



**Sara Cristina
Silva Ferreira**

**NOVOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS
PARA IMPLANTES ÓSSEOS**



**Sara Cristina
Silva Ferreira**

NOVOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS PARA IMPLANTES ÓSSEOS

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, com especialidade em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do CICECO e do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Andreia F. Sousa, Investigadora de Pós-Doutoramento do CICECO e do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, porque “dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas”. Dedico também aos meus pais Licínio e Isabel, ao meu irmão André e ao meu namorado Zé Tó. Não há palavras para descrever tudo o que fizeram e fazem por mim. O vosso amor e apoio incondicional fizeram de mim a pessoa que sou hoje e permitiram que eu tivesse chegado até aqui.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Clotilde Amaral Loureiro da Fonseca
Investigadora de Pós-Doutoramento da Universidade de Coimbra

Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros
Investigadora Principal do CICECO e do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A concretização deste trabalho não seria possível sem a disponibilidade e apoio dado pelas minhas orientadoras, por isso não poderia deixar de agradecer à Doutora Andreia Sousa e à Doutora Carmen Freire.

Agradeço ainda à Marina, à Maria João, ao Nuno e ao Ricardo pelo apoio no Laboratório.

Finalmente, obrigada Eva, Juliana, Nayjara, Sofia e Paula pela vossa ajuda ao longo deste percurso e principalmente pela vossa amizade.

palavras-chave

Implantes ósseos, engenharia de tecidos, materiais de suporte, biomateriais poliméricos, emulsões de Pickering, óleo de soja, celulose bacteriana

resumo

Os danos dos tecidos ósseos representam um problema importante de saúde em todo o mundo. Um dos componentes principais utilizados em engenharia de tecidos são os materiais de suporte, estruturas 3D formadas por matrizes porosas, que visam proporcionar o desenvolvimento do novo tecido. Muitas das matrizes poliméricas porosas (espumas) utilizadas em aplicações médicas são constituídas por poliuretanos, sendo estes produzidos a partir de isocianatos (produtos tóxicos) e polióis. Assim, surge a necessidade de desenvolver novos biomateriais poliméricos porosos com base em materiais não-tóxicos e em metodologias amigas do ambiente. Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de novos biomateriais porosos, por polimerização radicalar em emulsão de Pickering. Emulsão, esta, constituída por água-em-óleo de soja epoxidado acrilatado e estabilizada com nanocelulose bacteriana. Os materiais resultantes (polyMIPES) foram caracterizadas detalhadamente em termos estruturais, morfológicos e quanto às suas propriedades mecânicas. Os resultados obtidos permitiram concluir que a utilização do monómeros de divinilbenzeno (DVB) as melhora significativamente as propriedades mecânicas das espumas, sendo que poderão ser bons candidatos a materiais de suporte. As espumas obtidas apresentam poros cujos valores médios variam entre $268,20 \pm 30,27$ e $356,60 \pm 40,03$ μm , boas propriedades termomecânicas (T_g entre 43°C e 50°C e temperaturas de degradação inicial por volta dos 250°C), e ainda módulos de Young elevados de $\approx 11,41 \pm 0,86$ e $\approx 13,15 \pm 0,75$ MPa.

keywords

Bone implants, tissue engineering, scaffolds, polymeric biomaterials, Pickering emulsions, soybean oil, bacterial cellulose

abstract

Bone tissues damage represents a significant health problem all over the world. Scaffolds, 3D structures formed by porous matrices that provides the new tissue's development, are one of the main components used in tissue engineering. Most of the porous polymeric matrices (foams) used in medical applications are made by polyurethanes, which are produced from isocyanates (toxic products) and polyols. Hence, there is a need in the development of new porous polymeric biomaterials based on non-toxic materials and environmentally friendly methodologies. Thus, the objective of this work is to develop new porous biomaterials, by Pickering emulsion radical polymerization. This will be a w/o emulsion using bacterial nanocellulose fragments as Pickering emulsion stabilizers and the oil phase shall be composed by acrylated epoxidised soybean oil. The obtained foams (PolyMIPES) were characterized structurally, morphologically and regarding their mechanical properties. The results allow us to conclude that the use of divinylbenzene (DVB) monomers on the preparation of the foams highly improve their mechanical properties; and therefore these foams are good candidates to be used as scaffolds. These foams have good thermomechanical properties (T_g between 43°C-50°C and initial degradation temperatures around 250°C). The porous size are in the range $268,20 \pm 30,27$ and $356,60 \pm 40,03$ μm and present high Young's modulus: $\approx 11,41 \pm 0,86$ e $\approx 13,15 \pm 0,75$ MPa.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Tecido ósseo	2
1.2 Enxertos ósseos.....	4
1.3 Materiais de suporte e Implantes ósseos	5
1.4 Biomateriais na regeneração de Tecidos	8
1.4.1 Biomateriais poliméricos	10
1.5 Emulsões e polimerização	13
1.5.1 Emulsões	13
1.5.2 Emulsões de Pickering	14
1.5.3 Polimerização radicalar	18
1.6 Nanocelulose.....	20
2. Parte experimental	25
2.1 Substratos, reagentes e solventes	25
2.2 Metodologia	25
2.2.1 Acetilação da nanocelulose bacteriana.....	25
2.2.2 Preparação das emulsões de Pickering.....	26
2.2.3 Polimerização em emulsões de Pickering	27
2.2.3.1 Fotopolimerização em emulsões de Pickering	27
2.2.3.2 Polimerização térmica em emulsões de Pickering	28
2.3 Caracterização	28
2.3.1 Microscopia ótica	28
2.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo Refletância total atenuada	28
2.3.3 Microscopia eletrônica de varrimento.....	28
2.3.4 Análise termogravimétrica	29

2.3.5	Análise térmica dinâmico-mecânica	29
2.3.6	Ensaio de compressão	29
3.	Resultados e discussão	31
3.1	Acetilação da NCB	31
3.2	Estudo da estabilidade das emulsões de Pickering ao longo do tempo	33
3.3	Polimerização em emulsões de Pickering.....	37
3.4	Caracterização das espumas.....	40
3.4.1	Caracterização estrutural	40
3.4.2	Caracterização morfológica.....	42
3.4.3	Caracterização térmica	45
3.4.4	Ensaio mecânico.....	49
4.	Conclusão	51
5.	Bibliografia.....	53

Índice de Figuras:

Figura 1: Organização hierárquica do osso. O osso tem uma camada exterior compacta (a), a qual compreende sistemas Haversianos (b). As células constituintes são revestidas por recetores de membrana que respondem a locais específicos de ligação (c) e pela nanoarquitetura bem definida da matriz extracelular circundante (d). Adaptado da referência [10].	2
Figura 2: Tecidos ósseos cortical e trabecular. (a) Tecido ósseo cortical 1-Sistema de Havers 2-lamelas ósseas 3-elementos vasculo-nervosos. Adaptado da referência [2]. (b) Corte histológico de uma zona de tecido ósseo trabecular onde se observam trabéculas ósseas separadas por zonas de medula óssea. Adaptado da referência [15].	4
Figura 3: A tríade da Engenharia de Tecidos é constituída por materiais de suporte, células e fatores solúveis que conferem propriedades de osteocondução, osteogénese e osteoindução, respetivamente. Adaptado da referência [23].	6
Figura 4: Exemplo de um material de suporte tridimensional de um cõndilo femoral humano. Adaptado da referência [25].	6
Figura 5: Estruturas químicas do PLA (à esquerda), do PGA (no meio) e do PLGA (à direita).	11
Figura 6: Estrutura química de um poliuretano.	12
Figura 7: Esquema de diferentes emulsões e as suas diferentes fases. À esquerda: emulsão óleo em água (o/w). E à direita: emulsão água em óleo (w/o).	13
Figura 8: Desestabilização de uma emulsão. As gotículas podem crescer devido à coalescência, floculação ou maturação de Ostwald. Adaptado da referência [44].	14
Figura 9: Estabilização de uma emulsão clássica o/w através do uso de agentes tensoativos. Adaptado da referência [43].	14
Figura 10: Emulsão clássica vs emulsão de Pickering. (a) Emulsão clássica o/w estabilizada por tensoativos. (b) Emulsão de Pickering o/w estabilizada por partículas sólidas. Adaptado da referência [43].	15
Figura 11: Influência do ângulo de contacto água-partícula-óleo (ângulo θ) na formação de emulsões. Da esquerda para a direita: emulsão o/w e w/o. Adaptado da referência [46].	16
Figura 12: Interação da uma partícula sólida na interface óleo-água e respetivas tensões interfaciais e áreas de contacto (Estado 1). Remoção da partícula de uma interface óleo-água para a fase da água (Estado 2). Adaptado da referência [48].	17
Figura 13: Óleo de soja epoxidado acrilatado (AESO), evidenciando os grupos acrilato. Adaptado da referência [63].	20
Figura 14: Organização hierárquica da celulose: as pontes de hidrogénio entre cadeias de glucose permitem a formação de microfibrilas e a agregação destas origina fibras que constituem a parede células das plantas. Adaptado da referência [68].	21

Figura 15: Diferentes tipos de nanocelulose. a) Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM) de CNF. b) TEM de CNC c) Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) de NCB. Adaptado das referências [16,51].....	22
Figura 16: Preparação das fibras de NCB acetiladas.	26
Figura 17: Espectro de FTIR-ATR da NCB não acetilada e Ac-NCB.....	32
Figura 18: Medição do volume da fase cremosa; a) Emulsão E1 (acima da linha vermelha); b) Emulsão E2 (abaixo da linha vermelha) e c) Emulsão E3 (acima da linha vermelha).....	33
Figura 19: Evolução da emulsão E2 ao longo de 24,48,72 e 96 horas, após a preparação das mesmas.	34
Figura 20: Imagens de microscopia ótica referentes às diferentes fases da emulsão w/o, com ampliação 50x: a) emulsão E2, 48h após a sua preparação e b) óleo ejetado da emulsão E2.	34
Figura 21: Curvas dos índices de estabilidade das emulsões (IEE), em função do tempo decorrido (h) após a preparação das emulsões.	35
Figura 22: Imagens de microscopia ótica da emulsão E3 com ampliação 50x após 24, 48, 72 e 96h da sua preparação.	36
Figura 23: Espuma resultante da fotopolimerização da emulsão E3.....	38
Figura 24: Amostra F3: espuma obtida a partir da emulsão E3.	39
Figura 25: Monómeros usados na produção das espumas: a) divinilbenzeno (DVB) e b) 1,6-hexanodiol diacrilato (HDD).....	40
Figura 26: À esquerda: espuma F6 contendo DVB. À direita: espuma F7 contendo DVB e HDD.	40
Figura 27: Espectros de FTIR-ATR do AESO e das espumas fotopolimerizadas.	41
Figura 28: Espectros de FTIR-ATR do AESO e de uma das espumas obtidas por termopolimerização (F6).	42
Figura 29: Imagens de SEM para uma ampliação de x50 das espumas sem DVB (F2 e F3) e com DVB (F5 e F6) e com DVB e HDD (F9).	43
Figura 30: Imagens de SEM para uma ampliação de x150. Diminuição do tamanho do poro da espuma com DVB (F5) comparativamente com a espuma F3.	44
Figura 31: Imagens de SEM x15000: presença de fibrilas de NCB nas espumas F8 e F9.....	45
Figura 32: Termogramas do AESO e das espumas obtidas através da termopolimerização.	46
Figura 33: Análise DMTA das espumas a 1 Hz e a 10 Hz: Tangente δ em função da temperatura (°C).	48

Figura 34: Representação da tensão (MPa) em função da percentagem de deformação de cada espuma..... 49

Abreviaturas:

Ac-NCB- Nanocelulose bacteriana acetilada

AESO- Óleo de soja epoxidado acrilatado

FTIR-ATR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo Refletância total atenuada

CH- Ciclohexano

CNC- Celulose nanocristalina

CNF- Celulose nanofibrilada

DMTA- Análise térmica dinâmico-mecânica

HA- Hidroxiapatite

HDD- 1,6-hexanodiol diacrilato

HIPE- Emulsão de fase interna elevada

IEE- Índice de Estabilidade da Emulsão

MIPE- Emulsão de fase interna média

NCB- Nanocelulose bacteriana

PGA- Políácido glicólico

PLA- Políácido láctico

PLGA- Políácido láctico-co-glicólico

PolyHIPE- HIPE polimerizada

PolyMIPE- MIPE polimerizada

SEM- Microscopia eletrônica de varrimento

$T_{dmáx}$ -Temperatura máxima de degradação

TEM- Microscopia eletrônica de transmissão

T_g - Temperatura de transição vítrea

$T_{i,d}$ -Temperatura inicial de degradação

TGA- Análise termogravimétrica

1. Introdução

Os danos dos tecidos ósseos representam um problema importante de saúde em todo o mundo e estão geralmente associados a doenças ósseas (como por exemplo, a osteoporose e a osteoartrite), bem como a lesões provocadas por acidentes, pela prática desportiva e/ou envelhecimento [1,2]. Na população idosa, que representa atualmente uma fração significativa da população ocidental, os danos no tecido ósseo são um sério problema, em especial devido ao facto de se verificar, comparativamente a indivíduos jovens, uma redução na formação óssea e da cartilagem e a cura retardada de uma fratura [3].

Neste contexto, existe uma necessidade crescente em desenvolver novas estratégias que permitam restabelecer as funções primitivas do tecido ósseo. As soluções convencionais consistem, por exemplo na implantação de osso substituto adequado à área danificada (enxertos ósseos) [1]. No entanto, existem diversas limitações associadas a estes procedimentos, pelo que a Engenharia de Tecidos surge como uma alternativa promissora pois permite a regeneração dos tecidos do próprio doente [4]. Os materiais de suporte são estruturas tridimensionais (3D) utilizadas em Engenharia de Tecidos, formadas por matrizes porosas que pretendem mimetizar o tecido ósseo e que proporcionam o desenvolvimento do novo tecido [5] e concomitantemente restabelecem durante o tempo de regeneração a função biomecânica original. Diversos biomateriais têm sido utilizados como materiais de suporte para implantes ósseos, destacando-se os biomateriais poliméricos. A maioria das matrizes poliméricas porosas (espumas) utilizadas em aplicações médicas são constituídas por poliuretanos, sendo estes produzidos a partir de isocianatos (produtos tóxicos) e polióis [6]. Assim, surge a necessidade de desenvolver novos biomateriais poliméricos porosos com base em materiais não-tóxicos e em metodologias amigas do ambiente. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de novos biomateriais porosos, por polimerização radicalar em emulsão de Pickering constituída por água em óleo de soja epoxidado acrilatado (fase óleo) e estabilizada por nanocelulose bacteriana.

Neste primeiro capítulo serão expostos os conceitos teóricos fundamentais subjacentes ao tema estudado (da secção *1.1 Tecido ósseo* até à secção *1.4 Biomateriais*) e à parte experimental efetuada (secção *1.5 Emulsões e Polimerização* e secção *1.6 Nanocelulose*).

1.1 Tecido ósseo

Os ossos são estruturas dinâmicas e altamente vascularizadas que crescem, sofrem remodelação e, embora este seja um processo que fique mais comprometido com o envelhecimento, persiste durante toda a vida. Os ossos desempenham um papel fundamental na locomoção pois garantem ao esqueleto a capacidade adequada de suporte de carga e atuam como um revestimento protegendo os órgãos internos do corpo. Os ossos constituem, ainda, o local de maior armazenamento de íons cálcio e fósforo, sendo que a sua resistência e rigidez típicas são conferidas essencialmente pela mineralização da matriz extracelular [7,8]. Embora o tecido ósseo apresente, principalmente em pessoas mais jovens, uma elevada capacidade de regeneração (o que significa que as fraturas poderão cicatrizar naturalmente sem que haja intervenção cirúrgica), contudo esta capacidade nem sempre é verificada. Nomeadamente, após fraturas mais graves ou ressecções tumorais ósseas (operações cirúrgicas para retirar parte do osso), é necessária a implantação de osso substituto, por intervenção cirúrgica [8,9].

O tecido ósseo apresenta uma organização celular e estrutural hierárquica (Figura 1) que se estende por várias ordens de magnitude desde centímetros até componentes nanoestruturados, tal como a matriz extracelular [2].

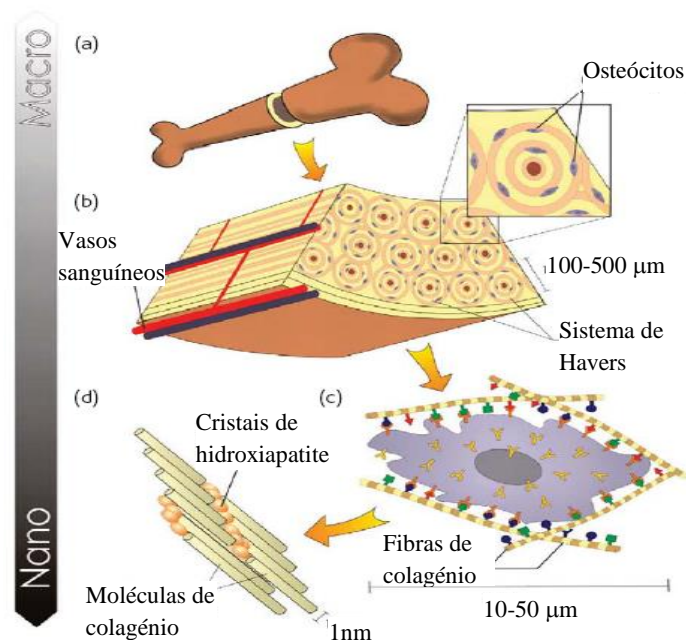


Figura 1: Organização hierárquica do osso. O osso tem uma camada exterior compacta (a), a qual compreende sistemas Haversianos (b). As células constituintes são revestidas por recetores de membrana que respondem a locais específicos de ligação (c) e pela nanoarquitetura bem definida da matriz extracelular circundante (d). Adaptado da referência [10].

O tecido ósseo é constituído por duas fases distintas: uma fase orgânica e uma inorgânica. A fase orgânica é constituída maioritariamente (cerca de 90%) por colagénio do tipo I, sendo também composta por colagénio do tipo III e VI e por uma variedade de proteínas não colagénicas (tais como as glicoproteínas, proteoglicanos e as sialoproteínas). Esta fase desempenha uma base estrutural importante para a deposição dos componentes inorgânicos e é responsável pela ductilidade do tecido ósseo (visto que é capaz de absorver uma quantidade de energia significativa antes da sua fratura) [8,11,12]. A fase inorgânica é constituída por cristais de fosfato de cálcio, sendo referida normalmente como hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o componente responsável pela resistência e rigidez do tecido ósseo [13].

