúcar e soja (ABNT NBR 15448-1). O crescente interesse por essas fontes nos últimos anos pode ser explicado tanto por fatores ambientais

quanto sócioeconômicos, como a facilidade de obtenção de matérias-primas de fontes renováveis à baixos custos, os grandes impactos ambientais gerados pela extração e refino de fontes fósseis para produção de polímeros, aumento e escassez do petróleo e a não biodegradabilidade dos polímeros de origem fóssil. Contudo, diversas limitações no processamento dos biopolímeros de fontes renováveis ainda interferem de forma negativa em seu uso. Porém, essa característica fortalece o interesse de diversos grupos de pesquisa no desenvolvimento de novas técnicas e/ou adaptação daquelas existentes para processamento de biopolímeros. Dessa maneira, a empregabilidade desses polímeros têm permeado diversas aplicações, como blendas, compósitos e nanocompósitos no intuito de melhorar características como resistência térmica, propriedades mecânicas e reológicas, permeabilidade a gases, taxa de degradação e processabilidade (Brito, 2011).

Uma classe bastante específica de biopolímero que tem surgido e atraído o interesse de muitas empresas e pesquisadores nos últimos anos são os polímeros verdes, muitas vezes denominados sustentáveis. Produzem menor impacto ambiental durante sua síntese, processamento e degradação quando comparados aos polímeros convencionais, originados de fontes fósseis, além de não precisarem necessariamente ser biodegradáveis, como ocorre com o polietileno verde (PE verde) e com o policloreto de vinila (PVC verde) (Brito, 2011). Outra característica bastante positiva é a capacidade dessa classe de polímeros em retirar CO_2 da atmosfera, em detrimento aos de origem fóssil, que adicionam CO_2 à atmosfera, além de gerarem produtos poluentes em menores quantidades (Biopolietileno..., 2009).

1.5 Polímeros derivados da Oleoquímica (Polímeros Verdes)

Polímeros são materiais amplamente utilizados como biomaterial. De acordo com a área, algumas características específicas são desejáveis, como estabilidade térmica, flexibilidade, resistência química, adesão a substâncias metálicas, condutibilidade elétrica, biodegradabilidade ou biocompatibilidade. A estrutura do monômero utilizado está diretamente relacionada a essas características, e para casos específicos, essas propriedades são significativas,

como em poliésteres degradáveis, utilizados em suturas cirúrgicas absorvíveis (Güner, 2006).

Com o objetivo de melhorar as propriedades dos produtos finais, óleos triglicerídeos têm sido utilizados para a produção de polímeros. Embora utilizados desde o século 19 para produção de tintas, somente nas últimas décadas tem sido propostos para fins diversos. Poliuretanos obtidos a partir do glicerol originado do biodiesel também representam importantes materiais para o desenvolvimento de dispositivos médicos (Saetae, 2008).

O interesse por biomateriais originados de fontes renováveis como óleos vegetais tem crescido, sendo atualmente uma das mais importantes alternativas para a obtenção de biomateriais (Thompson, 2002; Petrovic, 2008). Os polímeros a base desses óleos possuem muitas vantagens quando comparados a polímeros preparados a partir do petróleo. Estes polímeros oferecem vantagens como baixo custo, disponibilidade e biodegradabilidade (Kim, 2010a).

A metodologia empregada é crucial para o sucesso da polimerização, da estrutura do óleo e do monômero. A presença de ácidos graxos e óleos melhoram as propriedades físicas do polímero, como flexibilidade, adesão e resistência à água. Devido à origem e estrutura natural, os óleos triglicerídeos podem ser amplamente utilizados (Güner, 2006). Kim *et al.* desenvolveram polímeros a partir de óleo de soja que podem ser aplicados como materiais biodegradáveis e biocompatíveis a diversas áreas, como a biomédica (Kim, 2010b). Em bioaplicações, essas características como biocompatibilidade e biodegradabilidade desempenham um papel vital. Fatores como estes tornam os óleos de triglicerídeos matéria-prima essencial para diversas aplicações no futuro (Güner, 2006).

O desenvolvimento de polímeros a partir da rota de síntese derivada da oleoquímica tem atraído o interesse de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, não somente devido às questões relacionadas aos problemas ambientais, mas principalmente pelo fato das macromoléculas sintéticas obtidas apresentarem propriedades físico-químicas diferenciadas das de origem petroquímica. A rota oleoquímica utiliza como matéria-prima os triacilgliceróis, gorduras e óleos, de origem animal e vegetal para a síntese de polímeros. Em particular, os óleos vegetais formados por triglicerídeos de ácidos graxos fornecem uma excelente plataforma para a síntese de arcabouços moleculares

para utilização na engenharia de tecidos biológicos. Arcabouços moleculares obtidos a partir de óleos vegetais apresentam baixa toxicidade, menor quantidade de formação de resíduos durante a fase de processamento, baixo custo de produção e de processamento e biodegradabilidade.

1.6 Copolímeros obtidos por enxertia via Radiação Ionizante

O uso de radiação ionizante como ferramenta para modificação de materiais poliméricos é difundido por sua capacidade de ionização da matéria e produção de reações químicas específicas como polimerização, reticulação, enxerto e degradação, possibilitando a modificação das propriedades físicas e químicas dos materiais. O poder de penetração dessa energia depende da intensidade e comprimento de onda da radiação, bem como do tipo de material com que ela interage. Devido ao seu baixo poder de penetração na matéria, sua aplicação normalmente é limitada a tratamento de superfícies e à modificação de materiais de baixa densidade (McLaughlin, 1989). Apresenta algumas vantagens sobre as metodologias convencionais devido à formação de radicais livres ou reações iônicas sem a necessidade de aquecimento do sistema reacional ou adição de catalisadores (Peppas, 1987).

O cézio-137 e o cobalto-60 são as fontes de raios gama mais comumente utilizadas. O cobalto-60 é produzido em reatores nucleares a partir do cobalto-59 e normalmente é mais usado em aplicações industriais devido a sua maior intensidade energética de suas emissões gama comparado ao cézio, além de possuir menor reatividade química e maior segurança para o armazenamento (Makhlis, 1975; McLaughlin, 1989).

A principal consequência da passagem da radiação gama por um material é a ionização de seus átomos. Uma segunda reação passa a ocorrer a partir da geração de partículas intermediárias ativas, constituídas de moléculas excitadas, íons positivos e negativos e radicais livres. Esse conjunto de espécies químicas asseguram a ativação uniforme do material irradiado e a continuidade das reações (Makhlis, 1975).

As principais reações que ocorrem em materiais poliméricos expostos à radiação ionizante são de degradação e reticulação. Ambos os processos podem

ocorrer concomitantemente, porém a predominância de um sobre o outro está relacionada com a estrutura do polímero (Makhlis, 1975). Os principais efeitos da irradiação de polímeros com radiação ionizante são a formação de produtos gasosos (monóxido e dióxido de carbono, metano), a redução de grupos insaturados e a formação de novas insaturações por desidrogenação (Bovey, 1958; Güven, 1990).

A enxertia de monômeros hidrofílicos sobre superfícies poliméricas por raios gama tem se destacado de outros métodos, pois a extensão e a deposição do enxerto e a composição e o conteúdo de água desses copolímeros podem ser facilmente variados (Ikada, 1994). Dentre as várias aplicações dessa técnica, tem se evidenciado a síntese de copolímeros de enxerto para preparação de membranas trocadoras de íons e polímeros especiais na medicina e biotecnologia (Morrison, 1992).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar matrizes derivadas de óleo de soja para a engenharia de tecidos.

2.1 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização físico-química do Óleo de Soja Epoxidado (OSE);
- Síntese e caracterização físico-química do Polímero do Óleo de Soja Epoxidado (POSE);
- Síntese e caracterização físico-química do Polímero do Óleo de Soja Epoxidado enxertado com metacrilato de 2-hidroxietila (POSE-HEMA);
- Avaliação biológica do óleo de soja epoxidado e das matrizes poliméricas;
- Caracterização do crescimento celular nas matrizes poliméricas por microscopia óptica de fluorescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do Óleo de Soja Epoxidado (OSE) - Rota Oleoquímica

Neste trabalho, foi utilizado o óleo de soja (OS) refinado obtido no comércio local. O OS foi epoxidado utilizando ácido fórmico e peróxido de hidrogênio usando ácido perfórmico gerado *in situ*.

A reação de epoxidação do OS foi efetuada em um reator tribulado. Em um processo típico de epoxidação foi adicionado 50g de OS, seguido da adição de ácido fórmico e peróxido de hidrogênio com o auxílio de uma bomba peristáltica em um intervalo de tempo de aproximadamente duas horas (a razão molar de peróxido de hidrogênio/ácido fórmico/instauração do óleo vegetal foi mantida na proporção 20:2:1). A mistura foi aquecida a 60°C com agitação e refluxo constantes por duas horas. Ao término da reação, o reator foi resfriado até temperatura ambiente (25°C) e a fase orgânica foi lavada com água destilada para remoção do ácido peracético residual até que o pH da solução sobrenadante estivesse compreendido entre 6 e 7. A remoção da água do óleo de soja epoxidado (OSE) foi feita utilizando cerca de 20g de sulfato de sódio anidro por 24 horas seguido de filtração à vácuo.

