

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR SAMUEL HILSDORF
BARBANTI E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA EM 23/02/2001



ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

**MORFOLOGIA DE POLÍMEROS
BIOREABSORVÍVEIS COMO SUPORTE PARA
CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**

Autor : Samuel Hilsdorf Barbanti

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

08/01



200205851

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**MORFOLOGIA DE POLÍMEROS
BIOREABSORVÍVEIS COMO SUPORTE PARA
CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**

Autor : **Samuel Hilsdorf Barbanti**

Orientador: **Eliaana Aparecida de Rezende Duek**

Curso: Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2001
S.P. - Brasil

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
B 232m
 V. Ex.
 T. MOBO BC/ 47413
 PACC. 837102
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 04-02-02
 N.º CPO

CM00163515-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B232m

Barbanti, Samuel Hilsdorf

Morfologia de polímeros bioreabsorvíveis como
 suporte para cultura de osteoblastos / Samuel Hilsdorf
 Barbanti. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadora: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Materiais biomédicos. 2. Polímeros. 3.
 Morfologia. 4. Biodegradação. 5. Células – Cultura e
 meios de cultura. I. Duek, Eliana Aparecida de
 Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

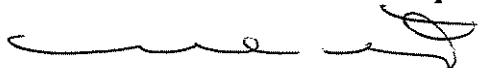
**MORFOLOGIA DE POLÍMEROS
BIOREABSORVÍVEIS COMO SUPORTE PARA
CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**

Autor : Samuel Hilsdorf Barbanti

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek



**Prof. Dr. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas**



**Prof. Dr. Necésio Gomes Costa
Escola Federal de Engenharia de Itajubá - EFEI**



**Prof. Dr. Célia Marina de Alvarenga Freire
Universidade Estadual de Campinas - FEM**

Campinas, 23 de Fevereiro de 2001

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Eliana Duek por toda a ajuda nesses anos, desde de 1995, ainda como aluno de iniciação científica. Sem dúvida, sua orientação e o exemplo do seu trabalho, fazem parte da minha formação como engenheiro e pesquisador, ou até mesmo como médico. Nesses anos, ser parte do seu grupo de pesquisa foi um grande prazer e privilégio.

À Profa. Dra. Sônia Malmonge por toda ajuda crítica nesses anos de convivência.

À minha mãe, Maria Lúcia Spedo Hilsdorf, pelo exemplo diário da importância do trabalho intelectual como profissão e, principalmente, por ter me ensinado a preservar o espaço de estudo dentro de casa e a respeitar os livros como instrumento desse trabalho.

A minha família, por toda ajuda desde a graduação: minhas irmãs Gabriela e Cristina, meu pai, Luciano Barbanti, meus tios e tias, Ronaldo e Paula Pilli, Aruy e Ana Marotta, e primos, Marcelo, Henrique e Guilherme Marotta, Conrado e Lucas Pilli.

À Profa. Cecília Zavaglia pelas conversas e oportunidades.

Aos amigos do Depto. de Engenharia de Materiais: Sra. Betina, Claudenete, Daniel, Gata Morta, Marcelo, Raul, Rita, M.Sc. Eng^o Rubis, Paula, Sérgio Maia, Serginho e Vanessa.

Aos pesquisadores do laboratório da Profa. Lúcia Wada, do Instituto de Biologia da UNICAMP, Arnaldo Santos Jr., Chris e Patrícia, pelo diálogo e ajuda na parte experimental em cultura de células.

Ao amigo pessoal e de estudos, Ricardo José Chimentão.

À FAPESP pelo suporte financeiro baseado no mérito científico e, principalmente, por não se submeter às regras esdrúxulas de concessão de bolsas, e financiamentos, praticadas no dia-dia.

RESUMO

BARBANTI, Samuel Hilsdorf, *Morfologia de Polímeros Bioreabsorvíveis como Suporte para Cultura de Osteoblastos*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2001, 90 p. Dissertação (Mestrado)

