

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

JOZIEL APARECIDO DA CRUZ

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE
POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)/TANFLOC COM POTENCIAL APLICAÇÃO
NA ÁREA BIOMÉDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2018

JOZIEL APARECIDO DA CRUZ

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE
POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)/TANFLOC COM POTENCIAL APLICAÇÃO
NA ÁREA BIOMÉDICA

Dissertação de Mestrado apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus Londrina*.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro

LONDRINA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

C957s Cruz, Joziel Aparecido da
Síntese e caracterização de filmes a base de Poli (Álcool vinílico) /
Tanfloc com potencial aplicação na área biomédica / Joziel Aparecido da
Cruz. - Londrina : [s.n.], 2018.
85 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins
Coorientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.
Londrina, 2018.
Bibliografia: f. 77-85.

1. Compostos poliméricos. 2. Taninos. 3. Materiais biomédicos.
I. Martins, Alessandro Francisco, orient. II. Monteiro, Johny Paulo, coorient.
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. V. Título.

CDD: 620.11

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais (PPGCEM)
Campus Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)/TANFLOC COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA

por

JOZIEL APARECIDO DA CRUZ

Dissertação de mestrado apresentada no dia 25 de Setembro de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Campus Londrina. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos Professores, conforme listado abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins
UTFPR – Campus Apucarana

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz (Membro titular)
UTFPR – Campus Londrina

Prof. Dr. Fabio Yamashita (Membro titular)
UEL - Londrina

Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
UTFPR – Campus Londrina

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais”;

Errar é humano, perdoar é preciso, e correr atrás daquilo que realmente queremos é uma obrigação. Viva, ame, pense, erre, caia, levante. E depois do erro corra atrás de refazer o seu acerto, faça tudo o que desejar fazer, diga te amo sem medo de não ouvir isso depois, aproveite a vida. Nunca se sabe o dia de amanhã.

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e, acima de tudo, quero agradecer a DEUS por me proporcionar vida, saúde, proteção, pessoas especiais que me ajudaram muito em minha caminhada e capacidade para alcançar mais esse importante objetivo pessoal. Além do mais, quero agradecer a DEUS por tantas bênçãos no meu dia-a-dia.

Quero agradecer os meus pais (José Francisco e Maria Inês) e meus irmãos (Jodson e Jocinei), que sempre estiveram ao meu lado, apoiando nas derrotas e vitórias. Meus pais sempre me deram apoio e incentivo para prosseguir em busca de meus sonhos e realizações profissional.

Em especial, quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins pela oportunidade, orientação, apoio, conhecimento transmitido e amizade ao longo do desenvolvimento desta dissertação. Definitivamente um excelente professor/pesquisador, extremamente dedicado ao que se propõe a fazer, sem dúvidas um profissional em que irei me espelhar.

Quero agradecer todos os Professores que nunca me negaram ajuda e que sempre colaboraram com a realização e interpretação de análises descritas nesta dissertação. Quero agradecer em especial os Professores Elton Bonafé, Johny Monteiro, Sandro Venter, Bruno Vilsinski, Edmilson Canesin e Patrícia Salomão.

Quero agradecer a parceria desenvolvida com a Universidade Estadual de Maringá pela realização de caracterizações, em especial ao Paulo e Jean que muito colaboraram com análises de FTIR ATR e MEV.

Quero agradecer os amigos e colegas de grupo de pesquisa do grupos de materiais, macromoléculas e compósitos – LA2MAC que sempre me apoiaram em tudo. Quero em especial citar os amigos e colegas de trabalho Ariel, Bruno, Debóra Facchi, Debora Almeida, Evandro, Ewerton, Fernanda, Jéssica e Sharise.

Quero agradecer os professores da Coordenação do curso de Engenharia Têxtil (COENT) que me apoiaram ao longo desses 2 anos de mestrado e, também, a oportunidade de atuar como professor temporário na UTFPR campus Apucarana.

E também quero agradecer ao Programa de Pós-graduação de Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina pela oportunidade de estar concluindo o mestrado para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

CRUZ, Joziel Aparecido. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)/TANFLOC COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA**. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Londrina, 2018.

RESUMO

Este estudo relata a síntese e caracterização de filmes a base de poli(álcool vinílico) (PVA) e tanfloc (TN), um derivado amino-funcionalizado sintetizado a partir de taninos condensados. Os filmes foram obtidos via método “casting” a partir de blendas poliméricas PVA/tanfloc (PVA/TN), partindo-se de soluções PVA a 5,0% m/v ou 10% m/v e tanfloc (TN) a 5% m/v. Blendas poliméricas foram preparadas em diferentes razões em massa de PVA/TN (100/0, 90/10, 80/20 e 50/50). O glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante para atribuir estabilidade aos filmes, sendo sua concentração ($1,7 \text{ g L}^{-1}$) mantida constante na maioria dos experimentos. Os materiais foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho no modo reflectância total atenuada (FTIR-ATR), análise termogravimétrica (TGA/DTG), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), medidas de ângulo de contato e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Filmes mais hidrofílicos foram obtidos partindo-se de blendas preparadas com PVA a 10% m/v. Os filmes apresentaram excelente estabilidade em solução PBS (pH 7,4) por até 14 dias, viabilizando sua aplicação como scaffolds. Os materiais também apresentaram citocompatibilidade sobre as linhagens celulares de fibroblastos (L929), células epiteliais (VERO) e células de macrófagos (J774A1) e sobre células tronco mesenquimais do tecido ósseo (MSCs). Além disso, testes mostraram que os filmes PVA/TN apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como atividade antioxidante. Estas propriedades foram decorrentes da presença do TN nos filmes e, também, dependeram da concentração de TN na composição final das blendas. Os filmes foram aplicados como suportes (scaffolds) para promoverem adesão e proliferação de células MSCs. Imagens de fluorescência e SEM revelaram que o filme mais hidrofílico (PVA10/TN10) atuou como matriz scaffold, pois em apenas 7 dias de estudo, a matriz promoveu fixação, proliferação e o espalhamento de células MSCs. De modo geral, o filme mais hidrofílico apresentou grande potencial para ser aplicado como scaffold, pois quando comparado a potencialidade biomédica do metal titânio (um dos dispositivos biomédicos mais importantes aplicados em implantes), confirmou-se à eficácia do filme PVA/TN para atuar na área de engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Hidrogéis, Taninos, Scaffolds, Engenharia de Tecidos, Atividade Bactericida, Citotoxicidade

CRUZ, Joziel Aparecido. **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF FILMS BASED ON POLYVINYL ALCOHOL/TANFLOC WITH POTENTIAL APPLICATION IN THE BIOMEDICAL FIELD.** Master's Qualification Project - Post-Graduate Program in Materials Science and Engineering (PPGCEM), Federal University of Technology (UTFPR). Londrina, 2018.

ABSTRACT

This study reports the synthesis and characterization of films based on polyvinyl alcohol (PVA) and tanfloc (TN), an amino-functionalized tannin derivative synthesized from condensed tannins. Films were obtained by “casting” method from PVA/TN polymer blends, using PVA solutions at 5.0 wt.% or 10% wt.% and Tanfloc (TN) solution at 5 wt.%. Polymeric blends were prepared in different PVA/TN weight ratios (100/0, 90/10, 80/20 and 50/50). Glutaraldehyde was used as a crosslinking agent to promote stability to the films, and its concentration ($1,7 \text{ g L}^{-1}$) was maintained constant in many assays. The materials were characterized through infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) mode, thermogravimetric analysis (TGA/DTG), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), contact angle measurements and scanning electron microscopy (SEM). More hydrophilic films were obtained using PVA at 10 wt.% to create PVA/TN blends. PVA/TN films presented excellent stability in PBS (pH 7.4) at least 14 days, making possible their application as scaffold matrices. All PVA/TN films had cytocompatibility on fibroblast cell lines (L929), epithelial cells (VERO) and macrophages (J774A1) cells and on bone mesenchymal stem cells (MSCs). In addition, some tests showed that PVA/TN films presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as antioxidant activity. These properties occurred due to the presence of TN in the films and also on the TN concentration in the final blend composition. The films were applied as scaffolds to promote adhesion and proliferation of MSCs. Fluorescence and SEM images revealed that the more hydrophilic film (PVA10/TN10) acted as a scaffold because in only 7 days of cell culture its matrix promoted fixation, proliferation, and spread of MSCs cells. In general, this more hydrophilic film showed great potential to be used as a scaffold because when compared to the biomedical activity of the titanium (one of the most important biomedical devices applied in implants), it was confirmed the effectiveness of the PVA/TN film to be used in tissue engineering arena.

Keywords: Hydrogels, Tannins, Scaffolds, Tissue Engineering, Bactericidal activity, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação hipotética da estrutura de um hidrogel químico (Fig. 1A) e um hidrogel físico (Fig. 1B).....	18
Figura 2. Estrutura geral do PVA.....	20
Figura 3. Polimerização do monômero acetato de vinila (Fig. 3A). Hidrólise parcial do poli(acetato de vinila) para formar o PVA com grau de hidrólise característico (Fig. 3B).	20
Figura 4. Estrutura química do glutaraldeído.....	21
Figura 5. Rota geral de síntese do hidrogel de PVA em catálise ácida na presença de glutaraldeído.....	22
Figura 6. Estrutura geral de um flavonoide (tanino condensado)	24
Figura 7. Estrutura geral do TN (cátion orgânico).....	25
Figura 8. Imagem das amostras PVA/TN (neutralizadas) obtidas a partir de blendas PVA/TN preparadas com soluções PVA a 5% e 10% (m/v).....	37
Figura 9. Imagem dos filmes PVA/TN (neutralizados) obtidos a partir da solução PVA5% (m/v). Amostras PVA5/TN0, PVA5/TN5, PVA5/TN10 e PVA5/TN20 foram reticuladas com glutaraldeído a 1,7 g L ⁻¹ (100 µL de glutaraldeído a 50% m/v).	38
Figura 10. Teste TN** (Tabela 2) mostrado a formação de um material a base de TN/glutaraldeído (Fig. 10A). Material residual de TN reticulado (com glutaraldeído a 1,7 g L ⁻¹) sobre papel filtro após lavagem e neutralização com água deionizada (Fig. 10B).....	39
Figura 11. Espectros FTIR-ATR das amostras: filme PVA* (não reticulado e não neutralizado), filmes PVA/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e TN.	42
Figura 12. Espectros FTIR-ATR das amostras: filme PVA* (não reticulado e não neutralizado), filmes PVA5/TN0, PVA10/TN05, PVA10/TN10 e TN.	43
Figura 13. Curvas TGA (Fig. 11A) e DTG (Fig. 11B) do PVA (pó), PVA5/TN0 e PVA* (filme não reticulado).....	45
Figura 14. Curvas TGA (Fig. 12A) e DTG (Fig. 12B) dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN5, PVA5/TN20 e TN.....	45
Figura 15. Curvas TGA (Fig. 13A) e DTG (Fig. 13B) dos filmes PVA5/TN0, PVA10/TN5, PVA10/TN10 e TN.....	45
Figura 16. Espectros XPS dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.	48

Figura 17. Espectros XPS de alta resolução C1s: PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.....	50
Figura 18. Espectros XPS de alta resolução N1s: filmes PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.	51
Figura 19. Imagens de SEM do TN (puro) e amostras dos filmes reticulados e secos PVA/5TN0, PVA5/TN10 e PVA5/TN20 (filmes neutralizados).....	52
Figura 20. Imagens SEM dos filmes PVA/TN preparados a partir da solução de PVA a 10% m/v. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio) após as mesmas estarem imersas em diferentes ambientes (SGF e PBS por 24 h), congeladas em N _{2(l)} e liofilizadas.	54
Figura 21. Imagens SEM dos filmes PVA/TN preparados a partir da solução de PVA a 10% m/v. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio) após as mesmas estarem imersas em água destilada (24 h), congeladas em N _{2(l)} e liofilizadas.....	54
Figura 22. Imagens SEM do filme PVA5/TN20. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio), após as mesmas estarem imersas (24 h) em diferentes ambientes (SGF, solução de ácido acético/acetato de sódio a pH 3,2 e PBS), congeladas em N _{2(l)} e liofilizadas.	55
Figura 23. Medidas de ângulo de contato sobre os filmes PVA/TN em função do tempo (intervalo de 10 min).....	56
Figura 24. Imagens digitais das superfícies dos filmes PVA5/TN0 (Fig. 24A), PVA5/TN10 (Fig. 24B), PVA5/TN20 (Fig. 24C) e PVA10/TN10 (Fig. 24D) realizadas na presença de uma gota de água. As imagens foram processadas após 0, 5 e 10 min de contato entre a superfície dos filmes com a gota de água.....	57
Figura 25. Grau de intumescimento (GI%) dos filmes PVA/TN avaliados em SGF e PBS (24 h). Resultados significativamente diferentes implicam $p \leq 0,0001$ (****) e $p \leq 0,001$ (***)......	58
Figura 26A. Degradação (%) dos filmes PVA/TN avaliados em SGF (pH 1,2) durante 1, 3, 5, 7 e 14 dias.....	60
Figura 26B. Degradação (%) dos filmes PVA/TN avaliados em PBS (pH 7,4) durante 1, 3, 5, 7 e 14 dias.....	61
Figura 27. Curvas de liberação de TN obtidas em PBS. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA5/TN10 e PVA5/TN20 durante 14 dias.	63
Figura 28. Curvas de liberação de TN obtidas em SGF. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA10/TN5 e PVA10/TN10 durante 14 dias.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais usadas para preparar os filmes PVA/TN.....	26
Tabela 2. Propriedades dos filmes PVA/TN reticulados com glutaraldeído na concentração de 1,7 g L ⁻¹	38
Tabela 3. Concentrações de TN na blenda PVA/TN, concentração de TN perdida da estrutura dos filmes após neutralização e rendimento de TN incorporado nos filmes.	40
Tabela 4. Valores de variação de massa (%) relacionada aos 4 eventos principais decorrentes das curvas de TGA.....	46
Tabela 5. Percentual relativo de grupos –NH ₃ ⁺ e razão –NH ₂ /–NH ₃ ⁺ nos filmes PVA/TN determinados por meio dos espectros XPS de alta resolução N1s (Fig. 18).	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
ANOVA	Análise de variância
CSU	<i>Colorado State University</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH [•]	Método de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTG	Derivada primeira das curvas de análise termogravimétrica
ET	Engenharia de tecidos
FTIR-ATR	Espectroscopia na região do Infravermelho no modo de reflectância total atenuada
GA	Glutaraldeído
MSCs	Células tronco mesenquimais do tecido ósseo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio
PBS	Solução tampão de fosfato
PVA	Álcool poli(vinílico)
PVA/TN	Filmes de álcool poli(vinílico)/tanfloc
RPMI	<i>Roswell park memorial institute medium</i>
SBF	Soro fetal bovino
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SGF	Fluído gástrico simulado
TGA	Análise termogravimétrica
TN	Tanfloc
VERO	Células epiteliais de rim de macaco verde africano
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)
α -MEM	<i>A-minimum essential medium</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 ÁREA DE ENGENHARIA DE TECIDOS E DEFINIÇÃO DE SCAFFOLDS.....	16
3.2 HIDROGÉIS	17
3.3. POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) E HIDROGÉIS	20
3.4. O DERIVADO DE TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO (TANFLOC).....	23
4. METODOLOGIA	25
4.1. MATERIAIS	25
4.2. MÉTODOS	26
4.2.1. Preparo dos filmes a partir de blendas poliméricas PVA/TN	26
4.2.2. Rendimento de incorporação do tanfloc nos filmes PVA/TN.....	27
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PVA/TN	28
4.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR).....	28
4.3.2. Análise termogravimétrica (TGA/DTG)	28
4.3.3. Espectroscopia de fotoelétrons de raio-X (XPS).....	29
4.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	29
4.3.5. Medidas de ângulo de contato	30
4.4. PROPRIEDADES DOS FILMES PVA/TN	30
4.4.1. Grau de intumescimento.....	30
4.4.2. Degradação <i>in vitro</i> dos filmes.....	30
4.5. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES PVA/TN	31
4.5.1. Atividade antioxidante.....	31
4.5.2. Atividade antimicrobiana	32
4.5.2.1 <i>Microorganismos utilizados e condições de crescimento</i>	32
4.5.2.2 <i>Ensaio antimicrobiano via método disco-difusão</i>	32
4.5.3. Ensaio de citotoxicidade via método MTT	32
4.5.4. Cultura de células tronco mesenquimais de tecido ósseo (MSCs).....	33
4.5.4.1. <i>Extração de células tronco mesenquimais</i>	33
4.5.4.2. <i>Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) via método AlamarBlue</i>	34
4.5.4.3. <i>Ensaio de adesão e proliferação celular</i>	34
4.5.4.3.1. <i>Via imagens de fluorescência</i>	34
4.5.4.3.2. <i>Via microscopia eletrônica de varredura</i>	35
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. FORMAÇÃO DOS FILMES PVA/TN	37
5.2 RENDIMENTO E INCORPORAÇÃO DO TANFLOC NOS FILMES PVA/TN	40
5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PVA/TN	41
5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR).....	41
5.3.2. Análise termogravimétrica (TGA/DTG)	44
5.3.3. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS).....	48
5.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	52
5.3.5. Medidas de ângulo de contato sobre os filmes PVA/TN.....	56
5.4.1. Grau de intumescimento.....	58
5.4.2. Degradação dos filmes PVA/TN	60
5.5. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES PVA/TN	62
5.5.1. Atividade antioxidante e estudos de liberação controlada	62
5.5.2. Atividade antimicrobiana dos filmes PVA/TN	65
5.5.3. Citocompatibilidade dos filmes PVA/TN.....	67
5.5.3.1. <i>Via método MTT</i>	67
5.5.3.2. <i>Via método AlamarBlue</i>	68
5.5.4. Ensaio de adesão e proliferação celular	71
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, diversas pesquisas tem destacado o uso de hidrogéis como scaffolds para aplicações no campo de engenharia de tecidos, como matrizes carreadoras de fármacos (área farmacêutica), como sistemas para condicionamento de solos (agricultura), agentes adsorventes de poluentes em efluentes e águas residuárias (área ambiental), agentes promovedores de cicatrização de ferimentos (área biomédica) e como filmes para embalagens de alimentos (indústria de alimentos) (VARAPRASAD *et al.*, 2017; GUILHERME *et al.*, 2015; FACCHI *et al.*, 2018).

Os hidrogéis são constituídos de redes poliméricas com estrutura tridimensional. Estes são capazes de intumescer quando em contato com água e fluidos biológicos, podendo manter sua integridade física, mesmo quando intumescidos (AHMED, 2015). Os hidrogéis também podem possuir propriedades de citocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, propriedades mecânicas adequadas e responder a estímulos externos, tais como variações de temperatura, pH e força iônica. Todas estas propriedades tornam os hidrogéis materiais com potencial para serem aplicados na indústria médico-farmacêutica, indústria de alimentos, no campo de engenharia de tecidos, agricultura e meio ambiente (KAMOUN *et al.*, 2017).

O poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético e hidrofílico, amplamente estudado devido às suas propriedades de baixa toxicidade, biodegradabilidade e citocompatibilidade (SWAROOP *et al.*, 2016). Devido a isso, o PVA e materiais a base de PVA podem ser utilizados em aplicações tecnológicas. No campo médico-farmacêutico, hidrogéis filmes a base de PVA são utilizados como dispositivos para liberação controlada de fármacos e scaffolds (CRISPIM *et al.*, 2012).

Hidrogéis a base de PVA podem ser preparados por meio dos processos de reticulação química ou física. O processo mais comum para obter hidrogéis de PVA é por meio da reticulação química. Neste caso, os agentes de reticulação, tais como glutaraldeído, acetaldeído, formaldeído, epícloridrina, carbodiimidas e outros são amplamente utilizados (YANG *et al.*, 2017; MARTUCCI *et al.*, 2012). Os agentes de reticulação podem conferir estabilidade aos hidrogéis de PVA no processo de dissolução e, também, podem aumentar a citotoxicidade do material. Porém, o aumento de citotoxicidade dependerá de outros fatores. Estes fatores serão abordados neste estudo. Assim, esta dissertação relata a síntese de hidrogéis a base

de PVA (no formato de filmes) reticulado com glutaraldeído. Este agente reticulante foi escolhido devido ao seu baixo custo e excelente potencial para reagir com o PVA (YU *et al.*, 2011).

Além disso, a reticulação entre PVA e glutaraldeído pode melhorar a resistência mecânica e a estabilidade térmica de materiais a base de PVA (YU *et al.*, 2011). Por exemplo, filmes scaffolds de PVA aplicados na área de engenharia de tecidos como matrizes para promover cicatrização e regeneração da pele humana devem, necessariamente, apresentar resistência à tração na faixa de 5 a 30 MPa, uma vez que a resistência à tração da pele humana pode variar nesta faixa, dependendo do local e orientação do tecido (EDWARDS e MARKS 1995).

Neste caso, o biomaterial deve mimetizar o tecido biológico e, então, promover uma resposta satisfatória. Na engenharia de tecidos, o biomaterial scaffold deve promover fixação e proliferação de células, bem como, formar novos tecidos (reparação e cicatrização tecidual). Contudo, biomateriais a base de PVA podem ser susceptíveis a adesão e proliferação de bactérias (KAMOUN *et al.*, 2017; SALOMÉ VEIGA e SCHNEIDER 2013). Este fato limita a aplicação destes filmes na área biomédica, especialmente na área de engenharia de tecidos, onde se requer dispositivos para cicatrização, reparação de tecidos e dispositivos com capacidade para inibir o crescimento de bactérias. Na América Latina, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são responsáveis por 7,5% das infecções causadas na corrente sanguínea, 31,2% de pneumonia e 13,8% de infecções causadas sobre o tecido da pele e outros tecidos moles (JOACHIMS *et al.*, 2003 - MARTIS *et al.*, 2018a).

Diversas pesquisas abordam a incorporação de materiais com atividade antimicrobiana em filmes a base de PVA reticulados com glutaraldeído. Dentre estes, recebem destaque as nanopartículas de prata (HUAWEI *et al.*, 2017), nanopartículas de óxido de zinco (GUTHA *et al.*, 2017), quitosana (HAJJI *et al.*, 2016), derivados de quitosana (YU *et al.*, 2011) e outros. Porém, materiais scaffolds com base nas formulações citadas anteriormente já foram amplamente estudados e aplicados no campo de engenharia de tecidos, principalmente para promoverem regeneração e reparação tecidual (KONG *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2013; RAVINDRAN *et al.*, 2013; CARBONE *et al.*, 2016; GOY *et al.*, 2016; TACHABOONYAKIAT, 2016). Além disso, ainda existem dúvidas a respeito da citocompatibilidade destes materiais.

Dessa forma a presente pesquisa mostra com detalhe o potencial biomédico de filmes de PVA associados com TN e reticulados com glutaraldeído.

Para aplicações biomédicas, o uso de nanopartículas metálicas pode apresentar sérias limitações. Nanopartículas possuem baixa estabilidade devido à elevada área superficial e tendem naturalmente a se agregarem (FACCHI *et al.*, 2017b). O processo de agregação leva à perda de suas propriedades. Por exemplo, estudos indicam que a atividade antimicrobiana de nanopartículas metálicas ocorre quando estas apresentam em torno de até 10 nm de diâmetro (MARTINS *et al.*, 2014). Este tamanho é suficiente para que estas partículas adentrem às membranas de micro-organismos e desempenhem mecanismos para inibir o crescimento e induzir a morte destes micro-organismos (MARTINS *et al.*, 2014).

Almejando obtenção de filmes com atividade antimicrobiana, a quitosana recebe grande destaque para ser associada ao PVA (TRIPATHI, MEHROTRA e DUTTA 2009). Contudo, além da quitosana já ter sido muito estudada, esta possui baixa solubilidade em água e, ainda, soluções de quitosana são difíceis de serem manipuladas, devido à elevada viscosidade.

Por isso, este estudo tem como objetivo associar o PVA com um polímero catiônico (amino-funcionalizado), comercialmente conhecido como tanfloc (TN). O TN é obtido principalmente a partir de taninos condensados, extraídos da espécie *Acacia decurrens*, popularmente conhecida como Acácia Negra (BELTRÁN-HEREDIA *et al.*, 2009). O TN é extensivamente utilizado como agente de coagulação e floculação no tratamento de águas residuárias e efluentes (MANGRICH *et al.*, 2014). Por outro lado, há apenas um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa relatando pela primeira vez a atividade antimicrobiana do TN e complexos polieletrólíticos de TN/alginate contra *S. aureus* e *E. coli*, bem como, a citocompatibilidade dos materiais (FACCHI *et al.*, 2017a). Além do mais, os taninos condensados com grandes porções de grupos fenólicos em suas estruturas são conhecidos por terem atividade antimicrobiana contra micro-organismos biodeterioradores de madeira (e outros tipos de micro-organismos) (GUILLGUERRERO *et al.*, 2016), sendo responsáveis pelo mecanismo de defesa de plantas (MONTEIRO *et al.*, 2005). Por isso, o TN pode ser uma alternativa interessante para aplicações biomédicas em relação ao uso de nanopartículas metálicas e, se trata de uma alternativa inovadora em relação à quitosana.

Desta forma, o presente trabalho aborda a síntese e caracterização de filmes de PVA associados com TN. Os filmes foram obtidos por meio de blendas PVA/TN preparadas a partir de soluções de PVA a 5,0% m/v ou 10% m/v, usando diferentes razões PVA/TN (massa/massa; m/m). Os filmes foram reticulados com glutaraldeído e obtidos via método “casting”. O propósito foi obter novos hidrogéis (filmes) com atividade antimicrobiana, antioxidante, citocompatíveis e com potencial para atuarem como matrizes scaffolds na área de engenharia de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar filmes scaffolds a base de PVA/TN com potencial para serem aplicados na área de engenharia de tecidos.

- Sintetizar filmes de PVA/TN reticulados com glutaraldeído variando a concentração de PVA e a razão PVA/TN (m/m);
- Caracterizar os filmes obtidos por meio de espectroscopia na região de Infravermelho no modo de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), análise termogravimétrica (TGA/DTG), microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) e medidas de ângulo de contato;
- Realizar ensaios de intumescimento e investigar se os filmes atuam como matrizes carreadoras do TN nos meios de fluido gástrico simulado (SGF) e tampão fosfato (PBS).
- Avaliar a propriedade de citocompatibilidade, bem como, a atividade antioxidante e antimicrobiana.
- Realizar ensaios de cultura de células utilizando os filmes scaffolds de PVA/TN.
- Comparar o potencial biomédico dos filmes scaffolds com amostras de titânio.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ÁREA DE ENGENHARIA DE TECIDOS E DEFINIÇÃO DE SCAFFOLDS

De acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), em 2017 apenas 23.742 pacientes conseguiram receber transplante de órgãos, enquanto 39.362 pacientes esperam em filas (ABTO, 2017). Além da espera, após receberem transplante, os pacientes são submetidos a medicamentos imunossupressores (usados para minimizar a rejeição do tecido ou órgão transplantado) pelo resto de suas vidas (MARSHALL e BROWNER, 2007). O tratamento com imunossupressores é essencial, pois o alotransplante (prática de transplante que ocorre entre indivíduos de uma mesma espécie mas geneticamente diferentes) é tido como o mais comum (LANGER e VACANTI, 1999). Uma alternativa para superar as limitações do alotransplante é aplicar células (de um determinado tecido) do paciente em um material (scaffold) que possa promover adesão das células aplicadas, bem como, proliferação e espalhamento das células para formação de novos tecidos. Dessa forma, materiais scaffolds podem reduzir o longo tempo de espera em filas para recebimento de transplante de órgãos e tecidos, minimizando o risco de rejeição e a necessidade de cirurgia de alto risco pós-transplante (NAAHIDI *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o campo de engenharia de tecidos se trata de uma área interdisciplinar que surgiu por meio da combinação de outras áreas, tais como a biologia celular, ciências médicas básicas e veterinárias, ciência de transplantes, ciência dos materiais, biomateriais, biofísica, bioimunologia, biomecânica e engenharia biomédica (DEB *et al.*, 2018; NAAHIDI *et al.*, 2017). De modo geral, o campo de engenharia de tecidos visa o desenvolvimento de novos materiais com propriedades que mimetizem tecidos biológicos e, assim, atuem na regeneração, reconstrução, reparação e formação de tecidos do corpo humano. O material scaffold citocompatível implantado em um paciente deve mimetizar o ambiente biológico, regenerando o tecido danificado e formando um novo tecido (WAGHMARE *et al.*, 2018). Portanto, o objetivo é desenvolver materiais responsivos com propriedades semelhantes às desempenhadas por tecidos do corpo humano (DELUZIO *et al.*, 2013).