O arcabouço molecular de óleo de soja epoxidado (POSE) foi obtido a partir da reação de polimerização do ácido (9Z)-octadecenóico epoxidado (ácido oleico epoxidado) em reação catalisada por trietilamina. A reação foi conduzida a 120°C por oito horas em um reator equipado com condensador de refluxo e atmosfera de nitrogênio sob agitação magnética constante durante oito horas. Um esquema exemplificando a reação é ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração genérica de uma reação para a obtenção de um polímero derivado do ácido oleico destinado ao preparo de arcabouços moleculares.

3.2 Síntese dos Polímeros de Óleo de Soja Epoxidado (POSE)

3.2.1 Formulação A (Polímeros com 100% OSE)

Foi adicionado a 200mL de óleo de soja epoxidado (OSE) 1,5% de trietilamina sobre o peso total do OSE e manteve-se sob agitação constante por duas horas à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, cada placa de cultura de 5cm de diâmetro recebeu 3mL da mistura, colocadas em seguida em estufa por seis horas à 60°C . As placas foram acondicionadas em atmosfera de nitrogênio e irradiadas em seguida com raios gama nas doses de 50kGy e 100kGy para promover a reação de polimerização.

3.2.2 Formulação B (Polímeros com 90% OSE/10% HEMA)

Foi adicionado a 180mL de óleo de soja epoxidado (OSE) e 20mL de HEMA em um béquer sob agitação constante à temperatura ambiente (25°C). Adicionou-se em seguida 1,5% de trietilamina sobre o peso total da mistura OSE/HEMA e manteve-se sob agitação constante por duas horas à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, cada placa de cultura de 5cm de diâmetro recebeu 3mL da mistura, colocadas em seguida em estufa por seis horas à 60°C para a ligação covalente do HEMA ao anel epoxídico do óleo vegetal. As placas foram acondicionadas em atmosfera de nitrogênio e irradiadas em seguida com raios

gama nas doses de 50kGy e 100kGy para promover a reação de polimerização.

3.2.3 Formulação C (Polímeros com 65% OSE/35% HEMA)

Foi adicionado a 130mL de óleo de soja epoxidado (OSE) 70mL de HEMA em um béquer sob agitação constante à temperatura ambiente (25°C). Adicionou-se em seguida 1,5% de trietilamina sobre o peso total da mistura OSE/HEMA e manteve-se sob agitação constante por duas horas à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, cada placa de cultura de 5cm de diâmetro recebeu 3mL da mistura, colocadas em seguida em estufa por seis horas à 60°C para a ligação covalente do HEMA ao anel epoxídico do óleo vegetal. As placas foram acondicionadas em atmosfera de nitrogênio e irradiadas em seguida com raios gama nas doses de 50kGy e 100kGy para promover a reação de polimerização.

3.3 Purificação dos Polímeros

Após a reação de polimerização as placas foram lavadas quatro vezes com PBS pH 7,2 (0,358g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 8,182g de NaCl em um litro de água ultra pura) e liofilizadas. Em seguida, foi adicionada água de coco como tampão biológico, até o completo preenchimento das placas e deixou-se por 24 horas. A literatura especializada aponta a água de coco como uma solução natural e estéril, composta de diversas substâncias necessárias para a conservação de células de mamíferos (Gopikrishna, 2008a; Gopikrishna, 2008b; Moura, 2014).

Após 24 horas, o líquido das placas foi desprezado e adicionado novamente água de coco, deixando em repouso *overnight*. O líquido foi desprezado e um novo volume de água de coco foi adicionado às placas de cultura, ficando em repouso por cinco horas. Após esta etapa, mais uma lavagem foi promovida com água de coco, repousando *overnight*. No dia seguinte, a água de coco foi retirada e tampão PBS pH 7,2 contendo albumina a 0,01% foi adicionado as placas. A solução foi deixada por 24 horas, então descartada e as placas novamente liofilizadas. As placas foram acondicionadas e esterilizadas com raios gama à 25kGy.

3.4 Caracterização Físico-Química do Óleo de Soja Epoxidado e dos Polímeros do Óleo de Soja Epoxidado

3.4.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

A espectrofotometria na região do infravermelho para o óleo de soja epoxidado (OSE) e para os polímeros do óleo de soja epoxidado (POSE e POSE-HEMA) foi feita em um espectrofotômetro modelo Spectrum™ 100, da marca Perkin-Elmer. As amostras foram adicionadas diretamente no cristal de ZnSe do aparelho sem a necessidade de preparo prévio da amostra em KBr. A atribuição das bandas de absorção no IR foi efetuado através da utilização do software Spectrum, em um computador acoplado ao espectrofotômetro com resolução de 2cm^{-1} . As análises foram feitas à temperatura ambiente (25°C).

3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN)

As análises de RMN, utilizada para obtenção de informações sobre a estrutura química do óleo de soja (OS) e do óleo de soja epoxidado (OSE), foram conduzidas em um espectrômetro da marca Bruker, modelo Avance 300MHz.

3.4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises por calorimetria exploratória diferencial das amostras de OSE e dos POSE da etapa 1 foram efetuadas em equipamento da Perkin-Elmer, modelo DSC-60, com velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. e uma faixa de temperatura de -100°C a 150°C , utilizando cerca de 10mg de amostra.

As análises dos POSE da etapa 2 foram efetuadas em um termoanalisador Shimadzu DSC-60. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, sob fluxo de 300mL/min. Utilizou-se cerca de 3,0mg das amostras, com faixa de temperatura de -130°C a 130°C . As velocidades de aquecimento e resfriamento foram de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. para eliminar a história térmica do material. Os dados foram tratados com o auxílio do programa Origin® (versão 9) e a interpretação da Tg foi baseada na segunda

corrida.

3.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras de OSE e POSE da etapa 1 foram analisadas em um analisador termogravimétrico da Mettler Toledo, modelo TGSDTA 851, em atmosfera inerte de nitrogênio e vazão de 50mL/min, com taxa de aquecimento de 20°C/min. no intervalo de 30°C a 1000°C e massa de amostra de aproximadamente 10 a 20mg.

Para as análise da série de polímeros da etapa 2 utilizou-se um equipamento Mettler TA 4000 equipado com uma microbalança M3 com capacidade máxima para 150mg e sensibilidade de 1mg e forno TG50 capaz de operar até 1000°C, controlado por um microprocessador TC-11. Utilizou-se a razões de aquecimento de 10°C.min⁻¹, 15°C.min⁻¹, 25°C.min⁻¹ e 30°C.min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio de 150mL.min⁻¹ e cadinho de α -alumina. A temperatura inicial foi de 25°C e a temperatura final foi de 1000°C. As massas utilizadas no experimento situaram-se entre 5-10mg. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa Origin[®] (versão 8.5).

3.4.5 Reação de Polimerização

A reação de polimerização foi efetuada em reator tipo batelada em operação de refluxo a 120°C por oito horas sob agitação constante, seguido de refrigeração à temperatura ambiente (25°C) (FIG. 2). A reação de abertura do anel epóxido do OSE foi catalisado por adição da amina terciária 2-metil imidazol (MI). A reação de gelificação e o peso molecular do polímero de óleo de soja epoxidado (POSE) formado foram controlados através da adição de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) à mistura reacional. A polimerização por abertura do anel epóxido do OSE apresenta as vantagens de ausência de subprodutos durante a reação de polimerização, o que pode contribuir para a biocompatibilidade do polímero obtido. Adicionalmente, o grau de reticulação e as propriedades finais do polímero obtidos podem ser controlados pela estequiometria da reação; ou seja, pela proporção entre o grupo epóxi e o agente reticulante HEMA.

Figura 2 - Ilustração da montagem do reator de epoxidação/polimerização utilizado nesse trabalho.

3.4.6 Absorção de Água

A capacidade de inchamento dos POSE foi medida em solução de PBS (2,38g de Na_2HPO_4 , 0,19g de KH_2PO_4 e 8,00g de NaCl por litro de água destilada ajustada a pH 7,4) a 37°C. Amostras de 2cm² de superfície foram pesadas e colocadas individualmente em uma rede de arame de aço inoxidável, previamente tarada com abertura de malha de 600µm. A malha contendo a amostra foi submersa em 10mL de PBS pH 7,4 contido num recipiente de plástico (5cm de diâmetro, altura de 2cm). O aumento de peso nas membranas do POSE foi determinada em intervalos de tempo pré-definidos até se observar peso constante. Cada medição foi repetida quatro vezes.

O percentual de absorção de água (M_t/M_∞) foi calculado através da Equação 1.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{(W_t - W_o)}{W_o} \quad (1)$$

sendo W_t o peso do polímero no tempo t e W_o o peso inicial do polímero.

3.4.7 Difractometria de Raios-X (DRX)

As avaliações da cristalinidade dos materiais da etapa 1 foram promovidas em um difratômetro de Raios-X da marca PANalytica, modelo X'pert PRO, tensão 40kV, corrente 40mA. Os materiais foram analisados na forma de pó e a radiação utilizada foi $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$). Para os materiais analisados na seção 4.2.7, os ângulos de 2θ foram entre 15° e 80° , com passo de varredura de $0,05^\circ$ e tempo de medida de 2 s/passos. Já para os polímeros do OSE analisados na seção 4.3.4, os ângulos de 2θ foram entre 10° e 90° , com o passo variando de $0,02^\circ$ e um tempo de contagem de 2s entre as variações. As análises dos resultados foram feitas com auxílio do programa PeakFinder[®].