A utilização de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de células tem se destacado como alternativa para tratamento de lesões e perda de tecidos. O objetivo deste trabalho foi obter, caracterizar e avaliar a degradação *in vitro* de estruturas densas e porosas de poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)(50:50), preparadas pelo método da evaporação do solvente. Posteriormente os materiais foram utilizados como suporte para cultura de osteoblastos. Pelos resultados obtidos, as amostras de PLGA apresentaram degradação mais acentuada em relação às de PLLA. A comparação entre as estruturas densas e porosas confirmam o efeito autocatalítico dos poli(α -hidróxi ácidos), no qual a degradação é mais acentuada nas estruturas densas devido à concentração dos produtos ácidos no interior do material. A morfologia das amostras de PLLA mostraram-se sem alterações em função do tempo de 8 semanas de degradação, sugerindo que podem ser utilizadas como suporte estrutural durante o período estudado. As amostras de PLGA alteraram significativamente sua morfologia interna e de superfície, sendo as estruturas densas e porosas, morfologicamente semelhantes após 8 semanas de degradação *in vitro*. Os dados da cultura de células osteoblásticas mostrou baixa adesão celular para as amostras de PLLA e alta para as amostras de PLGA. O estudo da morfologia celular sobre a superfície dos materiais mostrou densidade e morfologia superior em membranas densas de PLLA. A seleção dos materiais para a Engenharia de Tecidos é dependente da aplicação, assim, como as estruturas de PLGA degradam rapidamente e permitem a adesão celular, podem ser indicadas para aplicações onde as lesões de tecido ósseo são pequenas, enquanto as estruturas de PLLA poderiam ser indicadas nos casos em que a lesão exigisse um material que degrade em um tempo longo, e servindo como suporte físico para as células e mecânico para o tecido.

Palavras-chave: Materiais Biomédicos, Polímeros, Morfologia, Biodegradação, Células-Cultura e meios de cultura.

ABSTRACT

BARBANTI, Samuel Hilsdorf, *Morfologia de Polímeros Bioreabsorvíveis como Suporte para Cultura de Osteoblastos*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2001, 90 p. Dissertation (Master's degree)

The use of bioresorbable polymers as a support for the culture of cells in polymers has received special attention as an alternative for the treatment of lesions and the loss of tissue. The aim of this work was to obtain, to characterize and to evaluate the degradation *in vitro* of dense and porous structures of lactic poli(L-acid) (PLLA) and poli(D,L-acid lactic-co-acid glicólico) (PLGA)(50:50), prepared by casting process, for the later use as a support for the osteoblasts culture. The results showed that samples of PLGA presented a more accentuated degradation in relation to the one of PLLA. Comparing dense and porous structures, it was verified the auto-catalytic effects of poly(α -hydroxy acids), in which the degradation is more accentuated in the dense structures due to the concentration of the acid products inside the material. The morphology of the samples of PLLA did not show any changes in function of the degradation time of 8 weeks, suggesting that the structures can be used as structural support during the studied period. On the other hand, samples of PLGA changed significantly its internal and surface morphology, being morphologically similar after 8 weeks of *in vitro* degradation. Data of osteoblasts culture showed low cellular adhesion for the samples of PLLA and high for the samples of PLGA. The study of the morphology on the surface of the materials showed high density and morphology in PLLA dense membranes. The selection of the materials for the Tissue Engineering is dependent of the application. Due to a faster degradation of the PLGA structures as compared to PLLA, allowing the cellular adhesion, it can be indicated for applications where the lesions of bone tissue is small. While the structures of PLLA could be suitable in the cases where the lesion demanded a material to degrade in a long time serving as physical support for the cells and mechanical support for the tissue.

Keywords: Biomedic Materials, Polymer, Morphology, Biodegradation, Cell-Culture e medium of culture.

ÍNDICE

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vii
Nomenclatura	viii
Abreviações	viii
 Introdução	 01
Objetivos	02
 Capítulo 1	
1 Revisão da Literatura	03
1.1 Engenharia de Tecidos	03
1.2 Polímeros Bioreabsorvíveis - Poli(α -hidroxi ácidos)	08
1.3 Biodegradação, Bioabsorção e Bioreabsorção	09
1.4 Fatores que Influenciam a Degradação	13
1.4.1 Localização do Implante	13
1.4.2 Composição Química	13
1.4.3 Cristalinidade	14
1.4.4 Morfologia	15
1.5 Cultura de Células	18
 Capítulo 2	
2 Materiais e Métodos	20
2.1 Preparação das Estruturas	20
2.2 Degradação <i>in vitro</i> em meio de cultura celular	22
2.3 Técnicas de Caracterização	22
2.3.1 Microscopia Ótica (MO)	22
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	22
2.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	23
2.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	23
2.4 Cultura de Células	24
2.4.1 Adesão Celular	24

	2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
Capítulo 3	3 Resultados e Discussão	25
	3.1 Microscopia Ótica (MO)	25
	3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
	3.2.1 Poli(L-ácido láctico)	37
	3.2.2 Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)	39
	3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	45
	3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	49
	3.5 Cultura de Células	60
	3.5.1 Adesão celular	61
	3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	64
Capítulo 4	4.1 Conclusões	70
	4.2 Sugestões para próximos trabalhos	71
Capítulo 5	5 Referências Bibliográficas	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Técnica da engenharia de tecidos (reproduzido de FREED *et al.*, 1993).