Os tecidos ósseos podem ser divididos em dois tipos com base no seu aspeto macroscópico: o tecido ósseo cortical (ou compacto) cuja superfície é sólida e bastante homogénea, e o tecido ósseo trabecular (ou esponjoso), um material celular altamente poroso (Figura 2) [11]. Os tecidos ósseos cortical e trabecular apresentam a mesma constituição relativamente às células e à matriz óssea tendo, no entanto, diferentes organizações estruturais, propriedades mecânicas e porosidades. Em relação a este último aspeto, o tecido ósseo cortical contém uma porosidade inferior a 20% e o tecido ósseo trabecular apresenta uma porosidade superior a 90% [2,13]. O tecido ósseo cortical é constituído por sistemas cilíndricos Haversianos (Figura 2a) em que cada sistema de Havers é formado por um canal central ocupado por elementos vasculo-nervosos, sendo este rodeado por lamelas ósseas concêntricas da matriz óssea. Apresenta ainda um módulo de Young de 7-30 GPa e uma força tênsil de 50-150 MPa [11,14]. Já o tecido ósseo trabecular está estruturado numa rede tridimensional de trabéculas (Figura 2b) que delimitam os espaços intercomunicantes ocupados pela medula óssea, conferindo ao tecido ósseo trabecular uma porosidade elevada [2,13].

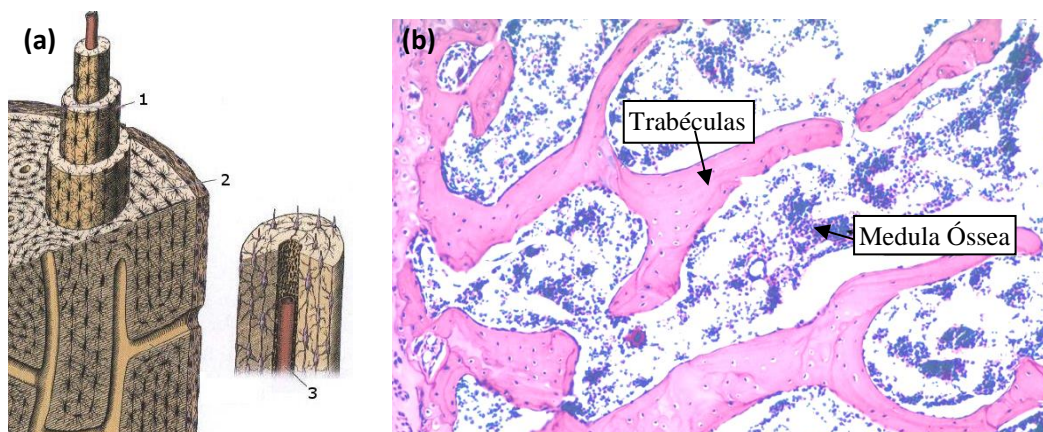


Figura 2: Tecidos ósseos cortical e trabecular. (a) Tecido ósseo cortical 1-Sistema de Havers 2-lamelas ósseas 3-elementos vasculo-nervosos. Adaptado da referência [2]. (b) Corte histológico de uma zona de tecido ósseo trabecular onde se observam trabéculas ósseas separadas por zonas de medula óssea. Adaptado da referência [15].

A permanente reorganização do tecido ósseo ocorre através de diversas células ósseas, responsáveis pela formação, reabsorção, reparação e manutenção da arquitetura óssea, tais como os osteoclastos, os osteoblastos e os osteócitos [12]. O desequilíbrio patológico destes processos celulares pode originar uma perda de massa óssea, como é exemplo a osteoporose.

1.2 Enxertos ósseos

Uma das estratégias convencionais que permitem a remodelação óssea são os enxertos ósseos, que consistem na implantação de osso substituto adequado à área danificada, por intervenção cirúrgica [1]. A procura por enxertos ósseos é considerável sendo que anualmente são realizados mais de 2,2 milhões de enxertos ósseos em todo o mundo em ortopedia e odontologia [16]. A incorporação dos enxertos ósseos inicia-se com a formação de um hematoma e de uma reação inflamatória, com libertação de citocinas e fatores de crescimento ósseo, muito semelhante ao que acontece no mecanismo de reparação de uma fratura óssea [2,17,18].

Os enxertos ósseos podem ser classificados de acordo com a sua origem em aloenxertos (transplantes entre indivíduos geneticamente diferentes, da mesma espécie), xenoenxertos (transplantes entre indivíduos de espécies diferentes) e ainda em autoenxertos (o tecido transplantado provém do próprio indivíduo) [8,19]. No entanto, as

duas primeiras estratégias mencionadas apresentam complicações, nomeadamente quanto à disponibilidade de dadores (sendo que a seleção de um dador obedece a critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais rigorosos), imunogenicidade e incompatibilidade de propriedades mecânicas entre o osso nativo e o osso substituto [1,2,16]. Os autoenxertos implicam a colheita do tecido do paciente a partir de um local que não seja suporte de carga (tipicamente um local de fácil acesso), e a sua transferência para o local da lesão [8]. Os autoenxertos ósseos apresentam um melhor resultado clínico, visto não estarem associados a complicações imunológicas (ao contrário dos aloenxertos e dos xenoenxertos) [17]. Apesar dos autoenxertos geralmente apresentarem bons resultados, é necessário dois procedimentos cirúrgicos, um para a colheita e outro para a implantação. Muitas vezes, o procedimento de colheita é mais doloroso para o paciente do que o de implantação [20]. Além disso, a quantidade de osso disponível no autoenxerto é limitada e, em autotransplantes de maiores dimensões, poderá existir um risco de fratura [18].

Assim, de modo a superar as limitações apresentadas pelos enxertos ósseos, expostas anteriormente, surgiu a necessidade de desenvolver soluções inovadoras de regeneração óssea através de abordagens da Engenharia de Tecidos, tal como o desenvolvimento de materiais de suporte [2].

1.3 Materiais de suporte e Implantes ósseos

Segundo Langer e Vacanti [21], a Engenharia de Tecidos é "um campo interdisciplinar de pesquisa que aplica os princípios da Engenharia e das Ciências da Vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorarem a função do tecido". Designa-se por implante qualquer dispositivo médico cuja finalidade é substituir, reparar ou melhorar a função biológica de elementos danificados, ausentes ou disfuncionais de um tecido ou de um órgão [22]. De modo a alcançar este objetivo, podem ser utilizadas diferentes estratégias de modo a desenvolver materiais de engenharia. A Engenharia de Tecidos integra diversos fatores de modo a mimetizar o microambiente do tecido ósseo através da manipulação de três componentes principais, comumente referidos como a "tríade da Engenharia de Tecidos": (i) materiais de suporte (ii) células e (iii) fatores solúveis (Figura 3) [1,5]. Estes fatores permitem que o material apresente propriedades de osteocondução (matriz que permite o crescimento e

organização do tecido ósseo), osteogênese (formação do tecido ósseo pela atividade de células osteogénicas) e osteoindução (capacidade de estimular a formação do novo tecido ósseo através de fatores solúveis tais como péptidos e fatores de crescimento) [18,23]. São ainda necessárias condições de cultura que incorporem os estímulos bioquímicos e físicos de modo a estimular a formação óssea.

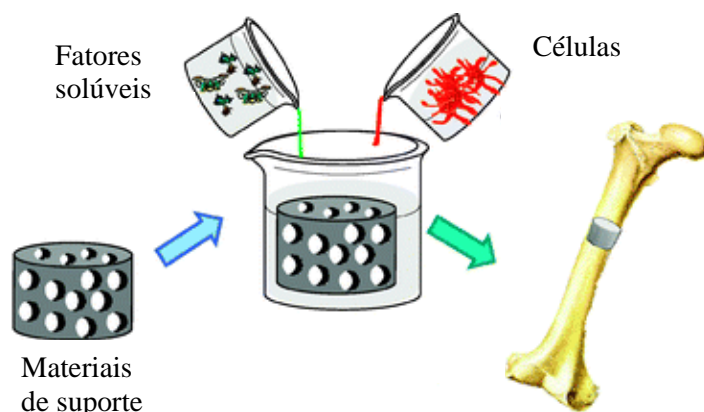


Figura 3: A tríade da Engenharia de Tecidos é constituída por materiais de suporte, células e fatores solúveis que conferem propriedades de osteocondução, osteogênese e osteoindução, respetivamente. Adaptado da referência [23].

O melhor material de suporte para a Engenharia de Tecidos seria, naturalmente, a matriz extracelular do tecido alvo, no entanto, a sua constituição complexa e natureza dinâmica tornam difícil a sua reprodução [24]. Contudo, o conceito atual de materiais de suporte pretende, exactamente, mimetizar as funções da matriz extracelular. Os materiais de suporte são estruturas 3D formadas por matrizes porosas que mimetizam o tecido ósseo, proporcionando o suporte estrutural para a fixação das células e para o desenvolvimento subsequente do tecido (Figura 4) [1,5].

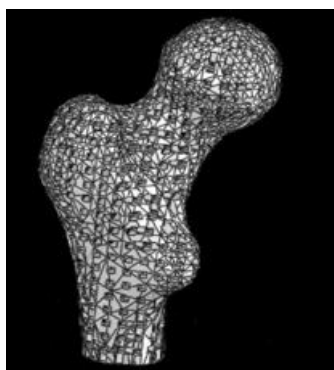


Figura 4: Exemplo de um material de suporte tridimensional de um côndilo femoral humano. Adaptado da referência [25].

Independentemente do tipo de tecido, o material de suporte ao ser colocado em contacto com um organismo vivo deve obedecer a um conjunto de funções e critérios. Estes são:

1. *Biocompatibilidade*. Após o implante, o material de suporte deve provocar uma reação imunitária negligenciável, a fim de evitar uma resposta inflamatória que possa impedir a cura ou até mesmo a rejeição do material de suporte pelo organismo [5]. Assim, é necessário que os materiais de suporte sejam biocompatíveis com as células do hospedeiro. Para tal, deverão ser realizados testes de citotoxicidade, adesão celular, hemocompatibilidade (tal como testes de trombogenicidade e adesão plaquetária), entre outros [4].

2. *Porosidade*. Os materiais de suporte devem apresentar uma estrutura suficientemente porosa de modo a assegurar o transporte celular e uma adequada difusão de nutrientes para as células, sem comprometer a sua estabilidade mecânica [16]. É ainda necessária uma estrutura de poros interligada a qual permite a difusão dos resíduos (resultantes do crescimento celular) e dos produtos de degradação para fora do material de suporte, sem que haja uma interação com outros órgãos e tecidos circundantes [5,24]. O tamanho do poro é crucial visto que necessita de ser suficientemente grande para as células migrarem para a estrutura, mas razoavelmente pequeno de modo a estabelecer uma superfície altamente específica. O tamanho do poro de um material de suporte ósseo deverá ter pelo menos 100 μm de diâmetro [16]. Para qualquer material de suporte existe uma gama de tamanhos de poros que varia dependendo do tipo de célula utilizada e do tecido manipulado [5].

3. *Bioatividade*. Os materiais de suporte devem apresentar ligandos com sequências de ligação Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) na sua superfície que regulam a atividade dos tecidos que irão ser formados. Estes ligandos encontram-se naturalmente em materiais de suporte sintetizados a partir de materiais naturais, enquanto que nos materiais de suporte constituídos por materiais sintéticos, é necessária a sua incorporação [5]. A adesão celular é feita via ligação com as integrinas. Os materiais de suporte podem ainda incorporar fatores de crescimento de modo a acelerar a regeneração dos tecidos. Para tal, é necessária uma libertação controlada destas moléculas bioativas [24,26].

4. *Propriedades mecânicas*. O material de suporte deverá apresentar uma integridade mecânica que permita o seu funcionamento desde o seu implante até à realização do

processo de remodelação do tecido ósseo. As propriedades mecânicas intrínsecas do material de suporte devem ser adequadas às pressões que o tecido ósseo vivo sofre e, portanto, devem variar de acordo com o local anatômico no qual o material de suporte irá ser implantado [5,16].

5. *Biodegradabilidade*. O objetivo da Engenharia de Tecidos é de permitir que as células do organismo substituam o material de suporte, sendo que este deverá ser biodegradável e os subprodutos resultantes desta degradação devem ser não-tóxicos. Para que seja assegurado o suporte mecânico da regeneração do tecido antes de ocorrer a biodegradação, é necessário que este processo seja controlado [5,27].

Em geral, o material de suporte deverá ainda ser de fácil manipulação cirúrgica, não provocar efeitos oncogênicos, deve ser visível por meios imagiológicos, esterilizável e, ainda, permitir que a sua fabricação e processamento possam ser efetuados em grande escala e a preferencialmente a um preço razoável [5]. Uma das dificuldades atuais passa pela dificuldade na esterilização dos materiais de suporte, o que poderá implicar temperaturas demasiado elevadas que podem degradar o material de suporte antes de este ser utilizado [19]. Para serem obtidos bons resultados clínicos, a técnica utilizada no ato operatório, a qualidade da mesma, a vigilância do pós-operatório (a curto, médio e longo prazo) e a idade do paciente representam fatores de maior importância. É necessário que haja um equilíbrio *in vivo* entre todas as propriedades mencionadas, estando estas obviamente dependentes da escolha dos materiais usados para preparar o material de suporte. Assim, o desenvolvimento de novos materiais é essencial para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis inovadores capazes de responder a novas especificações [28]. Inúmeros esforços têm sido direcionados de modo a identificar o material de suporte ideal que apresente todos os requisitos para uma regeneração acelerada do tecido ósseo.

1.4 Biomateriais na regeneração de Tecidos

Em estratégias de Engenharia de Tecidos a regeneração dos tecidos, como referido anteriormente, consiste na utilização de um material de suporte adequado, que pode ser composto por diversos biomateriais. Por sua vez, a definição de biomaterial surgiu pela primeira vez em 1976, na Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais sendo descrito como "um material não vivo, utilizado como dispositivo

médico, projetado para interagir com sistemas biológicos" [29]. Visto que esta definição se restringia a materiais não vivos, o termo "biomaterial" foi redefinido em 1991 como "todo o material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, reforçar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo" [21]. Assim, os biomateriais são agora entendidos como uma forma de influenciar processos biológicos, cujo objetivo é a regeneração do tecido [5]. Para tal, o biomaterial deverá ser biofuncional, isto é, ser capaz de substituir a função para a qual foi designado e assegurar a continuidade dessa função após a sua reabsorção. Um dos princípios gerais da bioengenharia é que um único biomaterial não pode revelar-se ideal para duas aplicações diferentes no corpo [8,19].

Os materiais de suporte podem ser compostos por diversos biomateriais tais como metais, cerâmicos e polímeros [1,5,8]. Cada um destes grupos de biomateriais apresenta vantagens específicas, mas igualmente diversas desvantagens destacando-se para alguns casos a falta de biocompatibilidade, biodegradabilidade ou ambos. Sendo assim, o uso de materiais compósitos tem-se tornado cada vez mais comum [5,14]. Os biomateriais compósitos contêm uma combinação de propriedades que nenhum dos seus constituintes individuais apresenta por si só, de modo a gerar materiais bioativos com propriedades melhoradas, tais como as propriedades mecânicas (por exemplo, a rigidez) e a resistência a ambientes corrosivos, e conseqüentemente, obter um elevado desempenho [8].

Os materiais de suporte à base de metais já não são tão utilizados visto que, na sua maioria, não são biodegradáveis. No entanto, existem alguns materiais cerâmicos biodegradáveis tipicamente derivados de materiais inorgânicos bioativos, tais como a HA e o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), que são utilizados em aplicações de regeneração óssea [2]. Os materiais de suporte cerâmicos caracterizam-se por terem uma elevada biocompatibilidade e osteocondução (devido à sua semelhança química e estrutural com a fase mineral do tecido ósseo) e são conhecidos por induzir respostas osteogénicas [17,30]. Apresentam normalmente uma elevada rigidez mecânica (80–120 GPa) e baixa elasticidade. Contudo, as suas aplicações clínicas têm sido limitadas visto que estes biomateriais são bastante quebradiços e difíceis de processar em materiais porosos com formas complexas, para além do controlo difícil da sua taxa de degradação [5,14]. Os polímeros, por outro lado, surgem como uma alternativa interessante visto que é possível sintetizá-los de modo a apresentarem características específicas.

1.4.1 Biomateriais poliméricos

Os substitutos de enxertos ósseos poliméricos são utilizados isoladamente ou em combinação com outros materiais e apresentam diferentes propriedades físicas, mecânicas e químicas, podendo ser divididos em polímeros naturais e polímeros sintéticos [6,17,24]. Estes, por sua vez, podem ainda ser divididos em polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis/reabsorvíveis são materiais que acabam por ser degradados, solubilizados ou fagocitados após a reparação dos tecidos, evitando a permanência de um corpo estranho no organismo [17]. Assim, não é necessária uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção do implante, o que representa uma grande vantagem em comparação com os implantes metálicos.

Diversos polímeros naturais têm sido utilizados na produção de materiais de suporte podendo citar-se desde polissacarídeos (tais como o quitosano e o ácido hialurônico) até proteínas (salientando-se o colagénio e a albumina) [6]. Estes polímeros apresentam uma elevada biocompatibilidade para aplicações *in vivo* visto que são componentes da matriz extracelular de uma variedade de tecidos biológicos [2,5]. Além disso, os polímeros naturais apresentam uma baixa toxicidade, sendo ainda biodegradáveis e renováveis [27].

O alto teor de colagénio do tipo I na matriz extracelular tem sido uma das principais razões pelas quais esta se tornou uma das proteínas mais investigadas na utilização em aplicações de Engenharia do Tecido Ósseo [6]. O colagénio desempenha um papel importante visto que intervém na diferenciação das células progenitoras em osteoblastos, induzindo o crescimento celular [31]. Tendo em conta que o colagénio aplicado isoladamente não apresenta interesse clínico (visto apresentar propriedades mecânicas reduzidas), têm sido realizados estudos no sentido de desenvolver um material compósito ideal. Os estudos são predominantemente focados no desenvolvimento de compósitos de colagénio tipo I e fosfato de cálcio mineral, por diferentes vias [5]. Uma abordagem comum é a utilização de suportes à base de colagénio, com uma fase adicional incorporada para melhorar as propriedades biológicas ou mecânicas. Por exemplo, Yang et al. [32] verificaram que as células ósseas aderem mais facilmente ao colagénio com HA e exibem uma atividade osteoblástica indicativa da formação do osso. Noutro estudo, investigou-se a incorporação de HA em materiais de suporte constituídos por colagénio

glicosaminoglicado, tendo-se verificado um potencial significativo para a regeneração do osso [33].

O fabrico de materiais de suporte a partir de materiais biológicos com estruturas homogêneas e reprodutíveis é um enorme desafio [5]. Apesar dos polímeros naturais apresentarem um elevado grau de biocompatibilidade, caso o material utilizado durante o processamento esteja contaminado com agentes patogénicos, poderá ocorrer uma resposta imune e, neste caso, é crucial a sua remoção [6]. Além disso, o potencial risco de transmissão de doenças, o manuseamento inadequado e a limitada estabilidade física e mecânica (que limita a sua utilização em, por exemplo, em aplicações ortopédicas de suporte de carga) são fatores a ter em conta [5,27]. Neste sentido, os polímeros sintéticos poderão ser uma alternativa interessante que tem sido amplamente explorada como irá ser descrito de seguida.