Portanto, um material *scaffold* consiste em uma matriz tridimensional, geralmente porosa, com estrutura homogênea contendo poros interconectados ou,

ainda, um material com superfície lisa e homogênea capaz de suportar a adesão, migração e proliferação de células quando estas são semeadas sobre o material scaffold (DEB *et al.*, 2018). Scaffolds devem possuir propriedades mecânicas adequadas para serem manipulados durante sua aplicação e devem suportar os esforços decorrentes de sua utilização. Ainda, scaffolds necessitam ser citocompatíveis e devem mimetizar tecidos do corpo humano (YANG *et al.*, 2017). Todo o processo é governado pela superfície do material e, caso haja poros na superfície deste, a geometria e tamanho dos poros dos scaffolds desempenham papel fundamental no transporte de oxigênio e nutrientes para as células em crescimento (WAGHMARE *et al.*, 2018).

Em geral, os scaffolds devem mimetizar a estrutura e as funções desempenhadas pela membrana extracelular (ECM). A ECM executa certas funções, tais como: i) regula a estocagem e armazenamento de moléculas solúveis; ii) oferece suporte mecânico para ancoragem celular; iii) controla o crescimento e proliferação celular; iv) determina a orientação celular; v) controla a renovação ordenada de tecidos; vi) estabelece microambientes teciduais; e vii) promove a diferenciação celular. Assim, a ECM é responsável pelas chamadas “decisões de destino celular”. Os principais componentes da ECM são as proteínas fibrilares (colágenos e elastina), proteínas adesivas (fibronectina e laminina), glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, heparina e sulfato de condroitina) e proteoglicanos, entre outros. Quando os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente em proteínas, estas espécies são denominadas de proteoglicanos (FACHHI *et al.*, 2017b). Desta forma, um material scaffold deve desempenhar todas estas funções.

Atualmente, diferentes materiais têm sido explorados como scaffolds para serem empregados na área de engenharia de tecidos. Os materiais utilizados como scaffolds podem ser divididos em materiais metálicos (inorgânicos), poliméricos (naturais ou sintéticos) e materiais compósitos (BAI *et al.*, 2018). Dentre os materiais poliméricos, os hidrogéis tem atraído atenção para serem aplicados como scaffolds, devido às suas propriedades de hidrofiliabilidade, estabilidade e propriedades mecânicas adequadas (WANG *et al.*, 2018).

3.2 HIDROGÉIS

Os hidrogéis são classificados em hidrogéis físicos e hidrogéis químicos (CRISPIM, *et al.*, 2012; AKHTAR, *et al.*, 2016). A Fig. 1 representa a estrutura

hipotética de um hidrogel químico (Fig. 1A) e de um hidrogel físico (Fig. 1B). No hidrogel químico, a estrutura é estabelecida por redes poliméricas organizadas e reticuladas por glutaraldeído, devido à ocorrência de ligações químicas (covalentes) ao longo da rede polimérica. O processo de reticulação pode ser controlado e depende das condições experimentais utilizadas para sintetizar o hidrogel. O processo de reticulação pode ocorrer por meio de polimerização radicalar, reação de adição, reação de condensação, e outros. Geralmente, os hidrogéis químicos são formados por estruturas permanentes, estáveis e insolúveis em água (VARAPRASAD, *et al.*, 2017).

Por outro lado, os hidrogéis físicos são na sua grande maioria reversíveis podendo em alguns casos serem irreversíveis (MARTINS, *et al.*, 2018c). Esta característica depende do grau de entrelaçamento (aleatório) das redes poliméricas, devido ao estabelecimento de interações de cargas opostas e interações secundárias (interações intermoleculares ou interações de segunda ordem) entre os constituintes da matriz polimérica do hidrogel (HASSAN e PEPPAS, 2000).

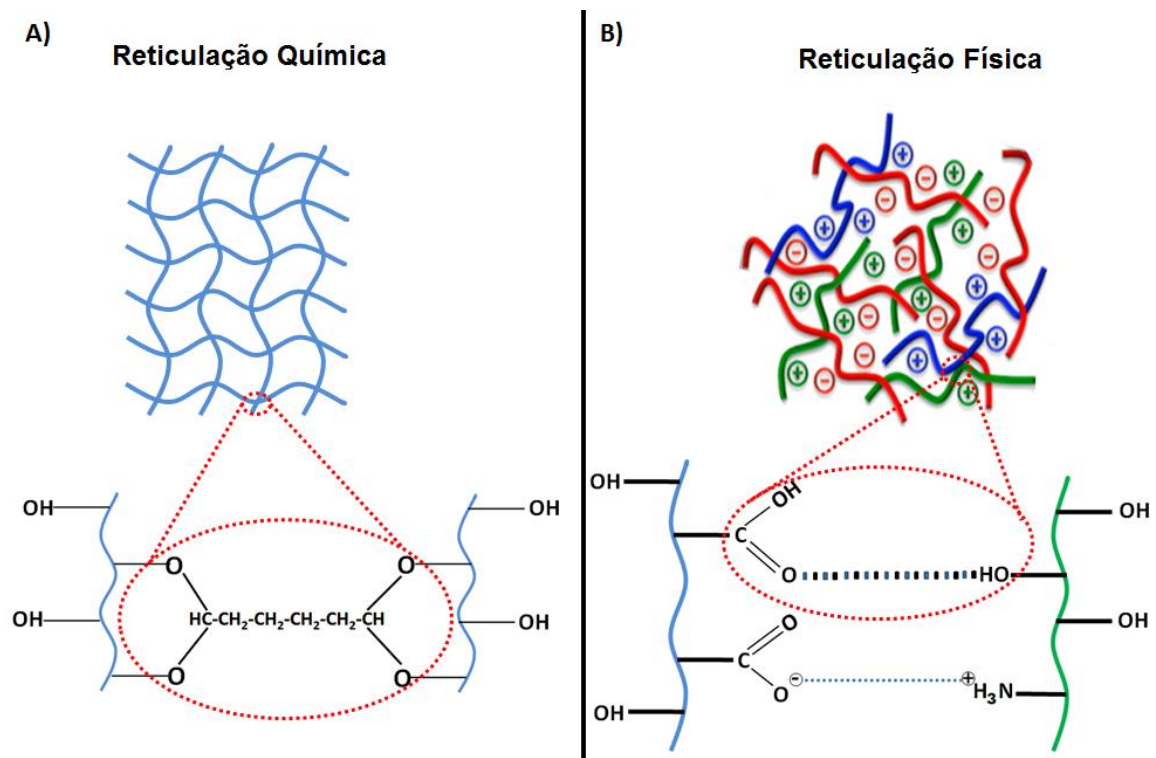


Figura 1. Representação hipotética da estrutura de um hidrogel químico (Fig. 1A) e um hidrogel físico (Fig. 1B).

O grau de entrelaçamento depende de muitos fatores, tais como, pH das soluções dos polieletrólitos precursores, força iônica, temperatura, espécies químicas

envolvidas, massa molar dos polímeros, solubilidade e outras (HOFFMAN 2012). A estrutura de um hidrogel físico é mantida por meio da ocorrência de interações de primeira ordem (interações eletrostáticas) e interações intermoleculares (principalmente interações de ligação de hidrogênio). Tentor *et al* (2017) obtiveram hidrogéis físicos irreversíveis e estáveis de quitosana/pectina devido a formação de interações de segunda ordem efetivas entre os polissacarídeos.

Polissacarídeos e proteínas são biopolímeros naturais que podem ser associados com polímeros sintéticos para obtenção de hidrogéis químicos citocompatíveis, para aplicação na área biomédica (SALOMÉ VEIGA e SCHNEIDER 2013). Por outro lado, o PVA, policaprolactona, poli(óxido de polietileno), poli(ácido láctico), entre outros, são polímeros sintéticos que, também, possuem potencial para formar matrizes de hidrogéis (SALOMÉ VEIGA e SCHNEIDER 2013). Polímeros naturais e sintéticos são associados para produção de hidrogéis, pois os naturais agregam citocompatibilidade ao material final, enquanto os sintéticos melhoram as propriedades mecânicas. Hidrogéis são amplamente utilizados nas áreas de liberação controlada de fármacos, como dispositivos scaffolds que promovem cicatrização de feridas, formação de tecidos danificados e, podem ser utilizados em revestimentos de superfície para implantes (PEPPAS *et al.*, 2006; TIBBITT *et al.*, 2009; CENSI *et al.*, 2012). Neste estudo, iremos utilizar o tanfloc (TN) como biopolímero de fonte natural. Este será associado ao PVA (biopolímero sintético) para obter hidrogéis scaffolds (filmes) com atividade antimicrobiana, antioxidante e citocompatibilidade.

Hidrogéis com atividade antimicrobiana são interessantes para formulação de curativos e bandagens. Devido a capacidade de reterem grandes quantidades de água em suas matrizes; os hidrogéis podem manter hidratado o ambiente onde são aplicados como bandagens. Este efeito diminui o atrito com a região do corpo à qual está em contato com o hidrogel (bandagem). Então, o hidrogel torna a pele hidratada, facilitando à atividade celular que é essencial para o processo de cicatrização. No entanto, o ambiente úmido pode facilitar a proliferação de bactérias, aumentando as chances de ocorrer infecções no local do ferimento (SALOMÉ VEIGA e SCHNEIDER 2013). Este fato pode ser evitado se a matriz do hidrogel possuir componentes com atividade antimicrobiana. Sendo assim, o preparo de hidrogéis com ação antimicrobiana possui interesse para aplicações em sistemas de bandagens.

3.3. POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) E HIDROGÉIS

O PVA é um polímero sintético, hidrossolúvel, possui baixa toxicidade, apresenta citocompatibilidade com tecidos biológicos e é biodegradável (RAFIQUE *et al.*, 2016). Devido à essas características, este polímero tem sido usado em diferentes aplicações biomédicas, como na engenharia de tecidos e na obtenção de matrizes carreadoras de fármacos (SHAHZAD *et al.*, 2015; RIZWAN *et al.*, 2017). Esse polímero apresenta estrutura química linear contendo grupos hidroxila (–OH) ligados alternadamente na cadeia principal (Fig. 2). O PVA é obtido por meio da polimerização por adição do monômero acetato de vinila (Fig. 3A), seguida da reação de hidrólise do poli(acetato de vinila) (Fig. 3B) (CHANG *et al.*, 2000). O PVA possui grau de hidrólise característico. Este efeito depende do processo de síntese do PVA, no qual utiliza-se o poli(acetato de vinila) como precursor. A conversão do poli(acetato de vinila) em PVA é promovida por uma reação de hidrólise (Fig. 3B). Esta reação não ocorre de forma completa, resultando em polímeros de PVA com graus de hidrólise característicos. Sendo assim, o PVA parcialmente hidrolisado é um copolímero de PVA com poli(acetato de vinila) (CHANG *et al.*, 2000).

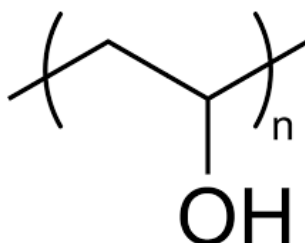


Figura 2. Estrutura química do PVA.

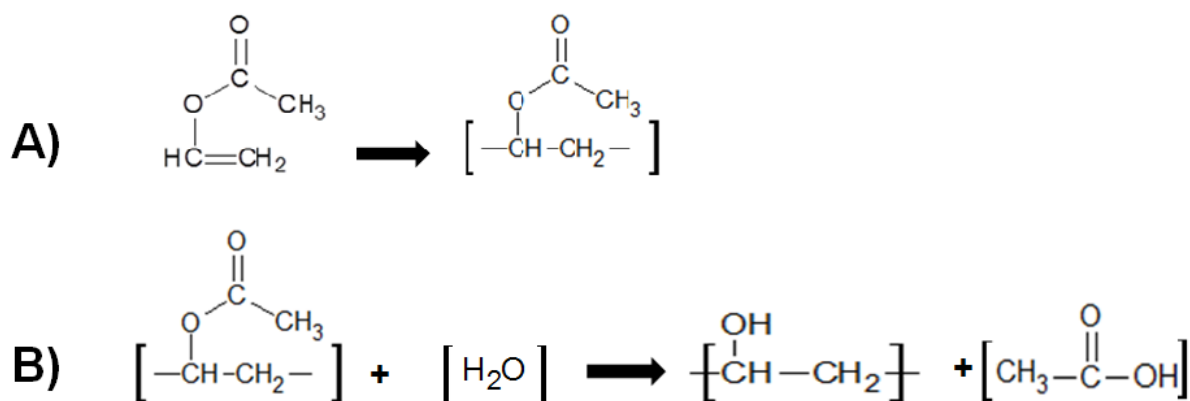


Figura 3. Polimerização do monômero acetato de vinila (Fig. 3A). Hidrólise parcial do poli(acetato de vinila) para formar o PVA com grau de hidrólise característico (Fig. 3B).

Segundo Halima (2016), as características físico-químicas do PVA dependem do seu grau de hidrólise. Um grau de hidrólise elevado dificulta a solubilidade do PVA em água, produzindo soluções mais viscosas e materiais com maior resistência à tração. As características ocorrem devido ao estabelecimento efetivo de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio entre os grupos –OH) entre as cadeias poliméricas de PVA conduzindo a um maior grau de cristalinidade. Por outro lado, um menor grau de hidrólise promove propriedades opostas às descritas anteriormente, pois os grupos acetato residuais são mais hidrofóbicos, diminuindo a efetividade das interações de segunda ordem na estrutura do PVA (HASSAN e PEPPAS, 2000).

Vários agentes de reticulação podem ser utilizados para promoverem hidrogéis químicos a base de PVA. Como citado anteriormente, o glutaraldeído tem se destacado para promover reticulação de sistemas a base de PVA devido à sua alta reatividade e seletividade aos grupos –OH presentes na estrutura do PVA (MAITRA e SHUKLA, 2014; VARAPRASAD, *et al.*, 2017). A Fig. 4 representa a estrutura molecular do glutaraldeído. Este é um di-aldeído com carbonilas suscetíveis ao ataque nucleofílico de grupos hidroxilas do PVA (PEREIRA, 2009). Este ataque é favorecido na presença de soluções ácidas diluídas (catálise ácida), devido à ativação parcial das carbonilas.

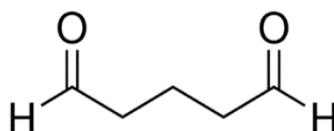


Figura 4. Estrutura química do glutaraldeído.

A hidrólise do PVA ocorre facilmente em soluções ácidas diluídas, possibilitando formação de pontes acetais e, conseqüentemente, formação do hidrogel de PVA devido à reticulação química (CHANG *et al.*, 2000). A Fig. 5 apresenta à rota geral de síntese do hidrogel de PVA reticulado com glutaraldeído. A reação ocorre em termos de um equilíbrio químico e é potencializada pela catálise ácida. Como pode se observar pela Fig. 5 a formação do hidrogel de PVA reticulado com glutaraldeído ocorre no equilíbrio na proporção estequiométrica de 4 mols de PVA para cada mol de glutaraldeído.

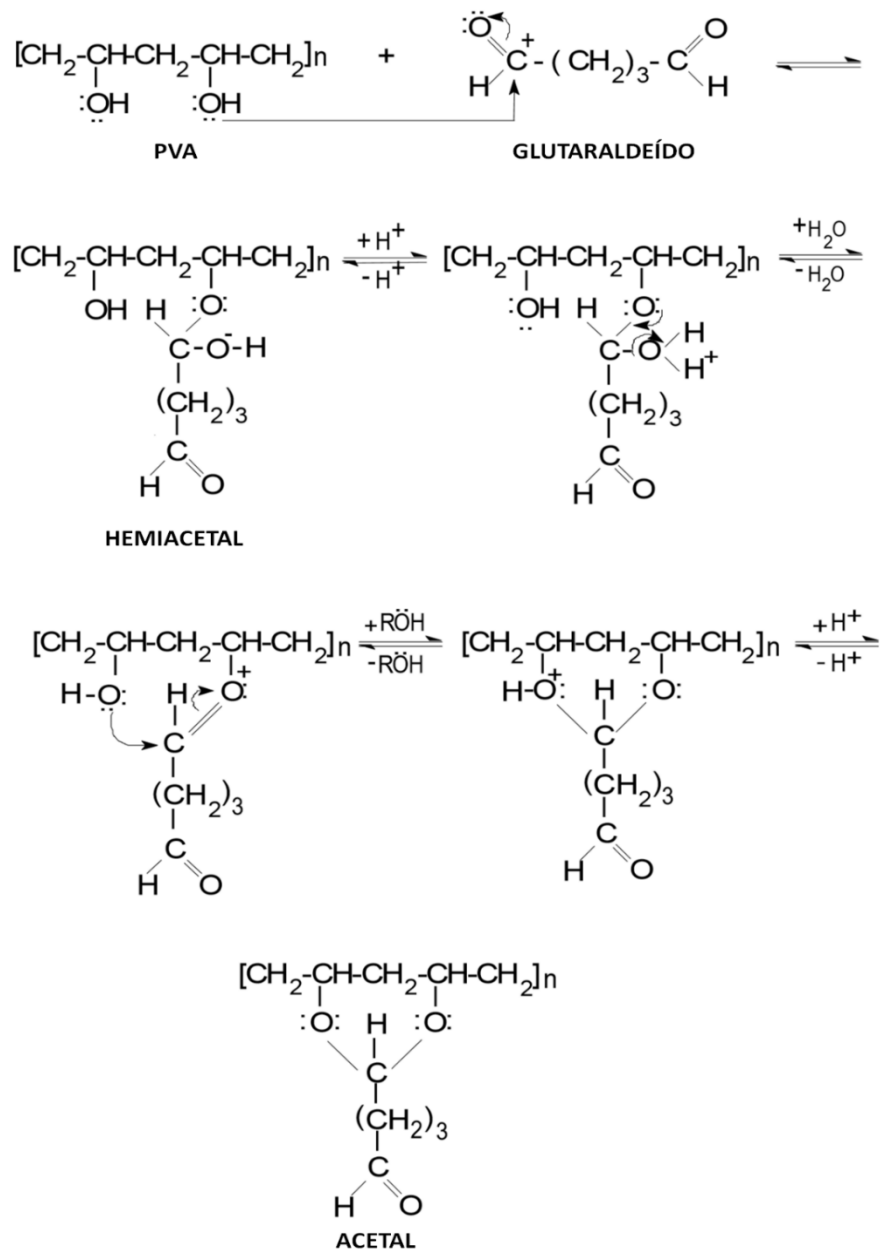


Figura 5. Rota geral de síntese do hidrogel de PVA em catálise ácida na presença de glutaraldeído.
Fonte: Adaptado de MELLO-JUNIOR (2006).

Hidrogéis filmes de PVA reticulados com glutaraldeído possuem grande potencial para serem aplicados no campo biomédico. Yu *et al* (2011) prepararam filmes a base de PVA e um derivado de quitosana (cloreto de N-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana) reticulados com glutaraldeído. Estes filmes apresentaram renomada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Escherichia coli* (*E. coli*), inibindo 99% das bactérias durante um período de incubação de 24h. Vimala *et al* (2011) sintetizaram filmes de PVA/quitosana encapsulados com nanopartículas de prata e curcumina. Estes filmes apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Estes filmes proporcionaram potencial para atuarem

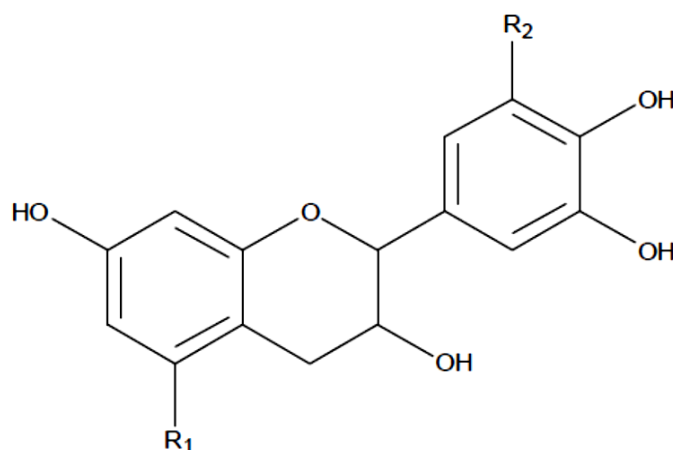
como bandagens, principalmente devido à capacidade de inibir proliferação de bactérias causadoras de doenças de pele (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) (MARTINS *et al.*, 2014).

Golafshan *et al* (2017) desenvolveram hidrogéis de PVA/alginato, visando obtenção de scaffolds com atividade cicatrizante. Os hidrogéis PVA/alginato apresentaram excelente citocompatibilidade (98% de viabilidade celular em 7 dias de incubação) para com as células osteoblastos (MG63) e, ainda, promoveram viabilidade celular de 180% para células fibroblastos (CD44) em um tempo de incubação de 7 dias.

3.4. O DERIVADO DE TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO (TANFLOC)

Taninos condensados são produzidos em escala industrial pela empresa TANAC SA (Montenegro, RS). A empresa realiza extração de taninos condensados a partir da casca da árvore, popularmente conhecida como Acácia Negra (MONTEIRO *et al.*, 2005). A estrutura geral dos taninos condensados é ilustrada na Fig. 6 (MANGRICH *et al.*, 2013). Os taninos condensados apresentam estrutura geral de um flavonoide (flavan-2-ol) (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016). Todos os flavonoides têm estrutura geral formada por dois anéis aromáticos, unidos através de uma cadeia com três átomos de carbono, contendo um heteroátomo de oxigênio (Fig. 6) (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016). Os flavonoides têm atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, devido principalmente ao grande conteúdo de sítios fenólicos em suas estruturas (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016).

Vários ácidos fenólicos, tais como os ácidos tirosol, gálico, cafeico, ferulico e clorogênico têm sido relatados na literatura, devido ao excelente potencial antimicrobiano. Foi demonstrado que ácidos fenólicos promovem ação antimicrobiana pela difusão dos grupos fenólicos ácidos (não ionizados) através da membrana celular de bactérias, promovendo acidificação do citoplasma e, conseqüente, morte celular (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016).



$R_1 = H, R_2 = OH$: Robinetinidol $R_1 = H, R_2 = H$: Fisetinidol

$R_1 = OH, R_2 = H$: Catequina $R_1 = OH, R_2 = OH$: Galocatequina

Figura 6. Estrutura química geral de um flavonoide (tanino condensado).
Fonte: Mangrich *et al* (2013).

Além disso, segundo Friedman *et al* (2006), os flavonoides exibem capacidade para formar complexos com as membranas celulares de bactérias, promovendo a morte das mesmas. Friedman *et al.* (2006) apresentaram um extrato a base de flavonoides (composto principalmente pela catequina e epicatequina) com atividade bactericida contra *Bacillus cereus* (uma bactéria gram-positiva). Em concentrações similares ($100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) estes compostos foram frequentemente mais ativos do que os antibióticos tetraciclina e vancomicina (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016).

O TN é um polímero catiônico sintetizado a partir de taninos condensados (Fig. 7). O TN é comercializado pela empresa TANAC SA, que produz o TN em escala industrial. A rota de síntese do TN se baseia em uma catálise ácida, proposta por Mannich. A reação ocorre na presença de excesso de formaldeído e cloreto de amônio (BELTRÁNHEREDIA *et al.*, 2010). Na verdade, o TN é um sal e sua estrutura é formada por um cation orgânico (Fig. 7), estabilizado pelo contra íon cloreto proveniente do cloreto de amônio. O cátion orgânico de TN prevalece em soluções aquosas de ácidos diluídos (pHs < 6), uma vez que o pK_a dos grupos $-NH_2$ é em torno de 6,0. A massa molar do TN pode chegar a 600 kDa (GRAHAM *et al.*, 2008).

O TN tem recebido grande destaque no tratamento de águas residuárias e efluentes, pois atua como agente coagulante e floculante. O TN é uma alternativa ao uso de agentes de coagulação tradicionais (tóxicos), tais como o sulfato de alumínio e o sulfato de ferro(II) (BELTRAN-HEREDIA *et al.*, 2010).

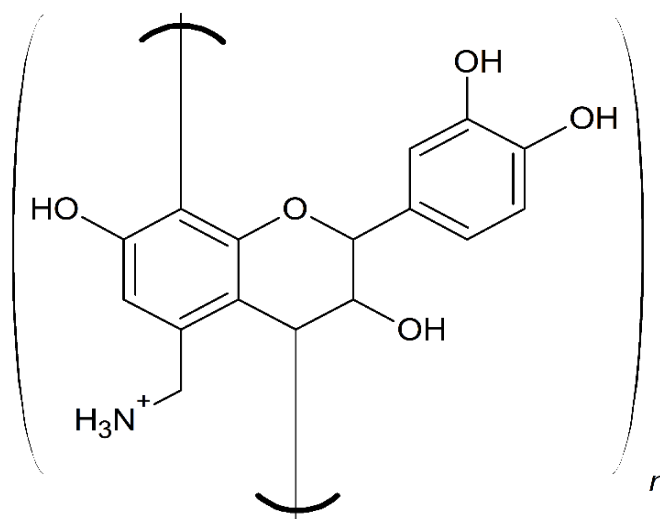


Figura 7. Estrutura química geral do TN (cátion orgânico).
Fonte: MARTINS *et al.*, 2018a.

Além do mais, um trabalho recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa reportou pela primeira vez que o TN tem grandes potenciais para uso em aplicações biomédicas (FACCHI *et al.*, 2017). Foi demonstrado que o TN apresenta atividade bactericida contra *E. coli* e *S. aureus*. Sobre *S. aureus*, o TN apresentou concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de 125 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Assim como a quitosana, acredita-se que os sítios catiônicos de ambos os polímeros possam interagir com as células microbianas carregadas negativamente, levando à ruptura da membrana celular e, posteriormente, evasão de componentes proteicos e outros constituintes intracelulares. Por isso, o TN é um candidato interessante para ser associado ao PVA, visando obtenção de filmes com potencial aplicação na área de engenharia de tecidos.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

Poli(álcool vinílico) com grau de hidrólise de 80% e massa molar entre 9 a 10 kDa, bem como, a solução aquosa de glutaraldeído (50% m/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O derivado amino-funcionalizado (Tanfloc, TN) foi gentilmente doado pela empresa TANAC SA (Montenegro-RS, Brasil).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo dos filmes a partir de blendas poliméricas PVA/TN

O procedimento experimental adotado por Yu e colaboradores (2011) foi utilizado neste estudo com adaptações para produção dos filmes PVA/TN. Os filmes PVA/TN foram rotulados como PVA(X)/TN(Y), onde X representa as concentrações das soluções de PVA (5,0 ou 10% m/v) utilizadas para preparar as blendas e Y representa a porcentagem em massa de TN na blenda PVA/TN (Tabela 1). Por exemplo, o filme PVA5/TN20 foi obtido a partir da solução de PVA 5,0% m/v com concentração de 20% em massa de TN na blenda (20% em relação à massa total de polímeros contidos em 30 mL da blenda).

Tabela 1. Condições experimentais usadas para preparar os filmes PVA/TN.

Amostras	TN 5% m/v (mL)	PVA 5% ou 10% m/v (mL)	TN (g)	PVA (g)	PVA/TN*
PVA5/TN0	0	30	0	1,5	100/0
PVA5/TN5	1,5	28,5	0,075	1,425	95/5
PVA5/TN10	3	27	0,15	1,35	90/10
PVA5/TN20	6	24	0,3	1,2	80/20
PVA5/TN50	15	15	0,75	0,75	50/50
PVA5/TN50**	15	15	0,75	0,75	50/50**
PVA10/TN0	0	30	0	3	100/0
PVA10/TN5	3	28,5	0,15	2,85	95/5
PVA10/TN10	6	27	0,3	2,7	90/10
PVA10/TN50	15	15	0,75	1,5	67/33
PVA10/TN50**	15	15	0,75	1,5	67/33**
PVA***	0	30	0	1,5	100/0***
TN****	30	0	0,3	0	0/100

*Razão PVA/TN em porcentagem m/m.