3.5 Avaliação Biológica dos Arcabouços

3.5.1 Citotoxicidade

Os estudos sobre a citotoxicidade do material foram conduzidos segundo a norma ISO 10993 (partes 1 e 5) e a técnica aplicada nos experimentos foi a de coloração com o corante supra vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazólico) e reagente acoplador de elétrons PMS (fenazina metassulfato).

Os testes de citotoxicidade foram conduzidos com a exposição das células aos extratos originados das amostras, obtidos da seguinte maneira: para cada amostra, o meio extrator (meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico, na proporção de 6cm^2 da amostra para cada mL de meio extrator) foi colocado em contato com as amostras, incubado por 24 horas à 37°C e em seguida filtrado com filtros de seringa com poros de $0,22\mu\text{m}$. Este extrato estéril é submetido a uma diluição seriada 1:2 até a concentração de 6,25%.

Em uma placa de 96 poços, uma suspensão celular em meio RPMI com soro de $100\mu\text{L}$ com 1×10^4 células de linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foi previamente incubada por 24 horas, antes da exposição com o extrato das amostras. Após este período, $100\mu\text{L}$ de cada extrato foram

pipetados em quadruplicata e 100µL de meio de cultura RPMI com soro pipetados nos poços controle e nos poços do branco. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, uma solução de 80µl de meio RPMI com soro e 20µL da solução 20:1 MTS/PMS foi adicionada em cada poço e as placas incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por duas horas. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Device®) no comprimento de onda 490nm (Rodas, 2008).

A disposição do extrato, dos controles e do branco nas placas de 96 poços está ilustrada na FIG. 3.

Figura 3 - Ilustração da distribuição em uma placa de cultura de 96 poços do branco, dos controles e das diluições do extrato de uma amostra em um teste de citotoxicidade.

3.5.2 Hemocompatibilidade

Os aspectos químicos, de degradação de superfície e estrutura física de um biomaterial estão diretamente ligados com possíveis reações entre a superfície do biomaterial e o sangue. A exposição do sangue a superfícies artificiais podem desencadear uma deposição de células e proteínas sobre esta superfície, levando a ativação do sistema imune e do sistema de coagulação (Seyfert, 2002). O sistema de coagulação é extremamente complexo e inicia-se após um contato inicial, resultando em uma resposta humoral não específica. Após esta ativação inicial gerada por uma diferença de cargas, o sistema de coagulação e de sistema complemento são iniciados (Bélanger, 2001).

O teste de hemocompatibilidade foi executado de acordo com a ISO 10993 (partes 1 e 4), cujos parâmetros de avaliação variam de acordo com o material a ser analisado.

3.5.2.1 Adesão Plaquetária

Amostras dos suportes poliméricos foram colocadas em placas de Petri com 5cm de diâmetro, que por sua vez foram colocadas em placas de Petri maiores com papel umedecido com água destilada. Esses conjuntos foram colocados em estufa a 37°C por 30 minutos para manter a umidade e a temperatura adequadas ao experimento. Após a imersão das amostras de polímero em sangue por 3 minutos a 37°C, as amostras foram lavadas com PBS pH 7,4. Em seguida as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas com etanol nas concentrações 50%, 75% e 95%, por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. Os sistemas foram secos à vácuo (Queiroz, 1993). Findo estas etapas, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

3.5.2.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram previamente metalizadas com ouro e analisadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-7401F.

3.5.3 Adesão Celular nos Arcabouços

3.5.3.1 Cultura Celular

A análise da adesão celular foi promovida com células do tipo fibroblastos, da linhagem celular BALB3-T3 (ATCC). As células foram previamente cultivadas em placas de cultura e posteriormente aplicadas nos suportes poliméricos com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de DBS (Donor Bovine Serum), 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico. Os suportes foram acondicionados em duplicata em placas de 12 poços e esterilizadas com radiação gama. Após esta etapa, foi aplicado meio de cultivo

DMEM (10% DBS, 1% L-glutamina, 1% antibiótico/antimicótico) para acondicionamento das membranas por 20 minutos. Os fibroblastos BALB/3T3 (ATCC) foram semeados na concentração de 1×10^4 células sobre os suportes com o auxílio de um anel de aço inoxidável de 1cm de diâmetro, delimitando desta maneira a área de aplicação. Após 48 horas de cultivo os anéis foram retirados e o meio de cultura DMEM (10% DBS, 1% L-glutamina, 1% antibiótico/antimicótico) foi trocado. Após mais 24 horas as células foram fixadas nos suportes com glutaraldeído 2,5% por 10 minutos, lavadas com PBS e secas a temperatura ambiente.

3.5.3.2 Microscopia Óptica de Fluorescência

As análises de fluorescência foram feitas com a utilização de dois fluorocromos, o alaranjado de acridina e o DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol).

O alaranjado de acridina é um corante de alta afinidade com ácidos nucleicos, sendo capaz de fluir rapidamente através do citoplasma e ligar-se ao DNA e RNA. Quanto ligado ao DNA, tem sua máxima excitação no comprimento de onda 500nm (ciano) e máxima emissão em 526nm (verde).

O fluorocromo DAPI, assim como o alaranjado de acridina, tem afinidade por ácidos nucleicos e quando associado à dupla fita de DNA tem sua máxima excitação no comprimento de onda 358nm (ultravioleta) e máxima emissão em 461nm (azul).

O tempo de acondicionamento das amostras nos corantes foi de cinco minutos. A concentração final da solução utilizada do alaranjado de acridina foi de $6,67 \times 10^{-5}\%$ e para o DAPI a de $3,3 \times 10^{-3}\%$, ambos diluídos em PBS. As amostras foram analisadas em um microscópio de fluorescência Nikon 80i (com câmera Nikon DS-Ri1), na ampliação de 200x.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do Óleo de Soja Epoxidado

O óleo de soja epoxidado (OSE) apresenta grupos epóxidos ou oxiranos que são versáteis intermediários dos polímeros vegetais. Devido à polaridade e tensionamento do anel, os epóxidos são suscetíveis a reações com grande número de nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, agentes oxidantes e redutores. A utilização do OSE para a obtenção de polímeros apresenta-se como uma importante alternativa por se tratar de produtos obtidos a partir de fontes renováveis. Nos últimos anos tem havido um aumento no interesse por este tipo de matéria prima. Nesse caso, o OSE apresenta-se como uma importante alternativa por se tratar de fonte renovável (Xua, 2002).

Os polímeros obtidos foram purificados em extrator Soxhlet, utilizando hexano para extração do óleo não reagido. A fração gel no polímero, demonstrada na seção 4.2.5, pôde ser obtida a partir da Equação 2.

$$\text{Conteúdo de gel (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100 \quad (2)$$

onde *mi* é a massa inicial da amostra seca e *mf* a massa final da amostra seca.

Após lavagem com água destilada para remoção dos resíduos químicos e liofilização, os arcabouços moleculares obtidos (os POSE e o OSE) foram caracterizados.

4.2 Caracterização Físico-Química do Óleo de Soja Epoxidado

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

No processo de epoxidação do OS, o ácido peracético atua como agente epoxidante na dupla ligação do óleo vegetal formando o anel oxirano. A reação de epoxidação do OS está representada na FIG. 4.

Figura 4 - Ilustração da reação de epoxidação do óleo de soja via perácido.

Ao realizar a reação do agente epoxidante com o ácido oléico, que é o composto insaturado de maior quantidade no OS, observa-se o aparecimento de bandas de absorção correspondentes ao anel epóxido no OSE. O anel epóxido presente no OSE foi caracterizado por FT-IR e é ilustrado na FIG. 5.

Figura 5 - Espectro FTIR do óleo de soja (OS)(A) e óleo de soja epoxidado (OSE)(B).

Comparando os espectros do OS e OSE (FIG. 5), são observadas bandas de absorção do grupo C=O referente aos ésteres alifáticos ocorrendo na região de 1750-1735cm⁻¹ e também a frequência de vibração do grupo (C-O-C), de ésteres, na região de 1200 e 1300cm⁻¹ (Silverstein, 1999). No espectro do OSE (FIG. 5B) é observada a banda de absorção a 823cm⁻¹ característica dos grupos epóxi (Silverstein, 1999; Vlcek, 2006), o que permite concluir o sucesso da reação de epoxidação do óleo de soja.

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN)

A FIG. 6 ilustra o espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) do OS e OSE. No espectro RMN do OS (FIG. 6A) é observado o multipletto referente aos hidrogênios oleofínicos a 5,4ppm e a existência dos prótons alílicos a 2,80ppm, característico das ligações duplas do ácido oleico que constitui o OS. Quanto ao OSE, a presença de epóxidos ficou evidenciada pelo sinal dos hidrogênios oxirânicos observados em 2,9ppm (FIG. 6B) do monoepóxido formado (Du, 2004; Aerts, 2004).