Apesar dos polímeros sintéticos não reproduzirem as características e comportamento da matriz extracelular, estes apresentam uma grande vantagem relativamente aos polímeros naturais, nomeadamente, a possibilidade da adaptação das suas propriedades, taxas de degradação e comportamento mecânico para aplicações específicas. Inúmeros polímeros sintéticos foram utilizados até à data na tentativa de produzir materiais de suporte, incluindo o poliácido láctico (PLA) [34], o poliácido glicólico (PGA) [35] e a sua combinação, o poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) [36] (Figura 5). Estes poliésteres alifáticos são amplamente utilizados como biomateriais na Engenharia de Tecidos. Apresentam, portanto, diversas aplicações em termos biomédicos tal como, por exemplo, a reconstrução óssea [37]. Uma das vantagens mais significativa da utilização destes polímeros é o facto de serem biodegradáveis. Estes materiais são absorvidos *in vivo*, sendo desnecessário um segundo procedimento cirúrgico para a remoção do implante.

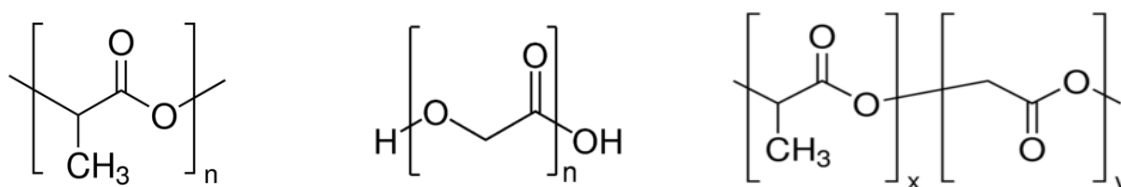


Figura 5: Estruturas químicas do PLA (à esquerda), do PGA (no meio) e do PLGA (à direita).

Os polímeros sintéticos apresentam diversas vantagens visto que são materiais facilmente reprodutíveis e é possível controlar a sua degradação. Contudo, existem também algumas desvantagens associadas aos polímeros sintéticos tal como o risco de rejeição devido à redução da bioatividade. Além disso, o processo de degradação de alguns polímeros tais como o PGA e o PLGA poderá levar à necrose das células e dos tecidos circundantes, visto que há redução do pH local proveniente da produção de dióxido de carbono resultante na participação no ciclo de Krebs [5]. Contudo, nos materiais de suporte compósitos, estas questões são minimizadas. Por exemplo, a introdução de um cerâmico em materiais de suporte à base de polímeros [38] e a combinação de polímeros sintéticos com polímeros naturais [39] são algumas das abordagens adotadas para ultrapassar as limitações anteriores.

Os poliuretanos (Figura 6) são também polímeros sintéticos utilizados na formação de espumas com diferentes porosidades, para aplicações médicas. As espumas são uma classe de materiais porosos com aplicações em materiais de suporte na Engenharia de Tecidos ou em implantes ósseos de substituição da função mecânica. Por exemplo, Gorna et al. [40] desenvolveram materiais de suporte porosos baseados em poliuretanos, destinados à regeneração do tecido ósseo trabecular. Os poliuretanos são maioritariamente produzidos a partir de polióis e de isocianatos (Figura 6), sendo que estes últimos estão usualmente associados a graves problemas ambientais e de saúde, devido à sua toxicidade [6].

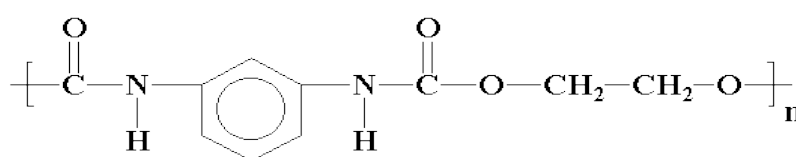


Figura 6: Estrutura química de um poliuretano.

Assim, surge a necessidade de desenvolver novos biomateriais poliméricos porosos com base em materiais não-tóxicos e em metodologias amigas do ambiente, e de preferência renováveis, tal como a polimerização radicalar em emulsão de Pickering [41]. Além disso, as matérias provenientes de fontes renováveis e sustentáveis têm surgido no panorama da síntese de polímeros para o desenvolvimento de novos materiais, como é o caso do óleo de soja.

Nas próximas secções irão ser descritos os princípios associados à metodologia que irá ser utilizada, nomeadamente, as emulsões de Pickering, a polimerização radicalar e a estabilização das emulsões com nanocelulose bacteriana.

1.5 Emulsões e polimerização

1.5.1 Emulsões

As emulsões resultam da mistura de dois líquidos imiscíveis sendo um disperso no outro sob a forma de gotículas e originando, desta forma, duas fases: a fase dispersa (também designada por fase interna) e a fase contínua (também referida como fase externa), separadas por uma interface [42]. Normalmente uma dessas fases é água e a outra é um líquido orgânico, comumente referido como “óleo”. Caso se trate de uma emulsão de gotículas de óleo dispersas em água, é atribuída a designação de emulsão óleo em água (o/w) (Figura 7). Da mesma forma, caso se trate de gotículas de água dispersas em óleo, é atribuída a designação de emulsão água em óleo (w/o). Existem ainda emulsões duplas tais como o/w/o e w/o/w correspondendo a emulsões óleo-água-óleo e água-óleo-água, respetivamente [43]. No entanto, como saem fora do âmbito do presente trabalho, não serão abordadas.

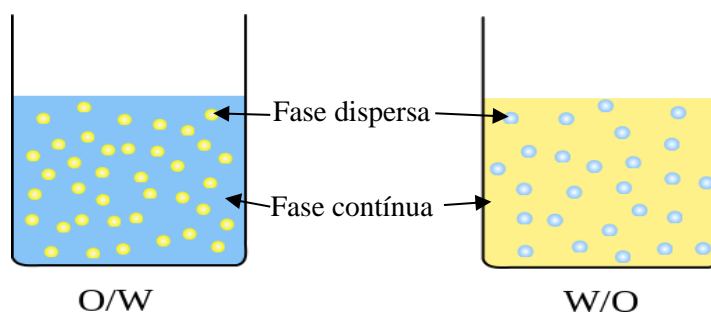


Figura 7: Esquema de diferentes emulsões e as suas diferentes fases. À esquerda: emulsão óleo em água (o/w). E à direita: emulsão água em óleo (w/o).

Para a preparação de uma emulsão é necessário que a emulsão seja estável por um longo período de tempo contra qualquer fenómeno de desestabilização, tal como a coalescência, a floculação ou a maturação de Ostwald (Figura 8) [43].

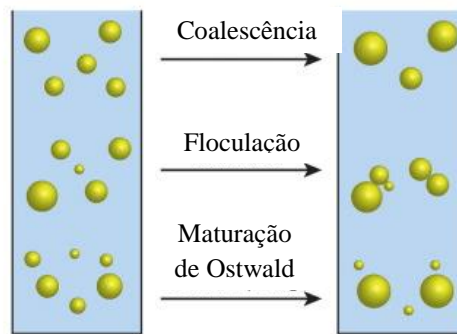


Figura 8: Desestabilização de uma emulsão. As gotículas podem crescer devido à coalescência, floculação ou maturação de Ostwald. Adaptado da referência [44].

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, pelo que usualmente são adicionados agentes tensoativos (Figura 9) que impedem a variação drástica do tamanho das gotículas, prolongando a estabilidade das emulsões ao longo do tempo. Por exemplo, emulsões w/o são estabilizadas por tensoativos adequados cujas quantidades podem variar entre 5 a 50%, de modo a retardar a coalescência [41,42].

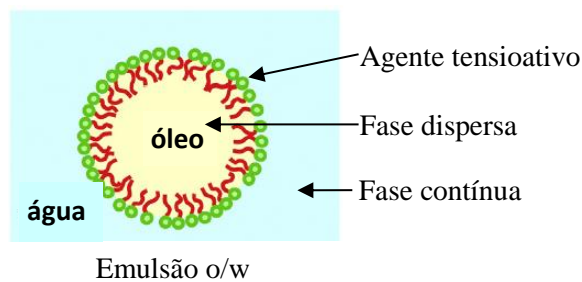


Figura 9: Estabilização de uma emulsão clássica o/w através do uso de agentes tensoativos. Adaptado da referência [43].

Os agentes tensoativos são, normalmente, moléculas anfifílicas (que contém simultaneamente grupos hidrofílicos e hidrofóbicos) e podem organizar-se em micelas [45]. A estabilidade das emulsões ao longo do tempo pode ser aumentada pela presença de tensoativos na sua interface, como referido anteriormente, sendo que estes são bons candidatos a diversas aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e biomédica (especialmente pelo facto das emulsões apresentarem a capacidade de transportar e solubilizar substâncias hidrofóbicas numa fase contínua de água) [42,46].

1.5.2 Emulsões de Pickering

Em 1907, Pickering [47] observou que ao utilizar partículas de sulfato de cobre, estas eram capazes de estabilizar a interface entre duas fases imiscíveis de uma emulsão.

Entende-se, portanto, por emulsões de Pickering as emulsões que são estabilizadas por pequenas partículas sólidas, em vez de tensoativos (como acontece nas emulsões clássicas) (Figura 10) [41,43]. As emulsões de Pickering são vistas como formulações amigas do ambiente e apresentam aplicações na área alimentar, sendo a maionese um dos exemplos, visto que se trata de uma emulsão w/o estabilizada por pequenas partículas de mostarda [48].

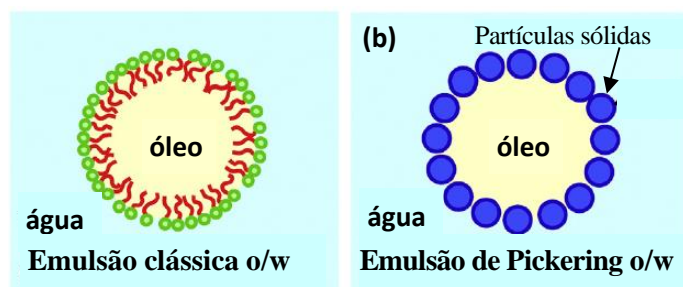


Figura 10: Emulsão clássica vs emulsão de Pickering. (a) Emulsão clássica o/w estabilizada por tensoativos. (b) Emulsão de Pickering o/w estabilizada por partículas sólidas. Adaptado da referência [43].

A capacidade de se formar gotículas altamente estáveis nas emulsões de Pickering deve-se essencialmente às propriedades das partículas, nomeadamente a forma, o tamanho e a presença de molhabilidades distintas no óleo e na água, o que leva à acumulação destas partículas na zona de interface [48]. As partículas sólidas são, naturalmente, de tamanho inferior ao das gotículas da emulsão; por exemplo, partículas sólidas de tamanho nanométrico permitem a estabilização de gotículas cujo diâmetro é da ordem dos micrómetros [43]. A nanocelulose é um dos exemplos de fibras utilizadas na estabilização de emulsões de Pickering [41,49–51], e que irá ser abordado mais à frente, na secção *1.6 Nanocelulose*.

Em 1923, Finkle et al. [52] descreveu pela primeira vez “a correlação entre a molhabilidade das partículas e a sua capacidade para estabilizar emulsões”. Assim, a regra de Finkle explica que dependendo do ângulo de contacto água-partícula-óleo (ângulo θ), poderá ser favorecida uma emulsão w/o ou uma emulsão o/w. Caso o valor do ângulo de contacto θ seja inferior a 90° , irá ser favorecida a formação de uma emulsão o/w (Figura 11); contrariamente, caso o valor do ângulo de contacto θ seja superior a 90° , ocorre a inversão de fase, sendo favorecida a emulsão w/o. Dizemos que ocorre uma inversão de fase quando a estrutura da emulsão é invertida, isto é, quando a fase contínua torna-se a fase dispersa e vice-versa [53–55]. A inversão de fase pode também ocorrer através da

alteração de variáveis tais como a temperatura, pressão, salinidade e da proporção de óleo/água [42].

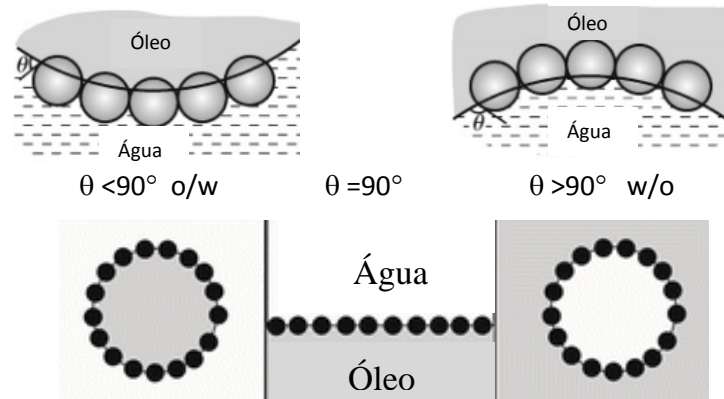


Figura 11: Influência do ângulo de contacto água-partícula-óleo (ângulo θ) na formação de emulsões. Da esquerda para a direita: emulsão o/w e w/o. Adaptado da referência [46].

As características de uma emulsão de Pickering dependem fortemente da estabilidade das partículas adsorvidas na interface óleo-água, sendo esta estabilidade determinada pela energia livre [55,56]. Para uma partícula adsorvida que se encontra num equilíbrio "Estado 1" (Figura 12), a energia livre do sistema ($G^{(1)}$) pode ser dada pela seguinte equação (3):

$$G^{(1)} = \gamma_{ow}A_{ow}^{(1)} + \gamma_{pw}A_{pw}^{(1)} + \gamma_{po}A_{po}^{(1)} \quad (3)$$

Onde γ_{ow} , γ_{pw} e γ_{po} representam, respetivamente as tensões interfaciais óleo-água, partícula-água e partícula-óleo. A área de interface óleo-água no Estado 1 é representada por $A_{ow}^{(1)}$ e as áreas de contacto da partícula com as fases de água e óleo são representadas, respetivamente por $A_{pw}^{(1)}$ e $A_{po}^{(1)}$.

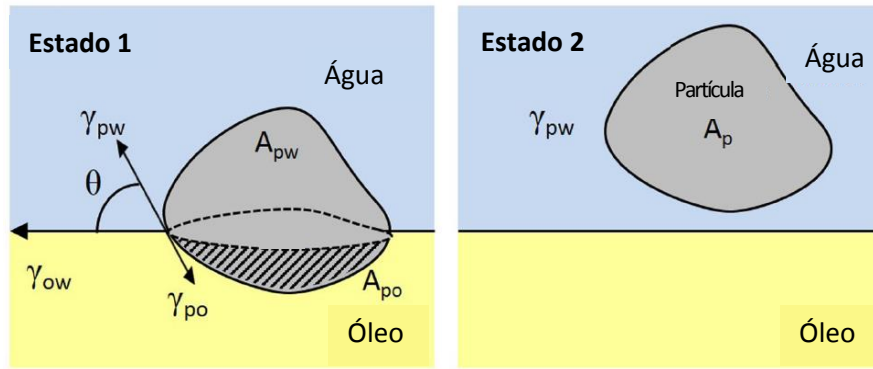


Figura 12: Interação da uma partícula sólida na interface óleo-água e respectivas tensões interfaciais e áreas de contacto (Estado 1). Remoção da partícula de uma interface óleo-água para a fase da água (Estado 2). Adaptado da referência [48].

A partícula pode ser removida da interface óleo-água para uma das fases; caso a partícula seja movida para a fase aquosa (Estado 2 da Figura 12), a energia livre do sistema ($G_w^{(2)}$) pode ser calculada pela equação (4):

$$G_w^{(2)} = \gamma_{ow}A_{ow}^{(2)} + \gamma_{pw}A_{pw}^{(2)} \quad (4)$$

Assim, subtraindo a energia livre do Estado 1 à energia livre do Estado 2, é possível calcular a energia livre de remoção para a fase de água (ΔG_{dw}), dada pela seguinte equação (5):

$$\Delta G_{dw} = G_w^{(2)} - G^{(1)} = \gamma_{ow}A_{ow}^{(2)} + \gamma_{pw}A_{pw}^{(2)} - (\gamma_{ow}A_{ow}^{(1)} + \gamma_{pw}A_{pw}^{(1)} + \gamma_{po}A_{po}^{(1)}) \quad (5)$$

Da mesma forma, é possível calcular a energia livre de remoção para a fase do óleo (ΔG_{do}). Naturalmente, o ângulo de contacto θ entre a partícula e cada um dos fluídos, influencia o valor de energia livre de remoção dessa mesma partícula. Por exemplo, uma partícula mais hidrofílica apresentará um valor de θ entre 0° e 90° e a sua remoção da interface para a fase do óleo requererá mais energia do que para a fase da água ($\Delta G_{do} > \Delta G_{dw}$). Para valores de θ compreendidos entre 90° e 180° , $\Delta G_{do} < \Delta G_{dw}$ [48,57].

Através da equação de Young e da equação (5), é possível calcular a energia livre de remoção de uma partícula esférica, em função do seu raio (R) e ângulo de contacto θ , pela equação (6) [56,57]):

$$\Delta G_{remoção} = \pi R^2 \gamma_{ow} (1 - |\cos \theta|)^2 \quad (6)$$

Para partículas coloidais com superfícies homogêneas $\Delta G_{remoção} = - \Delta G_{adsorção}$, em que a energia livre de adsorção das partículas à interface apresenta um valor negativo para todos os ângulos de contacto (exceto para 0° e 180°). Desta forma, a adsorção é termodinamicamente favorável e, conseqüentemente, as partículas acumulam-se espontaneamente na interface óleo-água. A adsorção é mais forte quando o valor de θ é igual a 90° , que corresponde a um máximo de estabilidade na maioria das emulsões [43,48].

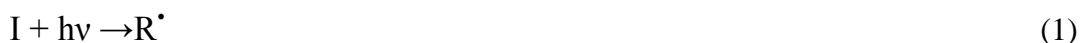
Ajustando as concentrações das diferentes fases, em emulsões de Pickering, é possível alcançar um máximo de concentração da fase dispersa antes que ocorra a fase de inversão, sendo este máximo fortemente dependente da afinidade das partículas para a fase contínua [55]. Desta forma, é possível produzir emulsões com frações de volume de fase interna média (MIPE do inglês “Medium Internal Phase Emulsions”) e com frações de volume de fase interna elevada (HIPE, do inglês “High Internal Phase Emulsions”). As MIPEs são definidas como emulsões com volumes de fase interna que variam de 30 a 70% e as HIPES são sistemas muito concentrados nos quais a fase dispersa ocupa, pelo menos, 74% da fração de volume total, podendo inclusive atingir os 99% [41,54,58]. Uma das aplicações das M/ HIPES é a sua utilização na formação de estruturas altamente porosas, denominadas “PolyHIPES” (M/HIPES polimerizadas)[59]. Estes materiais apresentam uma estrutura porosa e uma baixa densidade. A sua produção é feita a partir da polimerização de monómeros presentes na fase contínua (na qual as partículas sólidas estão incorporadas) e subsequente evaporação das gotículas aprisionadas na matriz polimerizada permitindo, desta forma, a formação dos poros da espuma [43,58,60].