**Utilizou-se 50 μ L da solução de glutaraldeído (50% m/v) para reticular o filme (concentração de glutaraldeído na blenda PVA/TN foi de 0,85 g L⁻¹).

***Filme de PVA não reticulado e não neutralizado.

****Teste realizado com solução TN a 5% m/v. 50 μ L da solução de glutaraldeído (50% m/v) foi utilizada para reticular o TN (concentração de glutaraldeído no teste foi de 1,7 g L⁻¹).

Soluções de PVA nas concentrações 5,0% m/v e 10% m/v foram obtidas em soluções de HCl 0,01 mol L⁻¹ sob agitação magnética durante 60 min a 60°C. Uma solução de TN (5,0% m/v) também foi preparada nas mesmas condições que as descritas para as soluções de PVA, mas a 25°C. A solução de TN foi filtrada para remoção de partículas suspensas remanescentes da Acácia Negra. Então, blendas poliméricas PVA/TN (30 mL) foram obtidas em agitação magnética (10 min) a 50°C. Os volumes (mL) das respectivas soluções de PVA e TN, as massas (g) de PVA e TN presentes nas composições das blendas, bem como, as razões PVA/TN (v/v ou m/m)

utilizadas no preparo dos filmes estão relatadas na Tabela 1. Após os 10 min, 100 μL (50% v/v) de glutaraldeído (com concentração final de 1,7 g L^{-1} na blenda PVA/TN) foram adicionados ao sistema PVA/TN (30 mL a 50°C), mantendo o mesmo sob agitação magnética (5 min). Finalmente, blendas PVA/TN (≈ 30 mL) foram vertidas para placas de Petri (90 \times 15 mm) e acondicionadas em estufa sob ventilação (35°C) por 24h.

Após secagem (24 h), os filmes foram removidos das placas de Petri e acondicionados em água deionizada (100 mL) sob agitação magnética (150 rpm) a 25°C. A cada 30 min procedeu-se adição de gotas de NaOH 0,001 mol L^{-1} até que o sobrenadante de lavagem estivesse com o pH em torno de 5,5 a 6,0. Este procedimento foi realizado com muito cuidado, pois o excesso de OH^- pode hidrolisar o TN livre em solução (FACCHI *et al.*, 2017). Por fim, os filmes neutralizados foram secos em estufa com ventilação a 35°C (24 h) e estocados em frascos de polipropileno para posterior análise e aplicação.

4.2.2. Rendimento de incorporação do tanfloc nos filmes PVA/TN

O rendimento de incorporação (percentual de TN que permaneceu nos filmes após etapa de neutralização) foi avaliado pelo método de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \bullet). Nesse método, uma solução metanólica de DPPH \bullet apresenta uma banda de absorção a 517 nm, que desaparece devido à redução concebida por uma espécie anti-radical (espécie com atividade antioxidante). A capacidade de eliminação do DPPH \bullet foi medida usando o método descrito por Brand-Williams (1995) com modificações (XIAOWEI *et al* 2011). As concentrações de TN, inicial na blenda (30 mL) e perdida no sobrenadante de lavagem dos filmes (aproximadamente 100 mL) foram determinadas e, então, o rendimento de incorporação de TN nos filmes (percentual de TN que permaneceu no filme após lavagem) foi avaliado pela diferença entre as concentrações de TN inicial (presente na blenda) e perdida na lavagem. Para isso, alíquotas (50 μL) da blenda PVA/TN e do sobrenadante de lavagem contendo o TN liberado dos filmes após etapa de neutralização foram adicionados em 3,0 mL de solução de DPPH \bullet a 0,06 mol L^{-1} . Após mistura (25°C), aguardou-se 30 min e, então, à absorbância das soluções resultantes foram avaliadas em um espectrofotômetro (Cary 60 UV-VIS) a 517 nm. Compostos fenólicos tais como o TN apresentam atividade antioxidante (FACCHI *et al.*, 2017a). Assim, a concentração de TN na blenda (concentração inicial) e no sobrenadante (concentração perdida durante o processo

de neutralização dos filmes) pode ser estimada por meio da atividade antioxidante do TN. Porém, as concentrações de TN foram estimadas em termos de equivalentes de Trolox. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de Trolox variando de 50 a 2100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram usadas para construir uma curva de calibração padrão ($R^2 = 0,994$; $y = - 0,0003x + 0,6336$). Então, a atividade antioxidante do TN foi expressa em termos de equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Algumas amostras (sobrenadantes) apresentaram concentrações de TN elevadas. Dessa forma, procedeu-se diluição (de até 100×) dos sobrenadantes até que a concentração de TN estivesse dentro da faixa de concentração da curva de calibração. Assim, as concentrações de TN foram obtidas considerando as correções de diluição. O rendimento de incorporação (R%) do TN nos filmes foi obtido por meio da Equação 1

$$R\% = \frac{[TNb] - [TNs]}{[TNb]} \times 100 \quad (1)$$

onde $[TNb]$ é a atividade antioxidante ($\mu\text{mol L}^{-1}$) do TN presente nas blendas PVA/TN e $[TNs]$ é a atividade antioxidante ($\mu\text{mol L}^{-1}$) do TN presente no sobrenadante de lavagem dos filmes.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PVA/TN

4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho no modo reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

Os filmes foram caracterizados por meio de FTIR-ATR utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu Scientific, modelo 8300 Japan). Os espectros foram obtidos na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , após acumulação de 64 varreduras. Esta análise foi realizada na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.3.2. Análise termogravimétrica (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada em um equipamento Shimadzu, modelo TG-50. Os parâmetros de aquisição foram: taxa de aquecimento

10°C min⁻¹, atmosfera de gás argônio com fluxo de 50 mL min⁻¹, e faixa de temperatura de 20 a 600°C.

4.3.3. Espectroscopia de fotoelétrons de raio-X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X é uma técnica utilizada para caracterizar superfícies de sólidos, pois fornece dados sobre a composição atômica da superfície e o estado ionizante dos grupos. Os espectros foram obtidos por meio de um espectrômetro PhiElectronics 5800 (modelo Chanhassen MN), com auxílio de um fonte Al K α monocromática de raios-X ($h\nu = 1486,6$ eV), um analisador hemisférico e um detector multicanal. O ajuste dos espectros de alta resolução foi realizado por meio do software Origin 8.5, usando função gaussiana (ROMERO *et al.*, 2015). Esta análise foi realizada na Colorado State University (CSU) USA.

4.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia dos filmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM), utilizando um equipamento Shimadzu, modelo SS-550. A morfologia dos filmes PVA/TN neutralizados foram avaliadas, bem como, a morfologia dos filmes PVA/TN (neutralizados) após estes estarem em contato (24 h) com água (25°C) deionizada (pH 5,5), solução de ácido acético/acetato de sódio (pH 3,2), solução tampão de PBS (pH 7,4) e solução de fluido gástrico simulado (SGF, pH 1,2). Antes da análise os materiais foram removidos das soluções, lavados uma vez com água deionizada para remover o excesso de sais na superfície dos filmes, congelados em nitrogênio líquido e secos por liofilização (72 h a -50°C) em um liofilizador Solab (modelo SL-404). As imagens de SEM foram obtidas na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Dados das soluções utilizadas:

SGF (pH= 1,2): 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de uma solução de ácido clorídrico concentrado (37% m/v) e completou-se com água deionizada para um volume final de solução de 1000 mL (GEROLA *et al.*, 2016).

PBS (pH 7,4): 82 g de cloreto de sódio, 10,5 g de fosfato de sódio e 3,55 g de fosfato de sódio monobásico em 1000 mL de água destilada.

Ácido acético/acetato de sódio (pH 3,2), 79,5 g de acetato de sódio em ácido acético 0,01 mol/L⁻¹ (15 mL) e água deionizada até atingir um volume final de 1000 mL.

Tais soluções foram utilizadas para avaliar a estabilidade dos filmes em diferentes meios que simulam condições biológicas para o caso de aplicações dos filmes como scaffolds.

4.3.5. Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulos de contato foram avaliadas nas superfícies dos filmes neutralizados. Ângulos de contato estáticos foram determinados pelo método de gota sésil com um goniômetro modelo Krüss DSA 10 (Hamburgo, Alemanha), equipado com captura de vídeo (ALMODÓVAR *et al.*, 2010). Uma gota de água foi depositada na superfície dos filmes e, então, imagens foram capturadas a cada 1,0 min depois do contato da gota de água com a superfície dos filmes PVA/TN. O ângulo de contato foi monitorado por 10 min. Três medidas foram feitas em cada amostra, considerando diferentes locais na superfície das amostras (ALMODÓVAR *et al.*, 2010).

4.4. PROPRIEDADES DOS FILMES PVA/TN

4.4.1. Grau de intumescimento

O grau de intumescimento (G%) dos filmes PVA/TN foi obtido em SGF (pH 1,2) e PBS (pH 7,4) a 37°C. Este experimento foi realizado registrando-se a massa inicial seca (M_i) dos hidrogéis (aproximadamente 1,0 g) antes do teste e a massa final (M_f) dos hidrogéis após o contato com as respectivas soluções por 24 h. O experimento foi realizado em uma incubadora Shaker (modelo Thoth 6430) com agitação de 100 rpm. O G% foi determinado por meio da Equação 2 (XIA *et al.*, 2015)

$$G(\%) = \left(\frac{M_f - M_i}{M_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde G% é o grau de intumescimento dos filmes, M_i a massa inicial seca dos filmes e M_f a massa final dos filmes intumescidos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4.2. Degradação *in vitro* dos filmes

Hidrogéis neutralizados e secos (aproximadamente 1,0 g) foram acondicionados em estufa a 40°C por 24 h e, então, a massa inicial seca (M_i) das amostras foram determinadas. Os filmes foram adicionados em 20 mL de solução

(SGF ou PBS) e foram mantidos sob a 37°C com agitação de 100 rpm em uma incubadora Shaker modelo Thoth 6430 (CHEN *et al.*, 2010). Após intervalos de tempos desejados (1, 3, 5, 7 e 14 dias), os hidrogéis foram removidos das soluções SGF e PBS por meio do uso de uma peneira. Por fim, os filmes foram secos em estufa a 40°C por 24 h e a massa final dos filmes secos foram determinadas. O percentual de degradação (D%) dos hidrogéis foram avaliados por meio da Equação 3

$$D(\%) = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde D(%) corresponde ao percentual de degradação dos filmes, M_f a massa final dos filmes secos determinadas após contato com as soluções SGF e PBS e M_i a massa inicial dos hidrogéis secos. Todos experimentos foram realizados em duplicata.

4.5. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES PVA/TN

4.5.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada por meio do método DPPH• (XIAOWEI *et al.*, 2011), como relatado anteriormente na secção 4.2.2. Hidrogéis (aproximadamente 1,0 g), foram acondicionadas em 20 mL de SGF e PBS e mantidos em incubadora Shaker a 37°C e agitação de 100 rpm (CHEN *et al.*, 2010). Após 1, 3, 5, 7 e 14 dias, alíquotas do sobrenadante (50 µL) foram retiradas dos frascos contendo os filmes e adicionadas em 3,0 mL de solução metanólica de DPPH• (0,06 mol L⁻¹). Após mistura, aguardou-se 30 min e, então, a absorbância da solução foi determinada em 517 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (modelo Cary 60). A concentração de TN liberada (atividade antioxidante) foi expressa em termos de equivalentes de Trolox (µmol g⁻¹). A atividade antioxidante foi determinada por meio da Equação 4 ($y = -0.0003x + 0.6336$ R² = 0,9935) como relatado na seção 4.2.2. Quando necessário, diluições foram realizadas afim de determinar atividade antioxidante do TN. Todos experimentos foram realizados em duplicata.

As atividades antioxidantes das soluções PBS e SGF puras foram determinadas com intuito de verificar ocorrência de uma possível diminuição da absorbância do DPPH•. Com isso, garantiu-se que a atividade antioxidante determinada era proveniente apenas do TN liberado em solução.

4.5.2. Atividade antimicrobiana

4.5.2.1 *Microrganismos utilizados e condições de crescimento*

Antes de realizar os experimentos, bactérias *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram cultivadas em caldo Mueller Hinton a 37°C (24 h). Para os testes, a densidade celular foi padronizada em tubos esterilizados contendo solução salina (0,9% m/v), até que se atingisse a concentração predita na escala McFarland (concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de bactérias).

4.5.2.2. *Ensaio antimicrobiano via método disco-difusão*

O método disco-difusão foi realizado em meio ágar Muller-Hinton nas condições de pH 6,0 e 7,4 (o pH de 6,0 foi ajustado adicionando lentamente HCl 0,01 mol L⁻¹). As bactérias foram suspensas em solução salina e semeadas sobre placas contendo ágar. Após, foram colocados os discos (6,0 mm de diâmetro) dos filmes PVA/TN sobre as placas contendo as bactérias. Então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos foram medidos (BHALODIA e SHUKLA, 2011). O experimento foi realizado em triplicata na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.5.3. Ensaio de citotoxicidade via método MTT

Para a avaliação da citotoxicidade das amostras, utilizou-se o método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio). Este método colorimétrico baseia-se na capacidade das mitocôndrias viáveis de converter MTT, um sal de tetrazólio em cristais de púrpuras de formazan (MOSSMANN, 1983). Os testes foram realizados com suspensões de células VERO (tecidos epiteliais de rim de macaco verde africano - *Cercopithecus Aethiops*) e fibroblastos (murino da linhagem L929 *Murinae*), nas concentrações de $2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Adicionalmente, os testes de citotoxicidade foram avaliados sobre uma suspensão de macrófagos de linhagem J774A1, na concentração de $5,0 \times 10^5$ células mL⁻¹ em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), também suplementado com 10% de soro fetal bovino. As suspensões de células foram acondicionadas em placa estéril de 96 poços e incubado por 24 h a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado dos poços e amostras dos filmes PVA/TN foram adicionadas

aos poços contendo as células aderidas e meio de cultura novo. As células foram incubadas por 72 h a 37°C e 5% de tensão de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (0,010 mol L⁻¹) e 50 µL de MTT (2,0 mg mL⁻¹) foram adicionados em cada poço e a placa contendo células/amostras/meio de cultura e MTT foi incubada na ausência de luz a 25°C. Após 4 h, foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para romper a membrana das células e solubilizar os cristais de púrpuras de formazan. Então, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 570 nm. A viabilidade celular foi estimada em relação ao controle negativo (células sem tratamento, ou seja, sem estar em contato com as amostras). O experimento foi realizado em triplicata na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.5.4. Cultura de células tronco mesenquimais de tecido ósseo (MSCs)

4.5.4.1. Extração de células tronco mesenquimais

As MSCs foram isoladas de ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidos por Harlan Sprague Dawley, Inc (USA). O protocolo para extração das células foi aprovado pelo comitê de ética da Colorado State University (CSU), que trata do uso de animais em experimentos. Este comitê também está em conformidade com o guia “*National Institute of Health*” que aborda sobre cuidados necessários que devem ser tomados com o uso de animais em laboratório. O fêmur dos animais recém mortos, bem como, o tecido mole sobre cada fêmur foi assepticamente removido. As extremidades metafisárias dos ossos foram removidas para expor a cavidade da medula óssea. Num tubo falcon de 50 mL, a medula foi repetidamente lavada com meio de cultura (α -minimum essential medium; α -MEM), contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS, Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (pen/strep, Sigma-Aldrich, USA). A medula foi removida com auxílio de seringas de 10 mL com agulhas de 18 e 25 gauges. Então, as células MSCs foram recolhidas em meio de cultura α -MEM em tubo falcon de 50 mL. Após coleta, o sistema foi filtrado em filtro de nylon (70 µm) e recolhidas em um novo tubo falcon. Então, as células foram contadas em microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer, contendo 10 µL da suspensão contendo as MSCs. A contagem foi realizada antes de semear as células com as amostras. Antes de semear as MSCs com os filmes neutralizados, amostras de filmes secos (aproximadamente 8×3 mm) foram esterilizadas, adicionando as amostras em uma placa de 48 poços e incubando estas em PBS por 30 min sob exposição de

irradiação ultravioleta. Em seguida, o PBS foi removido e as MSCs (500 μL em suspensão) foram semeadas nas amostras a uma densidade de 1 milhão mL^{-1} . As culturas foram incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 durante 4 e 7 dias de cultura. Após este tempo, a viabilidade celular, bem como, o potencial para os filmes atuarem como scaffolds foram determinados.

4.5.4.2. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) via método AlamarBlue

A viabilidade celular sobre as MSCs foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue® (Promega G808A, Madison, WI), de acordo com instruções do fabricante. Após 4 e 7 dias, 50 μL do corante CellTiter-Blue (AlamarBlue) foram adicionados aos poços contendo as amostras semeadas com as células em meio de cultura α -MEM. Em seguida, cada conjunto foi incubado por 4h a 37°C e 5% de CO_2 . Assim, a absorbância do sobrenadante dos poços foi lida em leitor de microplacas (Molecular Devices Spectra Max M3, Sunnyvale, CA, USA) em 570 nm e 600 nm.

Os valores de porcentagem de redução do AlamarBlue (AB%) dependem da quantidade de células viáveis, ou seja, a porcentagem de redução AB% expressa a porcentagem de células viáveis (viabilidade celular) (AL-NASIRY *et al.*, 2007). O valor de AB% foi corrigido, considerando os valores AB% de dois controles. Um controle contendo o meio α -MEM (sem presença de células), as amostras (filmes PVA/TN) e AlamarBlue. Um outro experimento controle foi realizado, utilizando folhas de titânio (amostra com 8 mm de diâmetro) como controle negativo na presença de células e AlamarBlue. Para eliminar a contribuição do meio de cultura sobre os valores de AB% e, então, normalizar os resultados de viabilidade celular (%), o titânio foi escolhido como controle interno. Este foi selecionado devido à renomada citocompatibilidade e potencial biomédico para ser aplicado em implantes (DE VITERI e FUENTES 2013). Os experimentos foram realizados com $n = 5$.

4.5.4.3. Ensaios de adesão e proliferação celular

4.5.4.3.1. Via imagens de fluorescência

A resposta das MSCs sobre os filmes PVA/TN foi investigada após 4 e 7 dias de cultura em meio α -MEM. A adesão e proliferação celular foram avaliadas por meio de imagens de fluorescência das células contendo o corante 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen) para visualização do núcleo celular (MARTINS *et al.*,

2018c). As imagens foram obtidas por meio de um microscópio de fluorescência (Zeiss, USA). Após 4 e 7 dias de cultura, o meio α -MEM foi aspirado das placas e as amostras foram suavemente lavadas (2 vezes) em PBS antes de serem transferidas para uma nova placa de 48 poços. Este processo removeu as células não aderidas à superfície dos filmes. As células foram fixadas em uma solução de formaldeído a 3,7% v/v em água deionizada por 15 min em temperatura ambiente. Então, a solução de formaldeído foi removida e os filmes lavados três vezes com PBS (cada etapa de lavagem durou 5 min). As células foram permeabilizadas (3 min à temperatura ambiente) em 1,0% v/v de triton-X preparado em água destilada. Então, a solução de triton-X foi removida dos poços e os filmes lavados 4 vezes com PBS (cada etapa de lavagem durou 5 min). Após lavagem, o DAPI foi adicionado ao sistema na concentração de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ e as amostras foram incubadas por mais 5 min. A solução resultante foi removida dos filmes e as amostras lavadas com PBS. Então, as placas foram envelopadas com papel alumínio para proteger do contato com a luz e 500 μL de PBS foram adicionados sobre cada poço contendo as amostras. Por fim, a placa foi estocada a 4°C até as imagens de fluorescência serem realizadas. Imagens de fluorescência (5 imagens com ampliação $10\times$) foram coletadas de cada amostra em diferentes regiões da superfície dos filmes e, então, os núcleos foram contados usando o software ImageJ. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4.3.2. Via microscopia eletrônica de varredura

Após os ensaios de cultura de células (4 e 7 dias), os filmes foram removidos do meio de cultura e, então, acondicionados em solução 3,7% v/v de glutaraldeído, contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de cacodilato de sódio e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose por 45 min. Em seguida, as amostras foram adicionadas por 10 min em um tampão de cacodilato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e sucrose $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Após esta etapa, os filmes contendo as células fixadas e aderidas em suas superfícies foram adicionados em soluções etanólicas de 35, 50, 70 e $\approx 100\%$ v/v. Os filmes foram mantidos em contato com cada solução etanólica por 10 min. Por fim, os filmes foram mantidos (10 min) em 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (Sigma-Aldrich, USA) antes de serem armazenados em dessecador e analisados por SEM.

Para obtenção das imagens SEM das amostras com as células aderidas, as amostras foram revestidas (10 nm) com liga de paládio-ouro. Então, as imagens SEM

foram processadas em um equipamento SEM, modelo JSM-6500F(JEOL, Japão) que com aceleração de 5 kV. As análises foram realizadas na CSU (USA).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA e teste Tukey, utilizando o software Prism 6.0 (modelo GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) a um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FORMAÇÃO DOS FILMES PVA/TN

Imagens digitais dos filmes neutralizados estão apresentadas nas Figs. 8 e 9. Durante o processo de lavagem/neutralização dos filmes, algumas amostras não se mantiveram estáveis e dissolveram, como foi o caso das amostras PVA10/TN0 e PVA10/TN50** (amostra preparada com 50 μL de solução de reticulante a 50% v/v e concentração de glutaraldeído na blenda PVA/TN de 0,85 g L^{-1}) (Tabela 3). Por outro lado, as amostras PVA5/TN50, PVA5/TN50** (amostra preparada com 50 μL de reticulante a 50% v/v e concentração na blenda PVA/TN de 0,85 g L^{-1}) e PVA10/TN50 foram estáveis durante a lavagem mas não puderam ser utilizadas neste estudo por terem ficado extremamente quebradiças e frágeis (Fig. 8).

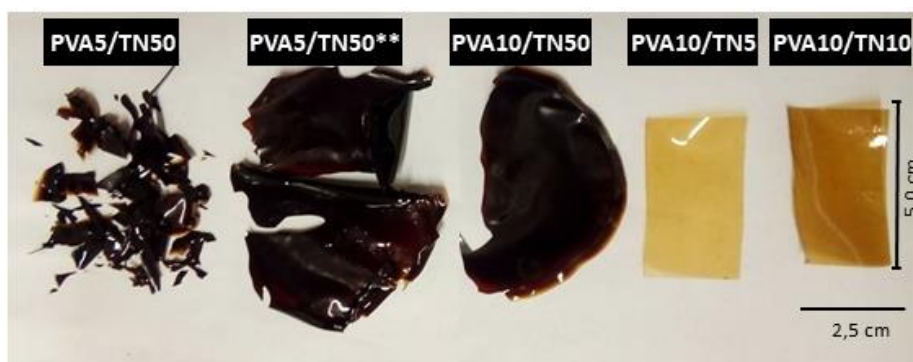


Figura 8. Imagens das amostras PVA/TN (neutralizadas) obtidas a partir de blendas PVA/TN preparadas com soluções PVA a 5% e 10% m/v. Amostras PVA5/TN50, PVA10/TN10, PVA10/TN10 e PVA10/TN foram reticuladas com glutaraldeído a 1,7 g L^{-1} (100 μL de glutaraldeído a 50% m/v). A amostra PVA5/TN50** foi reticulada com glutaraldeído a 0,85 g L^{-1} (50 μL de glutaraldeído a 50% m/v).

A baixa estabilidade da amostra PVA10/TN0 ocorreu devido ao aumento da concentração de PVA (10% m/v) em relação às demais condições (Tabela 2). Além disso, a concentração do agente reticulante glutaraldeído foi mantida constante na maioria dos experimentos (100 μL de solução de reticulante a 50% v/v e concentração na blenda PVA/TN de 1,7 g L^{-1}). Provavelmente, a quantidade de glutaraldeído na blenda não foi suficiente para reticular o PVA na condição PVA10/TN0. Uma vez que, a quantidade de PVA estava em excesso em relação ao reticulante considerando a estequiometria da reação 4 mols de PVA para 1 mol de glutaraldeído. Nesta condição, a concentração de PVA na blenda foi de 100 g L^{-1} . Assim, a baixa estabilidade da amostra PVA10/TN50** também pode ser explicada com base no conteúdo de PVA. Esta amostra foi preparada com blenda PVA/TN mantendo o PVA em 50 g L^{-1} e

glutaraldeído a $0,85 \text{ g L}^{-1}$. Sendo assim, ambos componentes tiveram suas concentrações reduzidas pela metade em comparação à amostra PVA10/TN0. Este efeito diminuiu a estabilidade do sistema devido ao excesso de PVA em relação ao glutaraldeído. Dessa forma, percebe-se um excesso de PVA em relação ao Tanfloc considerando a relação estequiométrica do equilíbrio dessa reação.

Tabela 2. Propriedades dos filmes PVA/TN reticulados com glutaraldeído na concentração de $1,7 \text{ g L}^{-1}$.

Amostras	Estabilidade na lavagem	Obtenção pós-lavagem
PVA5/TN0	Sim	Sim
PVA5/TN5	Sim	Sim
PVA5/TN10	Sim	Sim
PVA5/TN20	Sim	Sim
PVA5/TN50	Sim	Não
PVA5/TN50**	Sim	Não
PVA10/TN0	Não	****
PVA10/TN5	Sim	Sim
PVA10/TN10	Sim	Sim
PVA10/TN50	Sim	Não
PVA10/TN50**	Não	****
PVA***	****	****
TN****	Não	sim

**Filmes reticulados com glutaraldeído a $0,85 \text{ g L}^{-1}$.

***Filme de PVA não reticulado e não neutralizado.

****Propriedades não avaliadas.

*****Teste realizado com apenas TN (30 mL de solução a 5% m/v) e glutaraldeído ($1,7 \text{ g L}^{-1}$).

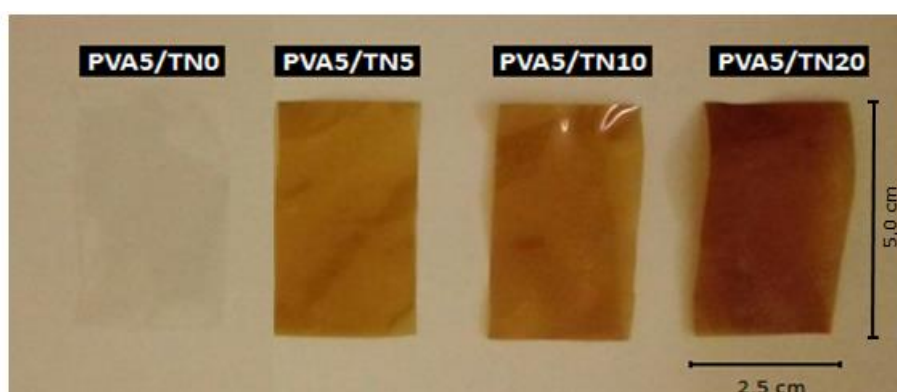


Figura 9. Imagens dos filmes PVA/TN (neutralizados) obtidos a partir da solução de PVA a 5% m/v. Amostras PVA5/TN0, PVA5/TN5, PVA5/TN10 e PVA5/TN20 foram reticuladas com glutaraldeído a $1,7 \text{ g L}^{-1}$ (100 μL de glutaraldeído a 50% m/v).

Considerando as blendas PVA/TN preparadas com soluções PVA a 5 e 10% m/v, o aumento da concentração de TN (até 20% em massa) na blenda possibilitou formação de filmes estáveis que não se dissolveram durante neutralização (Figs. 8 e 9). Porém, o aumento do conteúdo de TN para 50% nas blendas proporcionou

formação de filmes quebradiços, mesmo diminuindo proporcionalmente (ou não) a concentração de glutaraldeído (de 1,7 para 0,85 g L⁻¹) em relação à concentração de PVA na blenda (amostras PVA5/TN50, PVA5/TN50** e PVA10/TN50, Tabela 2 e Fig. 8). Esse efeito é evidente quando a concentração da solução de PVA utilizada para preparar os filmes foi de 5% m/v (Fig. 8). Filmes quebradiços foram obtidos (com PVA a 2,5 g L⁻¹) nas condições PVA5/TN50 e PVA5/TN50** reticulados com glutaraldeído nas concentrações de 1,7 e 0,85 g L⁻¹, respectivamente.