Figura 6 - Espectro ^1H -RMN (Bruker, 300 MHz) do óleo de soja (OS) (A) e óleo de soja epoxidado (OSE) (B). O padrão interno foi tetrametilsilano (TMS) e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3).

A partir do espectro ^1H -RMN as conversões das duplas ligações em epóxido foram calculadas, considerando o consumo dos hidrogênios olefínicos em 5.4ppm através da Equação 3.

$$\text{Epoxidação (\%)} = \left[\frac{(H_i - H_f)}{H_i} \right] \times 100 \quad (3)$$

onde H_i é a área correspondente ao sinal do espectro ^1H -NMR na condição inicial e H_f é a área correspondente ao sinal do espectro ^1H -NMR na condição final (após polimerização).

A integração dos sinais do espectro ^1H -RMN forneceu um rendimento no processo de epoxidação aproximadamente de 85%.

Para que uma reação de polimerização ocorra, é necessário que o monômero possua pelo menos dois sítios ativos suscetíveis para permitir o crescimento da cadeia (Mano, 1999). No caso do OSE, os sítios ativos são representados pelo grupo epóxi e em virtude da tensão provocada pelo anel oxirânico, os grupos epóxidos presentes no OSE podem reagir facilmente com ácidos, bases, nucleófilos ou eletrófilos (Smith, 1984).

4.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A FIG. 7 mostra as temperaturas de transição vítreas (T_g) obtidas a partir das curvas DSC do OSE e do polímero POSE. Observa-se que o OSE (FIG. 7A) apresenta T_g aproximadamente igual a -92°C enquanto que o polímero POSE apresenta T_g aproximadamente igual a -67°C . O aumento da temperatura T_g após formação do polímero POSE indica que o material produzido apresenta maior organização das cadeias e forças de interações intermoleculares mais fortes. Essa diferença nos valores das temperaturas de transição vítreas pode refletir alterações na dimensão lamelar e na distribuição dos cristalitos no polímero derivado do óleo vegetal. Esse comportamento é compatível com pesos moleculares mais altos, sugerindo o crescimento das cadeias poliméricas no POSE.

Figura 7 - Curvas de DSC do OSE (A) e do POSE (B).

4.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A FIG. 8 mostra as curvas referentes à análise termogravimétrica (TGA) do OSE e do polímero POSE obtido. Pode ser observado um aumento da estabilidade térmica do POSE (FIG. 8B) quando comparado ao OSE (FIG. 8A). Entretanto, as amostras apresentam perfis de degradação diferentes. O perfil de degradação do OSE acontece em dois estágios, sendo que o primeiro estágio é o mais bem definido. O primeiro estágio apresenta início de perda de massa a partir de aproximadamente 300°C, sendo observada uma perda de massa de aproximadamente 80% a 352°C; que pode ser atribuído à decomposição das cadeias carbônicas. O segundo estágio de decomposição térmica ocorre a 449°C e pode ser atribuído à decomposição de polímeros formados devido ao aquecimento do OSE. A perda de massa do polímero POSE acontece em um único estágio com início de decomposição térmica a 300°C e decomposição total a 402°C. A maior resistência térmica do polímero POSE pode estar relacionada ao aumento do peso molecular, assim como a um aumento das interações intermoleculares de suas cadeias. Esse resultado é compatível com o comportamento termogravimétrico de cadeias poliméricas, que apresentam um patamar de estabilidade térmica bem evidenciada até temperaturas mais altas com posterior perda de massa acontecendo em uma estreita faixa de temperatura.

Figura 8 - Curvas de TGA do OSE (A) e POSE (B) obtidas em atmosfera de N₂.

4.2.5 Reação de Polimerização

O ensaio de gel permite avaliar a fração de OSE que sofreu polimerização e reticulação com o HEMA formando assim uma rede polimérica tridimensional (3D). Conforme pode ser observado na FIG. 9, o teor de gel do polímero aumenta proporcionalmente até cerca de 20% em conteúdo de HEMA, o que confere à matriz polimérica obtida estabilidade mecânica adequada para sua aplicação em Engenharia de Tecidos Biológicos.

Figura 9 - Dependência do conteúdo de gel dos polímeros POSE em função do conteúdo de HEMA.

4.2.6 Absorção de Água

A característica de hidrofiliidade do material torna-se importante quando consideramos que a presença de água é fator favorável para o crescimento e proliferação celular. Mesmo não havendo correlação ideal entre hidrofiliidade e comportamento celular, alguns trabalhos demonstraram a preferência por parte das células em se ancorar em superfícies hidrofílicas (Ma, 2003; Wan, 2003; Tezcaner, 2003; Santos, 2007). As características de absorção de água do polímero POSE foram avaliadas a fim de se prever o comportamento do material quando em contato com os fluídos corpóreos. A FIG. 10 mostra a absorção de água pelo POSE, medida a 37°C. Observa-se que as características hidrofílicas

do POSE foram reforçadas pela adição de HEMA. Após aproximadamente uma hora de exposição nota-se uma estabilização no comportamento do POSE em relação à absorção de água.

Figura 10 - Curva de absorção de água pelo polímero POSE. As medidas foram realizadas à 37°C em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Os conteúdos de HEMA no polímero POSE são: 20% (A), 10% (B) e 5% (C).

4.2.7 Difractometria de Raios-X

A FIG. 11 mostra o espectro de difração de raios-X (DRX) do POSE obtido a partir da polimerização do OSE e reticulado com 5% de HEMA após oito horas de aquecimento a 120°C. O grau de cristalinidade da membrana obtida foi estimado em torno de 27,3 + 5%. Em se tratando de membranas para a Engenharia de Tecidos, a baixa cristalinidade do POSE pode favorecer sua aplicação como biomaterial implantável em tecidos biológicos de baixo módulo de elasticidade, como o músculo cardíaco, favorecendo o crescimento celular, assim como na absorção de água e na velocidade de degradação dos polímeros (Fisher, 1973; Li, 1999; Wu, 2004; Barbanti, 2005).

Figura 11 - Espectro por difração de raios-X do polímero do óleo de soja epoxidado (POSE) contendo 5% de HEMA como agente reticulante.

4.3 Caracterização Físico-Química do Polímero do Óleo de Soja Epoxidado

4.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

A análise estrutural dos POSE-HEMA foi feita através do FT-IR, que permite identificar as ligações presentes na molécula através de suas vibrações. Com a finalidade de comparar os espectros gerados certificando a presença dos componentes dos polímeros POSE, o óleo de soja (OS), o óleo de soja epoxidado (OSE) e o HEMA foram analisados separadamente, gerando os espectros mostrados nas FIG. 12, 13 e 15 respectivamente.

Figura 12 - Espectro gerado pelo óleo de soja quando analisado na região do infravermelho.

Figura 13 - Espectro gerado pelo OSE quando analisado na região do infravermelho.

Ao fazer a sobreposição do óleo de soja epoxidado com o óleo de soja puro (FIG. 14), percebe-se que os espectros apresentam como mudança mais significativa o aparecimento da banda em 830Cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O-C do anel oxirânico. Para uma comparação mais detalhada, a TAB. 1 mostra a atribuição de bandas para o OS, para o OSE e para o HEMA.

Figura 14 - Gráficos gerados pela análise de OSE (vermelho) e OS (Preto) na região do infravermelho.

Figura 15 - Espectro gerado pelo HEMA quando analisado na região do infravermelho.

Tabela 1 - Atribuição de bandas de HEMA, OS e OSE.

Comprimento de onda (Cm^{-1})	HEMA	OS	OSE
3434	Estiramento O-H	-----	-----
2961 e 2887	Estiramento simétrico e assimétrico CH_2	Estiramento simétrico e assimétrico CH_2	Estiramento simétrico e assimétrico CH_2
1715 – 1748	Estiramento C=O	Estiramento C=O	Estiramento C=O
1632		-----	-----
1450	Estiramento C=C	Estiramento C=C	Estiramento C=C
1316- 1341	Deformação angular de CH_2 e CH_3	Deformação angular de CH_2 e CH_3	Deformação angular de CH_2 e CH_3
1296 1159	Estiramento C-O	Estiramento C-O	Estiramento C-O
1080-1095	C-O-C de éter	C-O-C de éter	C-O-C de éter
830	-----	-----	C-O-C Anel Oxirânico

A FIG. 16 mostra os resultados obtidos para a análise do POSE-HEMA contendo 10 e 35% de HEMA e sintetizados sob irradiação de 50 e 100kGy. Observando-se os gráficos nota-se que não há mudanças significativas nos espectros, mostrando a ausência de diferenças estruturais entre os polímeros e consequentemente indicando o sucesso da síntese contendo ambas as quantidades do metacrilato e com as diferentes quantidades de radiação.

Figura 16 - Espectros gerados pela análise de POSE – HEMA 10%, 50 KGy (Preto), POSE – HEMA 10% , 100KGy (Vermelho) POSE – HEMA 35% , 50 KGy (Azul) e POSE – HEMA 35% , 100 KGy (Rosa) na região do infravermelho.