1.5.3 Polimerização radicalar

A síntese de polímeros com base em monómeros insaturados pode ser realizada pela polimerização radicalar. De uma forma geral, este tipo de reação consiste numa sequência de 3 etapas: iniciação (onde são geradas as espécies ativas que irão permitir a adição do primeiro monómero), propagação (crescimento da cadeia pela adição de monómeros) e terminação (em que ocorre, por exemplo, a combinação de duas espécies ativas) [61]. Adicionalmente, distinguem-se ainda três tipos de polimerização por adição consoante o passo de iniciação. Caso o iniciador da polimerização seja um ião, trata-se de

uma polimerização iônica; caso o iniciador seja um radical, trata-se de uma polimerização radicalar [45]. De seguida irá ser abordado em mais detalhe este último tipo de polimerização, uma vez que será a técnica de polimerização adotada no presente trabalho.

No caso particular de fotopolimerizações radicalares, ocorre uma reação fotoquímica na etapa de iniciação através da absorção de luz pelo iniciador, originando a produção de radicais iniciadores R^\bullet (1):



O processo inicia-se pela reação entre o radical livre e uma unidade de monómero, havendo posteriormente a propagação da cadeia, de forma rápida. O radical gerado poderá reagir com monómeros olefínicos (monómeros que apresentam pelo menos uma ligação dupla entre 2 carbonos), de acordo com a seguinte equação química (2):



Desta forma, ocorre o crescimento da cadeia por adições sucessivas de monómeros, permitindo a formação do polímero. A terminação deste processo poderá ocorrer de quatro formas: pela interação entre dois terminais de cadeias ativas; pela reação de um terminal de uma cadeia ativa com um radical iniciador; através da transferência de um centro ativo para outra molécula (tal como moléculas de solvente, iniciador ou monómero), e/ou pela interação com impurezas ou com inibidores [61,62].

O óleo de soja epoxidado acrilatado (AESO – do inglês “Acrylated Epoxidised Soybean Oil”) é vastamente utilizado em reações de polimerização radicalar envolvendo os grupos acrilato (assinalados na Figura 13) e conduzindo à formação de estruturas reticuladas. É este, precisamente, o monómero que será utilizado neste trabalho. A presença das ligações duplas nestes grupos permite que facilmente ocorra a polimerização radicalar utilizando quer fotoiniciadores adequados e radiação UV, quer termoiniciadores[63]. Desta forma, irá ocorrer a formação do polímero, sendo estabelecida uma matriz que originará a espuma.

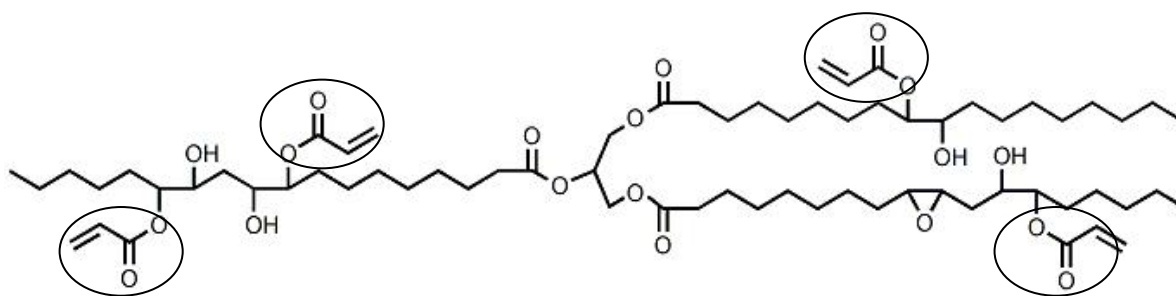


Figura 13: Óleo de soja epoxidado acrilatado (AESO), evidenciando os grupos acrilato. Adaptado da referência [63].

1.6 Nanocelulose

Como matéria-prima, a celulose é geralmente utilizada sob a forma de fibras ou de derivados numa ampla gama de produtos e materiais. A celulose constitui o polímero natural mais abundante da Terra, uma vez que é o principal componente da parede celular das plantas, sendo portanto biodegradável e não tóxica [50,64]. A celulose é uma substância fibrosa, insolúvel em água e é obtida, principalmente, a partir das plantas sendo que estas apresentam uma elevada resistência, conferida pela estrutura hierárquica das fibras de celulose [64–66]. Pode também ser produzida por algumas algas, bactérias aeróbicas não patogénicas e por fungos [67].

A celulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, é um homopolímero linear não ramificado, constituído por unidades de D-glucose, ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ [65,66]. Os valores do grau de polimerização da celulose (número de unidades de glucose) dependem da origem e do tratamento da matéria-prima. Por exemplo, no caso da celulose da pasta de madeira, o grau de polimerização pode variar entre 300 a 1700 e, caso seja proveniente do algodão ou de bactérias, entre 800 a 10.000 [67]. A abundância de grupos hidroxilo (OH) na celulose favorece a formação de ligações por pontes de hidrogénio entre duas unidades de D-glucose adjacentes bem como entre cadeias paralelas de celulose. Devido ao facto de serem estabelecidas pontes de hidrogénio entre cadeias paralelas, as cadeias têm uma elevada tendência em se agregarem entre si, formando as microfibrilas de celulose conforme representado na Figura 14. As microfibrilas, por sua vez, agregam-se entre si dando origem às fibras semi-cristalinas (zonas cristalinas alternam com zonas amorfas) de celulose que fazem parte da parede celular das plantas [50,67,68]. Desta forma, embora a celulose seja um polímero hidrofílico, as fibras de celulose são insolúveis em água [66].

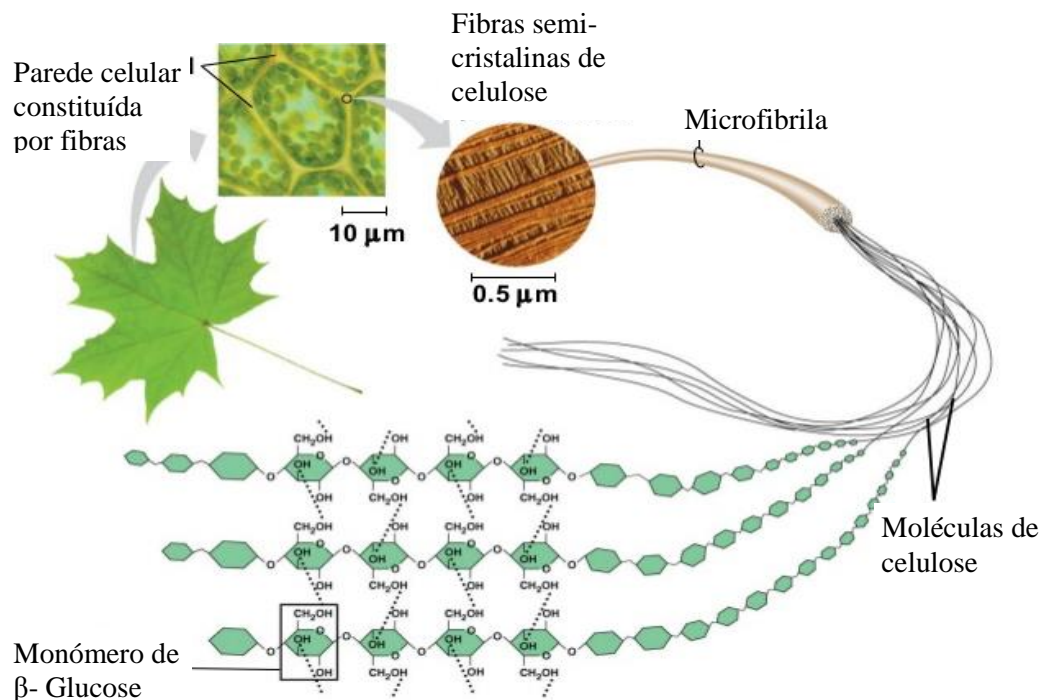


Figura 14: Organização hierárquica da celulose: as pontes de hidrogênio entre cadeias de glucose permitem a formação de microfibrilas e a agregação destas origina fibras que constituem a parede células das plantas. Adaptado da referência [68].

Para um material ser considerado nanoestruturado, deverá ser constituído por estruturas com uma ou mais dimensões na escala de 1 a 100 nm [19]. O termo nanocelulose refere-se a formas nanométricas de celulose, como a celulose nanofibrilada, celulose nanocristalina e nanocelulose bacteriana [69]. A celulose nanofibrilada (CNF) (Figura 15a) é constituída, alternadamente, por domínios cristalinos e amorfos e apresenta comprimentos de 500 a 2000 nm [69,70]. O seu processo de produção consiste num pré-tratamento químico ou enzimático, seguido de uma delaminação da pasta de celulose por ação mecânica [71]. Algumas aplicações da CNF passam pela produção de materiais como filmes, espumas e reforço para biocompósitos [72]. A celulose nanocristalina (CNC) (Figura 15b) é obtida pela remoção de zonas amorfas das fibras de celulose, por hidrólise ácida. Ou seja, a CNC refere-se a cristais de celulose de dimensões nanométricas com comprimentos que variam entre 100 e 250 nm, sendo que o tamanho e a geometria dos cristais são influenciados pela fonte de celulose utilizada [71]. A CNF e a CNC têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos materiais devido às características de biodegradabilidade, baixa densidade, alta resistência e rigidez [50].

A celulose bacteriana foi referida pela primeira vez em 1886 por Brown que, ao estudar fermentações acéticas, observou a formação de uma membrana gelatinosa branca resistente sobre a superfície do meio líquido [73]. Brown verificou que esta película era gerada por bactérias, inicialmente conhecidas como *Bacterium xylinum* e que atualmente se denominam por *Gluconacetobacter xylinus* [71]. A nanocelulose bacteriana (NCB) (Figura 15c) pode ser obtida a partir desta bactéria gram-negativa na forma de membranas altamente hidratadas (com um teor de água de, pelo menos, 90%) [16]. As bactérias são cultivadas em meios aquosos de nutrientes em que a NCB é excretada na interface com o ar, sendo o meio HS (Hestrin e Schramm) o meio de cultura mais comum (em que a fonte de carbono é a glucose). A NCB é uma forma pura de celulose e é caracterizada por uma rede de nanofibras cujo diâmetro varia entre 20 a 100 nm [65,71]. Apresenta excelentes propriedades mecânicas, com um módulo de Young de 15-35 GPa e uma resistência à tração de 200-300 MPa, o que indica que se trata de um material resistente [67].

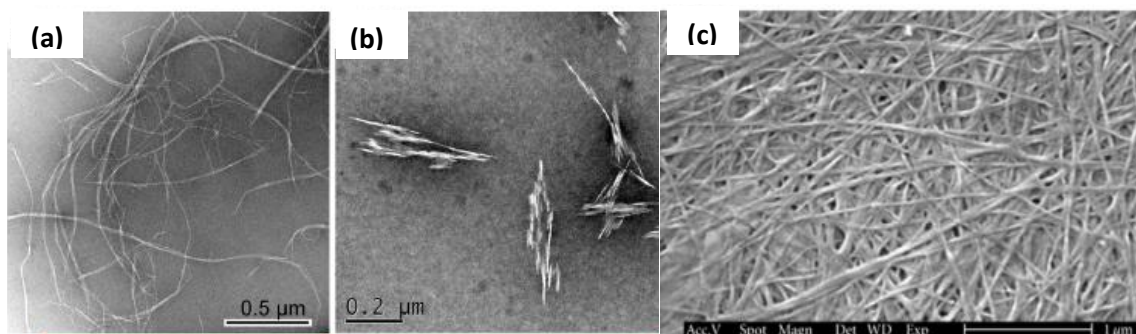


Figura 15: Diferentes tipos de nanocelulose. a) Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM) de CNF. b) TEM de CNC c) Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) de NCB. Adaptado das referências [16,51].

A estabilidade das emulsões conferida por fragmentos de NCB permite que estas permaneçam insensíveis a mudanças de pH e temperatura, contrariamente aos emulsionantes convencionais [50]. Tal como referido anteriormente, a celulose é um polímero hidrofílico e, como tal, favorece a formação de emulsões o/w. Assim, de modo a produzir uma emulsão w/o estável, a superfície das partículas de NCB pode ser modificada de modo a tornar as fibrilas mais hidrofóbicas, direcionando-as para a fase contínua (fase do óleo) [43,74]. Blaker et al. [41] verificou que, na presença quantidades adequadas de NCB esterificada com ácido acético (ou seja, hidrofóbica), é possível estabilizar emulsões w/o. Lee et al. [74] relatou ainda emulsões w/o estabilizadas por nanofibrilas de celulose bacteriana esterificadas com ácidos orgânicos com diferentes comprimentos de cadeia,

tendo sido obtidas HIPes. Neste trabalho pretende-se obter MIPes ou HIPes a partir de emulsões de Pickering w/o, estabilizadas com NCB, com o objetivo de produzir espumas que poderão ser utilizadas como materiais de suporte em implantes ósseos.

2. Parte experimental

2.1 Substratos, reagentes e solventes

A nanocelulose bacteriana (NCB) utilizada neste estudo foi produzida no nosso laboratório sob a forma de membranas hidratadas, utilizando a estirpe *Gluconoacetobacter sacchari* em meio HS. Para a acetilação da NCB foram utilizados os seguintes reagentes: anidrido acético (pureza $\geq 96\%$) fornecido pela VWR BDH Prolabo e ácido sulfúrico (solução em água, 96% pureza), fornecido pela Acros Organics.

O óleo de soja epoxidado acrilatado (AESO), o *p*-divinilbenzeno (DVB) e o 1,6-hexanodiol diacrilato (HDD) (80%) foram adquiridos à Sigma Aldrich-Chemicals. O ciclohexano (CH) (pureza $\geq 99,9\%$) foi fornecido pela Panreac Química e o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (pureza $\geq 99\%$) foi adquirido à Riedel-deHaën. O iniciador térmico, hidroperóxido de cumeno (80%), foi fornecido pela Alfa Aesar e o 2-hidroxi-2-metil-1-fenil-propan-1-ona (Irgacure 1173, antigo Darocur 1173) foi fornecido pela BASF.

2.2 Metodologia

2.2.1 Acetilação da nanocelulose bacteriana

Na Figura 16 encontra-se representado um esquema referente ao procedimento global utilizado na preparação de NCB acetilada (Ac-NCB). Inicialmente, as membranas de NCB foram desintegradas tendo sido utilizado um desintegrador de cozinha durante cerca de 2 minutos. Posteriormente, utilizou-se um Ultra-Turrax (Micra RT) a 11 000 rpm durante 15 minutos para cada porção de ≈ 200 mL de suspensão aquosa de NCB. De seguida, procedeu-se à troca de solventes com etanol e acetona, utilizando a centrífuga Rotofix 32A, a 4500 rpm durante 10 minutos. O processo foi repetido cinco vezes para cada solvente.

A reação de acetilação da NCB foi adaptada de um procedimento já existente [75], consistindo na mistura de aproximadamente 300,0 mL de anidrido acético, 1,00 mL de H_2SO_4 e aproximadamente 20 g de NCB. A mistura foi posteriormente aquecida a 30 °C

durante 4h, em atmosfera de azoto. No final da reação, a Ac-NCB foi filtrada e lavada sequencialmente com acetona, etanol, água e novamente com etanol. De modo a remover possíveis resíduos de anidrido acético ou outras impurezas, procedeu-se a uma extração Soxhlet com etanol durante 12h. Desta forma, as fibras de Ac-NCB encontram-se aptas para atuarem como estabilizadores de emulsões.



Figura 16: Preparação das fibras de NCB acetiladas.

2.2.2 Preparação das emulsões de Pickering

Foram preparadas diversas emulsões, nomeadamente água-em-AESO, água-em-AESO+ciclohexano(CH), água-em-AESO+CH+divinilbenzeno(DVB) e água-em-AESO+CH+DVB+HDD. De uma maneira geral, as emulsões w/o foram preparadas em tubos de Falcon de 50 mL, aos quais se adicionaram o AESO e CH. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água contendo 0,5 % (m/m) de Ac-NCB. No caso das emulsões água-em-AESO+CH+DVB, foi ainda adicionado DVB (5 e 10 % (m/m), relativamente ao volume de AESO). Quanto às emulsões água-em-AESO+CH+HDD, foram adicionados 5 %, 10 % e 15 % (m/m) de HDD relativamente ao volume de AESO. Todas as emulsões foram agitadas no Vórtex durante 1 minuto. As composições de todas as emulsões preparadas estão sumariadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dados experimentais relativos à composição das emulsões.

Tipo de emulsões	Designação da amostra	AESO (mL)	CH (mL)	Sol aq Ac-NCB (mL)	DVB (% relativamente ao V_{AESO})	HDD (% relativamente ao V_{AESO})	Rácio AESO/CH
Água-em-AESO	E1, E1UV ^a	10	-	10	-	-	-
Água-em-AESO+CH	E2	5	5	10	-	-	50/50
	E3, E3UV	7,5	2,5	10	-	-	75/25
Água-em-AESO+CH+DVB	E4	5	5	10	10	-	50/50
	E5, E5UV	7,5	2,5	10	10	-	75/25
	E6	7,5	2,5	10	5	-	75/25
Água-em-AESO+CH+DVB+HDD	E7	7,5	2,5	10	10	5	75/25
	E8	7,5	2,5	10	5	5	75/25
	E9	7,5	2,5	10	5	10	75/25

^a As amostras indicadas com a designação “UV” correspondem a emulsões que posteriormente foram fotopolimerizadas com radiação UV.

Na preparação das amostras que foram polimerizadas termicamente foi ainda adicionado o iniciador térmico hidroperóxido de cumeno (3 % (m/m), relativamente ao volume de AESO), juntamente com uma solução aquosa de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,3 M).

Na preparação das amostras E1UV, E3UV e E5UV foi adicionado o fotoiniciador Irigacur 1173 (0,4 % (m/m), relativamente ao volume de AESO). As emulsões foram agitadas manualmente e ficaram a repousar à temperatura ambiente durante 24h, tendo sido posteriormente polimerizadas.

No estudo da estabilidade das emulsões ao longo do tempo, foram medidos os volumes de óleo ejetado e volumes da fase cremosa. Seguidamente as misturas foram agitadas manualmente, tendo sido aquecidas num banho de óleo e posteriormente deixadas em repouso até o dia seguinte. Este estudo foi feito ao longo de 4 dias, tendo sido realizadas 2 réplicas para cada emulsão estudada.