Nesse caso, tal fato pode estar relacionado com a densidade de reticulação, uma vez que, à diminuição do conteúdo de PVA nos filmes (consequentemente aumento da proporção de TN), promove aumento da densidade de reticulação nas amostras. Este efeito tornou os filmes mais rígidos e quebradiços. Além disso, grandes quantidades de TN na blenda (acima de 20% em massa) deixaram os filmes frágeis, pois o TN não tem potencial para formar filmes estáveis com glutaraldeído (Fig. 10).

O TN deve reticular com o glutaraldeído, pois o teste TN***** (Tabela 2) levou à obtenção de um material insolúvel em água após neutralização (Fig. 10B). Portanto, o aumento do conteúdo de TN nas blendas diminuiu a elasticidade dos filmes, pois ele deve reticular com o glutaraldeído e o mesmo não possui propriedades mecânicas desejáveis como o PVA possui. A lavagem dos filmes deve remover oligômeros de TN da estrutura dos filmes e a desprotonação parcial do TN no processo de lavagem/neutralização deve aumentar significativamente as interações intermoleculares nas amostras. Este efeito promove formação de filmes mais rígidos.

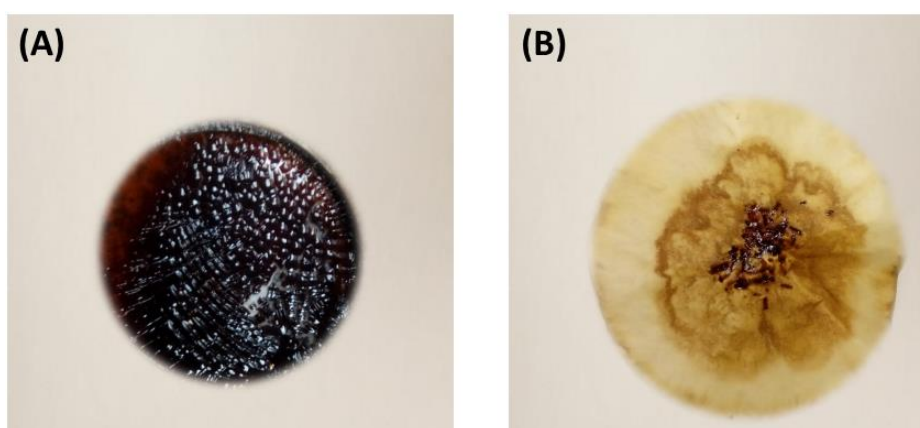


Figura 10. Imagens do teste TN** (Tabela 2) mostrando formação de um material a base de TN/glutaraldeído (Fig. 10A). Material residual de TN reticulado (com glutaraldeído a 1,7 g L⁻¹) obtido sobre papel filtro após lavagem e neutralização com água deionizada (Fig. 10B).

No geral, filmes rígidos foram obtidos quando as blendas foram preparadas com PVA na concentração 5% m/v, enquanto filmes mais flexíveis foram obtidos a partir das blendas preparadas com PVA a 10% m/v. Este efeito se deve principalmente a quantidade de PVA na blenda disponível para reagir com o glutaraldeído. Este resultado está em acordo com dados publicados na literatura (PEPPAS *et al.*, 2010). Hidrogéis preparados com maior concentração de PVA (mantendo a concentração de agente reticulante constante), apresentaram menor densidade de reticulação e, conseqüentemente, foram mais flexíveis. O aumento da concentração de TN torna os filmes com coloração marrom intensa, característica de taninos condensados e seus derivados (FACCHI *et al* 2017).

5.2 RENDIMENTO E INCORPORAÇÃO DO TANFOLC NOS FILMES PVA/TN

Durante a etapa de lavagem/neutralização dos hidrogéis, parte do TN incorporado nas amostras acaba sendo liberado da estrutura do hidrogel. O TN (pK_a 6,0) liberado encontra-se solúvel no sobrenadante de lavagem, uma vez que, os filmes foram neutralizados ao menos até o pH da água de lavagem atingir valor de 5,5 a 6,0. A coloração marrom do sobrenadante indicou presença do TN. A concentração de TN inicial presente na blenda, a concentração de TN liberada após neutralização, bem como, o rendimento de incorporação foram determinados por meio do método DPPH[•]. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 3 e foram avaliados em termos de equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 3. Concentração inicial de TN na blenda PVA/TN, concentração de TN perdida da estrutura dos filmes após neutralização e rendimento de TN incorporado nos filmes.

Amostras	TN na blenda (mmol L^{-1})	TN perdido (mmol L^{-1})	Rendimento (%)
PVA10/TN5	31,9	1,63	94,89
PVA10/TN10	63,9	1,70	97,33
PVA5/TN10	32,0	1,49	95,34
PVA5/TN20	63,9	1,68	97,37

Como relatado, o glutaraldeído deve reticular o TN e o aumento do conteúdo de TN nas blendas deve aumentar a efetividade das interações intermoleculares nos filmes. A desprotonação parcial do TN no processo de lavagem aumenta a possibilidade de formar novas interações nas matrizes dos filmes. Estes efeitos e a não solubilidade dos filmes em água promovem um elevado rendimento de incorporação do TN nos filmes. O rendimento foi superior a 95% para todas condições

avaliadas (Tabela 3). Além do mais, o elevado rendimento é explicado pela estabilidade da reticulação entre PVA e glutaraldeído (MAITRA e SHUKLA 2014). PVA e TN possuem grupos hidrofílicos ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$) em suas estruturas. Estes grupos podem estabelecer interações efetivas de segunda ordem e, assim, estabilizar os filmes durante o processo de neutralização. O baixo teor de TN lixiviado (2 a 5%) da estrutura dos filmes foi atribuído à pequena quantidade de TN adsorvido e fracamente ligado na superfície dos filmes. Devido ao elevado rendimento de incorporação, consideramos que a concentração inicial de TN nas blendas PVA/TN corresponde aproximadamente o teor de TN na composição final dos filmes.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PVA/TN

5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR)

As Figs. 11 e 12 apresentam os espectros FTIR-ATR do TN, dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20, PVA10/TN5, PVA10/TN10, além do espectro FTIR-ATR do filme de PVA não neutralizado e sem glutaraldeído (PVA*). Os espectros FTIR-ATR apresentaram diferenças significativas que, estão relacionadas às mudanças de intensidade, deslocamento e forma das bandas características de grupos químicos do PVA e TN. Estas alterações foram atribuídas à ocorrência de TN nos filmes, bem como, ao processo de reticulação. Estas diferenças espectrais confirmaram a formação dos filmes e foram mais acentuadas no espectro FTIR-ATR do filme PVA5/TN20, devido ao maior conteúdo de TN ($\approx 20\%$) desta amostra.

O espectro FTIR-ATR do TN apresentou uma banda de baixa intensidade em 1725 cm^{-1} atribuída à presença de grupos $\text{C}=\text{O}$, indicando presença de impurezas, tais como taninos hidrolisados (ácido gálico) e, possivelmente, presença de ácido fórmico remanescente do processo de síntese do TN (FACCHI *et al.*, 2017). Também, no espectro FTIR-ATR do TN ocorreu uma banda acentuada em 1608 cm^{-1} relacionada à presença das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático da estrutura do TN (FACCHI *et al.*, 2017). O alargamento do espectro FTIR-ATR do TN na região espectral de 2500 a 3600 cm^{-1} pode ser atribuído à grande extensão de interações intermoleculares de ligação de hidrogênio entre os segmentos de cadeia do TN. Este alargamento ocorreu devido à extensão destas interações (HAMEED *et al.*, 2016).

Todos os espectros apresentaram uma banda alargada na região de 3000 a 3600 cm^{-1} que foi relacionada ao estiramento das ligações $\text{O}-\text{H}$ e $\text{N}-\text{H}$ e, também,

atribuída à efetividade das interações de ligação de hidrogênio (ALAVARSE, 2015; HAMEED *et al.*, 2016). Dessa forma, a maior concentração de TN no filme PVA5/TN20 deve estar associada ao maior alargamento espectral na faixa de 3000 a 3600 cm^{-1} (Fig. 9). Este resultado indica a presença de TN no filme PVA5/TN20 e está em acordo com os resultados citadas nas seções anteriores.

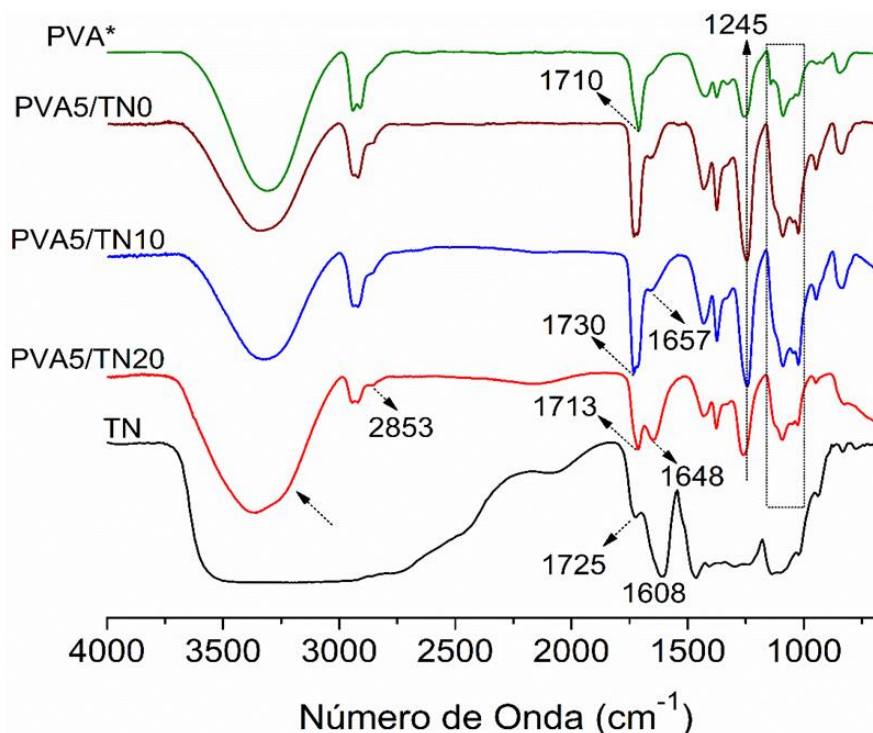


Figura 11. Espectros FTIR-ATR das amostras: filme PVA* (não reticulado e não neutralizado), filmes PVA/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e TN.

Além disso, no espectro FTIR-ATR do filme PVA5/TN20 verificou-se uma banda em 1648 cm^{-1} atribuída à formação da ligação imina ($\text{C}=\text{N}$) que está relacionada à formação de uma base de Schiff (WANG *et al.*, 2004). A reação de grupos amino do TN com o glutaraldeído não deve ser descartada (mesmo à reação de reticulação entre PVA/TN e glutaraldeído sendo viabilizada na presença de ácido clorídrico 0,010 mol L^{-1}) e deve promover formação de base de Schiff (WALTER 1982). Wang e colaboradores (2004) relataram a formação de base de Schiff no sistema PVA/quitosana reticulado com glutaraldeído por meio de catálise ácida e atribuiu uma banda na faixa de 1643 cm^{-1} ao estiramento das ligações $\text{C}=\text{N}$ de base de Schiff. A formação de base de Schiff ocorre quando átomos de nitrogênio nucleofílicos dos grupos amino ($-\text{NH}_2$) não protonados reagem com carbonilas de aldeídos e cetonas (MARTINS *et al.*, 2014). Além do mais, a banda em 1648 cm^{-1} no espectro FTIR-ATR

do filme PVA5/TN20 pode ser atribuída à presença das ligações C=C de anéis aromáticos do TN (MARTINS *et al.*, 2018a).

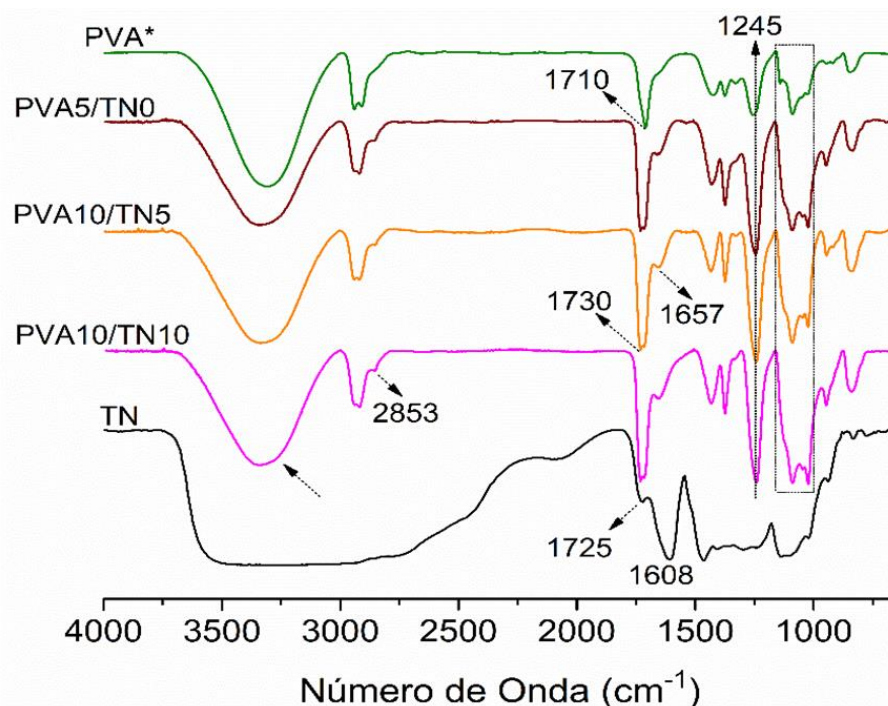


Figura 12. Espectros FTIR-ATR das amostras: filme PVA* (não reticulado e não neutralizado), filmes PVA5/TN0, PVA10/TN05, PVA10/TN10 e TN.

Cabe ressaltar que os demais espectros FTIR-ATR não apresentaram banda em 1648 cm^{-1} devido à baixa concentração de TN nos filmes. Nos demais espectros FTIR (com exceção do espectro da amostra PVA5/TN20) observou-se uma banda em 1657 cm^{-1} (Figs. 11 e 12). Esta banda está relacionada ao processo de reticulação do PVA com glutaraldeído, uma vez que, a mesma não foi evidente no espectro FTIR-ATR do PVA*.

A banda de baixa intensidade em 1710 cm^{-1} no espectro FTIR-ATR do filme PVA* (filme não neutralizado e sem reticulação) foi atribuída às ligações C=O de grupos ésteres não hidrolisados do PVA (SADAHIRA 2007). Esta mesma banda se deslocou para 1730 cm^{-1} e aumentou de intensidade nos espectros FTIR-ATR dos filmes reticulados contendo um maior teor de PVA e conteúdo de TN abaixo de 20% (filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA10/TN5 e PVA10/TN10) (Figs. 11 e 12). Este efeito foi atribuído ao processo de reticulação (MANSUR *et al.*, 2008) e, está relacionado aos grupos carbonilas na estrutura dos filmes, bem como, aos diferentes conteúdos de PVA e TN nas composições das amostras. Por outro lado, no espectro FTIR-ATR do filme PVA5/TN20, a banda atribuída às ligações C=O de grupos ésteres

não hidrolisados do PVA em 1710 cm^{-1} (espectro do filme PVA*) se deslocou para 1713 cm^{-1} devido ao maior conteúdo de TN no filme PVA5/TN20 e, possivelmente, por causa da formação da base de Schiff e/ou presença das ligações C=C do TN (Fig. 9). Bandas referentes às ligações acetais provenientes da reticulação entre PVA e glutaraldeído também foram identificadas na região de 1035 a 1245 cm^{-1} (Figs. 11 e 12). O processo de reticulação aumenta a intensidade das bandas citadas anteriormente. Nesta mesma região, também ocorrem bandas atribuídas às ligações C–O de álcoois primários. As alterações nesta faixa espectral estão atribuídas às diferentes composições das amostras.

A reticulação nos filmes deve ocorrer entre os conjuntos PVA/glutaraldeído, PVA/TN/glutaraldeído e TN/glutaraldeído. Além de grupos aminos, o TN possui grupos fenólicos que podem reagir com o glutaraldeído. Porém, o ambiente ácido da catálise favorece a formação de grupos $-\text{NH}_3^+$. Esse efeito diminui significativamente a nucleofilicidade dos átomos de nitrogênio dos grupos amino, diminuindo o potencial para formar base de Schiff. Por outro lado, caso tenha carbonilas do glutaraldeído disponíveis, o processo de neutralização deve aumentar a concentração de grupos aminos livres (desprotonados), elevando as chances de formação de base de Schiff. Nos espectros FTIR-ATR dos filmes reticulados foi observado o surgimento de uma banda em 2853 cm^{-1} atribuída ao estiramento de ligações C–H provenientes do glutaraldeído (SADAHIRA *et al.*, 2007). As alterações espectrais confirmam a incorporação do TN nos filmes, bem como, o processo de reticulação.

5.3.2. Análise termogravimétrica (TGA/DTG)

As Figs. 13, 14 e 15 apresentam curvas TGA/DTG das amostras PVA (pó), filmes reticulados (PVA5/TN0, PVA5/TN5, PVA5/TN10, PVA5/TN20, PVA10/TN5 e PVA10/TN10), filme PVA* (não neutralizado e não reticulado) e TN. Com exceção da curva TGA do TN, as demais curvas mostraram três ou até quatro eventos principais de perda de massa na faixa de temperatura de 20 a 600°C (Figs. 13A, 14A e 15A). As curvas DTG retratam os pontos de inflexão relacionado à faixa de temperatura na qual a taxa de degradação possui maior velocidade (Figs. 13B, 14B e 15B). A variação de massa atribuída à cada estágio de perda de massa está representada na Tabela 4.

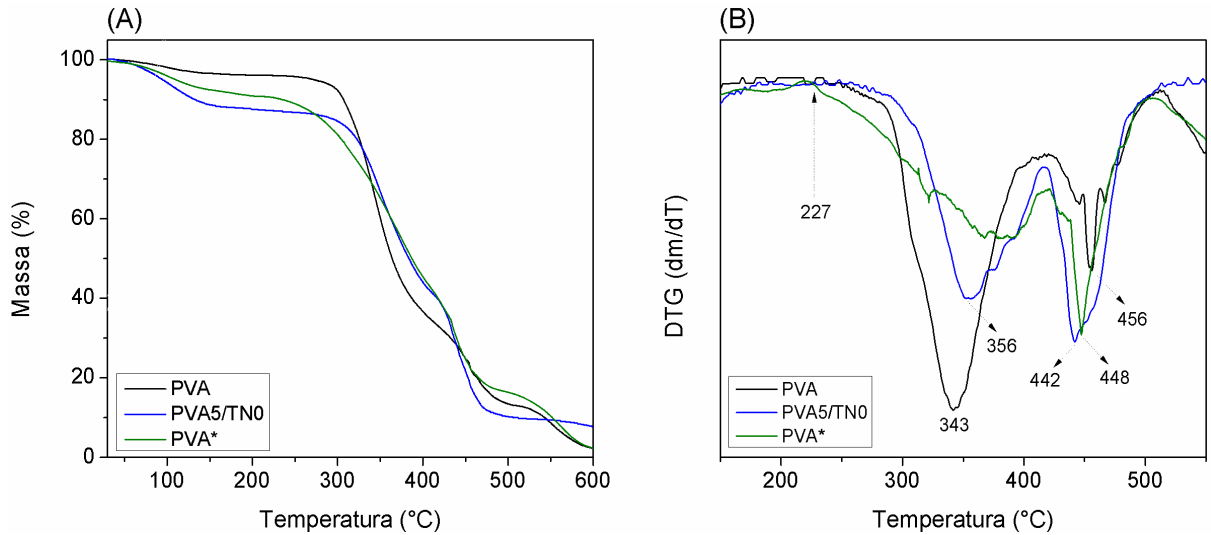


Figura 13. Curvas TGA (Fig. 13A) e DTG (Fig. 13B) do PVA (pó), PVA5/TN0 e PVA* (filme não reticulado).

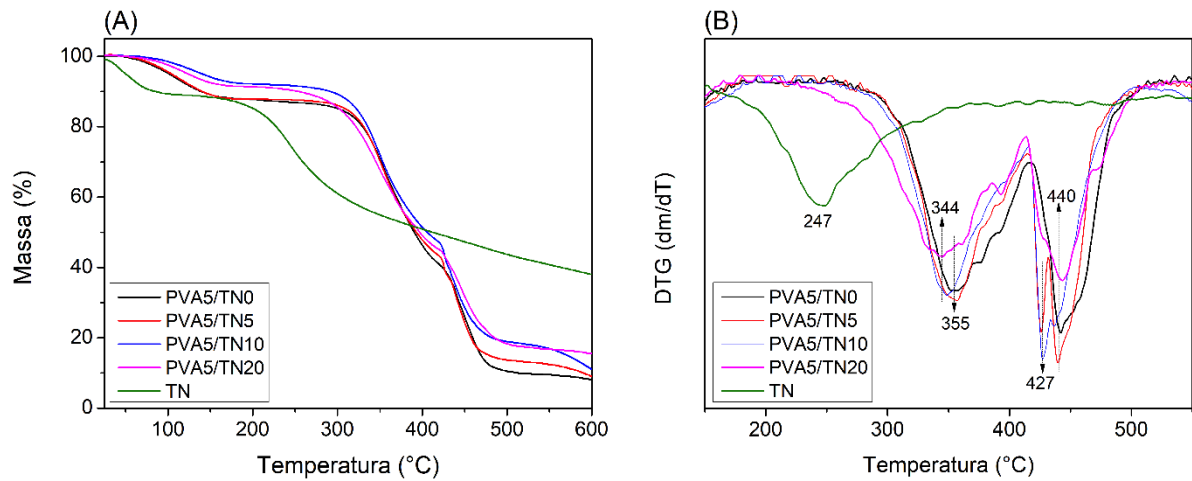


Figura 14. Curvas TGA (Fig. 14A) e DTG (Fig. 14B) dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN5, PVA5/TN20 e TN.

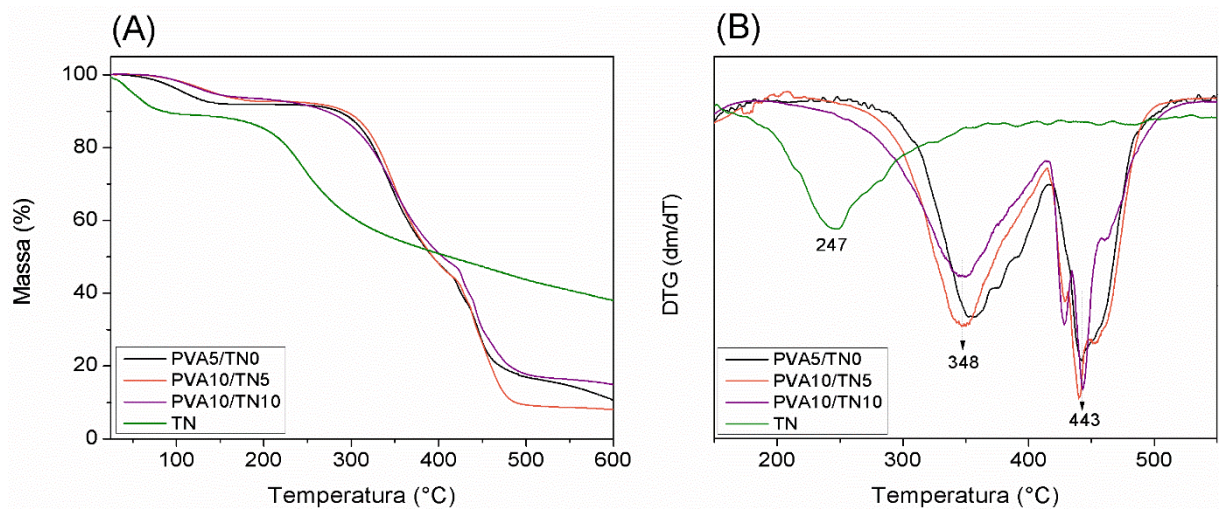


Figura 15. Curvas TGA (Fig. 15A) e DTG (Fig. 15B) dos filmes PVA5/TN0, PVA10/TN5, PVA10/TN10 e TN.

Tabela 4. Valores de variação de massa (%) relacionada aos 4 eventos principais de decorrentes das curvas de TGA.

Amostras	Variação de massa (%)				Massa residual a 600°C
	25-200°C	200-400°C	400-500°C	500-600°C	
PVA (pó)	3,9	59,1	23,5	11,5	2,0
PVA*	8,8	44,1	33,1	2,5	11,5
PVA5/TN0	12,4	44,1	33,1	2,5	7,9
PVA5/TN5	12,2	40,0	34,2	4,6	9,0
PVA5/TN10	7,7	40,9	32,5	7,9	11,0
PVA5/TN20	8,6	42,3	30,8	2,8	15,6
PVA10/TN5	7,3	44,6	38,8	1,3	8,1
PVA10/TN10	6,8	42,2	33,2	2,9	15,0
TN	14,8	34,6	7,2	5,3	38,1

O primeiro evento de perda de massa (alteração de massa entre 3,9 e 14,8%; Tabela 4) ocorreu entre 25 a 200°C e foi atribuído à perda de água e compostos voláteis. Os filmes apresentaram conteúdos similares de água e componentes voláteis (variação de massa entre 7 a 12%; Tabela 4). O TN apresentou o maior teor de água (14,8%; Tabela 4). Por outro lado, o PVA mostrou apenas 4% de água de hidratação em sua composição (Tabela 4). Estes resultados dependeram do processo de preparo e estocagem das amostras.

O segundo evento principal de perda de massa (variação de massa entre 34,6 a 59,1%) aconteceu entre 200 a 400°C e foi atribuído à degradação das estruturas dos materiais. Todos os filmes reticulados apresentaram variação de massa em torno de 40 a 44,6%, enquanto à amostra PVA pó mostrou variação de massa de 59,1%. O processo de reticulação estabilizou as cadeias de PVA, diminuindo a variação de massa no segundo estágio de perda de massa (200 a 400°C). O terceiro evento (variação de massa entre 7,2 e 38,8%), bem como o quarto (caso ocorreu) se deram entre 400 e 600°C (região de oxidação). Estes eventos de perda de massa foram associados ao processo de descarboxilação de sub-produtos gerados no estágio principal de degradação (segundo evento de perda de massa) (CHOO *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2018).

A análise do segundo estágio de perda de massa (200 a 400°C) revelou que os filmes PVA* e PVA5/TN0 apresentaram maior estabilidade térmica quando comparados ao PVA pó (Fig. 13). Nas curvas DTG dos filmes, os pontos de inflexão ocorreram em temperaturas mais elevadas, isto é, na faixa de 350 a 400°C (Figs. 14B e 15B). Na curva DTG do PVA pó, a temperatura do ponto de inflexão aconteceu em

343°C (Fig. 13B). O aumento de estabilidade térmica se deve à presença de água nos filmes e, no caso do filme PVA5/TN0, este efeito também se relacionou ao processo de reticulação. (YANG *et al.*, 2014). Este fato deve elevar a estabilidade térmica dos filmes PVA* e PVA5/TN0 devido ao estabelecimento de interações de curto alcance entre as moléculas de água com a matriz dos filmes. Por outro lado, o perfil das curvas TGA dos filmes PVA* e PVA5/TN0 foram similares. Porém, o segundo evento de degradação na curva TGA do filme PVA* ocorreu antecipado em relação ao mesmo evento na curva TGA do filme PVA5/TN0 (Fig. 13A). Este efeito deve estar relacionado ao processo de reticulação do PVA. Estes resultados estão em acordo com dados apresentados na literatura (WANG *et al.*, 2004).

No geral, o perfil das curvas TGA/DTG nos filmes reticulados foram similares (Figs. 14 e 15). Eventos de degradação na faixa de 200 a 500°C nas curvas DTG exibiram pontos de inflexão em 344, 348, 355, 427, 440 e 443°C (Figs. 14B e 15B). Estes eventos estão associados ao segundo (degradação principal) e terceiro (descarboxilação de sub-produtos) eventos de perda de massa (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Contudo, o perfil das curvas TGA/DTG dos filmes reticulados foram diferentes em comparação ao perfil das curvas TGA/DTG dos filmes PVA/TN0 e PVA*. Este fato confirmou a síntese dos filmes PVA/TN.