A TAB. 2 mostra a atribuição de bandas para os POSE-HEMA, de modo que é possível confirmar a presença do OSE e do metacrilato no material obtido. Comparando-se os gráficos na FIG. 16 e a atribuição de bandas na TAB. 2, é possível ainda descartar a probabilidade de modificações estruturais nas cadeias poliméricas tanto quando se faz a síntese usando 10 ou 35% de HEMA, quanto quando se utiliza 50 ou 100kGy de radiação ionizante como iniciadora da polimerização.

Tabela 2 - Atribuição de bandas para o polímero POSE-HEMA.

Comprimento de onda (Cm^{-1})	Atribuição
3409	Estiramento OH
2925	Estiramento simétrico e assimétrico de CH_2
2850	
1715	Estiramento C=O
1450	Estiramento C-OH de éster
1246	Estiramento C-O de éster
1072	C-O-C de éter
830	C-O-C anel oxirânico

Com a finalidade de confirmar a síntese os espectros obtidos para o HEMA, o OSE puro e o POSE-HEMA foram sobrepostos (FIG. 17). Assim é possível perceber a presença da banda referente à vibração de estiramento O-H em 3409Cm^{-1} , referente à hidroxila presente no HEMA, ausente no OSE e que passa a existir também no espectro do POSE-HEMA. Outra mudança que indica a ligação do HEMA à cadeia do polímero é a diminuição da intensidade relativa da banda em 1450Cm^{-1} , referente ao estiramento da dupla ligação C=C presente no HEMA e no OSE, fato que pode ser explicado pela perda da dupla ligação do OSE durante a polimerização e da ligação pi presente no HEMA, que dá lugar à ligação entre o HEMA e o POSE. Por último, na FIG. 17 é possível notar a ausência da banda em 830Cm^{-1} após a polimerização, confirmando a abertura do anel oxirânico e indicando o acoplamento do HEMA ao polímero.

Figura 17 - Gráficos gerados pela análise de OSE (Azul) e POSE-HEMA (Vermelho) e HEMA (Preto) na região do infravermelho.

Dessa maneira é possível afirmar que a análise na região do infravermelho indica o sucesso da síntese do polímero POSE-HEMA, entretanto pode-se afirmar que não houve uma mudança estrutural significativa quanto à posição dos átomos na cadeia polimérica quando a síntese é feita com diferentes intensidades de radiação ou com diferentes quantidades do metacrilato.

4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da análise por DSC foi possível encontrar a transição vítrea (t_g) da série POSE-HEMA. A FIG. 18 mostra o gráfico obtido para a análise do POSE-HEMA 10%-50kGy, que mostra uma transição vítrea em -70°C , seguido de outras duas t_g em -52 e -6°C respectivamente.

Figura 18 - Gráfico obtido pela análise via DSC do POSE-HEMA 10%-50kGy.

A presença de mais de uma transição vítrea pode ser explicada através da existência de um alto grau de liberdade na molécula. Dessa maneira há diferentes temperaturas em que há a passagem de partes da molécula deixam de a forma vítrea (rígida) e adquirem liberdade de rotação.

4.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Os resultados obtidos através da análise termogravimétrica foram estudados pelos modelos de Kissinger e Ozawa. As FIG. 19 e 20 mostram os gráficos obtidos através do aquecimento das amostras de POSE-HEMA, 10% de HEMA-50kGy da temperatura ambiente até 1000°C nas diferentes taxas de aquecimento.

Figura 19 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 50kGy em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A), 15 (B)°C/min.

Figura 20 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 50kGy em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B) °C/min.

Verificando-se a curva diferencial apresentada nos gráficos da FIG. 19 pode-se notar um pequeno incremento na temperatura de degradação de acordo com que há um aumento da velocidade de aquecimento. Os modelos propostos

por Kissinger e Ozawa apresentam-se como bons candidatos para a correção desta variação e cálculo da energia de ativação (E_a) do material. Dessa maneira, para o cálculo E_a é necessário gerar um gráfico comparativo das temperaturas e máxima degradação (T_m) em função da taxa de aquecimento (T_x). Os modelos de gráficos devem seguir $\ln(\frac{T_x}{T_{m2}}) \times \frac{1}{T_m}$. Para o modelo de Kissinger, onde a E_a será dada pela equação 4.

$$Ea = -R.S \quad (4)$$

onde R é a constante dos gases; S é o coeficiente angular da reta gerada pela intercessão dos pontos da curva.

Para o modelo de Ozawa usa-se a curva gerada por $\log T_x \times \frac{1}{T_m}$ e a equação 5 permite a obtenção da E_a .

$$Ea = \frac{R.S}{0,4567} \quad (5)$$

A FIG. 21 mostra os gráfico obtidos para o cálculo da E_a do POSE-HEMA contendo 10% de HEMA e polimerizado à 50 kGy.

Figura 21 - Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 10% à 50kGy.

Com a finalidade de comparar a degradação dos POSE-HEMA com diferentes concentrações de HEMA e sintetizados frente à diferentes quantidades de radiação adotou-se o mesmo tratamento para POSE-HEMA 10% à 100kGy, POSE-HEMA 35 à 50 e 100kGy. As FIG. 22 e 23 mostram as curvas geradas da análise de POSE-HEMA 10% à 100kGy.

Figura 22 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B) °C/min.

Figura 23 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 10% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B) °C/min.

A FIG. 24 mostra os gráficos gerados pelo tratamento pelos modelos de Ozawa (A) e Kissinger (B) e os resultados obtidos para a energia de ativação calculados pelas equações 4 e 5 foram de 54,132KJ/mol para o modelo de

Kissinger e 62,42KJ/mol para o modelo de Ozawa.

Figura 24 - Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 10% à 100kGy.

As FIG. 25 e 26 mostram os gráficos gerados para o POSE-HEMA 35% à 50kGy que obteve sua energia de ativação de degradação de 126,1188KJ/mol para o modelo de Kissinger e 129,9797KJ/mol quando utiliza-se o modelo de Ozawa.

Figura 25 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 50kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B)°C/min.

Figura 26 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% à 50kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30 (B) °C/min.

A FIG. 27 mostra os gráficos gerados para a utilização dos métodos de Kissinger e Ozawa para o cálculo da energia de ativação da degradação do POSE-HEMA 35% e dose de radiação de 50kGy.

Figura 27 - Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 35% à 50kGy.

As FIG. 28 e 29 Mostram os gráficos gerados para o POSE-HEMA 35% à 100 kGy que obteve sua energia de ativação de degradação igual a 25,3005KJ/mol quando tratada ante ao modelo de Kissinger e de 23,8548KJ/mol quando utiliza-se o modelo de Ozawa.

Figura 28 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 10 (A) e 15 (B)°C/min.

Figura 29 - Gráfico obtidos através da perda percentual de massa do POSE-HEMA 35% sintetizado à 100kGy, em função da temperatura (preto) e da primeira derivada dos mesmos (Azul). Os gráficos foram obtidos com taxas de aquecimento de 25 (A) e 30°C/min (B).

A FIG. 30 mostra os gráficos gerados para a utilização dos métodos de Kissinger e Ozawa para o cálculo da energia de ativação da degradação do POSE-HEMA 35% à 100kGy.

Figura 30 - Gráficos gerados para o Cálculo da E_a pelo método de Ozawa (A) e Kissinger (B), para o POSE-HEMA 35% à 100kGy.

A fim de facilitar a comparação entre os resultados obtidos, a TAB. 3 mostra as energias de ativação calculadas para a degradação dos diferentes polímeros e quando tratadas ante aos modelos de Kissinger e Ozawa.

Tabela 3 - Energias de ativação calculadas para o POSE com diferentes concentrações de HEMA e sintetizados frente a diferentes intensidades de radiação.

	Kissinger	Ozawa
POSE-HEMA 10% 50kGy	126,1188 KJ/mol	129,9797 KJ/mol
POSE-HEMA 10% 100kGy	54,1320 KJ/mol	61,4201 KJ/mol
POSE-HEMA 35% 50kGy	406,7560 KJ/mol	397,1067 KJ/mol
POSE-HEMA 35% 100kGy	25,3005 KJ/mol	23,8548 KJ/mol

Observando as energias de ativação de degradação obtidas, percebe-se que ao usar uma maior intensidade de radiação ionizante na síntese há uma diminuição na E_a , que pode ser explicada pela formação de cadeias menores durante a síntese ou pela desestabilização das cadeias devido aos efeitos físicos da radiação na cadeia polimerizada.

Conclui-se também que o polímero POSE-HEMA 35% se mostra mais estável frente à degradação térmica quando comparado ao POSE-HEMA 10% quando sintetizados frente à mesma quantidade de radiação ionizante, mostrando a capacidade do HEMA de conferir uma maior estabilidade à cadeia.

Apesar de apresentarem uma pequena diferença nos valores calculados, os modelos de Kissinger e Ozawa se mostraram eficientes para o cálculo da E_a , já que há uma consistência nos resultados encontrados para ambos os métodos. A diferença de valores pode ter se originado no fato de os valores de T_m obtidos em função da taxa de aquecimento não apresenta valores lineares, sendo o R^2 das retas traçadas sempre inferior a 0,9, o que poderia gerar um pequeno erro nos cálculos.