2.2.3 Polimerização em emulsões de Pickering

2.2.3.1 Fotopolimerização em emulsões de Pickering

As emulsões foram aquecidas a 50 °C durante 15 minutos e, posteriormente, irradiadas com luz UV (lâmpada de mercúrio de 120W e com $\lambda > 280$ nm) durante 10h. As espumas obtidas foram colocadas sobre um papel de filtro de modo a remover o óleo em

excesso. Finalmente, as espumas foram lavadas com acetona e secas em estufa à temperatura de 40 °C, durante 24h.

2.2.3.2 Polimerização térmica em emulsões de Pickering

Após 72h da preparação das emulsões, procedeu-se à sua polimerização térmica, tendo estas sido aquecidas à temperatura de 80 °C, durante 24h. Após ocorrer a polimerização, as amostras foram lavadas e secas, tendo-se utilizado o mesmo procedimento das amostras fotopolimerizadas.

2.3 Caracterização

As emulsões foram observadas por microscopia ótica e as espumas obtidas caracterizadas por diversas técnicas tais como espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier com acessório de refletância total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrónica de varrimento (SEM), análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA). Foram ainda realizados ensaios mecânicos, em modo de compressão.

2.3.1 Microscopia ótica

As imagens de microscopia ótica das emulsões foram captadas com uma câmara IDS UI124DML acoplada ao microscópio Olympus BX51. A ampliação da lente ocular utilizada foi de x10 e a das objetivas de x5 e x10.

2.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo Refletância total atenuada

Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos usando o espectrofotómetro Paragon 100 Perkin-Elmer equipado com uma célula horizontal ATR (Refletância total atenuada) Golden Gate. Os dados foram registados à temperatura ambiente, na gama dos 4500-500 cm^{-1} , com 64 scans e com uma resolução de 8 cm^{-1} .

2.3.3 Microscopia eletrónica de varrimento

As imagens de SEM do corte transversal das amostras das espumas foram obtidas usando um microscópio FEG-SEM Hitachi S4100 operando a 25 kV. Previamente à realização da análise, as amostras foram coladas com fita-cola de carbono num substrato de alumínio e posteriormente revestidas com carbono, tendo sido utilizado o equipamento

Emitech K950X. As ampliações utilizadas para captar as imagens foram de x50, x150, x250, x1500 e x15000.

2.3.4 Análise termogravimétrica

A TGA foi realizada com o equipamento Setaram Setsys 1750, com uma célula de alumina. As amostras (~15 mg) foram aquecidas a uma velocidade constante de 10 °C min^{-1} , desde os 25 °C até os 800 °C , sob um fluxo de nitrogénio de 20 mL min^{-1} .

2.3.5 Análise térmica dinâmico-mecânica

Os ensaios de DMTA das espumas (com as dimensões de $1\text{ x }1\text{ x }1\text{ cm}^3$), previamente acondicionadas a 25 °C e a uma humidade relativa de 51% durante 24 h, foram realizados com o equipamento Tritec 2000 DMTA Triton, em modo de compressão. Os testes foram realizados, simultaneamente, a 1 e 10 Hz, na gama de temperaturas de -50 a 200 °C e a uma velocidade de 2 °C min^{-1} . Cada medição foi repetida pelo menos 2 vezes.

2.3.6 Ensaio de compressão

Os ensaios mecânicos em modo de compressão das espumas, previamente acondicionadas a 25 °C e humidade relativa de 51% durante 48 h, foram realizados no equipamento INSTRON 5564 equipado com uma célula de carga de 500N. As amostras ($1\text{ x }1\text{ x }1\text{ cm}^3$) foram sujeitas a uma taxa de compressão constante de 3 mm min^{-1} até atingir 30% de deformação. Cada medição foi repetida 7 vezes.

3. Resultados e discussão

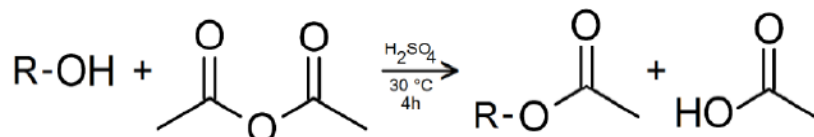
Do ponto de vista experimental, a preparação das espumas envolveu uma série de etapas distintas, nomeadamente a acetilação das nanofibras de BC de modo a poderem ser utilizadas na preparação das emulsões de Pickering w/o, seguida de polimerização radicalar, tal como já havia sido descrito anteriormente no capítulo 2 (Parte Experimental). Os resultados obtidos ao longo destas etapas, e respectiva discussão, serão apresentados neste capítulo ao longo das seguintes secções: acetilação da NCB (secção 3.1), estudo da estabilidade das emulsões de Pickering ao longo do tempo (secção 3.2), polimerização em emulsões de Pickering (secção 3.3) e finalmente, a caracterização estrutural, morfológica e térmica das espumas (secção 3.4).

Ao longo deste trabalho foram preparadas emulsões de Pickering água-em-AESO, água-em-AESO+CH, água-em-AESO+CH+DVB e água-em-AESO+CH+DVB+HDD cuja composição se encontra na Tabela 1. De uma forma geral, as emulsões são constituídas por água e por uma fase óleo constituída por um ou mais agentes reticulantes (AESO, DVB e HDD). Como o AESO é um óleo viscoso, na maioria das emulsões adicionou-se também por CH de modo a que a fase óleo seja mais fluída. Deste modo, estudaram-se ao longo de 4 dias as emulsões água-em-AESO e água-em-AESO+CH de maneira a averiguar a estabilidade das mesmas ao longo do tempo. Posteriormente, os agentes reticulantes polimerizados radicalmente resultaram em espumas que foram amplamente caracterizadas. Esta é uma metodologia amiga do ambiente, tendo sido utilizados essencialmente materiais provenientes de fontes renováveis e sustentáveis.

3.1 Acetilação da NCB

Tal como referido anteriormente, a celulose é um polímero hidrofílico, contudo para que as fibrilas de NCB possam ser utilizadas como estabilizadores de emulsões w/o, é necessário que o ângulo de contacto água-partícula-óleo seja superior a 90° [46], tal como explicado em detalhe no Capítulo 1 (Introdução). Para tal, é necessário que as fibrilas de nanocelulose apresentem carácter hidrofóbico. Desta forma, é essencial modificar a superfície da BC, por exemplo, neste trabalho em concreto pela introdução de grupos acetilo. A reação de acetilação das nanofibrilas (Esquema 1) foi realizada utilizando anidrido acético e ácido sulfúrico e foi levada a cabo durante apenas 4 horas a uma

temperatura moderada ($\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) de forma a promover apenas a acetilação superficial das nanofibras de BC [75]. Seguiu-se portanto, uma metodologia de acetilação amiga do ambiente, comparativamente a outras descritas na literatura [41,74]. Por exemplo, na metodologia adoptada por Blaker *et al.* [41] foram utilizados reagentes considerados tóxicos tais como piridina, metanol, tetrahidrofurano, tolueno e cloreto de *p*-toluenossulfonilo.



Esquema 1: Reacção de acetilação utilizada na modificação da NCB.

O sucesso da reacção de acetilação foi confirmado por FTIR -ATR. Os espectros da NCB não acetilada e da Ac-NCB estão representados na Figura 17. É possível confirmar que a NCB foi efetivamente acetilada, tendo em conta o aparecimento de uma nova banda na ordem dos 1736 cm^{-1} correspondente à vibração do grupo carbonilo ($\nu_{\text{C=O}}$), característica do grupo éster [76]. Além do aparecimento desta banda, a acetilação foi ainda confirmada por uma redução significativa da vibração do grupo O-H (na ordem dos 3338 cm^{-1}).

Verificou-se ainda que durante as lavagens da Ac-NCB, as fibras apresentavam uma baixa afinidade para a água, o que comprova o seu carácter hidrofóbico e portanto a ocorrência de reacção de acetilação dos grupos hidroxilo.

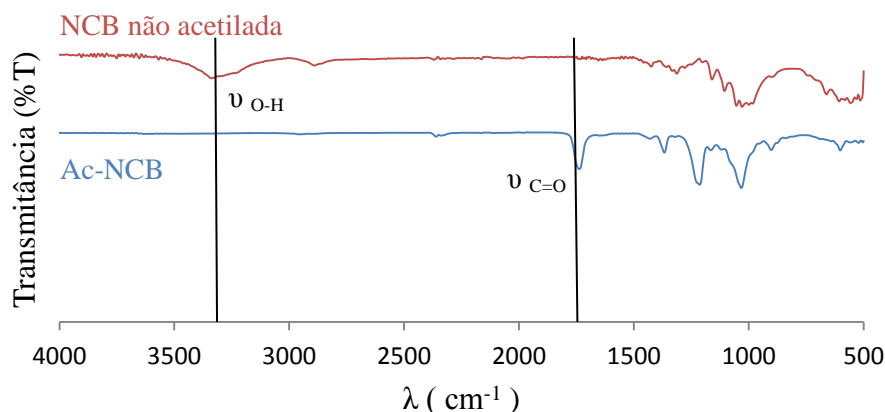


Figura 17: Espectro de FTIR-ATR da NCB não acetilada e Ac-NCB.

3.2 Estudo da estabilidade das emulsões de Pickering ao longo do tempo

A estabilidade das emulsões é de extrema importância pois, caso uma emulsão não seja estável, esse facto irá refletir-se na morfologia e na homogeneidade da espuma resultante e, conseqüentemente nas suas propriedades mecânicas. Desta forma, as fibrilas de Ac-NCB apresentam um papel crucial na estabilização das emulsões preparadas. Como referido anteriormente, foram estudadas as emulsões água-em-AESO e água-em-AESO+CH ao longo do tempo, de modo a averiguar qual o melhor rácio AESO/CH a utilizar (visto que estas emulsões apresentam diferentes viscosidades). Assim, de modo a aferir acerca da estabilidade das emulsões referidas, foram medidos os volumes totais das emulsões e os volumes da fase cremosa (referente à emulsão), como mostra a Figura 18. As emulsões foram ainda observadas por microscopia ótica. As emulsões analisadas neste estudo foram designadas por E1, E2 e E3 cuja composição se encontra descrita na Tabela 1.

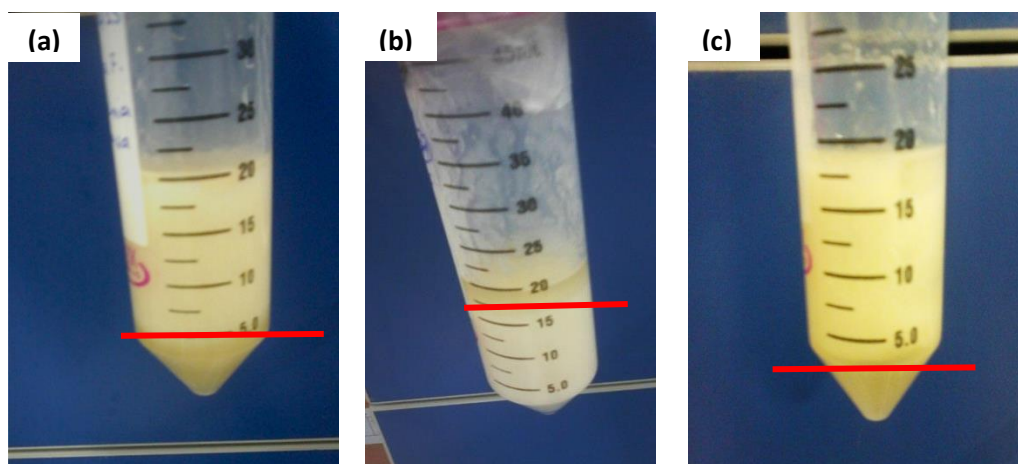


Figura 18: Medição do volume da fase cremosa; a) Emulsão E1 (acima da linha vermelha); b) Emulsão E2 (abaixo da linha vermelha) e c) Emulsão E3 (acima da linha vermelha).

As emulsões foram estudadas durante 4 dias e foram consideradas estáveis quando os volumes e o seu aspeto microscópico permaneceu constante, nomeadamente ao nível das dimensões e homogeneidade das gotas. A Figura 19 ilustra a evolução da emulsão E2 ao longo dos 4 dias.

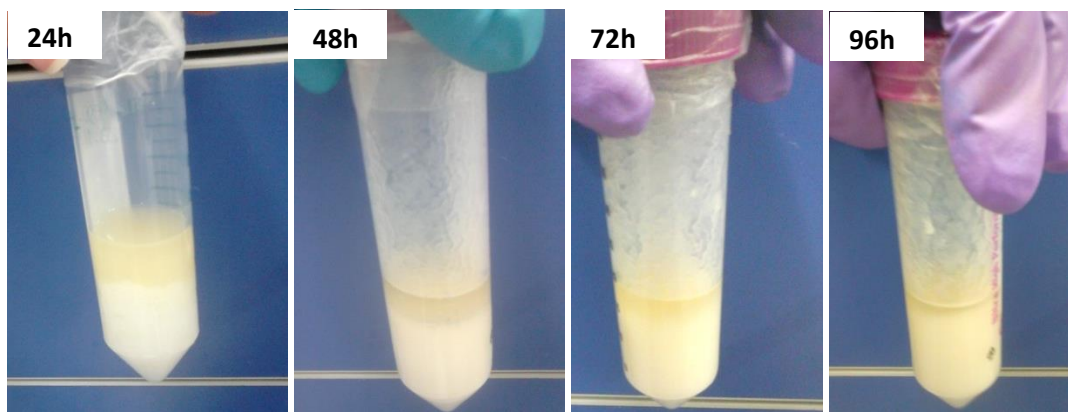


Figura 19: Evolução da emulsão E2 ao longo de 24,48,72 e 96 horas, após a preparação das mesmas.

Uma emulsão é considerada estável quando não ocorre nenhuma mudança (ou quando existe apenas uma pequena alteração) no tamanho das gotas da fase dispersa num determinado intervalo de tempo [77]. A visualização por microscopia ótica confirma a formação de duas fases distintas após 24, 48, 72 e 96h: uma fase cremosa (referente à emulsão) (Figura 20a) e a presença de uma fase oleosa, correspondente ao óleo ejetado (Figura 20b).

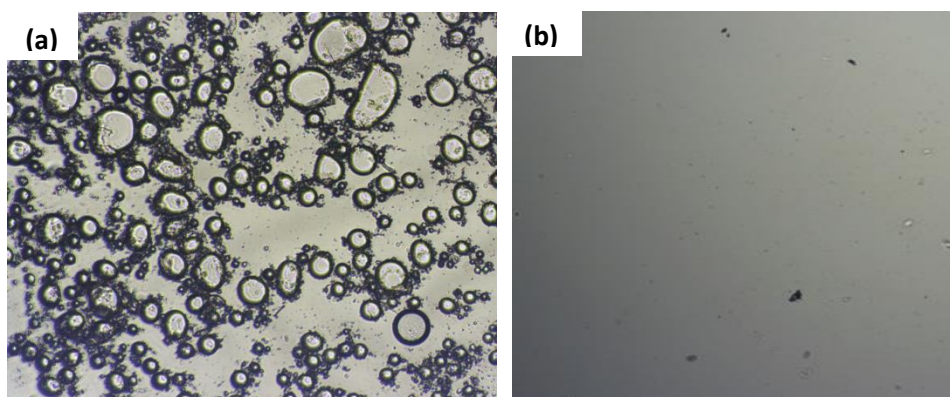


Figura 20: Imagens de microscopia ótica referentes às diferentes fases da emulsão w/o, com ampliação 50x: a) emulsão E2, 48h após a sua preparação e b) óleo ejetado da emulsão E2.

O índice de estabilidade das emulsões (IEE), ao longo do tempo, foi também determinado através do cálculo do rácio entre os volumes médios da emulsão e os volumes médios totais da mistura (Figura 21). Verificou-se, de uma forma geral, que o IEE das emulsões E1 (emulsão água-em-AESO) manteve-se constante a partir das 72h após a preparação desta. Relativamente às restantes emulsões E2 e E3 (emulsões água-em-AESO+CH), o IEE permaneceu constante a partir das 24h e 48h, respectivamente.

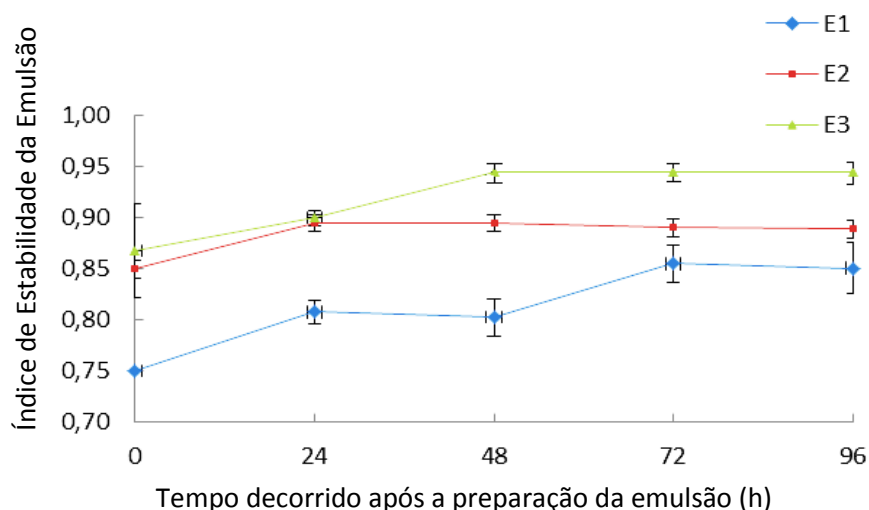


Figura 21: Curvas dos índices de estabilidade das emulsões (IEE), em função do tempo decorrido (h) após a preparação das emulsões.

Adicionalmente, todas as emulsões estudadas foram observadas por microscopia ótica ao longo dos 4 dias. A título ilustrativo, a Figura 22 mostra imagens de microscopia ótica da evolução da emulsão E3 ao longo do tempo. Podemos observar, tendo em conta o seu aspeto microscópico, que as gotículas inicialmente de dimensões mais reduzidas (24h após a sua preparação), aumentam progressivamente de dimensão, atingindo um tamanho estável e maior homogeneidade unicamente 72h após a sua preparação. Este resultado mostra que apesar da emulsão manter um valor constante de IEE, a nível microscópico ainda se está a organizar, podendo-se considerar que é estável apenas após 72 h, e não ao fim de 48 h, após a sua preparação.