O TN apresentou menor estabilidade térmica em relação às demais amostras (ponto de inflexão na curva DTG a 247°C) (FACCHI *et al.*, 2017a). Por outro lado, a massa residual (38,1%) de TN a 600°C foi a mais elevada (Tabela 4). Taninos apresentam estruturas heterogêneas com valores de massas molares distribuídos em uma grande faixa (GRAHAM *et al.*, 2008). Este efeito diminuiu a temperatura de degradação do cátion orgânico TN (FACCHI *et al.*, 2017a). Por outro lado, o elevado teor de resíduos a 600°C se deve à presença de impurezas (cloreto de amônia e cloreto de potássio) e formação de pares iônicos na estrutura do sal de TN (MARTINS *et al.*, 2015c; MARTINS *et al.*, 2018a). A formação de pares iônicos é decorrente do processo de síntese do TN (MARTINS *et al.*, 2018a). A presença de impurezas, bem como, o estabelecimento de pares iônicos aumentam o teor de massa residual dos filmes. No geral, o aumento da concentração de TN proporcionou aumento da massa residual a 600°C (Tabela 4).

5.3.3. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)

A composição química da superfície dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10 foram analisadas por meio de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS). Os espectros estão apresentados na Fig. 16. Os resultados foram interpretados, considerando as estruturas dos hidrogéis homogêneas.

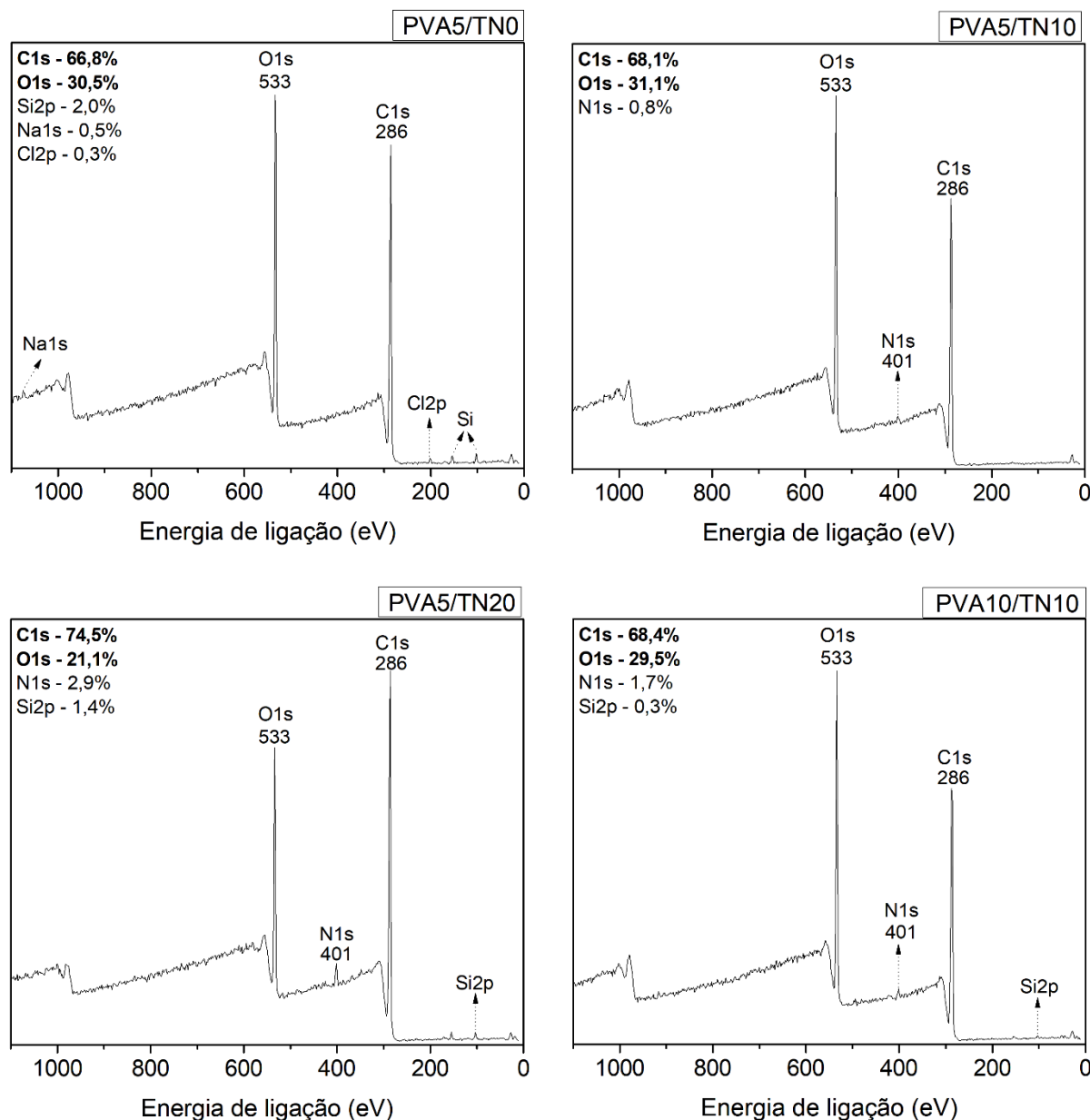


Figura 16. Espectros XPS dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.

Os espectros de XPS mostraram presença de picos característicos referentes aos elementos O1s (534 eV), N1s (401 eV) e C1s (287 eV) (Fig. 16). Estes elementos

ocorrem nas estruturas do PVA e TN. A presença de nitrogênio (401 eV) na superfície dos filmes se deve à incorporação do TN na matriz dos filmes. Além disso, a maior intensidade do pico N1s no espectro XPS da amostra PVA5/TN20 foi atribuída à maior concentração de TN (20% em massa). O aumento da concentração de TN para 20% elevou o teor de N1s para 2,9% no filme PVA5/TN20. Por outro lado, amostras com menor conteúdo de TN apresentaram teor de N1s abaixo de 2%. Como previsto, o filme PVA5/TN0 não apresentou sinal de N1s, pois o PVA não possui átomos de nitrogênio em sua composição (Fig. 16). Além disso, a composição atômica do filme PVA/TN0 apresentou valor similar em relação a resultados já descritos na literatura (LÓPEZ *et al.*, 1991). Verificou-se que o aumento do teor de TN na estrutura dos filmes promoveu aumento do conteúdo de C1s, uma vez que, a relação carbono oxigênio na unidade repetitiva do TN é aproximadamente 3,2 enquanto que para o PVA é de aproximadamente 2, de acordo com as Figs 2 e 7. Este efeito foi melhor visualizado no espectro XPS do filme PVA5/TN20 (amostra com 20% em massa de TN). O teor de C1s aumentou de 66,8% no filme PVA5/TN0 para 74,5% no filme PVA5/TN20. À presença de glutaraldeído também deve aumentar o teor de C1s, porém, este efeito é minimizado nos filmes reticulados, uma vez que, a concentração do agente reticulante foi mantida constante ($1,7 \text{ g L}^{-1}$) nos experimentos.

A Fig. 17 apresenta espectros XPS de alta resolução para C1s. Os grupos químicos característicos do PVA ocorreram em todos os espectros XPS de alta resolução (Fig. 17). Destacam-se os grupos químicos $-\text{COOCH}_3$ (região de 289 eV), $-\text{C}-\text{OH}$ (região de 286 eV), bem como, ligações $-\text{C}-\text{C}$ na região de 284-285 eV. Porém, a presença de TN foi confirmada apenas no espectro XPS de alta resolução (C1s) referente ao filme PVA5/TN20. O pico em 287,9 eV foi atribuído à presença das ligações químicas $-\text{C}-\text{N}$ e $-\text{C}-\text{O}$. A ocorrência deste pico confirmou a incorporação do TN no filme PVA5/TN20. Não se observou alteração significativa nos espectros XPS de alta resolução (C1s) para às demais amostras devido à menor concentração de TN incorporada nos filmes (Fig. 17). Estes resultados estão em acordo com os dados de FTIR-ATR relatados anteriormente, pois o espectro FTIR-ATR do filme PVA5/TN20 foi significativamente diferente em relação aos demais espectros (Figs. 14 e 15).

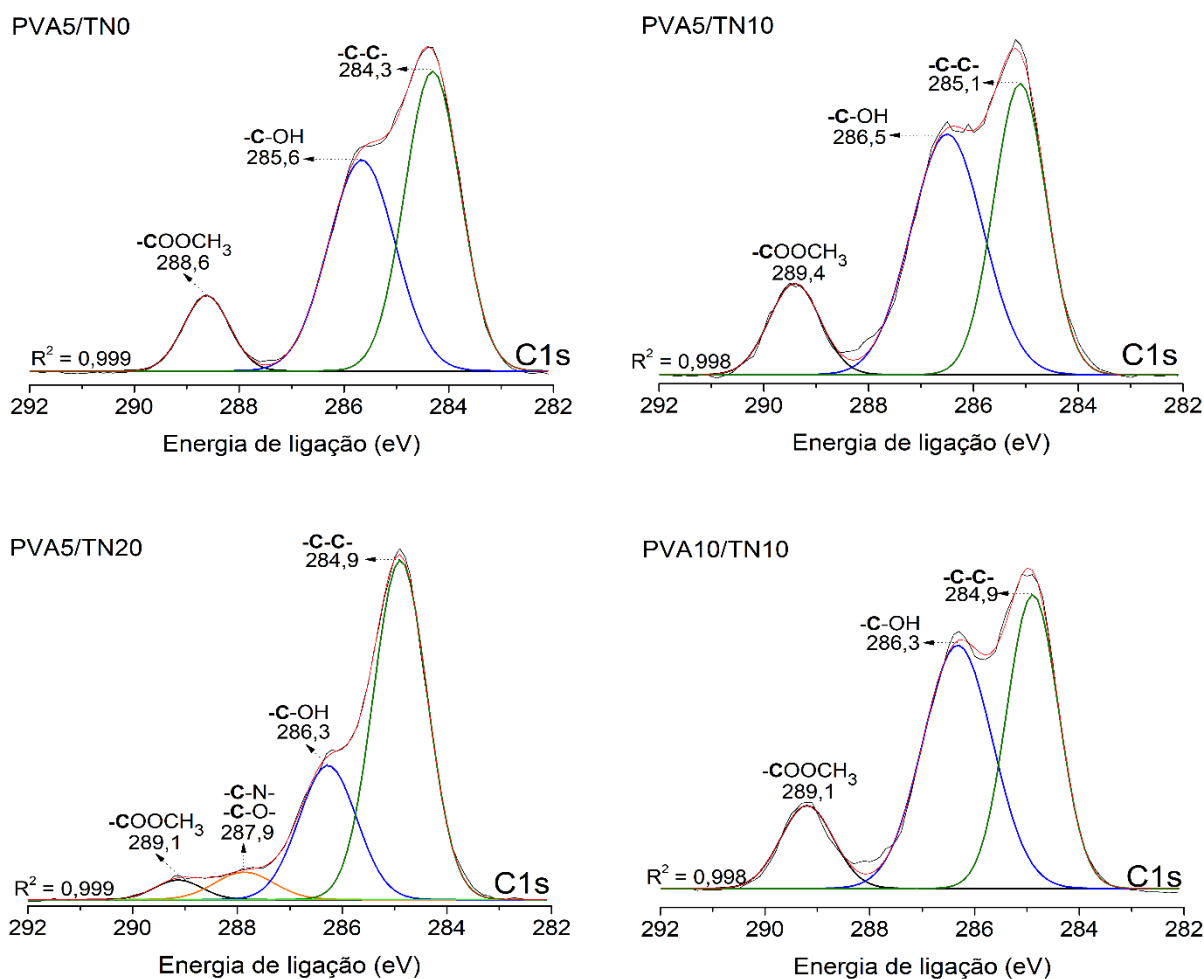


Figura 17. Espectros XPS de alta resolução C1s: PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.

Por outro lado, o espectro XPS de alta resolução do N1s mostrou ocorrência dos grupos -NH_2 (400,0 eV) e -NH_3^+ (401–402 eV) característicos do TN (Fig. 18). Este fato foi observado em todos os filmes contendo TN. Os materiais foram neutralizados até o sobrenadante de lavagem atingir faixa de pH entre 5,5 a 6,0. Nesta condição, o TN apresenta-se na condição de equilíbrio, uma vez que o pK_a dos grupos -NH_2 é em torno de 6,0 (WANG et al., 2004). Por isso, nesta condição, o espectro XPS de alta resolução deveria indicar presença concomitante dos grupos -NH_2 e -NH_3^+ . Este efeito foi confirmado. Todos os sinais atribuídos nos espectros XPS relatados neste estudo estão em acordo com outros dados já publicados (LÓPEZ et al., 1991; D'ALMEIDA et al., 2017).

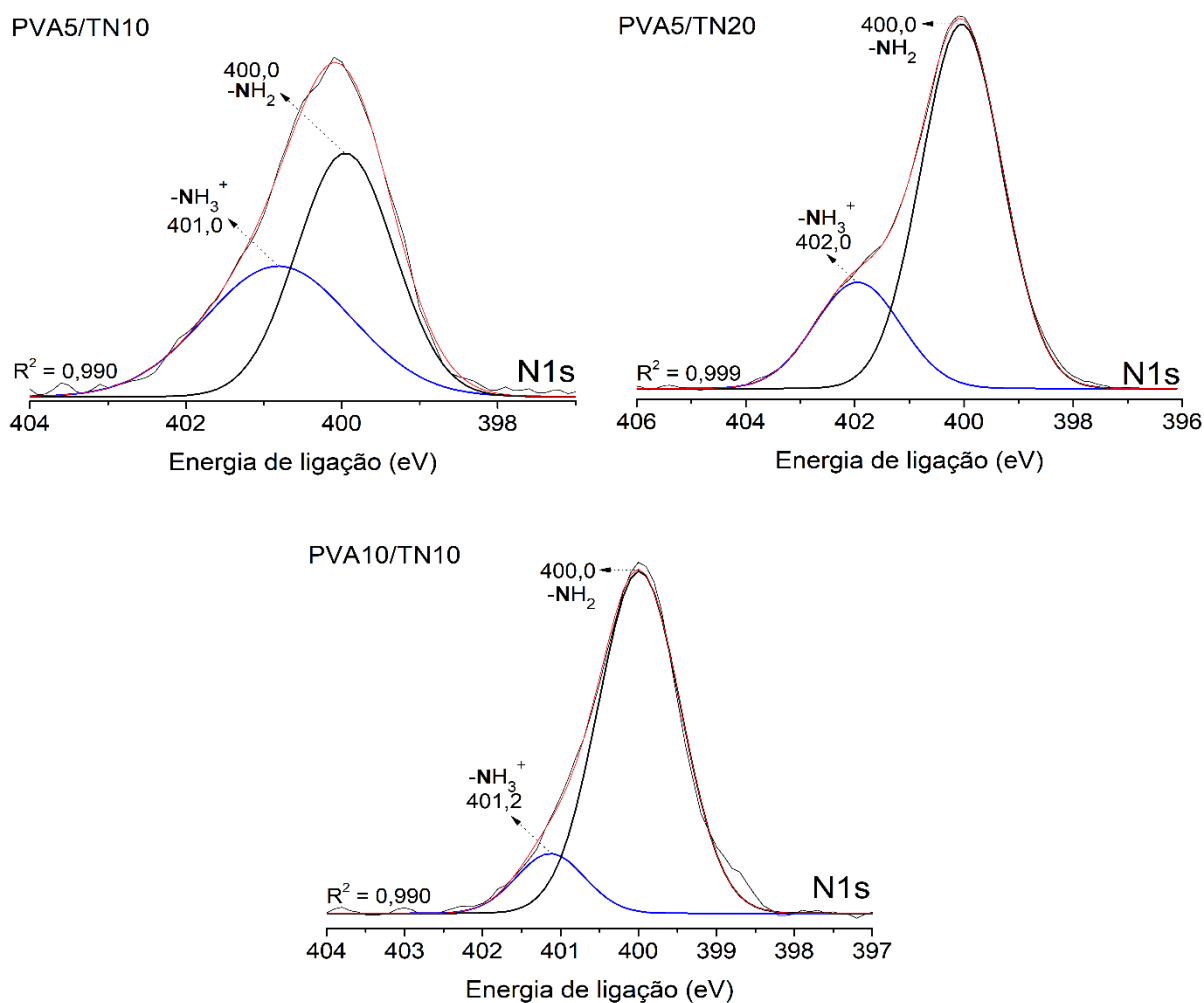


Figura 18. Espectros XPS de alta resolução N1s: filmes PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10.

A porcentagem relativa de grupos -NH_3^+ , bem como, a razão $\text{-NH}_2/\text{-NH}_3^+$ foram determinadas por meio das áreas dos picos preditos na Fig. 18 (Tabela 5). A ocorrência de grupos aminos protonados na estrutura dos filmes pode estar relacionada à uma possível atividade bactericida. Este efeito ainda será investigado.

Tabela 5. Percentual relativo de grupos -NH_3^+ e razão $\text{-NH}_2/\text{-NH}_3^+$ nos filmes PV/TN determinados por meio dos espectros XPS de alta resolução N1s (Fig. 18).

Amostras	-NH_3^+ (%) [*]	Razão $\text{-NH}_2/\text{-NH}_3^+$
PVA5/TN10	45	1,2
PVA5/TN20	24	3,2
PVA10/TN10	13	7,0

^{*}Porcentagem relativa de -NH_3^+ a partir do conteúdo total de átomos de nitrogênio estimada pela área de cada pico do espectro XPS de alta resolução N1s (Fig. 18).

5.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As imagens de SEM das amostras TN e dos filmes PVA/TN secos (neutralizados) estão apresentadas na Fig. 19. O TN é obtido como um sal orgânico (cátion orgânico) que apresenta íons cloreto como contra íon. A imagem SEM do TN mostrou que a estrutura do polímero é formada por partículas esféricas com superfície lisa (MARTINS et al., 2018a). Esta estrutura é organizada e característica de sais.

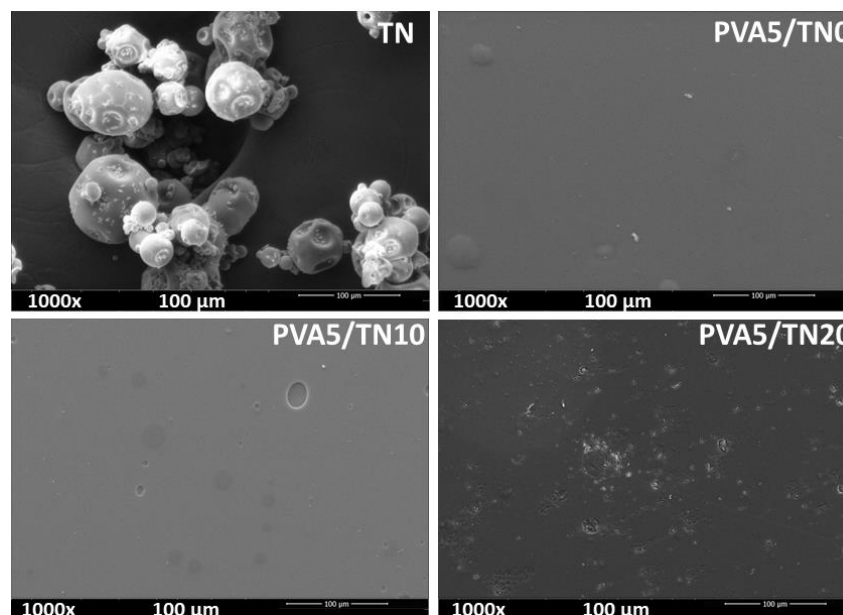


Figura 19. Imagens SEM do TN (puro) e amostras dos filmes reticulados e secos PVA/5TN0, PVA/5TN10 e PVA/5TN20 (filmes neutralizados).

No entanto, este comportamento não ocorre em estruturas poliméricas; porém, a formação de pares iônicos entre TN com íons cloreto em excesso remanescente do cloreto de amônio promovem a estrutura esférica do TN. Este resultado está em acordo com dados já reportados na literatura (MARTINS et al., 2018a). Além disso, Martins e colaboradores (2015c) mostraram que a formação de pares iônicos envolvendo espécies Na^+Cl^- e o polímero derivado de quitosana (cloreto de N,N,N-trimetilquitosana; TMC) pode conferir alto grau de ordenamento na estrutura polimérica do sal TMC. Dessa forma, assim como na pesquisa de Martins et al 2015c, tanto o TN, como a TMC apresentam um cátion orgânico em sua estrutura. Portanto, assim como obtidos, estes polímeros possuem suas estruturas organizadas (FOLLMANN et al., 2012; MARTINS et al., 2015c). Por outro lado, a diálise de soluções poliméricas de TN e TMC contra água destilada pode facilmente remover os pares iônicos e, assim, tornar as estruturas do TN e TMC desorganizadas, ou seja,

materiais amorfos são formados após diálise das soluções poliméricas do TN e TMC (MARTINS et al., 2018a).

Os filmes de PVA preparados por meio de soluções 5,0% m/v ocorreram com superfície lisa, compacta e homogênea. A estrutura compacta dos filmes está relacionada com às concentrações de PVA (faixa de 40 a 50 g L⁻¹) e glutaraldeído (1,7 g L⁻¹) utilizadas nas blendas. Em relação à amostra PVA5/TN10, foi observada leve alteração na morfologia do filme PVA5/TN20 (Fig. 19). Este filme foi obtido com maior teor de TN (20% em massa; Tabela 1). Percebe-se que a superfície desta amostra apresentou pequenas partículas que não ocorreram nas demais amostras. Estas partículas são características da estrutura do TN, confirmando incorporação do mesmo na matriz do filme PVA5/TN20.

As Figs. 20 e 21 apresentam imagens SEM dos filmes obtidos a partir de blendas poliméricas preparadas com soluções PVA a 10% m/v. As imagens SEM foram obtidas na condição de equilíbrio, após as amostras estarem imersas e intumescidas (24 h a 25°C) em SGF (pH 1,2) e PBS (pH 7,4) (Fig. 20) e em água destilada (pH 5,5) (Fig. 21). Após intumescimento, as amostras foram removidas dos meios (SGF, PBS e água destilada), congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. As imagens SEM foram processadas a partir das amostras liofilizadas (Figs. 20 e 21).

As soluções SGF e PBS possuem elevada concentração de íons devido à presença de sais inorgânicos dissolvidos. Esse efeito aumenta a força iônica das respectivas soluções. A elevada força iônica restringe o intumescimento dos filmes e, conseqüentemente, formação de poros. Em pH 1,2 (solução SGF) há elevada concentração de íons H₃O⁺ e o TN na estrutura dos filmes pode estar completamente ionizado, uma vez que o pK_a dos grupos -NH₂ é em torno de 6,0. A presença de TN promove filmes mais compactos devido ao estabelecimento de interações efetivas nos filmes. Este efeito também reduz a formação de poros na superfície dos filmes em SGF. O grau de intumescimento das amostras ainda será investigado e os resultados serão associados aos apresentados nesta seção.

No meio PBS (pH 7,4) ocorre desprotonação do TN. Este efeito aumenta a efetividade de interação na matriz dos filmes e a elevada concentração de sais impede o intumescimento dos filmes e ocorrência de poros maiores (Fig. 18A). Por outro lado, em água deionizada (pH 5,5), o TN está parcialmente ionizado e não há presença de sais dissolvidos. Este efeito induz a ocorrência de poros definidos na estrutura dos filmes PVA/TN (Fig. 20).

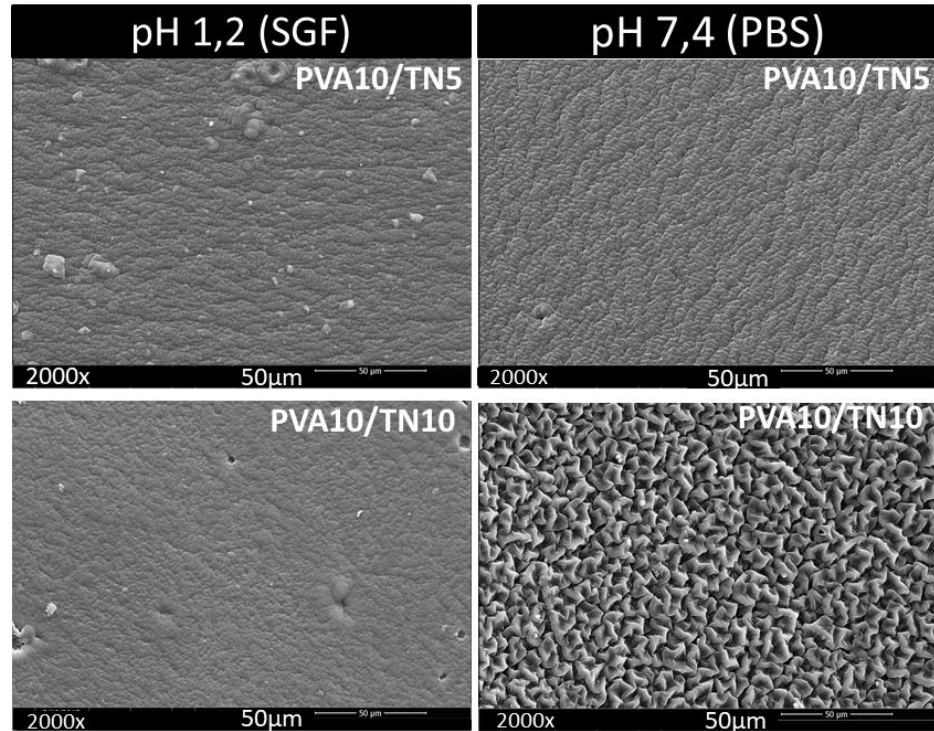


Figura 20. Imagens SEM dos filmes PVA/TN preparados a partir da solução de PVA a 10% m/v. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio) após as mesmas estarem imersas em diferentes ambientes (SGF e PBS por 24 h), congeladas em $N_2(l)$ e liofilizadas.

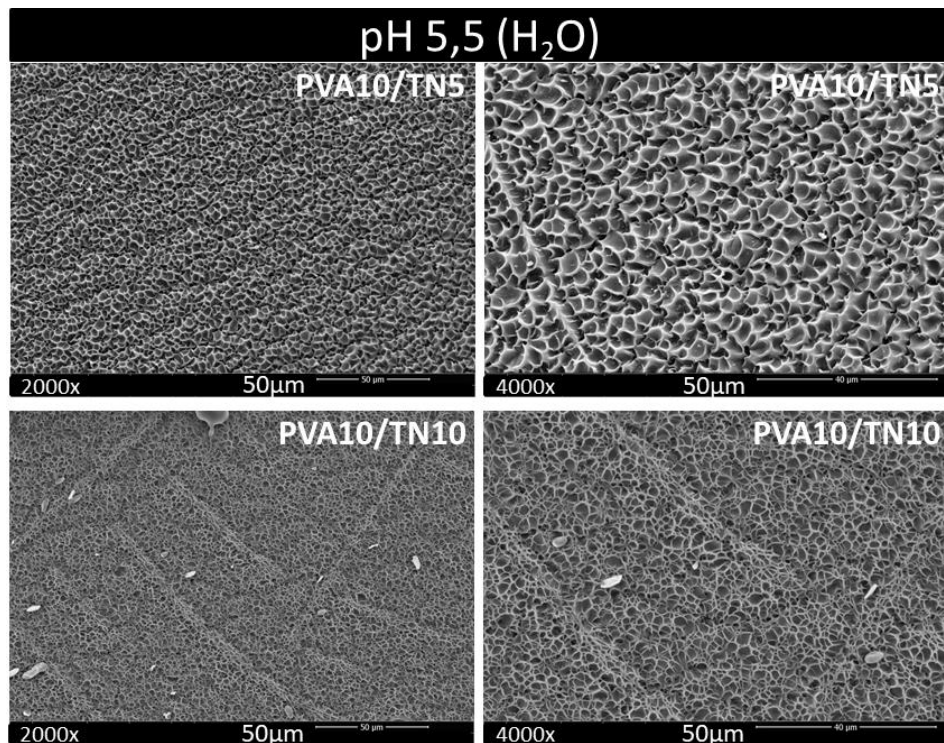


Figura 21. Imagens SEM dos filmes PVA/TN preparados a partir da solução de PVA a 10% m/v. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio) após as mesmas estarem imersas em água destilada (24 h), congeladas em $N_2(l)$ e liofilizadas.