4.3.4 Difratometria de Raios-X

A análise por difração de raios X dos polímeros POSE-HEMA foi feita com a finalidade de investigar a cristalinidade dos materiais, bem como a influência da intensidade de irradiação e da quantidade de HEMA no meio. A FIG. 31 mostra o gráfico obtido para a difração apresentada pelo POSE-HEMA 10% à 50kGy, que

não apresentou picos cristalinos, tratando-se portanto de um material totalmente amorfo. A banda apresentada em $2\theta = 18,93^\circ$ refere-se à porção amorfa da amostra.

Figura 31 - Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 10% de HEMA, com 50kGy de irradiação durante a síntese.

O POSE-HEMA, 10%-100KGy, (FIG. 31) entretanto, apresenta picos cristalinos bem definidos em $2\theta = 49,15, 72,73$ e $88,27^\circ$, bem como a banda amorfa em $18,93^\circ$. Para o cálculo do índice de cristalinidade da amostra pode-se utilizar a equação 6, que compara o pico cristalino de maior intensidade com a banda amorfa.

$$IC\% = \frac{ACr}{ACr + AA} \cdot 100 \quad (6)$$

onde IC é o índice de cristalinidade, AA é a área da banda amorfa e ACr é a soma das áreas dos picos cristalinos.

Figura 32 - Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 10% de HEMA, com 100kGy de irradiação durante a síntese.

Para os cálculos das áreas dos picos os gráficos foram plotados utilizando-se o programa PeakFinder, que calcula a área de cada um dos picos da amostra separadamente. Dessa maneira para o POSE-HEMA 10%-100kGy, obteve-se um índice de cristalinidade de 13,10% indicando um polímero amorfo, apenas com porções cristalinas.

O mesmo estudo foi aplicado ao POSE-HEMA 35%-50kGy (FIG. 32) e POSE-HEMA 35%-100kGy (FIG. 33), de maneira que obteve-se um IC% = 2,68% para o POSE-HEMA 35%-50kGy e um IC% = 3,05% para o POSE-HEMA 35%-100kGy.

Figura 33 - Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 35% de HEMA, com 50kGy de irradiação durante a síntese.

Figura 34 - Difração de raios-X gerada por POSE-HEMA, contendo 35% de HEMA, com 100kGy de irradiação durante a síntese.

A difração de raios x gerada pelos polímeros da série POSE-HEMA mostra, portanto uma tendência amorfa do material, bem como um pequeno incremento na porcentagem da cristalinidade quando se aumenta a intensidade de radiação, durante a síntese. Nota-se também que a quantidade de HEMA nas amostras

influencia um decréscimo da cristalinidade, de maneira que a intensidade dos picos cristalinos diminui, assim como o IC% se mostra substancialmente menor, fato que pode ser explicado pela inserção da cadeia volumosa do HEMA em posições adjacentes, impedindo a cristalização do material.

4.4 Avaliação Biológica dos Arcabouços

4.4.1 Citotoxicidade

O aumento do rigor no uso de animais em pesquisa, assim como a preocupação pelo bem estar animal, aliado a constante preocupação da segurança do uso de biomateriais e dispositivos médicos nos seres humanos tem estimulado o surgimento de novas técnicas de avaliação da toxicidade dos materiais. Durante muitos anos o teste DL₅₀ (dose letal mediana) foi utilizado na determinação da toxicidade aguda, e após muitas discussões foi banido das diretrizes que norteiam a avaliação da toxicidade de um material (Valadares, 2006). A tendência é a substituição das técnicas *in vivo* pelas *in vitro*, desde que os resultados obtidos reproduzam com fidelidade os métodos tradicionais. A ISO 10993 compila vários testes na interação biomaterial/tecido biológico e determina que a biocompatibilidade se inicie com a avaliação de um material a partir da citotoxicidade. A parte 5 da ISO 10993 é a responsável por sugerir os testes e condições necessários para a avaliação do teste de citotoxicidade. Três categorias de testes são determinadas nessa norma: teste no extrato da amostra, teste de contato direto com a amostra e teste de contato indireto com a amostra. A aplicação de uma ou mais categoria é definida pela natureza do material. De acordo com a norma, uma redução maior que 30% na viabilidade celular nos testes é indicativo de citotoxicidade do material. A parte 5 dessa norma ainda classifica a toxicidade de um biomaterial ou dispositivo médico em quatro níveis (Anexo C) de acordo com seu grau de toxicidade, análise qualitativa da morfologia celular e diminuição da viabilidade celular.

Todas as amostras obtidas foram avaliadas com o teste de citotoxicidade, representado na FIG. 35.

Figura 35 – Gráfico do teste de citotoxicidade das amostras de óleo de soja, do óleo de soja epoxidado, do metacrilato de 2-hidroxietila e dos polímeros do óleo de soja epoxidado antes da lavagem dos polímeros para retirada de resíduos tóxicos das etapas de processamento.

Neste teste, todas as amostras de polímero apresentaram citotoxicidade nas concentrações máximas (100%), que representam as concentrações de uso nas avaliações de crescimento celular sobre os arcabouços. Por essa toxicidade, todas as amostras foram submetidas à lavagem, como descrito na seção 3.3. Após, novamente foi testado a citotoxicidade das amostras, cujo resultado está representado na FIG. 36, na qual não se observa toxicidade nas amostras, com exceção da amostra OSE (Óleo de Soja Epoxidado puro; sem lavagem).

Figura 36 – Gráfico do teste de citotoxicidade das amostras de óleo de soja, do óleo de soja epoxidado, do metacrilato de 2-hidroxietila e dos polímeros do óleo de soja epoxidado após a lavagem dos polímeros para retirada de resíduos tóxicos das etapas de processamento.

Comparando-se as FIG. 35 e 36, podemos comprovar a eficiência das sucessivas lavagens das amostras descritas na seção 3.3 a fim de se retirar resíduos de catalisadores do processo de epoxidação do óleo de soja, provavelmente o ácido fórmico, reconhecidamente citotóxico pela literatura (Nicholls, 1975, Treichel, 2003).

A ausência de citotoxicidade do óleo de soja e no óleo de soja epoxidado era esperada, já que existem pesquisas na literatura demonstrando a baixa ou a ausência de toxicidade em polímeros originados de óleos naturais (Palamakula, 2004; Wang, 2010; Bakhshi, 2013; Akbari, 2014) ou que usem OSE em sua formulação (Liu, 2012; Miao, 2012).

4.4.2 Hemocompatibilidade

4.4.2.1 Adesão Plaquetária

A interação de um polímero com o sangue desencadeia diversas reações, e uma das principais e mais frequentes é a formação de trombos. As pesquisas nessa área resultaram no desenvolvimento de inúmeras metodologias de avaliação, incluindo protocolos *ex vivo* e *in vivo* capazes de avaliar as reações biológicas e químicas que ocorrem na interface sangue-polímero, a ativação do sistema de coagulação e a adsorção de proteínas plasmáticas (Bélanger, 2001).

As dificuldades e as complexidades desta avaliação têm sido analisadas na literatura (Ratner, 1984; Ratner, 2012). A quantidade de reações complexas ocorridas dessa interação, quando não analisadas em sua totalidade, ou se as condições do biomaterial não foram bem estabelecidas, os resultados das metodologias empregadas podem não ser fiéis (Ratner, 2007).

As amostras foram submetidas à avaliação da adesão plaquetária com a utilização de sangue humano total. Os resultados foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura, representados na FIG. 37.

Nas micrografias da FIG. 37, observa-se a presença de hemácias e/ou plaquetas e ausência de trombos e de rede de fibrinas nas amostras do polímero de OSE na dose de 100kGy (B), do polímero do OSE com HEMA (90% OSE/10% HEMA) na dose de 50kGy (C) e 100kGy (D) e do polímero OSE com HEMA (65% OSE/35% HEMA) na dose de 50kGy (E). Já nas amostras do polímero de OSE na dose de 50kGy (A) e na do polímero do OSE com HEMA (65% OSE/35% HEMA) na dose de 100kGy (F) não se observa a presença de hemácias/plaquetas, de trombos ou rede de fibrinas; mostrando portanto uma menor trombogenicidade dessas amostras quando comparadas as demais.

De acordo com a literatura, o óleo de soja epoxidado é um composto amplamente utilizado como plastificante na produção de biomateriais poliméricos. Como exemplo, podemos citar bolsas de sangue ou dispositivos de contato com o sangue produzidos em policloreto de vinila (PVC) (Wilson, 1998; Sastri, 2013).

Figura 37 - Microscopia Eletrônica de Varredura: Controle Positivo (vidro); (A) POSE (50kGy); (B) POSE (100kGy); (C) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (E) POSE-HEMA (65%:35 – 50kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).

4.4.3 Adesão Celular nos Arcabouços Poliméricos

O propósito deste ensaio foi verificar a interação das membranas poliméricas com as células para uma possível obtenção de um arcabouço para aplicação na engenharia de tecidos.

Para observar a biofuncionalidade das membranas poliméricas de OSE e OSE/HEMA, foram semeados fibroblastos da linhagem celular imortalizada BALB3-T3 (ATCC) para verificar a adesão celular. Foram utilizados para estes testes os fluoróforos alaranjado de acridina e DAPI.