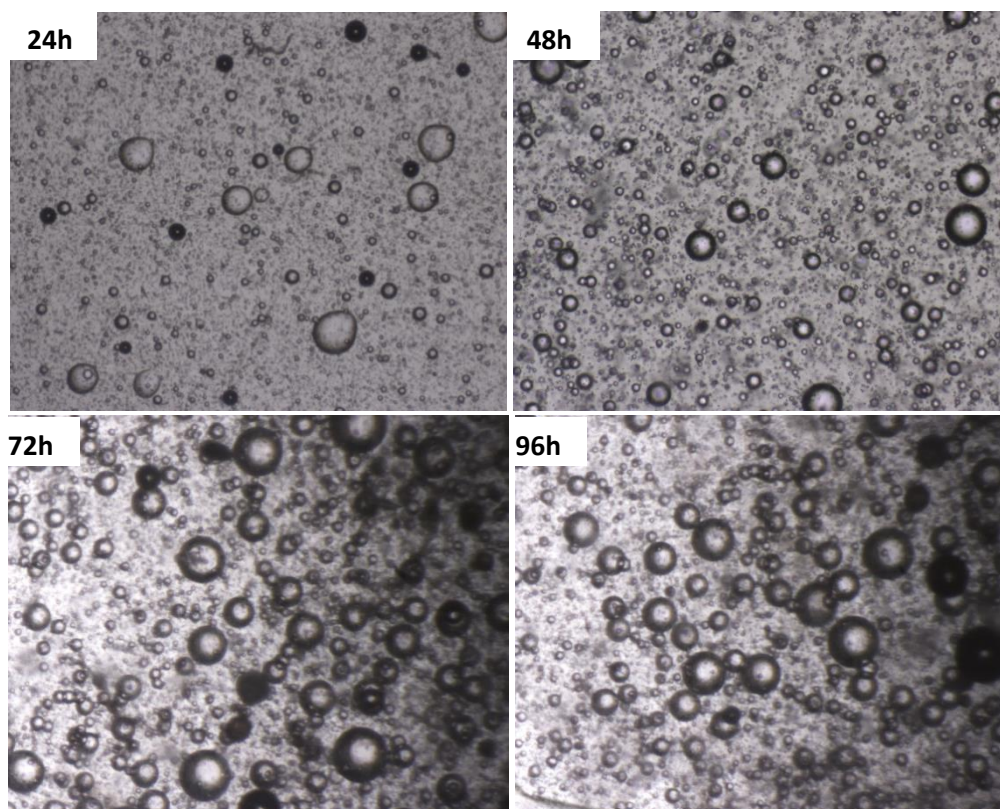


Figura 22: Imagens de microscopia ótica da emulsão E3 com ampliação 50x após 24, 48, 72 e 96h da sua preparação.

A mesma análise por microscopia foi realizada para as emulsões E1 e E2, tendo-se verificado que as emulsões E1 e E2 se encontram estáveis após 72 e 48h, respetivamente. Relativamente às emulsões água-em-AESO (E1) a observação por microscopia ótica corrobora o resultado anterior relativo à medição do IEE. No entanto, no caso das emulsões E2, apesar do IEE se manter estável a partir das 24h, verifica-se por microscopia que as emulsões apenas se encontram estáveis ao fim de 48h após a sua preparação. Os resultados encontram-se sumariados na Tabela 2.

Apesar do AESO já ter sido utilizado na preparação de espumas usando outras metodologias [78,79], que nós tenhamos conhecimento, existe apenas um estudo na literatura que reporta a utilização do AESO na formação de emulsões w/o, estabilizadas por NCB [41]. Neste estudo, verificou-se que o índice de estabilidade da emulsão ao fim de 3 dias era de 98,5%. Desta forma, os resultados obtidos experimentalmente relativos às emulsões água-em-AESO estão de acordo com a literatura. Quanto às emulsões água-em-AESO+CH, estas são um aspeto inovador deste trabalho, sendo que a sua estabilidade não se encontra descrita na literatura.

Cada emulsão estudada apresenta uma percentagem de volume de fase interna entre 60 e 63% (Tabela 2). Desta forma, e tendo ainda em conta o seu aspeto microscópico (Figura 22), pode-se assumir que se formaram MIPES. Pode-se, portanto, concluir que é possível estabilizar MIPES de água-em-AESO e de água-em-AESO+CH, usando fibrilas de Ac-NCB. Idealmente pretendiam-se formar HIPES visto que estas podem originar estruturas altamente porosas. No entanto, apesar de existirem cada vez mais estudos acerca das PolyHIPES e das suas possíveis aplicações em Engenharia de Tecidos [80,81], ainda não existem aplicações comerciais visto que estas espumas, embora em termos de adesão e proliferação celular possam ser mais adequadas, apresentam alguma fragilidade mecânica [82]. Assim pretendem-se preparar PolyMIPES que apresentem propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo.

Tabela 2: Constituição e estabilização das MIPES obtidas.

Tipo de emulsões	Emulsões	AESO (%)	CH (%)	Sol aq Ac-NCB (%)	Tempo a partir do qual a emulsão se encontra estável (h)	% fase interna
Água-em-AESO	E1, E1UV ^b	50	-	50	72	63
Água-em-AESO+CH	E2	25	25	50	48	60
	E3, E3UV	37,5	12,5	50	72	60

O comportamento das restantes emulsões foi extrapolado a partir das emulsões E1, E2 e E3.

3.3 Polimerização em emulsões de Pickering

As amostras água-em-AESO+CH foram polimerizadas após 72 h à sua preparação. A identificação das espumas obtidas, por fotopolimerização e por termopolimerização, encontra-se apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Atribuição das designações das espumas. Nota: a percentagem de Ac-NCB presente em cada espuma é de 0,25%.

Tipo de emulsões	Espumas	Emulsões
Água-em-AESO	F1, F1UV	E1, E1UV
Água-em-AESO+CH	F2	E2
	F3, F3UV	E3, E3UV
Água-em-AESO+CH+DVB	F4	E4
	F5, F5UV	E5, E5UV
	F6	E6
Água-em-AESO+CH+DVB+HDD	F7	E7
	F8	E8
	F9	E9

Em todos os ensaios referentes às espumas E1UV, E3UV e E5UV, verificou-se apenas a ocorrência de fotopolimerização à volta do tubo e não no interior da amostra (Figura 23), provavelmente devido ao facto das amostras não serem muito fluídas e a luz UV não transpor o seu interior. Assim sendo, recorreu-se a uma abordagem diferente: a termopolimerização radicalar, sendo que esta abordagem já foi utilizada na produção de materiais poliméricos porosos [41,79].

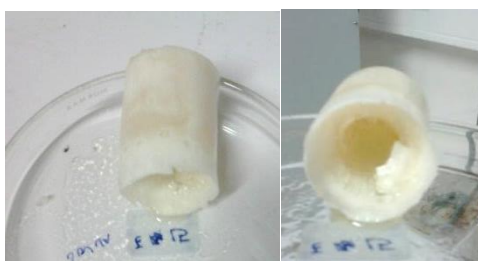
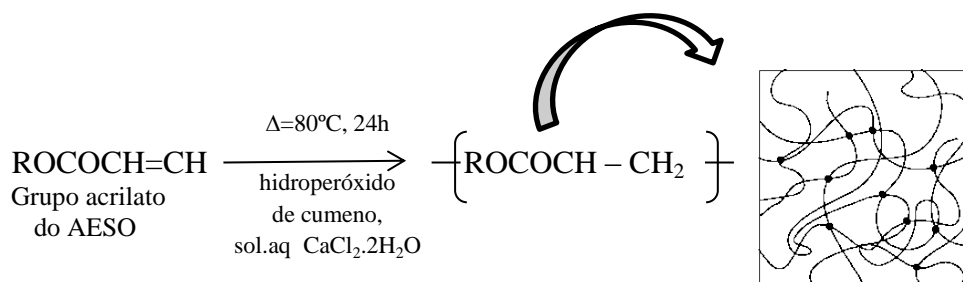


Figura 23: Espuma resultante da fotopolimerização da emulsão E3.

Especificamente, procedeu-se à termopolimerização radicalar das emulsões E1, E2 e E3 (MIPES), conforme a reacção apresentada no Esquema 2. Visto que a reacção envolve vários grupos acrilato do AESO, foi obtido um polímero reticulado com uma estrutura tridimensional.



Esquema 2: Reação de termopolimerização radicalar envolvida na formação das espumas.

Verificou-se que foram obtidas PolyMIPES (MIPES polimerizadas). A formulação que permitiu obter a espuma mais homogênea e não-quebradiça foi a correspondente à emulsão E3 (Figura 24). Desta forma, a espuma F3 foi definida como a espuma “modelo” e adotou-se o rácio AESO/CH = 75/25 para as restantes emulsões estudadas. Assim sendo daqui em diante toda a discussão reporta-se exclusivamente às espumas F3 e F5 a F9.



Figura 24: Amostra F3: espuma obtida a partir da emulsão E3.

De forma a modelar as propriedades mecânicas das espumas, foram incorporados monómeros de divinilbenzeno (DVB) e de 1,6-hexanodiol diacrilato (HDD). O DVB que apresenta um anel aromático e dois grupos vinilo (Figura 25a), é um agente de reticulação que é usado na síntese de polímeros altamente reticulados [83]. Quanto ao HDD (Figura 25b), trata-se de um diéster insaturado, com dois grupos vinilo e que também pode ser utilizado como agente de reticulação entre cadeias poliméricas [84,85]. Na Figura 26 encontram-se algumas das espumas resultantes da adição destes monómeros.

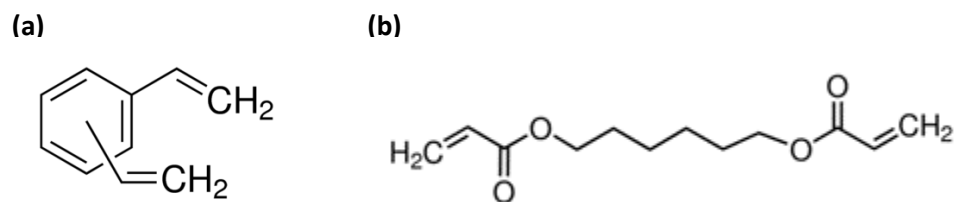


Figura 25: Monómeros usados na produção das espumas: a) divinilbenzeno (DVB) e b) 1,6-hexanodiol diacrilato (HDD).

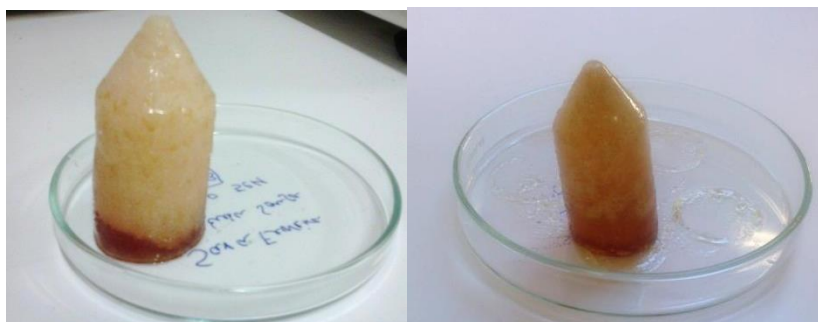


Figura 26: À esquerda: espuma F6 contendo DVB. À direita: espuma F7 contendo DVB e HDD.

3.4 Caracterização das espumas

3.4.1 Caracterização estrutural

As espumas obtidas por fotopolimerização radicalar, e o AESO, foram caracterizados por FTIR-ATR (Figura 27). No espectro do AESO é possível identificar a banda correspondente à vibração assimétrica e simétrica da ligação C-H do grupo CH₂ (ν CH₂) a 2924 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹, respetivamente. É possível identificar ainda a vibração da ligação C=O do grupo carbonilo (ν C=O) a 1730 cm⁻¹ e a vibração da ligação C=C a 1636 cm⁻¹ (ν C=C). A banda que surge a 1400 cm⁻¹ corresponde à vibração da ligação C-H (do CH₂ do grupo acrilato) no plano e as bandas a 985 e 810 cm⁻¹ são atribuídas à vibração da ligação C-H (do CH₂ do grupo acrilato) fora do plano. Finalmente, a banda a 722 cm⁻¹ corresponde à vibração C-H dos grupos metilenos ν (CH₂)_n das cadeias alifáticas, em que $n \geq 3$ [76,86].

Nos espetros das espumas (Figura 27) é possível identificar bandas com valores de comprimento de onda muito semelhantes às bandas do AESO (2923, 2853, 1726, 1632, 1404, 985, 807 e 720 cm⁻¹). Estes resultados confirmam que as emulsões F1UV, F3UV e

F5UV não foram completamente polimerizadas (pois continuam presentes as bandas associadas ao grupo acrilato). Apesar disso, foram obtidos resultados mais promissores no caso das espumas obtidas por termopolimerização radicalar (Figura 28).

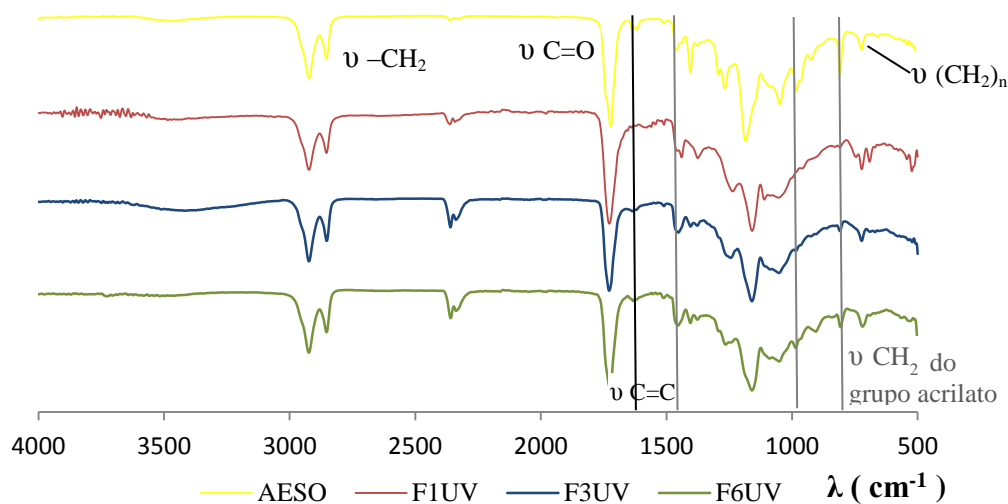


Figura 27: Espectros de FTIR-ATR do AESO e das espumas fotopolimerizadas.

A Figura 28 apresenta os espectros de FTIR-ATR do monómero de AESO e de uma das espumas que foram termopolimerizadas (F6). A formação de um polímero foi confirmada pelos espectros de FTIR, visto que se verificou o desaparecimento das bandas associadas ao grupo acrilato, comparativamente com o espectro FTIR-ATR do AESO (espectros normalizados com base na banda do grupo CH_2). Particularmente, no espectro da espuma F6 é possível observar a ausência da banda associada à vibração da ligação $\text{C}=\text{C}$ a 1636 cm^{-1} ($\nu \text{ C}=\text{C}$), comparativamente com o espectro do AESO. Verifica-se ainda a ausência da banda correspondente à vibração da ligação C-H no plano (do CH_2 do grupo acrilato) próximo de 1400 cm^{-1} e das bandas a 985 e 810 cm^{-1} correspondentes à vibração da ligação C-H (do CH_2 do grupo acrilato) fora do plano.

Não se observam alterações significativas nos espectros das espumas contendo na sua formulação DVB (F4, F5 e F6) e HDD (F7 a F9) relativamente às espumas sem DVB (F1 a F3) e sem HDD (F1 a F6), possivelmente devido à pequena percentagem existente nas espumas.

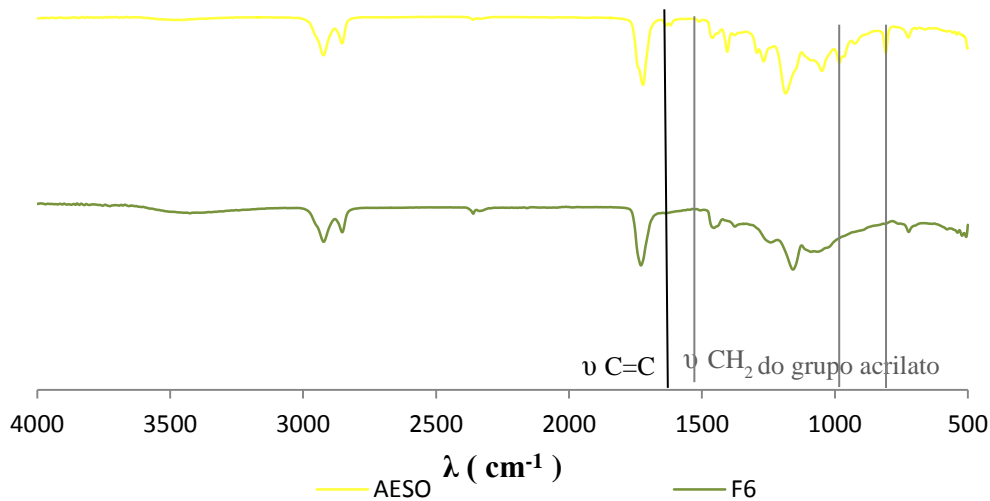


Figura 28: Espectros de FTIR-ATR do AESO e de uma das espumas obtidas por termopolimerização (F6).

3.4.2 Caracterização morfológica

Como referido anteriormente, os materiais de suporte devem apresentar uma estrutura suficientemente porosa de modo a assegurar o transporte celular e uma adequada difusão de nutrientes para as células [16]. Além disso, o aumento da porosidade providencia uma maior área de superfície para a adesão celular e crescimento do tecido ósseo e a interconetividade dos poros fornece uma melhor migração das células [87]. A porosidade de um material de suporte é, portanto, um fator importante a ter em conta visto que o aumento da porosidade pode acelerar o processo de deposição da apatite, melhorando a bioactividade da regeneração do tecido ósseo [60]. No entanto, estudos demonstram que quanto maior for a porosidade de um material de suporte, mais pobres serão as suas propriedades mecânicas [88]. Assim, é necessário que haja um equilíbrio entre a existência de uma arquitetura porosa necessária e propriedades mecânicas adequadas.

A morfologia das espumas preparadas foi estudada por microscopia electrónica de varrimento (Figuras 29 e 30), o que permitiu aferir acerca da dimensão dos poros das espumas (Tabela 4) e avaliar a sua homogeneidade. Analisando as imagens de SEM das espumas para menores ampliações (x50) (Figura 29) é possível confirmar a estrutura porosa dos novos materiais preparados, observando-se que, de uma forma geral, as

espumas são homogéneas. É de salientar que as espumas F3 e F5 são as que apresentam maior homogeneidade.

Tipicamente, os valores médios do diâmetro de poro situam-se na gama entre ≈ 268 e $537 \mu\text{m}$. Como se pode averiguar, a presença de DVB na formulação inicial das emulsões parece desempenhar um papel importante visto que as espumas sem unidades de DVB (F2 e F3) apresentam poros com maior diâmetro do que as espumas com DVB (F5 e F6), de acordo com a Figura 29 e evidenciado na Figura 30 (que contém imagens de poros para maiores ampliações). Tal facto já havia sido reportado na literatura por Yang *et al.* [89] em que ao aumentar a quantidade de DVB em PolyHIPES, o volume de poro diminuiu.