Por outro lado, na Fig. 21, a protonação do TN em água (pH 5,5) favorece o intumescimento dos filmes, possibilitando formação de poros definidos (Fig. 21). A diferença de morfologia entre as amostras PVA10/TN5 e PVA10/TN10 (intumescidas em água deionizada) está relacionada à menor concentração de PVA no filme PVA10/TN10 (90% em massa). Provavelmente, a menor concentração de PVA impede a expansão da rede polimérica, mesmo com um maior teor de TN (10%) na matriz da amostra. Isso ocorre pois com menos PVA haverá mais pontos de reticulação do glutaraldeído por cadeia de PVA. Este efeito reduz o tamanho dos poros no material (Fig. 21). Aumentando a concentração de PVA nas amostras, haverá menos pontos de reticulação por cadeia de PVA, pois mais sítios $-OH$ estarão disponíveis para reagirem com o glutaraldeído. Este fato induz à formação de poros com diâmetros maiores nas matrizes dos filmes como pode ser visto na Fig. 21.

A Fig. 22 apresenta imagens SEM do filme PVA5/TN20. As imagens foram processadas após as amostras estarem em contato (24 h) com PBS, SGF e solução tampão de ácido acético/acetato de sódio (pH 3,2). As imagens SEM (Fig. 22) mostraram o mesmo comportamento das imagens SEM apresentados na Fig. 20. O grau de reticulação no filme PVA5/TN20 é maior em relação ao filme PVA10/TN10, mantendo às concentrações de glutaraldeído ($1,7 \text{ g L}^{-1}$) e TN constantes nestas amostras (Tabela 1). Isso acontece, devido à diminuição da concentração de PVA no filme PVA5/TN20. No geral, o filme PVA5/TN20 apresentou superfície lisa e compacta, sem ocorrência de poros (Fig. 22).

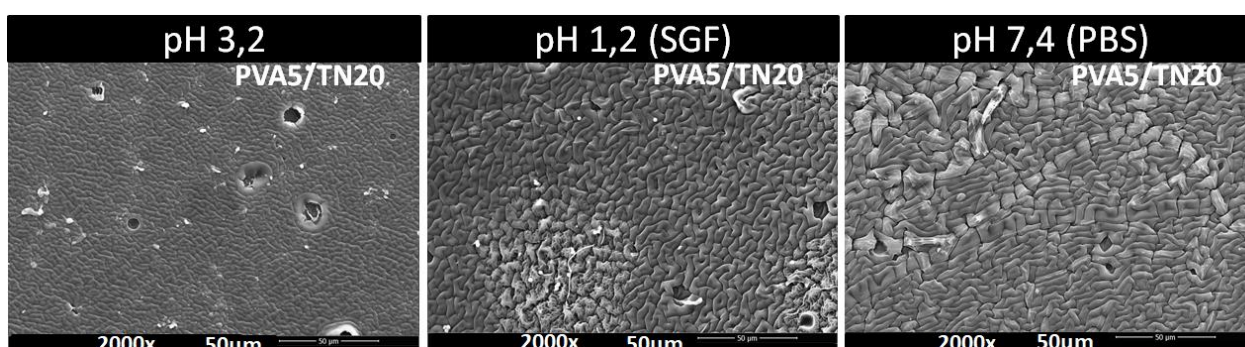


Figura 22. Imagens SEM do filme PVA5/TN20. As imagens foram obtidas a partir das amostras intumescidas (condição de equilíbrio), após as mesmas estarem imersas (24 h) em diferentes ambientes (SGF, solução de ácido acético/acetato de sódio a pH 3,2 e PBS), congeladas em $N_2(l)$ e liofilizadas.

5.3.5. Medidas de ângulo de contato sobre os filmes PVA/TN

A hidrofiliicidade de uma determinada superfície pode ser mensurada por meio de medidas de ângulo de contato (MARTINS *et al.* 2018b). A Fig. 23 apresenta os valores de ângulo de contato sobre as superfícies dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10 depois das amostras estarem em contato por 10 min com uma gota de água. A medida que à concentração de TN aumenta, bem como, quando à concentração de PVA diminui, os filmes se tornam mais hidrofóbicos; isto é, o ângulo de contato não altera significativamente no intervalo de 10 min (Fig. 23).

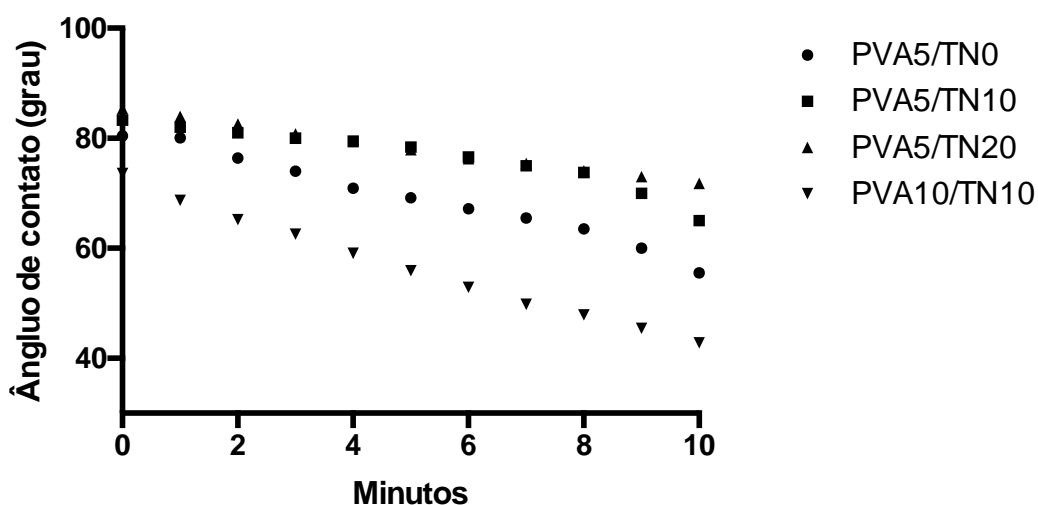


Figura 23. Medidas de ângulo de contato sobre os filmes PVA/TN em função do tempo (intervalo de 10 min).

Depois de 10 min, o ângulo de contato na superfície dos filmes PVA5/TN0, PVA5/TN10, PVA5/TN20 e PVA10/TN10 foi de 56°, 65°, 72° e 43°, respectivamente (Fig. 23). Este efeito é melhor visualizado por meio da análise da Fig. 24. Imagens digitais das superfícies dos filmes foram realizadas após uma gota de água estar em contato com as superfícies dos filmes. As imagens foram obtidas após 0, 5 e 10 min de contato. O filme PVA10/TN10 com maior concentração de PVA (90%) apresentou maior variação nas medidas de ângulo de contato (Fig. 24D). A superfície do filme PVA10/TN10 absorveu mais rápido a gota de água. Este efeito confirmou a maior hidrofiliicidade da superfície do filme PVA10/TN10 em relação aos demais filmes preparados com soluções de PVA a 5% m/v. Uma maior quantidade de grupos hidroxilas disponíveis promove filmes de PVA mais hidrofílicos (BAHRAMI *et al.*, 2003).

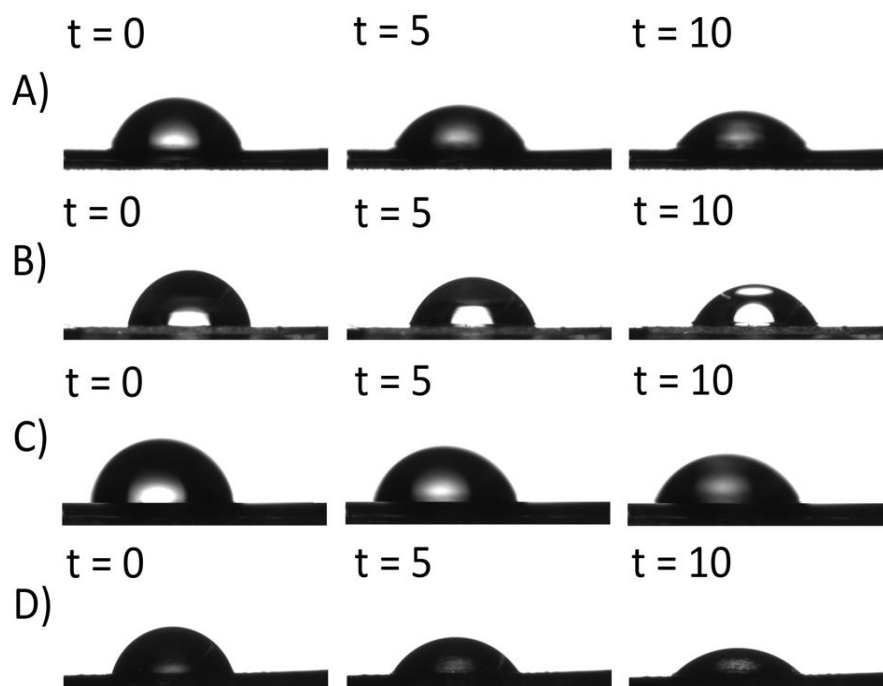


Figura 24. Imagens digitais das superfícies dos filmes PVA5/TN0 (Fig. 24A), PVA5/TN10 (Fig. 24B), PVA5/TN20 (Fig. 24C) e PVA10/TN10 (Fig. 24D) realizadas na presença de uma gota de água. As imagens foram processadas após 0, 5 e 10 min de contato entre a superfície dos filmes com a gota de água.

Observou-se que o filme PVA5/TN20 preparado com o maior teor de TN (0,3 g; 20% em massa) e o menor teor de PVA (1,2 g; 80% em massa) na blenda PVA/TN apresentou menor variação nas medidas de ângulo de contato (Fig. 24C). A diminuição da concentração de PVA tem um papel significativo nos valores de ângulo de contato dos filmes. Os filmes PVA5/TN20 e PVA10/TN10 foram obtidos a partir do mesmo conteúdo de TN (0,3 g) na blenda PVA/TN. Por outro lado, o teor de PVA aumentou de 1,2 g na blenda PVA5/TN20 para 2,7 g na blenda PVA10/TN10. Este aumento significativo no teor de PVA interferiu significativamente nos valores de ângulo de contato. Depois de 10 min, o ângulo de contato do filme PVA5/TN20 diminuiu de 72° para 43° no filme PVA10/TN10. Desta forma, pode-se ajustar à hidrofiliabilidade dos filmes por meio do controle das concentrações de polímeros presentes na blenda PVA/TN. A hidrofiliabilidade de uma superfície influencia significativamente nas suas propriedades biológicas (BAHRAMI *et al*, 2003). Este efeito foi investigado neste estudo e os resultados serão apresentados nas próximas seções.

Diversas pesquisas retratam que materiais hidrofílicos são requeridos para aplicação na área de engenharia de tecidos. Costa-Junior e colaboradores (2008) estudaram as propriedades de citocompatibilidade de filmes de PVA/quitosana

reticulados com glutaraldeído. Nesse estudo, os hidrogéis PVA/quitosana mais hidrofílicos foram mais citocompatíveis sobre células (VERO), apresentando maior potencial para serem aplicados no campo de engenharia de tecidos. Sheik e colaboradores (2018) também mostraram o aumento da citocompatibilidade de filmes mais hidrofílicos a base de PVA/quitosana reforçados com fibra de seda. Portanto, estes filmes possuem melhor capacidade para atuarem como materiais scaffolds. Sendo assim, a maior hidrofiliçidade de uma superfície está intimamente relacionada ao seu potencial de aplicação biomédico (MARTINS *et al.*, 2018a).

5.4. PROPRIEDADES DOS FILMES PVA/TN

5.4.1. Grau de intumescimento

O grau de intumescimento (GI%) é um parâmetro importante para um hidrogel, uma vez que esta propriedade influencia na capacidade que o mesmo possui para adsorver/dessorver água e solutos (GANJI *et al.*, 2010). A Fig. 25 apresenta resultados de GI% dos filmes PVA/TN avaliados em SGF e PBS após 24 h de contato.

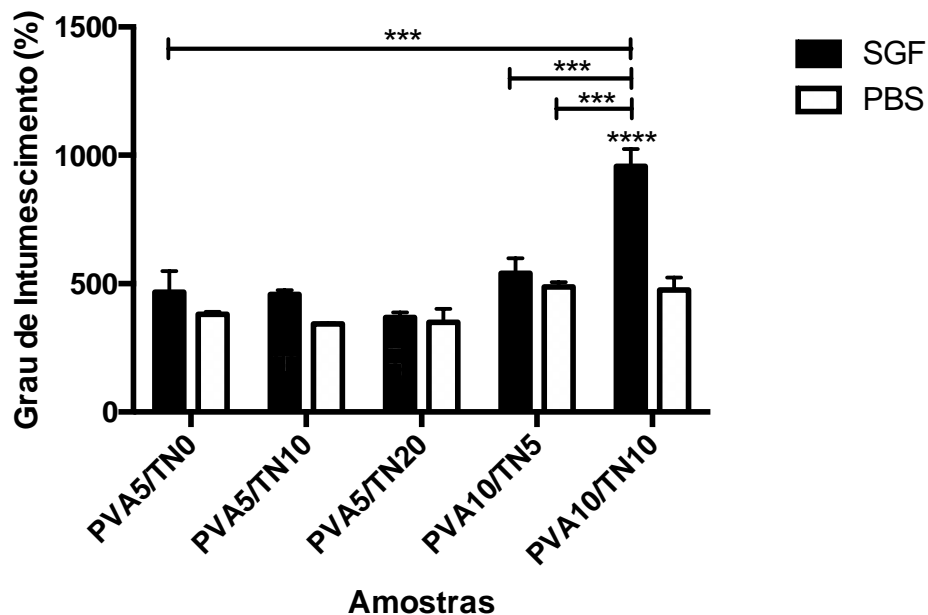


Figura 25. Grau de intumescimento (GI%) dos filmes PVA/TN avaliados em SGF e PBS (24 h). Resultados significativamente diferentes implicam $p \leq 0,0001$ (****) e $p \leq 0,001$ (***).

Resultados de GI% estão em acordo com os resultados de SEM, pois, de fato, os filmes não intumesceram significativamente nas soluções SGF (pH 1,2) e PBS (pH 7,4). Este efeito diminuiu a ocorrência de poros maiores na superfície dos materiais.

O GI% ocorreu em torno de 400 a 600%, com exceção do filme PVA10/TN10 que em SGF atingiu GI% de 957%. Após neutralização, possivelmente as cadeias dos filmes devem se aproximar mais umas das outras devido à desprotonação parcial dos grupos amino carregados na estrutura do TN. Esta desprotonação aproxima as cadeias de PVA e TN, aumentando a efetividade das interações intermoleculares entre os segmentos de cadeias, tornando os filmes mais compactos e promovendo baixo GI%. Este efeito é pronunciado em PBS (Fig. 25).

Resultados semelhantes foram obtidos por Hajji e colaboradores (2016), que analisaram o GI% de filmes PVA/quitosana. O GI% diminuiu com o aumento do teor de quitosana nas blendas poliméricas. No trabalho aqui desenvolvido o maior GI% do filme PVA10/TN10 em SGF se deve ao maior teor de PVA, bem como, ao maior teor de TN neste filme (0,3 g; Tabela 1). A concentração de glutaraldeído foi mantida constante nos ensaios (1,7 g L⁻¹). Por isso, o aumento da concentração de PVA de 5% m/v para 10% m/v deve reduzir a densidade de reticulação nos filmes, aumentando o GI% na amostra PVA10/TN10. Resultado semelhante foi obtido também por Bahrami e colaboradores (2003), que obtiveram diminuição do GI% de filmes PVA reticulados com glutaraldeído em função do aumento da concentração do agente reticulante.

Considerando os filmes preparados com soluções PVA a 10% m/v, em SGF (pH 1,2), o TN encontra-se protonado e, devido à maior concentração de TN, este pode interagir melhor com moléculas de água. Este fato aumentou significativamente o GI% do filme PVA10/TN10 no meio SGF, uma vez que, em SGF, o filme PVA10/TN5 (contendo excesso de PVA e menor teor de TN) não apresentou GI% significativamente superior em relação às demais amostras.

Para serem aplicados como scaffolds, os hidrogéis devem ser hidrofílicos ao ponto de promoverem o estabelecimento de interações com a membrana extracelular de células. Por outro lado, scaffolds não podem apresentar GI(%) elevado, pois esse comportamento diminui a fixação de células sobre uma determinada superfície, devido à elevada taxa de absorção/difusão de moléculas de água da superfície do filme no estado de equilíbrio (MARTINS *et al.*, 2018c). Por isso, filmes de pectina/quitosana com GI(%) acima de 1900% não atuaram como matrizes scaffolds (MARTINS *et al.*, 2018c). Porém, por meio do controle da razão pectina/quitosana na composição dos filmes, uma superfície hidrofílica (ângulo de contato de 45° após 10 min de contato com uma gota de água) e amostra com GI(%) menor (~400%) foram obtidas. Tais

superfícies atuaram como matriz scaffold, promovendo adesão e proliferação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (MARTINS et al., 2018c).

5.4.2. Degradação dos filmes PVA/TN

A estabilidade dos filmes neutralizados e secos foi avaliada em PBS (pH 7,4) e SGF (pH 1,2) durante 1, 3, 5, 7 e 14 dias a 37°C. A Fig. 26 mostra os resultados de degradação dos filmes PVA/TN em SGF (Fig. 26A) e PBS (Fig. 26B).

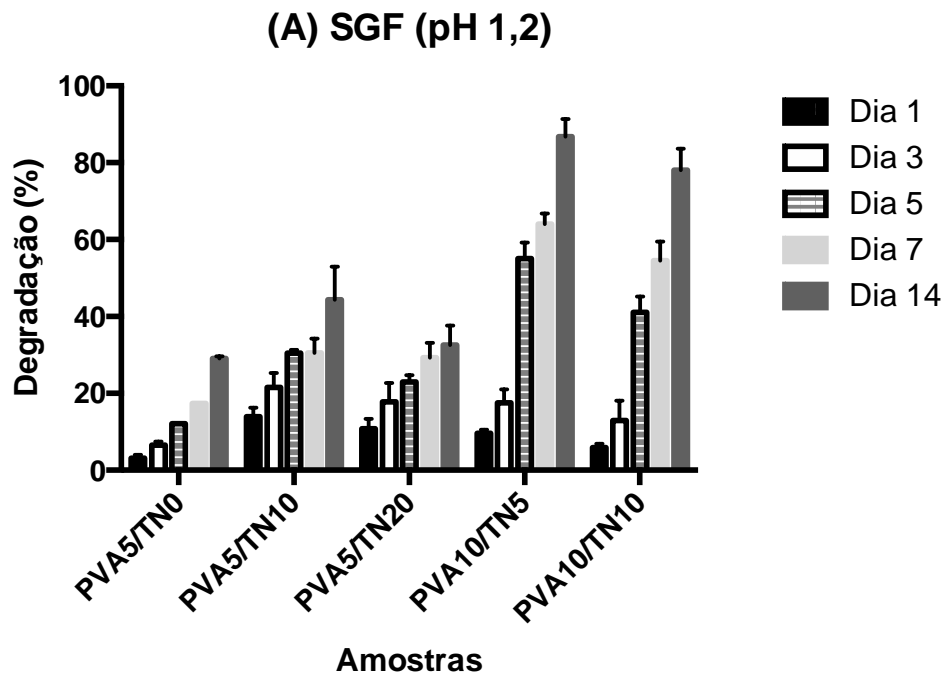


Figura 26A. Degradação (%) dos filmes PVA/TN avaliados em SGF (pH 1,2) durante 1, 3, 5, 7 e 14 dias. Em dias diferentes de análise (não alterando as amostras), todos os resultados de degradação em SGF foram significativamente diferentes (valor de p ao menos menor ou igual a 0,05).

Os filmes apresentaram baixa estabilidade em SGF (Fig. 26A). Este efeito foi maior sobre os filmes preparados com soluções de PVA a 10% m/v. Os filmes preparados com soluções de PVA 10% m/v apresentaram 78% (PVA10/TN10) e 87% (PVA10/TN5) de degradação após 14 dias de análise em SGF (Fig. 26A). Estes filmes perdem completamente sua estrutura após o dia 3 de análise. Após este período, a massa residual determinada (provenientes dos filmes) era composta de um aglomerado insolúvel em SGF. Depois de 14 dias, os filmes preparados com soluções de PVA a 5% m/v apresentaram degradação na faixa de 28 a 44% (Fig. 26A). O menor conteúdo de PVA torna os filmes mais estáveis em SGF. Quanto maior a concentração de PVA na composição da blenda, menor a quantidade de retículos por cadeia

polimérica. Comparando as mesmas amostras, porém em dias de análise distintos, verificou-se que os resultados de degradação foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) (Fig. 26A). Wang e colaboradores (2004) mostraram que a taxa de degradação de hidrogéis de PVA/quitosana reticulados com glutaraldeído atingiram 25% em 3 dias de análise em solução tampão (pH 3,0). Estes resultados estão em acordo com os resultados apresentados neste estudo.

Além do mais, a reação de reticulação do PVA é reversível (Fig. 5). Portanto, o excesso de H_3O^+ do SGF pode promover reação inversa. Este efeito desestabiliza a estrutura dos filmes, regenerando o PVA solúvel (COSTA-JÚNIOR et al 2009b). Por isso, a degradação dos filmes em SGF é mais significativa. De fato, o aumento da concentração de TN deve aumentar a velocidade de degradação das amostras em SGF. As macromoléculas de TN estão protonadas em SGF. Este fato aumenta a solubilidade do TN e pode viabilizar a degradação dos hidrogéis (Fig. 26A) (FACCHI et al., 2017a).

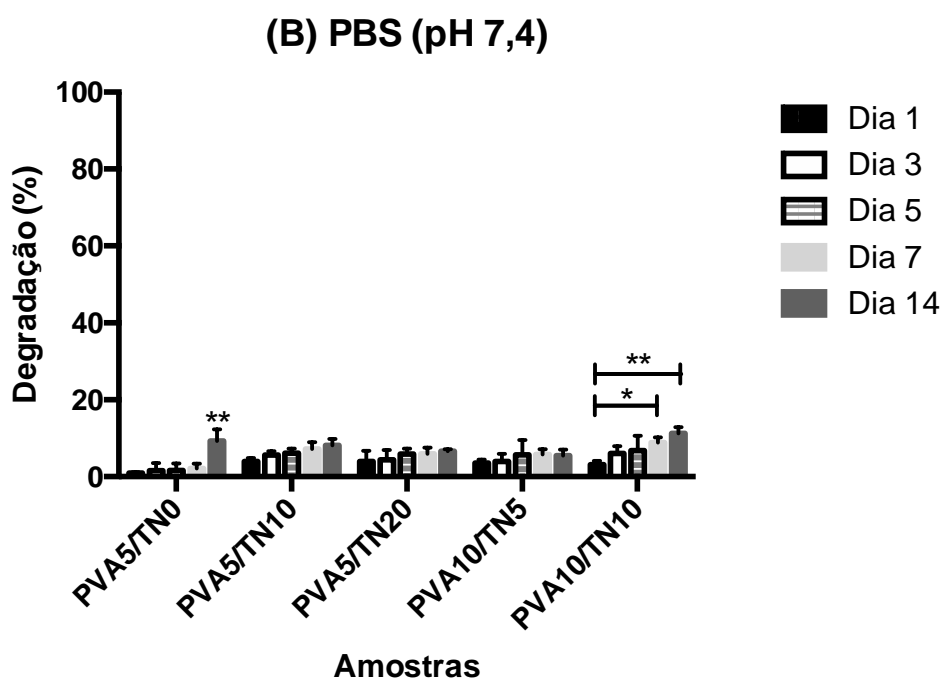


Figura 26B. Degradação (%) dos filmes PVA/TN avaliados em PBS (pH 7,4) durante 1, 3, 5, 7 e 14 dias. Em dias diferentes de análise (não alterando as amostras), os resultados de degradação em PBS foram significativamente diferentes. Os termos * e ** indicam resultados significativamente diferentes com $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente.

Por outro lado, os hidrogéis se mostraram mais estáveis contra o processo de degradação em PBS (Fig. 26B). Em 14 dias de teste, as amostras apresentaram degradação na faixa de 1,0 a 12%. Após neutralização dos filmes, o maior conteúdo

de grupos $-NH_2$ na estrutura do TN pode aumentar o estabelecimento de interações de segunda ordem na estrutura dos filmes. Este fato, bem como a solubilidade parcial do TN em PBS inibem a degradação dos filmes. O ensaio de intumescimento foi avaliado em 1,0 dia (24 h). Neste período, todos os filmes mantiveram suas estruturas. Com base nos resultados de estabilidade (em PBS a pH 7,4), os filmes PVA/TN possuem potencial para serem aplicados como scaffolds na área de engenharia de tecidos, principalmente quando a condição de pH fisiológico (pH 7,4) é requerida. Nas próximas seções serão discutidos os resultados das propriedades biológicas dos filmes visando aplicações na área biomédica.

5.5. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES PVA/TN

5.5.1. Atividade antioxidante e estudos de liberação controlada

As atividades antioxidantes das amostras PVA/TN foram avaliadas pelo ensaio DPPH \cdot (XIAOWEI *et al.*, 2011). O TN possui atividade antioxidante devido ao elevado conteúdo de grupos fenólicos em sua estrutura (FACHHI *et al.*, 2017a). Estas espécies consomem o radical livre DPPH \cdot . Porém, para o TN reagir com os radicais DPPH \cdot , este deve estar livre em solução, ou seja, o TN deve estar dissolvido para os radicais DPPH \cdot . Deste modo, estudos de liberação controlada de TN foram realizados. O TN liberado das matrizes dos filmes foi determinado em termos de equivalentes Trolox ($\mu\text{mol g}^{-1}$). As curvas de liberação controlada foram obtidas em SGF e PBS em um intervalo de 14 dias (Figs. 27, 28, 29 e 30).

Sendo assim, os filmes PVA/TN tiveram suas atividades antioxidantes avaliadas indiretamente. As Figs. 27 e 28 apresentam os resultados de liberação controlada de TN obtidos em PBS (pH 7,4). No geral, os filmes (PVA5/TN10, PVA5/TN20, PVA10/TN5 e PVA10/TN10) promoveram liberação de pequenas quantidades de TN em PBS.

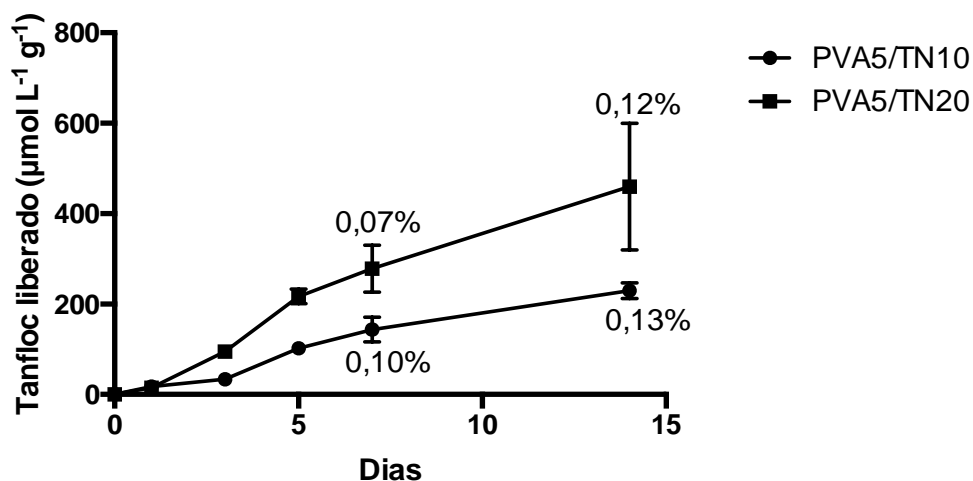


Figura 27. Curvas de liberação de TN obtidas em PBS. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA5/TN10 e PVA5/TN20 durante 14 dias.