A adesão e a proliferação celular em arcabouços poliméricos a base de óleo de soja já foram demonstradas na literatura (Çakmakli, 2005). Neste sentido, identifica-se na FIG. 38 a presença de fibroblastos aderidos aos polímeros, de coloração alaranjada. A FIG. 38A representa o controle positivo para a adesão celular, na qual os fibroblastos foram semeados em placas de cultura próprias

para o cultivo celular. A partir de uma análise qualitativa, observa-se uma prevalência da adesão celular na FIG. 38B e 38C, FIG. 38D e FIG. 38G. Uma menor adesão pôde ser determinada nas FIG. 38E e FIG. 38F.

A FIG. 39 representa as análises de adesão celular com o auxílio do fluoróforo DAPI, garantindo a presença celular através da coloração azulada. A FIG. 39A representa o controle positivo em placas próprias para crescimento celular, assim como foi conduzido nas análises da FIG. 38. Observa-se uma melhor adesão celular nas amostras do POSE (50kGy e 100kGy) e uma menor nas demais amostras.

A adesão celular foi, em média, maior nas amostras do polímero do óleo de soja epoxidado sem a adição de HEMA. Sugere-se que essa diferença possa estar relacionada à porosidade e permeabilidade das membranas (Babensee, 1998).

Figura 38 – Adesão celular observada por microscopia de fluorescência no aumento de 200x e corante fluorescente alaranjado de acridina: (A) Controle Positivo; (B) POSE (50kGy); (C) POSE (100kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (E) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 50kGy); (G) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).

Figura 39 – Adesão celular observada por microscopia de fluorescência no aumento de 200x e corante fluorescente DAPI: (A) Controle Positivo; (B) POSE (50kGy); (C) POSE (100kGy); (D) POSE-HEMA (90%:10% – 50kGy); (E) POSE-HEMA (90%:10% – 100kGy); (F) POSE-HEMA (65%:35% – 50kGy); (G) POSE-HEMA (65%:35% – 100kGy).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, as seguintes conclusões puderam ser propostas:

- O processo de epoxidação do óleo de soja foi eficiente;
- O método de copolimerização do óleo de soja epoxidado e do HEMA por irradiação gama foi efetivo em todas as concentrações;
- A intensidade de radiação ionizante é inversamente proporcional à energia de ativação do POSE-HEMA;
- A concentração de HEMA no polímero é diretamente proporcional a estabilidade frente à degradação térmica;
- Os POSE-HEMA apresentam tendência amorfa, havendo pequeno incremento da cristalinidade com o aumento da intensidade de radiação e diminuição com o aumento da concentração de HEMA;
- As sucessivas etapas de purificação dos polímeros garantiram a extração de resíduos tóxicos a concentrações atóxicas para as células;
- Os polímeros não apresentaram citotoxicidade em nenhuma concentração estudada;
- Evidência de propriedades hemocompatíveis dos POSE e dos POSE-HEMA pela ausência/baixa quantidade de plaquetas ou hemácias aderidas e ausência de trombos e de rede de fibrinas;
- Adesão e crescimento das culturas de células de fibroblastos indicam potencial uso como matrizes poliméricas;
- A adesão e o crescimento celular ocorreram em todas as amostras dos polímeros, porém com maior intensidade e evidência nos polímeros do OSE sem a adição de HEMA;
- As técnicas padronizadas e as avaliações das matrizes poliméricas permitem o desenvolvimento de novos biomateriais para uso na engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, H.A.J.; JACOBS, P.A. Epoxide yield determination of oils and fatty acid methyl esters using $^1\text{H-NMR}$. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 81, p. 841-846, 2004.

AKBARI, F.; KHOSROUSHAHI, A.Y.; YEGANEH, H. Quaternary ammonium salt containing soybean oil: an efficient nanosize gene delivery carrier for halophile green microalgal transformation. ***Chemico-Biological Interactions***, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.006

ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. ***Seminars in Immunology***, v. 20, p. 86–100, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15448-1**: embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis. Parte 1: Terminologia. São Paulo, 2008. 2 p.

BABENSEE, J.E.; ANDERSON, J.M.; MCINTIRE, L.V.; MIKOS, A.G. Host response to tissue engineered devices. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, n. 33, p. 111–139, 1998.

BAKHSHI, H.; YEGANEH, H.; MEHDIPOUR-ATAEI, S.; SHOKRGOZAR, M.A.; YARI, A.; SAEEDI-ESLAMI, S.N. Synthesis and characterization of antibacterial polyurethane coatings from quaternary ammonium salts functionalized soybean oil based polyols. ***Materials Science and Engineering***, v. 33, p. 153–164, 2013.

BALCK, J. Biological Performance of Materials: fundamentals of biocompatibility. 4 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. ***Polímeros: Ciência e Tecnologia***, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BÉLANGER, MC.; MAROIS, Y. Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. ***Journal of Biomedical Materials Research***, v. 58, p. 467-77, 2001.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T.J.; YARMUSH, M.L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. ***Annual Review***

Chemical Biomolecular Engineering, v. 2, p. 403–430, 2011.

BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials in Regenerative Medicine. **Journal of Postgraduate Medicine Education and Research**, v. 46, p. 81-89, 2012.

BIOPOLIETILENO BASEADO NO ETANOL. **Polímeros**. São Carlos , v. 19, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282009000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 13 jun. 2015.

BOVEY, F.A., **The Effects of Ionizing Radiation on Natural and Synthetic High Polymers**. New York: Interscience Publishers, 1958.

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6,2, p. 127-139, 2011.

ÇAKMAKLI, B.; HAZER, B.; TEKIN, I.O.; CÖMERT, F.B. Synthesis and characterization of polymeric soybean oil-g-methyl methacrylate (and n-butyl methacrylate) graft copolymers: biocompatibility and bacterial adhesion. **Biomacromolecules**, vol.6, p. 1750-1758, 2005.

DU, G.; TEKIN, A.; HAMMOND, E.G.; WOO, L.K. Catalytic epoxidation of methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 4, p. 477-480, 2004.

FISHER, E.W.; STERZEL, H.J.; WEGNER, G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. **Kolloid-Z Z Polymere**. v. 251, p. 980-990, 1973.

GOPIKRISHNA, V.; TOBY, T.; KANDASWAMY, D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 105, p. 61–65, 2008a.

GOPIKRISHNA, V.; PARVINDER, S.B.; VENKATESHBABU, N.; TOBY, T.; KANDASWAMY, D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. **Journal of Endodontics**, v. 34, p. 587–589, 2008b.

GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue Engineering - Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009-1014, 2002.

GÜNER, F.S.; YAĞCI, Y.; ERCIYES, A.T. Polymers from triglyceride oils. ***Progress in Polymer Science***, v. 31, p. 633–670, 2006.

GÜVEN, O. ***Crosslinking and scission in polymers***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990.

HOLZAPFEL, B.M.; REICHERT, J.C.; SCHANTZ, J.T.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NÖTH, 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.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D.J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. ***Nature***, v. 26, p. 426–432, 2009.

IKADA, Y. Interfacial biocompatibility. In: SHALABY, S.W.; IKADA, Y.; LANGER, R.; WILLIAMS, J. P. ***Polymers of biological and biomedical significance***. Washington: American Chemical Society, 1994.

International Organization for Standardization. ***Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood***. Suíça, 2002.

International Organization for Standardization. ***Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity***. Suíça, 2009.

International Organization for Standardization. ***Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process***. Suíça, 2009.

KIM, H.M., KIM, H.R., KIM, B.S. Soybean oil-based photocrosslinked polymer networks. ***Journal of Polymers and the Environment***, v. 18, n. 3, p. 291–297, 2010b.

KIM, H.M.; KIM, H.R.; HOU, C.T.; KIM, B.S. Biodegradable photo-crosslinked thin polymer networks based on vegetable oil hydroxy fatty acids. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 87, p. 1451–1459, 2010a.

KOH, C.J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine, ***Journal of the American Society Nephrology***, v. 15, p. 1113–1125, 2004.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920–926, 1993.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4 ed. Waltham: Academic Press, 2013.

LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, p. 342-353, 1999.

LIAO, S.; LI, B.; MA, Z.; WEI, H.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. **Biomedical Material**, v. 1, p. 45–53, 2006.

LIU, Z.; XU, Y.; CAO, L.; BAO, C.; SUN, H.; WANG, L.; DAIB, K.; ZHU, L. Phosphoester cross-linked vegetable oil to construct a biodegradable and biocompatible elastomer. **Soft Matter**, v. 8, p. 5888–5895, 2012.

LUTOLF, M.P.; HUBBELL, J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 47–55, 2005.

MA, Z.; GAO, C.; GONG, Y.; SHEN, J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. **Biomaterials**, v. 24, p. 3725-3730, 2003.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.

MANO, J.F.; SILVA, G.A.; AZEVEDO, H.S.; MALAFAYA, P.B.; SOUSA, R.A.; SILVA, S.S.; BOESEL, L.F.; OLIVEIRA, J.M.; SANTOS, T.C.; MARQUES, A.P.; NEVES, N.M.; REIS, R.L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative Medicine: present status and some moving trends. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 4, p. 999–1030, 2007.

MAKHLIS, F. A. **Radiation Physics and Chemistry of Polymers**. Jerusalem: John Wiley & Sons, 1975.