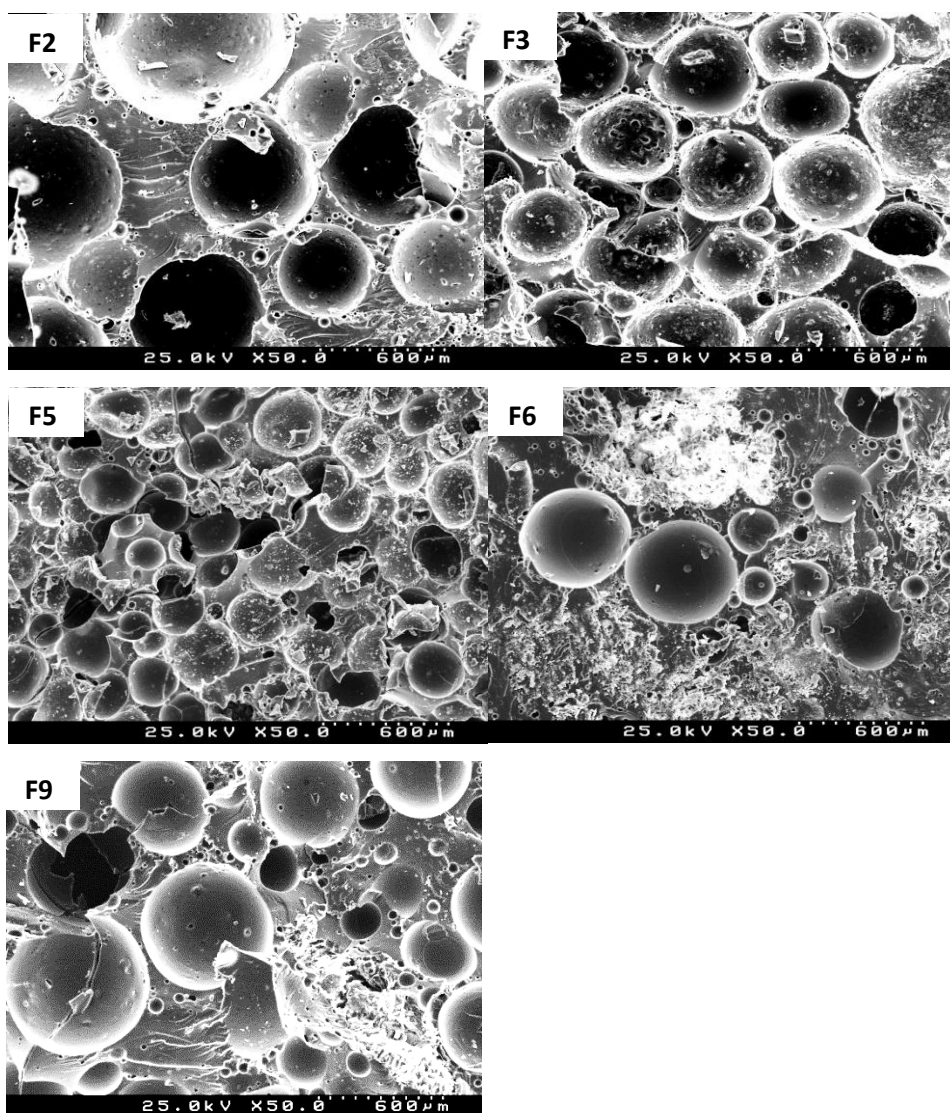


Figura 29: Imagens de SEM para uma ampliação de x50 das espumas sem DVB (F2 e F3) e com DVB (F5 e F6) e com DVB e HDD (F9).

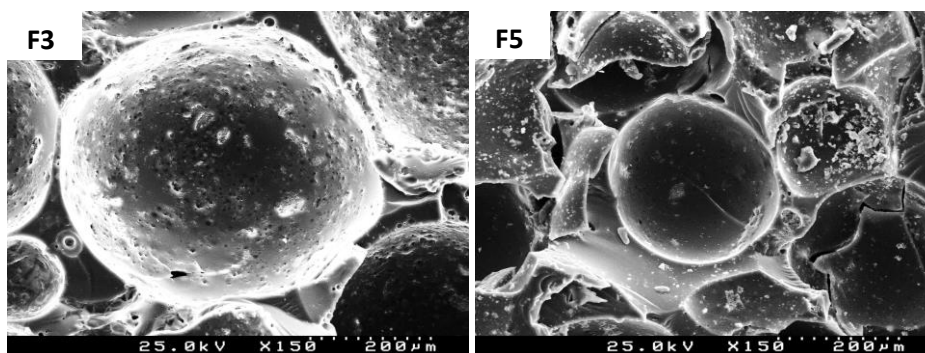


Figura 30: Imagens de SEM para uma ampliação de x150. Diminuição do tamanho do poro da espuma com DVB (F5) comparativamente com a espuma F3.

Tabela 4: Valores médios dos diâmetros dos poros das espumas

	Diâmetro dos poros (μm)
F2	$527,8 \pm 30,1$
F3	$434,3 \pm 18,3$
F5	$268,2 \pm 30,3$
F6	$356,6 \pm 40,0$
F8	$537,1 \pm 49,3$
F9	$521,2 \pm 33,7$

Relativamente às espumas que continham HDD na formulação inicial das emulsões, verificou-se um aumento do diâmetro dos poros, comparativamente à espuma F3. Por exemplo, o diâmetro médio dos poros da espuma F9 (Figura 29) é aproximadamente $521,2 \mu\text{m} \pm 34,0$, enquanto para a espuma F3 é $\approx 434,3 \mu\text{m} \pm 18,3$. Além disso, a distância interporos da espuma F9 não é tão elevada como a da F3. Um estudo realizado por Kim et al. [90] reporta que com o aumento da concentração de HDD os valores médios do diâmetro dos poros aumentam, o que corrobora os resultados obtidos no nosso estudo. Ainda na Figura 29, é possível observar que a superfície dos poros da espuma F9 não é tão irregular como na espuma F3 (sem HDD). Tal facto foi também observado por Kim et al.[90].

Para as maiores ampliações utilizadas (x15K), é possível observar a presença das fibrilas de NCB, na interface entre os poros e a matriz de AESO+DVB+HDD (Figura 31).

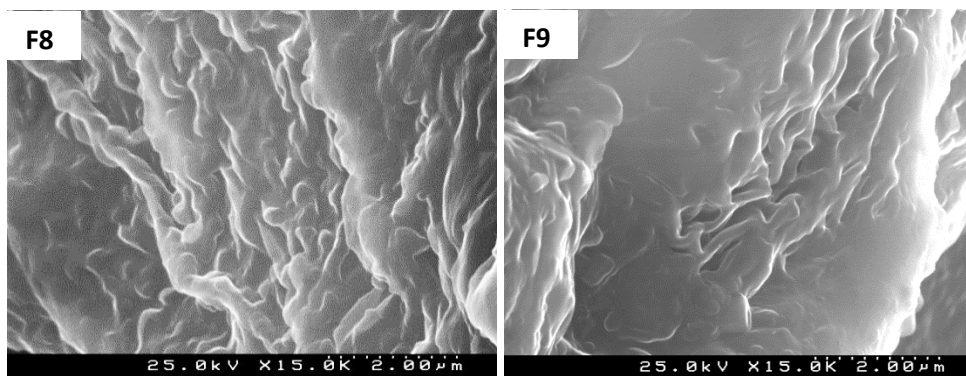


Figura 31: Imagens de SEM x15000: presença de fibrilas de NCB nas espumas F8 e F9.

Tendo em consideração que os poros de um material de suporte utilizado em regeneração óssea devem ter entre 100 a 1000 μm de diâmetro [91], como todas as espumas produzidas apresentam valores de diâmetro dentro desta gama, pode dizer-se que quanto a este parâmetro todas as espumas estudadas são adequadas para este tipo de aplicação biomédica.

3.4.3 Caracterização térmica

A análise termogravimétrica (TGA) permite avaliar a estabilidade térmica das espumas, através da análise da variação da massa da amostra em função da temperatura [92], pelo que se torna uma análise indispensável para caracterizar as espumas em termos térmicos especialmente quando as suas aplicações poderão envolver métodos de esterilização a altas temperaturas.

Na Figura 32 encontram-se representadas as curvas termogravimétricas (TG e DTG) em função da temperatura; enquanto que na Tabela 5 encontram-se sumariadas as temperaturas iniciais de degradação ($T_{i,d}$) e as principais perdas de massa máximas ($T_{dmáx}$) do AESO e de cada espuma estudada. As espumas apresentam valores de decomposição inicial muito próximos, a aproximadamente 252°C. A maioria das espumas apresenta um perfil de degradação que ocorre essencialmente em dois passos. A título de exemplo, o termograma da espuma F3 apresenta o primeiro máximo de decomposição por volta dos 373 °C e o segundo a cerca de 433°C. Relativamente à Ac-NCB, a literatura reporta que a sua $T_{dmáx}$ apresenta o valor de 329°C [75]. No entanto, na análise de TGA efectuada neste estudo da Ac-NCB não se observou nenhum pico de decomposição máxima com este valor, o que se deve provavelmente ao facto das espumas estudadas

terem uma percentagem de Ac-NCB muito baixa ($\approx 0,25\%$). As temperaturas máximas de degradação ($T_{dm\acute{a}x}$) de todas as espumas obtidas são superiores às reportadas para outros materiais de suporte já produzidos como, por exemplo o PLA, que ronda os 368°C [75].

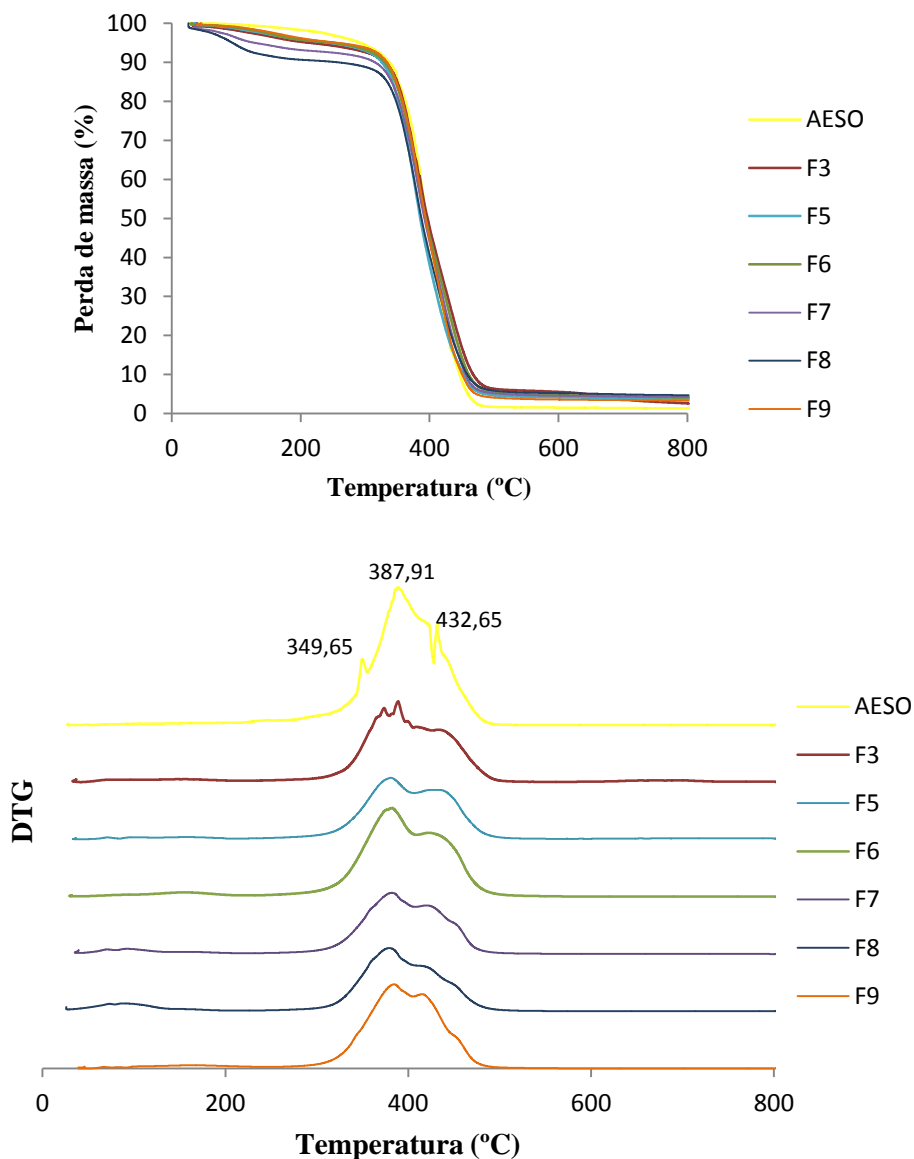


Figura 32: Termogramas do AESO e das espumas obtidas através da termopolimerização.

Verifica-se ainda que as temperaturas iniciais de degradação das espumas F5 e F6 que apresentavam DVB na formulação inicial da emulsão (253 e 248°C , respectivamente), são superiores ao valor de $T_{i,d}$ da espuma F3 (212°C). Uma vez que a degradação de F5 e F6 é iniciada a temperaturas mais elevadas do que a espuma F3, é possível aferir que as

espumas preparadas com base em AESO e DVB apresentam uma maior estabilidade térmica. O mesmo se verificou em outros copolímeros em que quanto maior a percentagem de DVB na formulação do material, maior a sua estabilidade térmica [93].

Relativamente às espumas que apresentam HDD na sua composição, verificou-se que a espuma F9 apresenta uma temperatura inicial de degradação mais elevada do que a F3 (sem HDD e DVB), com um valor próximo de 255 °C. Este resultado está de acordo com um estudo que reporta que em partículas polimerizadas, a presença de HDD resulta numa maior estabilidade térmica [90].

Tabela 5: Temperatura inicial de degradação para uma percentagem de 5% de perda de massa da espuma ($T_{i,d}$) e temperatura máxima de degradação ($T_{dmáx}$) do AESO e das espumas estudadas.

	$T_{i,d}$ (°C)		$T_{dmáx}$ (°C)	
AESO	291	349	388	433
F3	212	-	373	433
F5	253	-	381	430
F6	248	-	383	422
F7	127 ^a	-	382	420
F8	93 ^a	-	379	409
F9	255	-	385	415

^a Espumas não totalmente secas.

Uma das dificuldades atuais passa pela dificuldade na esterilização extensa dos materiais de suporte [19]. A esterilização pode implicar temperaturas demasiado elevadas que podem degradar os materiais antes mesmo de serem utilizados. Desta forma, os resultados deste trabalho constituem uma vantagem visto que os procedimentos de esterilização de implantes poderão ser realizados a temperaturas mais elevadas, sem que haja o comprometimento das propriedades do material de suporte.

De modo a aferir acerca das propriedades termomecânicas das espumas, foram realizadas análises térmicas dinâmico-mecânicas (DMTA), em modo de compressão. Um material de suporte deve apresentar propriedades mecânicas adequadas às pressões a que o tecido ósseo sofre [5]. Na Figura 33 encontram-se representadas as curvas da Tangente δ vs T, para as espumas obtidas por termopolimerização radicalar.

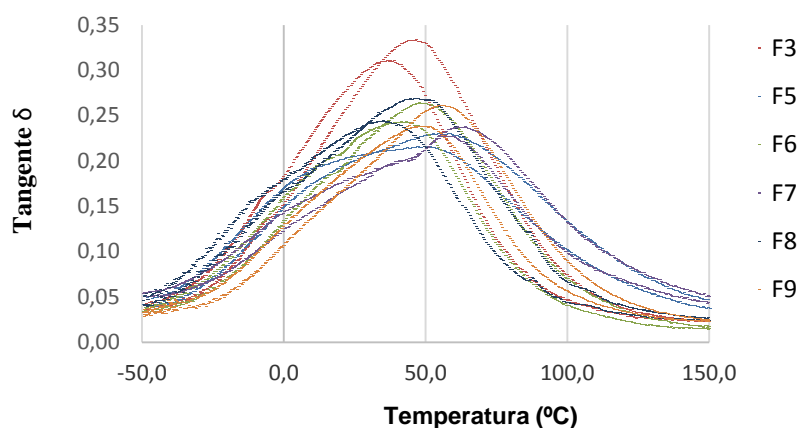


Figura 33: Análise DMTA das espumas a 1 Hz e a 10 Hz: Tangente δ em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Para todas as espumas estudadas, na curva Tangente δ vs T é possível observar essencialmente a existência de uma transição dependente da frequência (1 Hz e 10 Hz) correspondente a uma transição α , designada temperatura de transição vítrea (T_g) [92] e que se expande por uma gama alargada de temperaturas, aproximadamente entre -50 e 150 $^{\circ}\text{C}$ (Tabela 6). Comparando as diferentes amostras pode verificar-se que a espuma F5 apresenta um valor de T_g superior ($\approx 50^{\circ}\text{C}$), relativamente às espumas F3 e F6 (cujas T_g são $\approx 39^{\circ}\text{C}$ e 43°C , respetivamente). Este resultado poderá ser explicado pela presença na espuma F5 de unidades rígidas de DVB. Desta forma, concluiu-se que quanto maior a percentagem de DVB usado na formulação inicial, maior é o valor da T_g . Já as espumas com HDD (F7, F8 e F9) apresentaram temperaturas de transição vítrea de $\approx 55^{\circ}\text{C}$, 33°C e 51°C , respetivamente. Verifica-se que a espuma F7 apresenta uma T_g superior às F8 e F9 pois contém maior percentagem de DVB na sua constituição.

Tabela 6: Temperatura de transição vítrea (T_g) das espumas estudadas.

	T_g ($^{\circ}\text{C}$)
F3	39
F5	50
F6	43
F7	55
F8	33
F9	51

3.4.4 Ensaios mecânicos

As espumas foram estudadas relativamente ao seu comportamento mecânico. Como o objetivo destes testes passa pela determinação do módulo de Young e do regime elástico das espumas, estas foram sujeitas a uma força de compressão até 30% de deformação. Para cada amostra estudada, encontra-se representada na Figura 34 as curvas tensão (σ) vs deformação (%) e os valores médios dos módulos de Young sumariados na Tabela 7. As curvas resultantes apresentam duas regiões distintas e características do comportamento de uma espuma quando sujeita a uma força de compressão: a fase elástica e a fase de Plateau [94,95]. A fase elástica é uma fase reversível em que é possível aferir acerca da elasticidade do material. Com o aumento da tensão, a estrutura do material colapsa dando-se início à fase de Plateau. Através desta análise é ainda possível determinar o módulo de Young, que se define como sendo a tangente da curva na fase elástica. Assim, quanto maior for o valor do módulo de Young, mais rígido é o material. No geral, as espumas estudadas apresentam valores médios de módulo de Young entre $\approx 2,84$ e $13,15$ MPa.