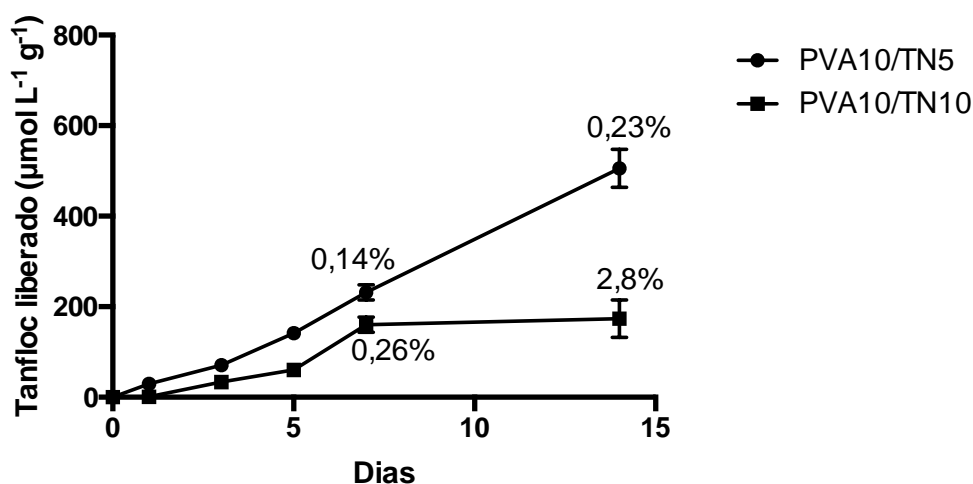


Figura 28. Curvas de liberação de TN obtidas em PBS. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA10/TN5 e PVA10/TN10 durante 14 dias.

Após 14 dias de ensaio, a concentração de TN liberada alcançou, aproximadamente, de 200 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por grama de hidrogel ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$). Esta concentração liberada corresponde entre 0,12 e 2,8% do TN incorporado nos filmes (Figs. 27 e 28). Estas porcentagens são muito baixas, porém os filmes apresentaram atividade antioxidante em PBS devido à concentração de TN liberada (200 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$). A baixa concentração de TN liberada em PBS se deve à elevada estabilidade dos filmes (Figs. 27 e 28). A baixa solubilidade do TN em PBS (FACCHI *et al.*, 2017a) também deve inibir a quantificação do TN em termos de equivalentes Trolox, pois o TN deve estar solúvel no meio para reagir com o radical DPPH*.

Por outro lado, quando os ensaios foram realizados em SGF (Figs. 29 e 30), a concentração de TN liberada foi significativamente maior. Os filmes preparados com

PVA a 5% m/v promoveram liberação de uma menor concentração de TN. Após 14 dias, os filmes PVA5/TN10 e PVA5/TN20 liberaram aproximadamente $2000 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ (1,2%) e $3184 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ (0,82%), respectivamente.

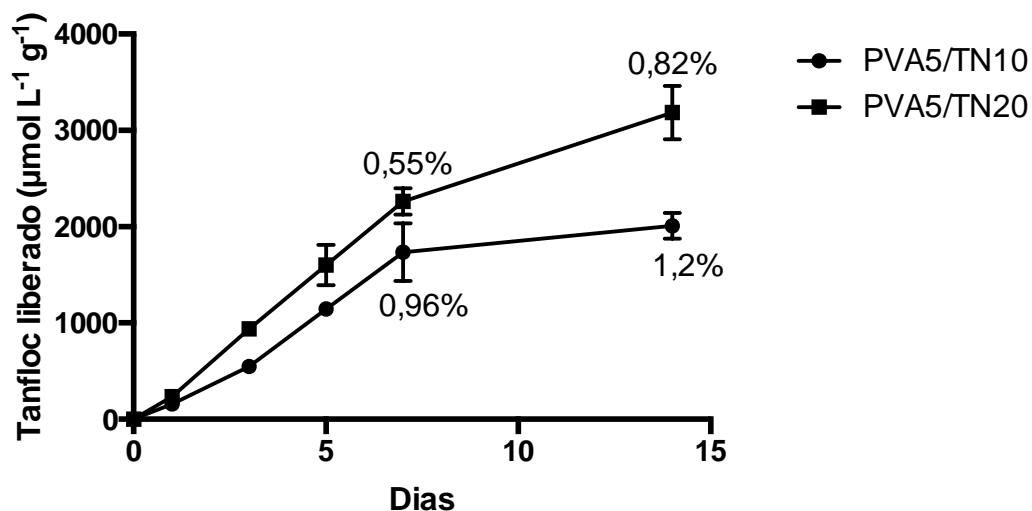


Figura 29. Curvas de liberação de TN obtidas em SGF. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA5/TN10 e PVA5/TN20 durante 14 dias.

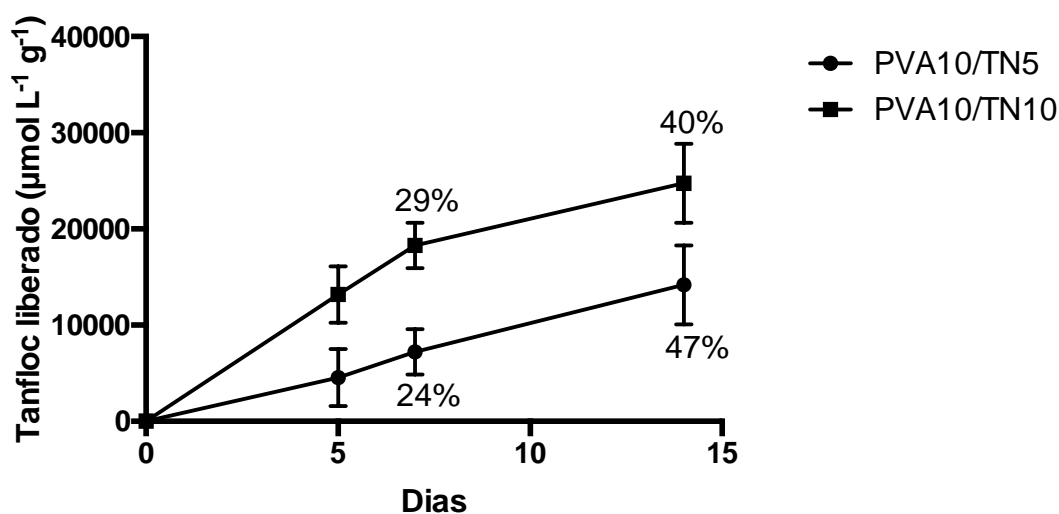


Figura 28. Curvas de liberação de TN obtidas em SGF. Os ensaios foram realizados com os filmes PVA10/TN5 e PVA10/TN10 durante 14 dias.

Em SGF, a maior densidade de reticulação nos filmes preparados com soluções PVA a 5% m/v reduz a quantidade de TN liberado. Este resultado está em acordo com os resultados de intumescimento e degradação. Por outro lado, os filmes PVA5/TN10 e PVA5/TN20 liberam uma maior quantidade de TN no meio SGF. Tal fato está relacionado à maior solubilidade do TN em SGF e, também, devido ao maior percentual de degradação dos filmes em SGF. Após 14 dias de análise em SGF, as amostras PVA10/TN5 e PVA10/TN10 promoveram liberação de aproximadamente

14.000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ (47%) e 25.000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ (40%) do TN incorporado nos filmes (Fig. 30). Este efeito está relacionado à elevada taxa de degradação em SGF dos hidrogéis preparados por meio de soluções PVA a 10% m/v. Todos os filmes apresentaram atividade antioxidante. Por outro lado, apenas os filmes submetidos a solução PBS mantiveram suas estruturas intactas. Por outro lado, todos filmes PVA/TN avaliados apresentaram atividade antioxidante.

5.5.2. Atividade antimicrobiana dos filmes PVA/TN

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada contra as bactérias *S. aureus* (bactéria gram-positiva) e *P. aeruginosa* (bactéria gram-negativa) em diferentes condições de pH (pH 6,0 e 7,4). Os resultados foram obtidos em termos do halo de inibição e os mesmos estão apresentados na Fig. 31.

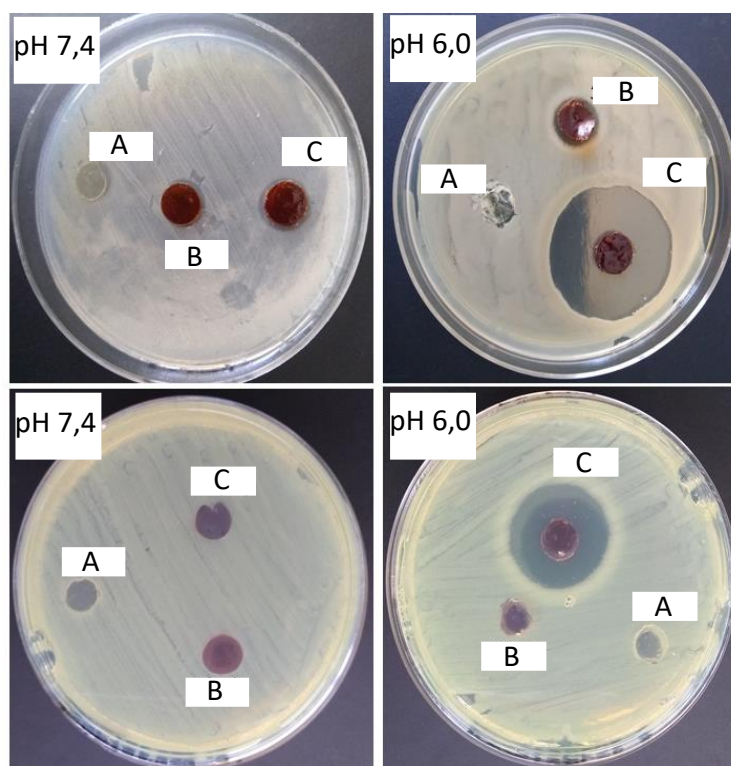


Figura 31. Atividade antimicrobiana (em termos do halo de inibição) dos filmes PVA/TN contra *S. aureus* (imagens no topo da Fig. 31) e *P. aeruginosa* (imagens na parte inferior da Fig. 31) após 24h a 37°C. Os ensaios foram realizados nas condições de pH 6,0 e 7,4. A = PVA5/TN0, B = PVA5/TN20 e C = PVA10/TN10.

O filme PVA5/TN0 (sem TN) foi utilizado como controle. Esta amostra não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ou seja, o halo de inibição foi nulo em ambos os ensaios realizados em pH 6,0 e 7,4 (Fig. 31). As bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram escolhidas para este teste, uma vez que

são micro-organismos causadores de infecções (JOACHIMS *et al.*, 2003), por isso, scaffolds com atividade antimicrobiana podem ter um potencial muito grande de aplicação. Para que um biomaterial seja aplicado no campo de regeneração de tecidos e, também, no combate de infecções causadas por bactérias, o material deve ser citocompatível, ter atividade antimicrobiana e, ainda, ser capaz de promover fixação, adesão e proliferação de células. Os resultados antimicrobianos foram positivos apenas com o teste realizado em pH 6,0 e, quando a amostra PVA10/TN10 (C) foi utilizada (Fig. 31). Em pH 6,0, o halo de inibição promovido pelo filme PVA10/TN10 alcançou 19 mm contra *S. aureus* (Fig. 31 parte superior) e 16 mm contra *P. aeruginosa* (Fig. 31 parte inferior).

A atividade antimicrobiana do filme PVA10/TN10 se deve à presença de TN, à condição de pH, bem como, do teor de PVA no filme. Como relatado nas seções anteriores, o filme PVA10/TN10 apresentou menor estabilidade em meio ácido em relação aos demais filmes. Esta menor estabilidade promove degradação e liberação de TN da matriz dos filmes. Este efeito é promovido quando o pH diminui de 7,4 para 6,0. Em pH 6,0 o TN encontra-se parcialmente ionizado e a matriz PVA10/TN10 deve liberar mais TN que se difunde nas placas, matando as bactérias. Os resultados foram significativamente diferentes ($p \leq 0,0001$) considerando os ensaios realizados em diferentes pHs (Fig. 31). Isso ocorre, uma vez que, em pH 6,0 o TN está parcialmente ionizado. Estes resultados estão em acordo com os resultados de XPS. Os espectros de XPS de alta resolução do N1s indicaram a presença de grupos aminos protonados em todas as amostras contendo TN. Assim, os grupos catiônicos do TN podem interagir com as membranas celulares das bactérias (carregadas negativamente) promovendo evasão de componentes celulares e consequente morte das bactérias (MARTINS *et al.*, 2014). Este efeito é positivo somente com a amostra PVA10/TN10 devido possivelmente a liberação de um maior conteúdo de TN na condição de pH 6,0. As demais amostras contendo TN não apresentaram atividade antimicrobiana devido à elevada estabilidade dos filmes nas condições dos testes.

Quanto maior a concentração de TN na amostra maior será a atividade bactericida da mesma. Porém, a matriz polimérica deve promover a liberação do TN para que o mesmo se difunda na placa semeada com as bactérias. A atividade antimicrobiana dependeu das condições de pH dos testes, mas também, dependeu da concentração de TN liberada, ou seja, difundida na placa de cultura. Em PBS e depois de 24 h, os filmes PVA5/TN10, PVA5/TN20, PVA10/TN5 e PVA10/TN10

promoveram a liberação de apenas 20, 15, 30 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$. Estas concentrações são muito pequenas, por isso, a atividade antimicrobiana deve estar relacionada à existência de grupos $-\text{NH}_3^+$ no TN e, condição de pH do teste. A neutralização dos filmes também pode influenciar na atividade antimicrobiana. Os filmes foram neutralizados até que o pH do sobrenadante atingisse a faixa de pH 5,5 a 6,0. Excesso de íons H_3O^+ pode aumentar a atividade antimicrobiana dos filmes. O pH normal da pele dos seres humanos é em torno 4,7 a 5,5 (LAMBERS *et al.*, 2006). Portanto, visando uma possível aplicação tópica, o filme PVA10/T10 com atividade antimicrobiana em contato com a pele poderia alavancar ainda mais o potencial antimicrobiano dos filmes, devido à característica catiônica do TN. Este filme pode ser aplicado como bandagem, pois possui ação antimicrobiana contra micro-organismos (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) causadores de infecções em tecidos moles (MARTINS *et al.*, 2018a).

5.5.3. Citocompatibilidade dos filmes PVA/TN

5.5.3.1. Via método MTT

Os hidrogéis tiveram sua atividade de citotoxicidade investigada sobre três linhagens de células (fibroblastos L929, células epiteliais VERO e macrófagos J774A1). Os resultados foram obtidos via método MTT após 72 h de ensaio e estão apresentados na Fig. 32.

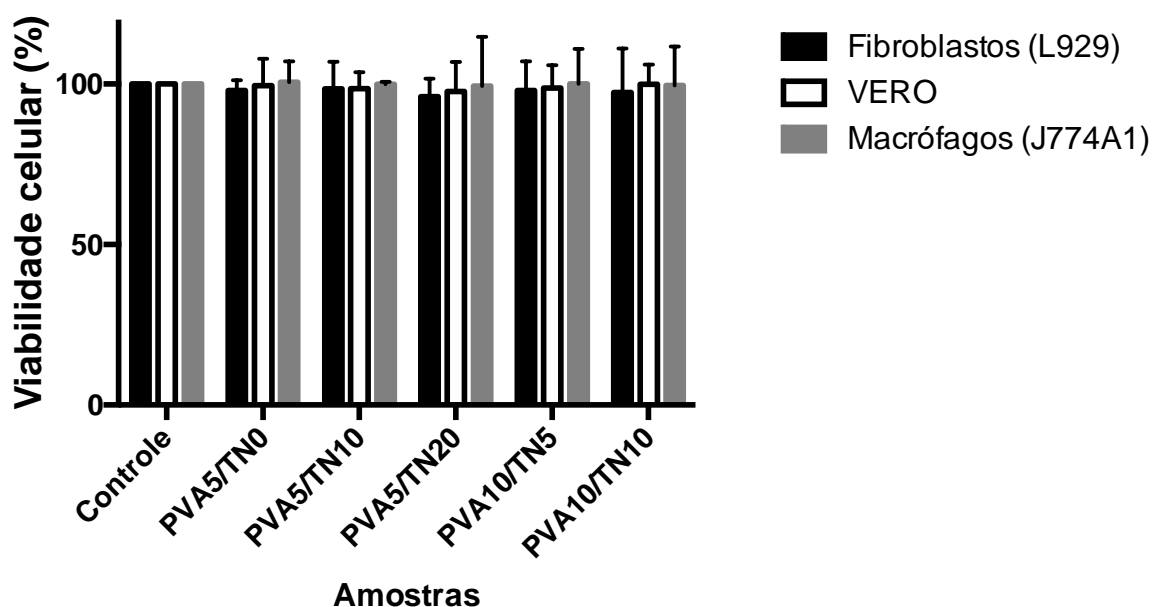


Figura 32. Viabilidade celular das células fibroblastos L929, células VERO e macrófagos J774A1 determinadas via método MTT após contato (72 h) com filmes PVA/TN. Os resultados não apresentaram diferença significativa em relação as amostras aplicadas ($p > 0,05$).

Os resultados indicaram que todas as amostras foram citocompatíveis sobre as linhagens celulares investigadas, promovendo resultados de viabilidade celular em torno de 100% após o período de incubação. Quando comparada ao teste controle (controle positivo), a viabilidade celular promovida por todos os filmes foi acima de 96%. Este resultado indicou remoção total do glutaraldeído residual e remoção do H_3O^+ em excesso antes da etapa de lavagem das amostras (portanto, a atividade antimicrobiana se deve apenas à presença de TN). Estudos indicam que o glutaraldeído possui toxicidade sobre tecidos vivos em concentração de apenas $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ (YANG, *et al.*, 2017). Na concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, o glutaraldeído diminuiu a viabilidade celular de células epiteliais para 50% após 12h de incubação. Contudo, hidrogéis de PVA reticulados com glutaraldeído não apresentaram citotoxicidade sobre as células epiteliais, pois o glutaraldeído encontrava-se reticulado na matriz dos filmes (YANG, *et al.*, 2017). Em geral, neste estudo, a concentração de glutaraldeído nas blendas PVA/TN foi de $1,7 \text{ g L}^{-1}$.

Outros trabalhos reportados na literatura apresentaram resultados semelhantes. Costa Junior e colaboradores (2009) produziram filmes de PVA/quitosana reticulados com glutaraldeído (na concentração de 1 a 5% m/v). Via método MTT, os filmes induziram até 97% de viabilidade celular sobre células VERO após 24 h de incubação. Portanto, filmes estáveis promovem resultados satisfatórios de citocompatibilidade. Esta propriedade é requerida para materiais scaffolds.

5.5.3.2. Via método AlamarBlue

O teste MTT se trata de um método indireto de avaliação da atividade citotóxica de materiais (MOSSMANN, 1983). Neste método, a viabilidade celular é determinada por meio de um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade das mitocôndrias viáveis de converter o MTT em cristais de púrpuras de formazan (MOSSMANN, 1983). Neste caso, a viabilidade celular é determinada a partir da morte de células vivas. Por isso, o método MTT não é o mais indicado para avaliar as propriedades de citotoxicidade de materiais. Sua limitação é em termos do ensaio indireto. Por outro lado, esta limitação pode ser superada por meio do teste via AlamarBlue (ou resazurina). A resazurina é um indicador redox que pode quantificar de forma direta (via ensaio colorimétrico) a viabilidade celular em organismos vivos desde bactérias até células de mamíferos. Existe uma correlação direta e linear entre o potencial de

redução da resazurina e o número de células viáveis (O'BRIEN et al 2000; MARTINS et al., 2018a). Quanto maior a concentração de células viáveis maior será a quantidade de corante resazurina reduzido no ensaio, ou seja a redução do corante indica a viabilidade celular no respectivo ensaio. No ensaio via AlamarBlue, a viabilidade celular depende da atividade metabólica celular e a concentração da espécie reduzida de resazurina resultante da atividade de células viáveis é proporcional ao número de células vivas (PULYALA et al., 2017). Neste ensaio, as células não precisam ser mortas para terem sua viabilidade celular estimada. Portanto, o teste via AlamarBlue é mais indicado para determinar a citotoxicidade de biomateriais em relação ao método MTT.

Os resultados de viabilidade celular sobre as células MSCs foram determinados via método AlamarBlue e estão apresentados na Fig. 33. Neste caso, os resultados de viabilidade celular promovidos pelos filmes foram comparados com os resultados de viabilidade celular promovidos por um controle interno, tal como o metal titânio. Os ensaios foram realizados depois de 4 e 7 dias de análise e o titânio foi escolhido como controle interno devido ao seu amplo espectro de aplicações no campo biomédico. O titânio é um dos materiais mais importantes para a substituição óssea em aplicações biomédicas, além de não apresentar toxicidade aos tecidos do corpo humano (DE VITERI e FUENTES, 2013).

Os resultados de viabilidade celular promovidos pelos filmes foram normalizados em termos dos resultados de viabilidade promovidos pelo meio de cultura e titânio. Assim, a viabilidade celular induzida pelo titânio foi tomada como sendo 100%. Neste caso, a viabilidade celular promovida pelos filmes foi comparada com a viabilidade produzida pelo metal titânio (depois de 4 e 7 dias de análise). O filme mais hidrofílico (PVA10/TN10) promoveu os melhores resultados de viabilidade celular (78% após 4 dias e 51% após 7 dias) (Fig. 33). Estes resultados foram significativamente maiores em relação aos resultados promovidos pelos demais filmes. Além disso, o resultado mais satisfatório de viabilidade celular promovido pelo filme PVA10/TN10 de superfície mais hidrofílica está em acordo com dados relatados na literatura. Bahrami e colaboradores (2003) demonstrou que filmes hidrofílicos de PVA/quitosana reticulados com glutaraldeído podem aumentar a viabilidade celular sobre células VERO. A amostra mais hidrofóbica (filme PVA5/TN20) apresentou os menores valores de viabilidade celular sobre as MSCs (68% depois de 4 dias e apenas

25% depois de 7 dias) (Fig. 33). Portanto, a hidrofiliçidade de uma superfície favorece microambientes necessários para promover cultura de células.

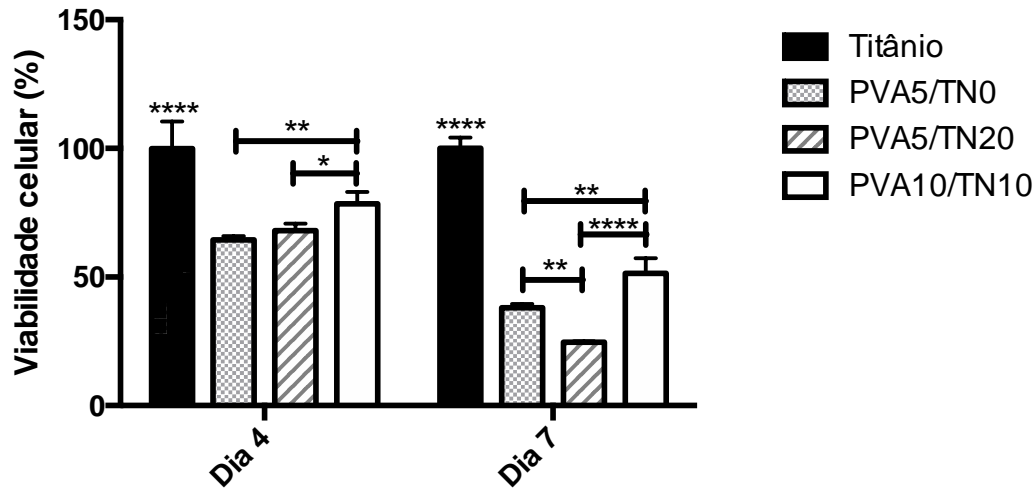


Figura 33. Resultados de viabilidade celular promovidos pelas amostras PVA/TN e titânio (controle interno) sobre células MSCs depois de 4 e 7 dias de análise. Os termos *, ** e **** indicam resultados significativamente diferentes com $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,0001$.

As viabilidades celulares promovidas pelos filmes foram significativamente menores em relação às viabilidades celulares promovidas pelo controle titânio. A diferença nos resultados foi maior depois do sétimo dia de estudo (Fig. 33). Este efeito será melhor entendido na próxima seção, quando analisarmos os ensaios de adesão e proliferação celular. O titânio tem potencial renomado para promover a adesão e proliferação de células MSCs (ALMODÓVAR *et al.*, 2010). De acordo com a Fig. 33, o titânio deve promover efetivamente a proliferação de células MSCs depois do dia 4.

O aumento da viabilidade celular promovida pelo titânio no dia 7, diminuiu os valores de viabilidade celular provocados pelos filmes no dia 7, uma vez que, os resultados de viabilidade celular promovidos pelos filmes foram normalizados em termos dos resultados promovidos pelo titânio (controle interno). Este efeito será melhor avaliado na próxima seção. Dentre todos os filmes, a amostra PVA10/TN10 (com superfície mais hidrofílica) foi a que melhor se aproximou dos resultados de viabilidade celular promovidos pela amostra de titânio. Além disso, o filme PVA10/TN10 também apresentou atividade antimicrobiana e atividade antioxidante. Estas propriedades tornam este filme com potencial para atuar como matriz scaffold na área de engenharia de tecidos.

5.5.4. Ensaio de adesão e proliferação celular

Células MSCs foram cultivadas sobre as superfícies dos filmes PVA/TN e titânio (controle interno positivo). Depois de 4 e 7 dias de incubação, os resultados de adesão e proliferação celular sobre as células MSCs foram determinados. A Fig. 34 apresenta o número de células MSCs determinados sobre cada cm^2 de superfície das amostras, depois de 4 e 7 dias de contato. Os resultados de contagem de células foram obtidos por meio de imagens de fluorescência (Fig. 35). O corante DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) se liga preferencialmente a moléculas de DNA, indicando a presença do núcleo celular pela coloração azul característica que é emitida nas imagens de fluorescência (Fig. 35) (Da SILVA 2014). Sendo assim, a quantidade de células/ cm^2 foi estimada em termos do número de núcleos celulares sobre as amostras. Os resultados foram obtidos em triplicata, utilizando 5 imagens de fluorescência (com ampliação de 10 \times) obtidas de cada superfície. Para isso, foram consideradas diferentes regiões na superfície dos materiais.

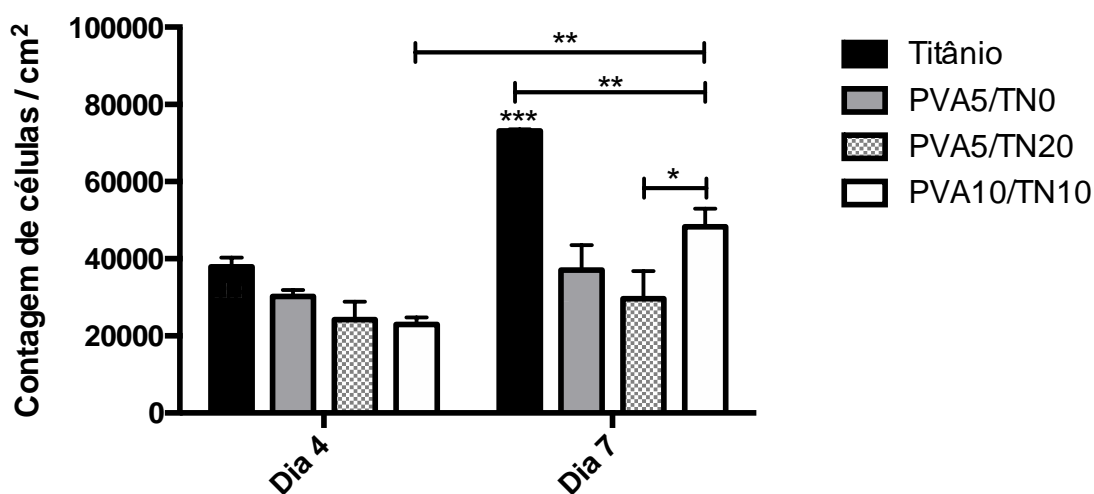


Figura 34. Número de células MSCs (por cada cm^2 de superfície) sobre os filmes PVA/TN e controle de titânio depois de 4 e 7 dias de análise. Os termos *, ** e *** indicam resultados significativamente diferentes com $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente.