MASON, C.; DUNNILL, P. A brief definition of regenerative medicine. ***Regenerative Medicine***, v. 3, p. 1–5, 2008.

MCLAUGHLIN, W.L.; BOYD, A.W.; CHADWICK, K.H.; MCDONALD, J.C. AND MILLER, A. ***Dosimetry for Radiation Processing***. London: Taylor and Francis, 1989.

MIAO, S.; SU, L.; WANG, P.; LIU, R.; SU, Z.; ZHANG, S. Soybean oil-based polyurethane networks as candidate biomaterials: Synthesis and biocompatibility. ***European Journal of Lipid Science and Technology***, v. 114, p. 1165–1174, 2012.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. ***Organic chemistry***. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992.

MOURA, C.C.; SOARES, P.B.; DE PAULA REIS, M.V.; FERNANDES NETO, A.J.; ZANETTA BARBOSA, D; SOARES, C.J. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. ***Dental Traumatology***, v. 30, p. 22-26, 2014.

NICHOLLS P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 67, p. 610–616, 1975.

PALAMAKULA, A.; KHAN, M.A. Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q10 Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 273, p. 63–73, 2004.

PEPPAS, N.A. ***Hydrogels in medicine and pharmacy*** – volume II polymers. Boca Raton: CRC Press, 1986.

PETROVIC, Z.S. Polyurethanes from vegetable oils. ***Polymer Reviews***, v. 48, p. 109–155, 2008.

PETRUZZO, P.; TESTELIN, S.; KANITAKIS, J.; BADET, L.; LENGELÉ, B.; GIRBON, J.P. First human face transplantation: 5 years outcomes. ***Transplantation***, v. 93, p. 236–240, 2012.

QUEIROZ, A.A.A. ***Obtenção de copolímeros de enxerto via radiação ionizante, caracterização e estudo de suas propriedades hemocompatíveis***. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo,

1993.

RATNER, B.D. Evaluation of the blood compatibility of synthetic polymers: consensus and significance. In: Boretos JW, Eden M, editors. **Contemporary biomaterials: material and host response, clinical applications, new technology and legal aspects**. New Jersey: Noyes Publications, p. 193–204, 1984.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 3 ed. Ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2012.

RATNER, B.D. The catastrophe revisited: Blood compatibility in the 21st Century. **Biomaterials**. V.28, P. 5144–5147, 2007.

ROCHA, A.M.; QUINTELLA, C.M.; TORRES, E.A. Prospecção de artigos e patentes sobre polímeros biocompatíveis aplicados à Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa. **Cadernos de Prospecção, América do Norte**, v. 5, p. 72-85, 2012.

RODAS, A.C.D.; MAIZATO, M.J.S; LEIRNER, A.A.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; HIGA, O.Z. Cytotoxicity and genotoxicity of bovine pericardium preserved in glycerol. **Artificial Organs**, v. 32, p. 272-276, 2008.

SAETAE, W.; PORNPAKAKUL, S. **Glycerol based polyurethane**. In: 1st PSU Phuket Research Conference. Phuket, Novembro, 2008.

SALGADO, A.J.; OLIVEIRA, J.M.; MARTINS, A; TEIXEIRA, F.G.; SILVA, N.A.; NEVES, N.M.; SOUSA, N.; Reis, R.L. Tissue Engineering and regenerative medicine: past, present, and future. **Internation Review of Neurobiology**, v. 108, p. 1-33, 2013.

SANTOS JR., A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 308-317, 2007.

SASTRI, V.R. **Plastics in Medical Devices : properties, requirements and applications**. 2 ed. Burlington: William Andrew, 2013.

SAXENA, A.K. Tissue engineering: Present concepts and strategies. ***Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons***, v. 10, p. 14-19, 2005.

SEYFERT, U.T.; BIEHL, V.; SCHENK, J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. ***Biomolecular Engineering***, v.19, p. 91-96, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, G.C. ***Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos***. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. ***Progress in Polymer Science***, v. 36, p. 1254–1276, 2011.

SKALAK, R.; Fox, C.F. Tissue Engineering. New York: Alan R Liss, 1988.

SMITH, J.G. Synthetically useful reactions of epoxides. ***Synthesis***, v. 8, p. 629-655, 1984.

TEZCANER, A.; BUGRA, K.; HASIRCI, V. Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. ***Biomaterials***, v. 24, p. 4573–4583, 2003.

THOMPSON, C.; OESTERLE, S. Biointerventional cardiology: the future interface of interventional cardiovascular medicine and bioengineering. ***Vascular Medicine***, v. 7, p. 135–140, 2002.

TREICHEL, J.L.; HENRY, M.M.; SKUMATZ, C.M.; EELLS, J.T.; BURKE, J.M. Formate, the toxic metabolite of methanol, in cultured ocular cells. ***NeuroToxicology***, v. 24, p. 825–834, 2003.

VACANTI, J. P., LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. ***Lancet***, v. 354, p. 32–34, 1999.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do teste DL50”. ***Revista Eletrônica de Farmácia***, v. 3, p. 93-98, 2006.

VLCEK, T.; PETROVIC, Z.S. Optimization of the chemoenzymatic epoxidation of

soybean oil. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 83, p. 247-252, 2006.

WAN, Y.; YANG, J.; YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly- (L-lactide) surface under shear stress field. ***Biomaterials***, v. 24, p. 3757-3764, 2003.

WANG, K.; JIA, Q.; HAN, F.; LIU, H.; LI, S. Self-assembled L-alanine derivative organogel as in situ drug delivery implant: characterization, biodegradability, and biocompatibility. ***Drug Development and Industrial Pharmacy***, v. 36, p. 1511–1521, 2010.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. ***Biomaterials***, v.29, p. 2941–2953, 2008.

WILSON, E.J. ***Thromboresistant plastic article and method of manufacture***. Estados Unidos patente US 6050980 A, 3 Ago. 1998, 18 Abr. 2000.

WU, L.; DING, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. ***Biomaterials***, v. 25, p. 5821-5830, 2004.

XUA, J.; LIUB, Z.; ERHANB, S.Z.; CARRIEREA, C.J. A potential biodegradable rubber - viscoelastic properties of a soybean oil-based composite. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 79, p. 593–596, 2002.

ZHANG, X.; REAGAN, M.R., KAPLAN, D.L. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 61, p. 988–1006, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Descrição das partes compreendidas na norma ISO 10993

ISO 10993 – Biological evaluation of medical devices	
Parte 1	Evaluation and testing within a risk management process
Parte 2	Animal welfare requirements
Parte 3	Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
Parte 4	Selection of tests for interactions with blood
Parte 5	Tests for in vitro cytotoxicity
Parte 6	Tests for local effects after implantation
Parte 7	Ethylene oxide sterilization residuals
Parte 9	Framework for identification and quantification of potential degradation products
Parte 10	Tests for irritation and skin sensitization
Parte 11	Tests for systemic toxicity
Parte 12	Sample preparation and reference materials
Parte 13	Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices
Parte 14	Identification and quantification of degradation products from ceramics
Parte 15	Identification and quantification of degradation products from metals and alloys
Parte 16	Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
Parte 17	Establishment of allowable limits for leachable substances
Parte 18	Chemical characterization of materials
Parte 19	Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials
Parte 20	Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices

Fonte: <http://www.iso.org/>

ANEXO B – Determinação dos testes de biocompatibilidade de acordo com o grau de interação biomaterial/tecido biológico.

Medical device categorization by				Biological effect						
Nature of body contact		Contact duration A – limited (≤ 24h) B – prolonged (> 24h to 30 d) C – permanent (> 30 d)	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or intracutaneous reactivity	Systemic toxicity (acute)	Subchronic toxicity (subacute toxicity)	Genotoxicity	Implantation	Hemocompatibility
Category	Contact									
Surface device	Skin	A	x ^a	x	x					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
	Mucosal membrane	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		
	Breached or compromised surfasse	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		
External communicating device	Blood path, indirect	A	X	X	X	X				X
		B	X	X	X	X				X
		C	X	X		X	X	X		X
	Tissue/boné/dentin	A	X	X	X					
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Circulating blood	A	X	X	X	X				X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X
Implant device	Tissue/boné	A	X	X	X					
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Blood	A	X	X	X	X	X		X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X

^a The crosses indicate data endpoints that can be necessary for a biological safety evaluation, based on a risk analysis. Where existing data are adequate, additional testing is not required.

Fonte: International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.

Anexo C – Determinação do grau de toxicidade de um biomaterial ou dispositivo médico de acordo com a relação da toxicidade da amostra e a diminuição da viabilidade celular.

Grade	Reactivity	Conditions of all cultures
0	None	Discrete intracytoplasmatic granules, no cell lysis, no reduction of cell growth
1	Slight	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached and without intracytoplasmatic granules, or show changes in morphology; occasional lysed cells are present; only slight growth inhibition observable
2	Mild	Not more than 50% of the cells are round, devoid of intracytoplasmatic granules, no extensive cells lyses; not more than 50% growth inhibition observable
3	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed; cell layers not completely destroyed, but more than 50% growth inhibition observable
4	Severe	Nearly complete or complete destruction of the cell layers

Fonte: International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.