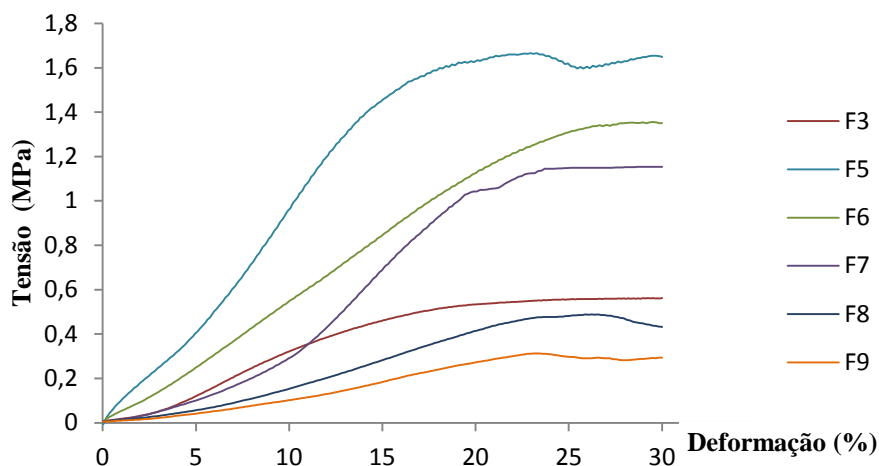


Figura 34: Representação da tensão (MPa) em função da percentagem de deformação de cada espuma.

Tabela 7: Módulos de Young das espumas estudadas.

Espumas	% de DVB	% de HDD	Módulo de Young (MPa)
F3	-	-	$3,41 \pm 0,66$
F6	5	-	$11,41 \pm 0,86$
F5	10	-	$13,15 \pm 0,75$
F7	10	5	$9,40 \pm 1,55$
F8	5	5	$2,84 \pm 0,45$
F9	5	10	$1,73 \pm 0,59$

As espumas F5 e F6 ($\approx 13,15 \pm 0,75$ e $\approx 11,41 \pm 0,86$ MPa) apresentam valores de módulo de Young superiores ao obtido para a espuma F3 ($\approx 3,41 \pm 0,66$ MPa) pelo que podemos concluir que as primeiras espumas são mais rígidas devido à presença do DVB. De facto, a presença de DVB na formulação inicial das emulsões parece desempenhar um papel importante visto que quanto maior a percentagem de DVB utilizada na produção da espuma, maior é o seu módulo de Young (compare-se F6 e F5). Têm sido estudadas PolyHIPES que apresentaram módulos de Young relativamente baixos (cerca de 3 MPa) [60]. Visto que o módulo de Young do osso é de 7-30 GPa [14], o DVB permite aumentar a dureza das espumas e, conseqüentemente melhorar as suas propriedades mecânicas.

As espumas F7, F8 e F9 apresentaram módulos de Young inferiores ao da espuma F3 o que é concordante com o facto das espumas com HDD apresentarem poros com dimensões superiores, o que se reflecte conseqüentemente num menor módulo de Young. Deste modo, podemos concluir que as espumas que contém apenas DVB na sua formulação inicial apresentam propriedades mecânicas superiores às espumas com HDD.

4. Conclusão

Com este trabalho foram produzidas PolyMIPes, tendo-se recorrido a metodologias amigas do ambiente, nomeadamente, a acetilação da NCB (em que foram evitados o uso de compostos nocivos para o ambiente) e a reacção de polimerização de emulsões de Pickering w/o (em que foram utilizadas materiais provenientes de fontes renováveis e sustentáveis, tal como o óleo de soja e a NCB). Desta forma, os principais objectivos do trabalho foram cumpridos.

Na primeira parte deste trabalho foram optimizadas as condições de preparação das emulsões, tendo-se seleccionado a espuma F3 como “modelo” e, portanto foi adotado o rácio AESO/CH=75/25 e 72 h para a estabilização das emulsões. Todos os materiais porosos obtidos a partir de emulsões água-em-AESO+CH, água-em-AESO+CH+DVB e água-em-AESO+CH+DVB+HDD foram analisados por FTIR-ATR, SEM, TGA e DMTA. Foram ainda realizados ensaios mecânicos.

Nas micrografias de SEM, averiguou-se que na presença de DVB os valores médios do diâmetro dos poros diminuem, variando entre $\approx 268,2 \pm 30,3$ e $\approx 356,6 \pm 40,0$ μm . Já na presença de HDD, os valores médios do diâmetro dos poros aumentam, variando entre $\approx 537,1 \pm 49,3$ e $\approx 521,2 \pm 34,0$ μm . Na análise de TGA, verifica-se que com a introdução do DVB nas espumas, a sua estabilidade térmica aumenta. Através da análise de DMTA, verificou-se que quanto maior a percentagem de DVB na formulação inicial da emulsão, maior é o valor da T_g . Desta forma, a espuma que contém 10% de DVB (relativamente ao volume de AESO) apresenta uma maior T_g (50°C), comparativamente à espuma sem DVB.

Relativamente aos ensaios mecânicos, averiguou-se que quanto maior for a percentagem de unidades de DVB na espuma, maior é o seu módulo de Young, concluindo-se que o DVB permite aumentar a dureza das espumas e, conseqüentemente melhorar as suas propriedades mecânicas. À excepção das espumas com HDD, todas as outras apresentaram módulos de Young mais elevados do que os reportados pela literatura (cerca de 3MPa) [60]. Na presença de HDD, os valores dos módulos de Young diminuíram significativamente.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a presença de DVB melhora significativamente as propriedades mecânicas das espumas. Por outro lado, as espumas

com DVB e HDD apesar de apresentarem maior porosidade, não apresentam propriedades mecânicas tão boas quanto as espumas sem HDD. Como é necessário que haja um equilíbrio entre a existência da porosidade e boas propriedades mecânicas, pode-se concluir que os materiais porosos com DVB (5% e 10%) poderão ser bons candidatos a materiais de suporte. Estas espumas apresentam poros cujos valores médios variam entre $\approx 268,2 \pm 30,3$ e $\approx 356,6 \pm 40,0$ μm , boas propriedades termomecânicas (T_g que variam entre 43°C e 50°C e temperaturas de degradação iniciais à volta dos 250°C) e ainda módulos de Young elevados de $\approx 11,41 \pm 0,86$ e $\approx 13,15 \pm 0,75$ MPa.

Como trabalho futuro, propõe-se continuar o estudo aqui apresentado nomeadamente deverão ser feitos testes de biocompatibilidade e biodegradabilidade das espumas preparadas, de forma a afinar as suas características de modo a poderem ser um material de suporte do tecido ósseo e usadas como implante ósseo.

5. Bibliografia

1. Shadjou N, Hasanzadeh M. Bone Tissue Engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials: recent progress. *Mater Sci Eng*. 2015;55:401–9.
2. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in Bone Tissue Engineering: integrating biological and physicommechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;84:1–29.
3. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol*. 2006;41(11):1080–93.
4. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of ccaffolds for use in Tissue Engineering Part I-Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001;7(6):679–89.
5. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for Tissue Engineering. *Mater Today*. 2011;14(3):88–95.
6. Ozdil D, Aydin HM. Polymers for medical and Tissue Engineering applications. *J Chem Technol Biotechnol*. 2014;89(12):1793–810.
7. Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Kein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic plastic properties of bone. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 1975;57(7):956–61.
8. Stevens MM. Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Mater Today*. 2008;11(5):18–25.
9. Li JJ, Kaplan DL, Zreiqat H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. *J Mater Chem B*. 2014;2(42):7272–306.
10. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*. 2005;310(5751):1135–8.
11. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech*. 2004;71(13-14):1809–40.
12. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;65:20–31.
13. Keaveny TM, Morgan EF, Yeh OC. Bone Mechanics. In: Kutz M, editor. *Standard handbook of Biomedical Engineering and Design*. New York: McGraw-Hill; 2004. p. 1–24.
14. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003;24(13):2133–51.
15. YSM. Yale Medical Cell Biology: Trabecular Bone [Internet]. New Haven: Yale School of Medicine. 2015 [cited 2015 Oct 20]. Available from: http://medcell.med.yale.edu/histology/bone_lab/trabecular_bone.php
16. Basha RY, Kumar S, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2015;57:452–63.
17. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*. 2010;132:15–30.
18. McAuliffe JA. Bone graft substitutes. *J Hand Ther*. 2003;16(2):180–7.
19. Uskoković V. When 1+1>2: Nanostructured composites for hard Tissue Engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2015;57:434–51.
20. Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*. 2000;21(8):757–64.
21. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920–6.
22. Young JH, Teumer J, Ross RN, Parenteau NL. Approaches to transplanting engineered cells and tissues. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press; 2000. p. 281–91.
23. Vallet-Regí M, Colilla M, González B. Medical applications of organic-inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics. *Chem Soc Rev*. 2011;40(2):596–607.

24. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in Tissue Engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur spine J*. 2008;17 Suppl 4:467–79.
25. Duan B, Wang M. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for Bone Tissue Engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *J R Soc Interface*. 2010;7(Suppl_5):S615–29.
26. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):197–208.
27. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci*. 2010;35(4):403–40.
28. Bergmann CP, Stumpf A. *Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation*. 1st ed. Porto Alegre: Springer Science & Business Media; 2013.
29. Nerem RM. Cellular engineering. *Ann Biomed Eng*. 1991;19:529–45.
30. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):317–32.
31. Mullen CA, Haugh MG, Schaffler MB, Majeska RJ, McNamara LM. Osteocyte differentiation is regulated by extracellular matrix stiffness and intercellular separation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013;28:183–94.
32. Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, Oreffo ROC. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue Eng*. 2004;10(7-8):1148–59.
33. Lyons FG, Gleeson JP, Partap S, Coghlan K, O'Brien FJ. Novel microhydroxyapatite particles in a collagen scaffold: a bioactive bone void filler? *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(4):1318–28.
34. Shah AR, Shah SR, Oh S, Ong JL, Wenke JC, Agrawal CM. Migration of co-cultured endothelial cells and osteoblasts in composite hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2011;39(10):2501–9.
35. Itani Y, Asamura S, Matsui M, Tabata Y, Isogai N. Evaluation of nanofiber-based polyglycolic acid scaffolds for improved chondrocyte retention and in vivo bioengineered cartilage regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(6):805–13.
36. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3640–59.
37. Olewnik E, Czerwiński W, Nowaczyk J, Sepulchre M-O, Tessier M, Salhi S, Fradet A. Synthesis and structural study of copolymers of l-lactic acid and bis(2-hydroxyethyl terephthalate). *Eur Polym J*. 2007;43(3):1009–19.
38. Damadzadeh B, Jabari H, Skrifvars M, Airola K, Moritz N, Vallittu PK. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(9):2523–31.
39. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for Bone Tissue Engineering. *Bone*. 2009;45(1):4–16.
40. Gorna K, Gogolewski S. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):813–27.
41. Blaker JJ, Lee KY, Li X, Menner A, Bismarck A. Renewable nanocomposite polymer foams synthesized from Pickering emulsion templates. *R Soc Chem*. 2009;11(9):1321.
42. Leal-Calderon F, Schmitt V, Bibette J. *Emulsion Science: Basic Principles*. 2nd ed. New York: Springer; 2007.
43. Chevalier Y, Bolzinger MA. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2013;439:23–34.
44. Heeres AS, Picone CSF, van der Wielen LAM, Cunha RL, Cuellar MC. Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends Biotechnol*. 2014;32(4):221–9.

45. Odian G. Principles of Polymerization. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
46. Khristov K, Czarnecki J. Emulsion films stabilized by natural and polymeric surfactants. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2010;15(5):324–9.
47. Pickering SU. CXCVI Emulsions. *J Chem Soc Trans.* 1907;91:2001–21.
48. Rayner M, Marku D, Eriksson M, Sjö M, Dejmek P, Wahlgren M. Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2014;458:48–62.
49. Kalashnikova I, Bizot H, Cathala B, Capron I. New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir.* 2011;27(12):7471–9.
50. Salas C, Nypelö T, Abreu CR, Carrillo C, Rojas OJ. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2014;19(5):383–96.
51. Cunha AG, Mougél JB, Cathala B, Berglund LA, Capron I. Preparation of double Pickering emulsions stabilized by chemically tailored nanocelluloses. *Langmuir.* 2014;30(31):9327–35.
52. Finkle P, Draper HD, Hildebrand JH. The theory of emulsification 1. *J Am Chem Soc.* 1923;45(12):2780–8.
53. Andresen M, Stenius P. Water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobized microfibrillated cellulose. *J Dispers Sci Technol.* 2007;28(6):837–44.
54. Kumar A, Li S, Cheng CM, Lee D. Recent developments in phase inversion emulsification. *Ind Eng Chem Res.* 2015;54(34):8375–96.
55. Binks BP, Lumsdon SO. Catastrophic phase inversion of water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobic silica. *Langmuir.* 2000;16(6):2539–47.
56. Sabouni R, Gomaa HG. Effect of hydrodynamics on nanoparticles stability in Pickering emulsions stabilized by metal organic frameworks (MOFs) in reversing shear flow. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;484:416–23.
57. Destribats M, Gineste S, Laurichesse E, Tanner H, Calderon FL, Héroguez V, Schmitt V. Pickering emulsions: what are the main parameters determining the emulsion type and interfacial properties? *Langmuir.* 2014;30(31):9313–26.
58. Cameron NR. High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers. *Polymer (Guildf).* 2005;46(5):1439–49.
59. Dunstan TS, Fletcher PDI, Mashinchi S. High Internal Phase Emulsions: Catastrophic Phase Inversion, Stability, and Triggered Destabilization. *Langmuir.* 2012;28:339–49.
60. Menner A, Powell R, Bismarck A. Open porous polymer foams via inverse emulsion polymerization: should the definition of High Internal Phase (ratio) Emulsions be extended? *Macromolecules.* 2006;39(6):2034–5.
61. Cowie JMG. *Polymers: Chemistry and Physics of modern materials.* 2nd ed. Edinburgh: CRC Press; 1991.
62. Rodrigues MR, Neumann MG. Photopolymerization: principles and methods. *Polímeros.* 2003;13(4):276–86.
63. Santiago EV, López SH. Acrylated-Epoxidized Soybean Oil-Based Polymers and their use in the generation of electrically conductive polymer composites. In: El-Shemy H, editor. *Soybean - Bio-Active Compounds.* 1st ed. Rijeka: InTech; 2013. p. 231–63.
64. Dufresne A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Mater Today.* 2013;16(6):220–7.
65. Figueiredo ARP, Vilela C, Neto CP, Silvestre AJD, Freire CSR. Bacterial cellulose-based nanocomposites: roadmap for innovative materials. In: Thakur VK, editor. *Nanocellulose Polymer Nanocomposites.* New Jersey: Scrivener Publishing; 2014. p. 17–64.
66. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013.
67. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw

- material. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44(22):3358–93.
68. Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R. *Campbell Biology*. 9th ed. Benjamin Cummings; 2011.
 69. Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev.* 2011;40(7):3941–94.
 70. Nechyporchuk O, Pignon F, Belgacem MN. Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. *J Mater Sci.* 2014;50(2):531–41.
 71. Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(24):5438–66.
 72. Lucenius J, Parikka K, Österberg M. Nanocomposite films based on cellulose nanofibrils and water-soluble polysaccharides. *React Funct Polym.* 2014;85:167–74.
 73. Brown AJ. XLIII. On an acetic ferment which forms cellulose. *R Soc Chem.* 1886;49:432.
 74. Lee K-Y, Blaker JJ, Murakami R, Heng JYY, Bismarck A. Phase behavior of medium and high internal phase water-in-oil emulsions stabilized solely by hydrophobized bacterial cellulose nanofibrils. *Langmuir.* 2014;30(2):452–60.
 75. Tomé LC, Pinto RJB, Trovatti E, Freire CSR, Silvestre AJ, Neto CP, Gandini A. Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid) through a simple approach. *Green Chem.* 2011;13(2):419–27.
 76. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra. A practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000. p. 10815–37.
 77. Becher P. *Emulsions: Theory and Practice*. 3rd ed. Wilmington: American Chemical Society; 2001.
 78. Wu SP, Rong MZ, Zhang MQ, Hu J, Czigany T. Plastic Foam Based on Acrylated Epoxidized Soybean Oil. *J Biobased Mater Bioenergy.* 2007;1(3):417–26.
 79. Lee K-Y, Wong LLC, Blaker JJ, Hodgkinson JM, Bismarck A. Bio-based macroporous polymer nanocomposites made by mechanical frothing of acrylated epoxidised soybean oil. *Green Chem.* 2011;13(11):3117–23.
 80. Bokhari MA, Akay G, Zhang S, Birch MA. The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials.* 2005;26(25):5198–208.
 81. Hayman MW, Smith KH, Cameron NR, Przyborski SA. Growth of human stem cell-derived neurons on solid three-dimensional polymers. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;62(3):231–40.
 82. Menner A, Haibach K, Powell R, Bismarck A. Tough reinforced open porous polymer foams via concentrated emulsion templating. *Polymer (Guildf).* 2006;47(22):7628–35.
 83. Li W-H, Stöver HDH. Porous monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres by precipitation polymerization. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 1998;36(10):1543–51.
 84. Ji L, Chang W, Cui M, Nie J. Photopolymerization kinetics and volume shrinkage of 1,6-hexanediol diacrylate at different temperature. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2013;252:216–21.
 85. Lee H, Lee SG, Doyle PS. Photopatterned oil-reservoir micromodels with tailored wetting properties. *R Soc Chem.* 2015;15(14):3047–55.
 86. Fu L, Yang L, Dai C, Zhao C, Ma L. Thermal and mechanical properties of acrylated epoxidized-soybean oil-based thermosets. *J Appl Polym Sci.* 2010;117(4):2220–5.
 87. Dorozhkin S V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials.* 2010;31(7):1465–85.
 88. He L-H, Standard OC, Huang TTY, Latella BA, Swain M. Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2008;4(3):577–86.
 89. Yang X, Tan L, Xia L, Wood CD, Tan B. Hierarchical porous polystyrene monoliths from PolyHIPE. *Macromol Rapid Commun.* 2015;36(17):1553–8.
 90. Kim D, Lee DY, Lee K, Choe S. Effect of crosslinking agents on the morphology of polymer particles produced by one-step seeded polymerization. *Macromol Res.* 2009 Apr;17(4):250–8.

91. Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chem Eng J*. 2008;137:62–71.
92. Gabbott P. *Principles and Applications of Thermal Analysis*. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
93. Hwang CW, Park H-M, Oh CM, Hwang TS, Shim J, Jin C-S. Synthesis and characterization of vinylimidazole-co-trifluoroethylmethacrylate-co-divinylbenzene anion-exchange membrane for all-vanadium redox flow battery. *J Memb Sci*. 2014;468:98–106.
94. Gibson L, Ashby M. *Cellular solids: Structure and properties*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
95. Rodríguez-Perez MA, Álvarez-Láinez M, de Saja JA. Microstructure and physical properties of open-cell polyolefin foams. *J Appl Polym Sci*. 2009;114(2):1176–86.