Os resultados de proliferação celular descritos nas Figs. 33 e 34 estão em acordo com os resultados de viabilidade celular avaliados via método AlamarBlue (Fig. 33). Assim como nos ensaios de viabilidade celular (determinados no dia 4), os resultados de proliferação celular, ou seja, o número de células/ cm^2 na superfície dos filmes não foi “muito menor” em relação ao número de células determinados sobre o titânio (controle) uma vez que, os resultados não foram significativamente diferentes

($p > 0,05$; Fig. 34). Por outro lado, o titânio promoveu proliferação celular significativa depois do dia 4. No titânio, o número de células/cm² variou de aproximadamente 37.000 células/cm² (dia 4) para quase 78.000 células/cm² (dia 7) (Fig. 34). Por isso, os resultados de viabilidade celular avaliados via ensaio AlamarBlue diferiram expressivamente dos valores de viabilidade promovidos pelos filmes no dia 7 (Fig. 33). Este efeito explica a redução de viabilidade celular promovido pelos filmes depois do dia 4 (Fig. 33). Porém, esse fato não indica que os filmes foram mais citotóxicos para as células MSCs depois do dia 4. Ao contrário, o filme PVA10/TN10 também promoveu proliferação celular de células MSCs depois do dia 4 ($p \leq 0,01$; Fig. 34). No entanto, este efeito foi menor quando comparado ao controle interno de titânio (Fig. 34).

Considerando os filmes PVA/TN, a proliferação celular foi significativa apenas sobre a superfície do filme PVA10/TN10 mais hidrofílico. Depois do dia 4 de análise, o número de células/cm² sobre o filme PVA10/TN10 aumentou de 23.500 células/cm² para aproximadamente 48000 células/cm². Este efeito indicou que este filme tem potencial para atuar como scaffold. Os resultados de proliferação e adesão celular podem ser confirmados por meio da análise da Fig. 35.

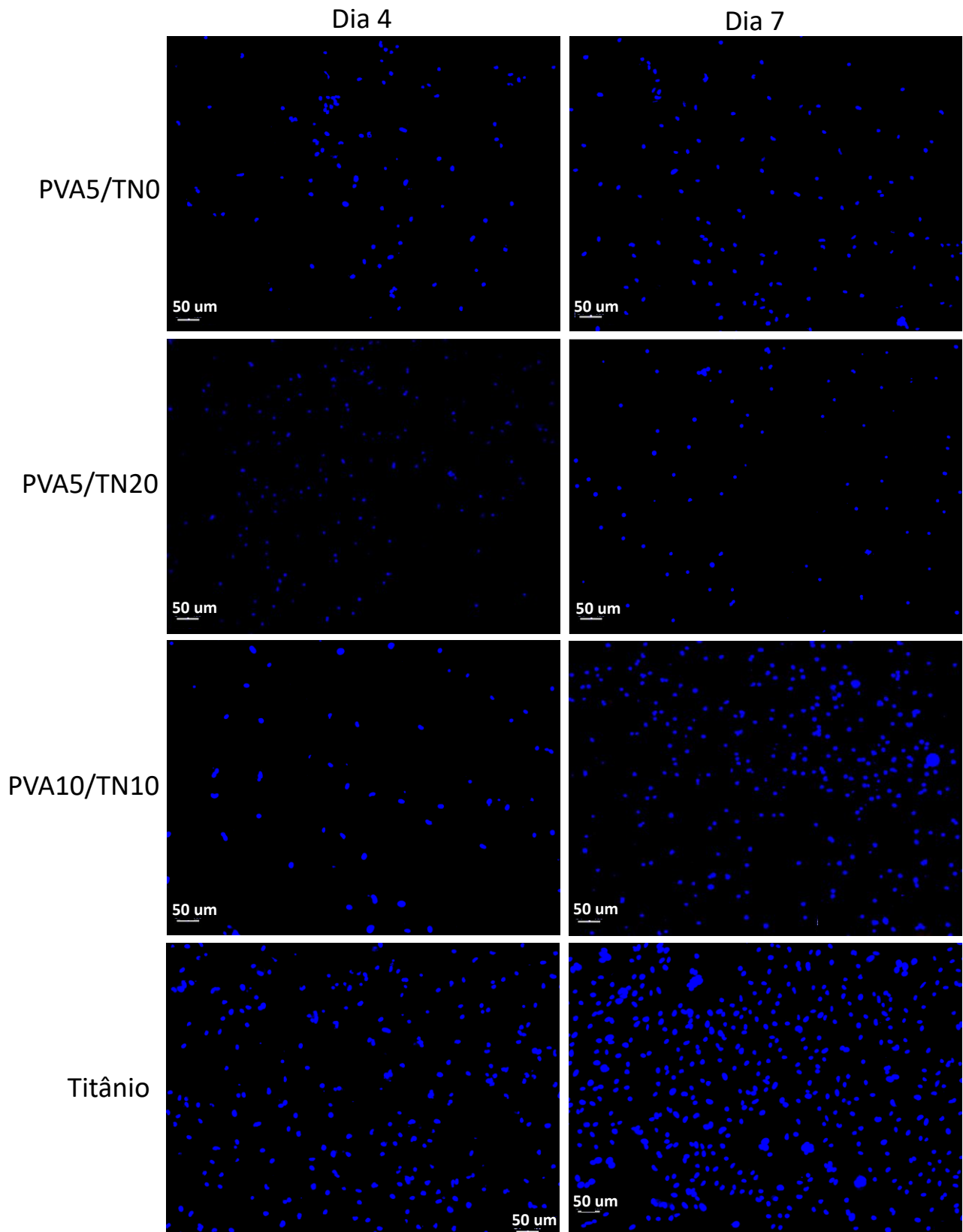


Figura 35. Imagens de fluorescência das superfícies dos filmes PVA/TN e controle de titânio. As imagens foram obtidas após 4 e 7 dias de análise.

Após o dia 7, verificou-se um número consideravelmente maior de núcleos celulares sobre as amostras controle (titânio) e filme PVA10/TN10 (Fig. 35). Nesse caso, a maior hidrofiliçidade do filme PVA10/TN10 promoveu maior interação com as células MSCs, fornecendo locais de ligação para ocorrência de adesão de células e superfície adequada para promover crescimento celular (KANIMOZHI *et al* 2018).

A Fig. 36 apresenta imagens SEM das superfícies dos filmes PVA/TN após 7 dias de contato com as células MSCs.

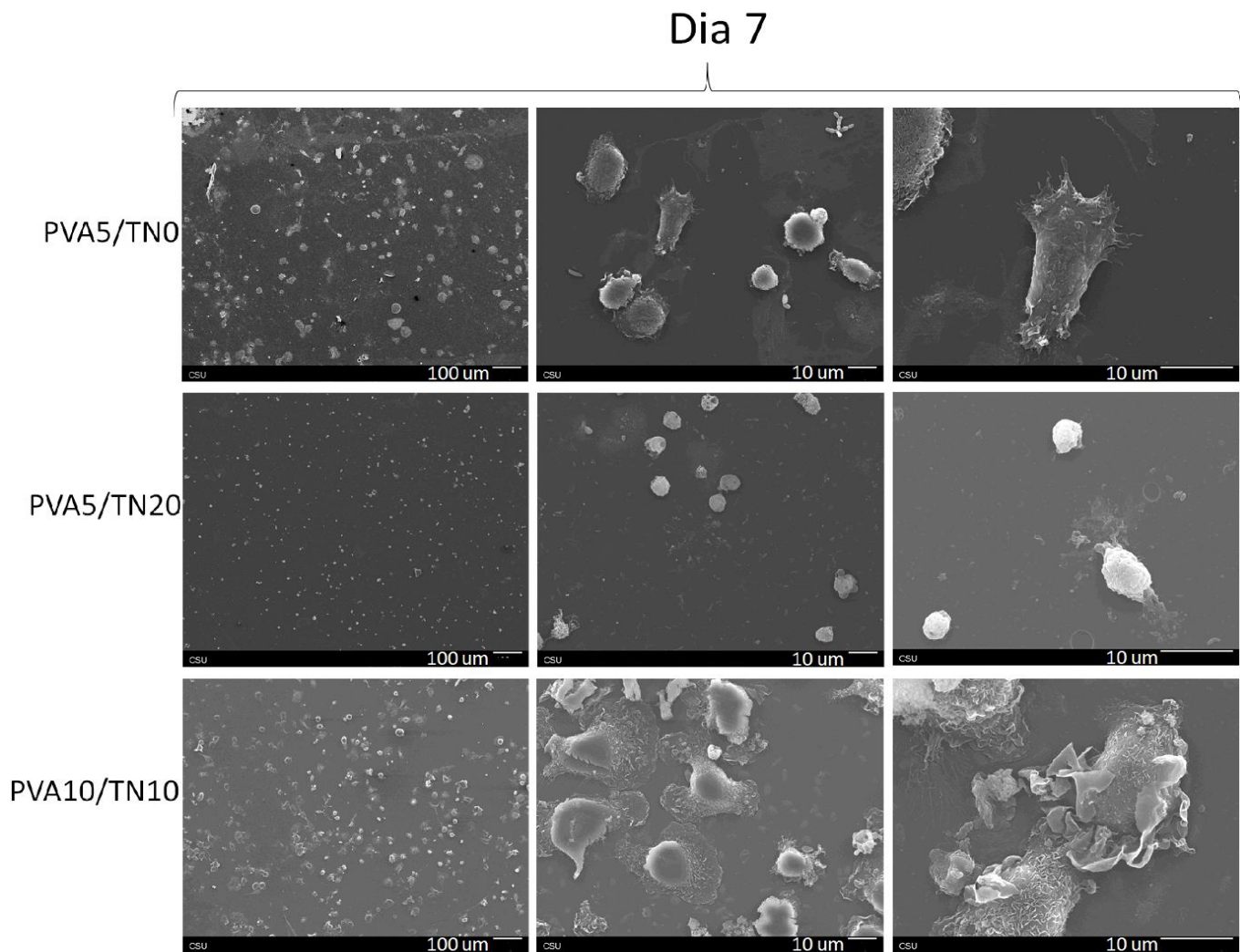


Figura 36. Imagens de SEM dos filmes PVA/TN em contato com as células MSCs após 7 dias de estudo.

Os resultados de adesão e proliferação celular estão em acordo com os dados reportados nas imagens de fluorescência. Após 7 dias de estudo, confirmou-se que as células MSCs se espalham preferencialmente na superfície dos filmes PVA10/TN10 e PVA5/TN0. Estes filmes possuem superfícies mais hidrofílicas em relação ao filme PVA5/TN20. Na superfície do filme PVA5/TN20 (filme de superfície

mais hidrofóbica), as células não conseguem se espalhar. O espalhamento das células na superfície de scaffolds deve ocorrer afim de se obter a formação de novos tecidos. Neste sentido, uma matriz scaffold deve estimular o espalhamento de células para, então, viabilizar a cicatrização e regeneração de novos tecidos (COSTA-JUNIOR *et al.*; 2008). Neste sentido, significativamente, apenas a amostra PVA10/TN10 tem potencial para atuar como material scaffold no campo de engenharia de tecidos.

6. CONCLUSÕES

Materiais filmes a base de PVA e tanfloc (um derivado catiônico de taninos condensados) foram sintetizados pela primeira vez na presença de glutaraldeído. Os filmes foram obtidos com diferentes concentrações de PVA e TN. Resultados indicaram que o aumento de TN (maior que 20% em massa) na blenda PVA/TN torna os filmes quebradiços e frágeis. Por isso, a concentração ótima de TN utilizada nas blends PVA/TN foi de até 20% em massa. A concentração de TN e de PVA, bem como a de glutaraldeído, foram variadas afim de obter filmes com propriedades de hidrofiliabilidade e estabilidade contra processos de degradação. Resultados indicaram que o filme PVA10/TN10 foi o que apresentou superfície mais hidrofílica. Resultados de FTIR-ATR, XPS, TGA e SEM indicaram presença de TN nos filmes. Os resultados mostraram também que os filmes reticulados são citocompatíveis e possuem atividade antioxidante. Porém, apenas a amostra PVA10/TN10 apresentou atividade antimicrobiana. Este fato dependeu do conteúdo de TN e PVA no filme, bem como, do pH do teste antimicrobiano. A amostra PVA10/TN10 possui baixa estabilidade em meio SGF e promove liberação de TN significativa neste meio. A redução de pH de 7,4 para 6,0 (no teste antimicrobiano) deve facilitar a difusão de macromoléculas de TN para o interior das placas contendo as bactérias. Este efeito é alavancado pela protonação parcial do TN. A liberação aumenta a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (halo de inibição de 19 mm) e *P. aeruginosa* (halo de inibição de 16 mm). Comparado ao titânio, o filme de superfície mais hidrofílica (PVA10/TN10) foi capaz de promover adesão, proliferação e espalhamento de células MSCs em apenas 7 dias de cultura. Portanto, ajustando as concentrações de TN, PVA e glutaraldeído pode-se obter filmes com capacidade para atuarem como matrizes scaffolds. Este estudo relatou pela primeira vez a formação de um scaffold (filme PVA10/TN10) a base de PVA e TN. Este scaffold apresenta grande potencial de aplicação na área de engenharia de tecidos, pois possui atividade antimicrobiana, antioxidante e pode promover ambientes para adesão e proliferação de células, bem como, formação de novos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E. M.; Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.
- AHMED, S. *et al.* A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.
- AKHTAR, M.; FAHEEM; H., MUHAMMAD, R., NAZAR, M. Methods of synthesis of hydrogels... a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 554-559, 2016.
- ALAVARSE, A.C.; **Desenvolvimento e caracterização de arcabouços à base de blendas poliméricas de pva e de quitosana para engenharia de tecido**. 73f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do ABC - Santo André SP, 2015.
- ALMODÓVAR, J. *et al.* Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayer surface coatings can enhance mesenchymal stem cell response to adsorbed growth factors. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 10, p. 2629-2639, 2010.
- AL-NASIRY, S.; GEUSENS N.; HANSSENS, M.; LUYTEN. C.; PIJNENBORG. R.; The use of AlamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, 2007.
- ALVES, P. M.A.; *et al.* Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p.1751-1757, out. 2011.
- ATTA, S. *et al.* Injectable biopolymer based hydrogels for drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 240-245, 2015.
- BAHRAMI, S. B. *et al.* Poly (vinyl alcohol)-chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. **Iranian Polymer Journal**. Volume 12 N2 (2003).
- BAI, X. *et al.* Bioactive hydrogels for bone regeneration. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 4, p. 401-417, 2018.
- BALOUIRI, M. *et al.* Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6 (2016) 71–79.
- BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 3, p. 1019-1025, 2010.
- BHALODIA NR.; SHUKLA VJ. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of Cassia fistula L.: An ethnomedicinal plant. **J Adv Pharm Technol Res**. 2011 Apr-Jun; 2(2):104–109.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CARBONE, M. *et al.* Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. **Journal of King Saud University-Science**, v. 28, n. 4, p. 273-279, 2016.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CARRASCO, L. D. M. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906-9946, 2013.

CENSI, R. *et al.* Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 680-692, 2012.

CHANG, J. Y.; *et al.* **Biopolymers- PVA Hydrogels Anionic Polymerisation Nanocomposites**. Springer Science & Business Media, 2000.

CHEN, P. H., KUO, T. Y., KUO, J. Y., TSENG, Y. P., WANG, D. M., LAI, J. Y., HSIEH, H. J. (2010). Novel chitosan-pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration. **Carbohydrate Polymers**, 82(4), 1236–1242.

COSTA-JÚNIOR E.S, BARBOSA-STANCIOLI E.F, MANSUR A.A.P, VASCONCELOS W.L, (2009) Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. **Carbohydr Polym** 76:472–481

COSTA-JÚNIOR, E; PEREIRA, M M.; MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 553-561, 2009.

CRISPIM, E. G. *et al.* Hydrogels based on chemically modified poly (vinyl alcohol)(PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: Preparation and characterization. **Express Polymer Letters**, v. 6, n. 5, 2012.

D'ALMEIDA, Mélanie *et al.* Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0189537, 2017.

DA SILVA, L. H.A., **Marcação de células-tronco mesenquimais com nanopartículas metálicas funcionalizadas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília. 128f Brasília 2014

DAI, T. *et al.* "Chitosan Preparations for Wounds and Burns: Antimicrobial and Wound-Healing Effects." Expert review of anti-infective therapy 9.7 (2011): 857–879. **PMC Web**. 1 Oct. 2017.

DE VITERI, V. S.; FUENTES, E.; Titanium and titanium alloys as biomaterials. In: **Tribology-Fundamentals and advancements**. InTech, 2013.

DEB, P. *et al.* Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 5, p. 12909-12919, 2018.

DELUZIO, T. G. B; SEIFU, D. G.; MEQUANINT, K.; 3D scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine: beyond structural templates?. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 1, n. 3, p. 267-281, 2013.

EDWARDS, C.; MARKS, R.; Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375-380, 1995.

FACCHI, D. P. *et al.* Polyelectrolyte complexes based on alginate/tanfloc: Optimization, characterization and medical application. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 129-138, 2017a

FACCHI, D. P.; *et al.*; Polysaccharide-Based Materials Associated with or Coordinated to Gold Nanoparticles: Synthesis and Medical Application. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 25, p. 2701-2735, 2017b

FACCHI, S. P. *et al.* Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 87, p. 237-245, 2016.

FACCHI, Débora P. *et al.* New magnetic chitosan/alginate/Fe₃O₄@ SiO₂ hydrogel composites applied for removal of Pb (II) ions from aqueous systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 337, p. 595-608, 2018.

FIGUEIREDO, K. C. S.; ALVES, TITO, L.M.; BORGES, CRISTIANO, P.. Poly (vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 6, p. 3074-3080, 2009.

FOLLMANN, H. D. M. *et al.*, Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes **Biomacromolecules**, 13 (2012), pp. 3711-3722,

FRIEDMAN, M. *et al.* Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 2, p. 354-361, 2006.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, **Iran. Polym. J.** 19 (2010) 375–398.

GEBHARDT, C. *et al.* Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 141-149, 2010.

GEROLA, A. P.; *et al.* The effect of methacrylation on the behavior of Gum Arabic as pH-responsive matrix for colon-specific drug delivery, **Eur. Polym. J.** (2016).

GUILHERME, M. R.; *et al.* Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 365-385, 2015.

GOLAFSHAN, N. *et al.* Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. **Carbohydrate polymers**, v. 176, p. 392-401, 2017.

GORRASI, G., BUGATTI, V. VITTORIA, V.; Pectins filled with LDH-antimicrobial molecules: preparation, characterization and physical properties **Carbohydrate Polymers**, 89 (2012), pp. 132-137

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B; ASSIS, ODILIO, B.G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 122-127, 2016.

GRAHAM, N. *et al.* Characterisation and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, n. 1-3, p. 9-16, 2008.

GUIL-GUERRERO, J. L. *et al.* Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. **Livestock Science**, v. 189, p. 32-49, 2016

GUTHA, Y. *et al.* Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 234-241, 2017.

HAJJI, S. *et al.* Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p. 15310-15320, 2016.

HALIMA, N. B.; Poly (vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. **RSC Advances**, v. 6, n. 46, p. 39823-39832, 2016.

HAMEED, Y. T. *et al.* A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to Polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. **Journal of Environmental Management**, v.184, n. 3, p. 494-503, 2016

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In: (Ed.). **Biopolymers- PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites**: Springer, 2000. p.37-65.

HAYWARD, G. N. *et al.* Effect of oral dexamethasone without immediate antibiotics vs placebo on acute sore throat in adults: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 317, n. 15, p. 1535-1543, 2017.

HE, H. *et al.* Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

HENNINK, W.E.; VAN NOSTRUM, C.F.. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p.223-236, dez. 2012.

HOFFMAN, A. S.; Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.

INABA, H.; PUI, C. H.; Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1096-1106, 2010.

JINDAL, N.; MEHTA, S. K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: optimization of formulation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 100-106, 2015.

JOACHIMS, H. Z. *et al.* Antioxidants in treatment of idiopathic sudden hearing loss. **Otology & Neurotology**, v. 24, n. 4, p. 572-575, 2003.

KAMARUL, T.; KRISHNAMURITHY, G.; SALIH, N. D.; , IBRAHIM, N. S.; RAGHAVENDRAN HR.; SUHAEB, A. R.; CHOON, D. S.; Biocompatibility and

toxicity of poly(vinyl alcohol)/n,o-carboxymethyl chitosan scaffold. **Scientific World Journal** Volume 2014, 7 pages.

KAMOUN, E.; A.; KENAWY, EL-REFAIE S.; CHEN, X.. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, 2017.

KANIMOZHI, K.; et al.; In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose – nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells **Appl. Surf. Sci.**, 449 (2018), pp. 574-583,

KONG, M.; et al.;. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

LAM, S. J. et al.;. Antimicrobial Polymeric Nanoparticles. **Progress in Polymer Science**, 2017.

LAMBERS H, PIESENS S, BLOEM A et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; **28**: 359–370.

LÓPEZ, G. P.; CASTNER, D. G.; RATNER, B.D;. XPS O 1s binding energies for polymers containing hydroxyl, ether, ketone and ester groups. **Surface and Interface Analysis**, v. 17, n. 5, p. 267-272, 1991.

MA, X.; et al.; Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MAITRA, J.; ; SHUKLA, V.; Cross-linking in hydrogels-a review. **American Journal of Polymer Science**, v. 4, n. 2, p. 25-31, 2014.

MANGRICH, A. S. et al.; Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2013.

MANSUR, H. S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 539-548, 2008.

MARTINS, A. F.; et al.;. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20800-20832, 2014

MARTINS, A. F.; et al. Bactericidal activity of hydrogel beads based on N, N, N-trimethyl chitosan/alginate complexes loaded with silver nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 9, p. 1129-1132, 2015a

MARTINS, A. F.; et al. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 174-184, 2013.

MARTINS, A. F.; et al.; Novel poly (ϵ -caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 525, p. 21-30, 2018a.

MARTINS, A. F.; *et al.*; Polyelectrolyte complex containing silver nanoparticles with antitumor property on Caco-2 colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 748-755, 2015b

MARTINS, A. F.; *et al.*; Shielding effect of 'surface ion pairs' on physicochemical and bactericidal properties of N, N, N-trimethyl chitosan salts. **Carbohydrate Research**, v. 402, p. 252-260, 2015c.

MARTINS, Jéssica G. et al. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, 2018c.

MARTINS, J., OLIVEIRA, A., GARCIA, P., KIPPER, M., MARTINS, A., Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties **Carbohydrate Polymers**, 188 2018b.

MARTUCCI, J. F.; ACCAREDDU, A. E. M.; RUSECKAITE, R. A. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of glutaraldehyde. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 7, p. 3282-3292, 2012.

MELO-JUNIOR, M. R.; **Imobilização de anticorpos em compósito de polisiloxano-álcool polivinílico para uso em imunodiagnóstico**. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M.J., WALDRON, K. C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, 37:790-802, Nov. 2004.

MITCHEL, D.B., MINNIS, R.L., CURRAN, T.P., DEBOO, S.M., KELLY, J.A., PATWARDHAN, W., TAI, T., Treatment of aqueous systems using a chemically modified tannin, **US patent 5,843,337** (1998).

MONTEIRO, J. M. *et al.*; Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MONTEIRO, J. M.; *et al.*, Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím. Nova** 2005, vol.28, n.5, pp.892-896.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

NAAHIDI, S.; *et al.*; Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 5, p. 530-544, 2017.

O'BRIEN, J.; *et al.*; Investigation of the AlamarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, Renata N. et al. PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 25, 2015.

PARK, S. Y.; JUN, S. T.; MARSH, K. S. Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4, p. 499-502, 2001.

PEPPAS, N. A.; *et al.*; Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

PEPPAS, Nicholas A. **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. Springer Science & Business Media, 2010.

PEREIRA, Ana Paula Viana. **Análise e caracterização de tecidos porcino e bovino fixados com glutaraldeído para aplicação em biopróteses cardíacas**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PULYALA, Praneetha et al. In-vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1305-1316, 2017.

QUAMME, J.E., KEMP, A. H. Stable tannin based polymer compound, US **patent** 4,558,080 (1985).

RAFIQUE, A.; *et al.*; Chitosan functionalized poly (vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 141-154, 2016.

RAVINDRAN, A.; *et al.*; Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 342-352, 2013.

REED, P.E., FINCK, M.R., Modified tannin mannich polymers, US **patent** 5,659,002 (1997).

Registro Brasileiro de Transplantes 2017. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado 2010-2017 - **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos** ABTO -Ano XXIII N^o4

RIZWAN, M.; *et al.*; pH Sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. **Polymers**, v. 9, n. 4, p. 137, 2017.

ROMERO, R.; CHUBB, L.; TRAVERS, J. K.; GONZALES, T. R.; EHRHART, N. P.; KIPPER, M. J. (2015). Coating cortical bone allografts with periosteum-mimetic scaffolds made of chitosan, trimethyl chitosan, and heparin. **Carbohydrate Polymers**, 122, 144–151.

SADAHIRA, Carolina Mieko. **Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico ph sensitivos processados por métodos físico-químicos**. 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte MG, 2007.

SALOMÉ VEIGA, A.; SCHNEIDER, J. P.; Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. **Peptide Science**, v. 100, n. 6, p. 637-644, 2013.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH^{*}, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111-125, 2015.

SHAHZAD, S. *et al.*; Chitosan-based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: novel anti-bacterial wound dressing matrices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 3, p. 136, 2015.

SHEIK, S. *et al.*, Study on the morphological and biocompatible properties of chitosan grafted silk fibre reinforced pva films for tissue engineering applications **International Journal of Biological Macromolecules** Volume 116, 2018, Pages 45-53

SHEN, W.; *et al.*; The bactericidal mechanism of action against Staphylococcus aureus for AgO nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 610-619, 2017.

SLAUGHTER, B. V. *et al.* Hydrogels in regenerative medicine. **Advanced materials**, v. 21, n. 32-33, p. 3307-3329, 2009.

SLAUGHTER, B.V., KHURSHID, S.S., FISHER, O.Z. , KHADEMHOSEINI, A., PEPPAS, N.A. Hydrogels in regenerative medicine(Review) **Advance. Materials.**, pp.3307-3329, 21 (2009).

SWAROOP, K.; FRANCIS, S.; SOMASHEKARAPPA, H. M. Gamma irradiation synthesis of Ag/PVA hydrogels and its antibacterial activity. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 6, p. 1792-1798, 2016.

TACHABOONYAKIAT, W. Antimicrobial applications of chitosan. **Chitosan Based Biomaterials Volume 2: Tissue Engineering and Therapeutics**, p. 245, 2016.

TENTOR, F.R. *et al.* Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 1186-1194, 2017.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S.; Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655-663, 2009.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 4, p. 372-376, 2009.

VARAPRASAD, K. *et al.*; A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. **Materials Science and Engineering: C**, 2017.

VARDY, J. *et al.*; Side effects associated with the use of dexamethasone for prophylaxis of delayed emesis after moderately emetogenic chemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 7, p. 1011, 2006.

VASCONCELLOS, S.R., BOYCE, L.P, SMITH, L.P., Methods for the flocculation of coal fines and insoluble metals in coal mine waters, US **patent** 4,183,575 (1993).

VIMALA, K.; *et al.*; Fabrication of curcumin encapsulated chitosan-PVA silver nanocomposite films for improved antimicrobial activity. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 01, p. 55, 2011.

WAGHMARE, V. S. *et al.*; Starch based nanofibrous scaffolds for wound healing applications. **Bioactive materials**, v. 3, n. 3, p. 255-266, 2018.

WALTER, Joseph L. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. 1982.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S.; Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly (vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911-918, 2004.

WANG, Y.; TAN, H.; HUI, X.; Biomaterial Scaffolds in Regenerative Therapy of the Central Nervous System. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

XIA, M.; *et al.*; Swelling behavior of thermosensitive nanocomposite hydrogels composed of oligo(ethylene glycol) methacrylates and clay, **Eur. Polym. J.** 69 (2015) 472–482. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.03.072.

YANG, Y.; RITCHIE, A. C.; EVERITT, N. M.; Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 263-273, 2017.

YANG, W. *et al.* Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 181, p. 275-284, 2018.

YU, Qian *et al.* Preparation and properties of chitosan derivative/poly (vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 465-470, 2011