Figura 2 - Estratégia I utilizada na Engenharia de Tecidos (adaptado de HUTMACHER, 2000). (A, B, C, D, E, F explicados no texto anterior. Etapas de biodegradação e bioabsorção: (I) Hidratação do suporte polimérico, (II) Hidratação e degradação, (III) Degradação e perda de massa, (IV) Absorção e metabolismo, (V) Metabolismo).

Figura 3 - Estratégia II em Engenharia de Tecidos (adaptado de HUTMACHER, 2000). (A, B, C, D, E, F explicados no texto anterior. Etapas de biodegradação e bioabsorção: (I) Hidratação do suporte polimérico, (II) Hidratação e degradação, (III) Degradação e perda de massa, (IV) Absorção e metabolismo, (V) Metabolismo).

Figura 4 - Síntese das cadeias poliméricas de PLA e PLGA.

Figura 5 - Hidrólise da ligação éster originando terminal carbóxi e hidróxi na cadeia polimérica.

Figura 6 - Rota metabólica de degradação dos poli(α -hidróxi ácidos) (adaptado de BÖSTMAN, 1991).

Figura 7 - Meia-vida (em meses) de razões entre unidades de ácido láctico e ácido glicólico em copolímeros PLGA implantados em ratos (reproduzida de MILLER *et al.*, 1977).

Figura 8 - Dispositivos para preparação das amostras de PLLA e PLGA (Tubo de ensaio, placa e cuba para evaporação do solvente).

Figura 9 - Microscopia ótica de amostras de PLLA observadas no estereoscópio (a = não degradado, a' = 8 semanas de degradação *in vitro*).

Figura 10 - Microscopia ótica de amostras de PLGA observadas no estereoscópio (a = não degradado, a' = 8 semanas de degradação *in vitro*).

Figura 11 - Microscopia ótica / Superfície superior de amostras de membranas densas observadas no microscópio (a = PLGA, a' = PLLA) (Aumento 150 x)

Figura 12 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana densa de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SS ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SI)

Figura 13 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de estrutura esférica de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SExterna ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SInterna)

Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SS ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SI)

Figura 15 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana densa de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (FR), b = 0 sem. (superfície), c = 1 sem. (FR), d = 1 sem. (superfície), e = 2 sem. (superfície com fratura), f = 2 sem. (superfície), g = 4 sem. (FR), h = 4 sem. (superfície), i = 8 sem.)

Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de estrutura esférica de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (FR), a' = 0 sem. (superfície), b = 1 sem. (FR), b' = 1 sem. (superfície), c = 2 sem. (FR), c' = 2 sem. (superfície), d = 4 sem. (superfície), e, e' = 8 sem.)

Figura 17 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana porosa de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (SS), b = 0 sem. (FR), c = 1 sem. (SS), d = 1 sem. (FR), e = 2 sem. (SS), f = 2 sem. (FR), g = 0 sem. (SI), h = 4 sem., i = 8 sem.)

Figura 18 - Gráfico da temperatura de início de degradação térmica (Ti) em função do tempo de degradação *in vitro* para amostras de PLGA.

Figura 19 - Gráfico da temperatura de início de degradação térmica (T_i) em função do tempo de degradação *in vitro* para amostras de PLLA.

Figura 20 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de PLLA.

Figura 21 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de PLLA.

Figura 22 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de membranas densas de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

Figura 23 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membranas densas de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 24 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

Figura 25 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 26 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

Figura 27 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 28 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de PLGA.

Figura 29 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana densa de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 30 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 31 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Figura 32 – Gráfico da adesão de osteoblastos em amostras de membranas densas e porosas de PLLA e PLGA.

Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre lamínula de vidro (controle).

Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre amostras de PLLA (A, B, C, D = Superfície superior de membranas densas ; E, F, G, H = Superfície superior de membranas porosas).

Figura 35 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre amostras de PLGA (a, b, c, d = Superfície superior de membranas densas ; e, f, g, h = Superfície superior de membranas porosas).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho de poros e espessura de amostras para as diferentes estruturas de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Tabela 2 - Temperatura de início de degradação térmica para amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Tabela 3 - Temperatura de máxima degradação térmica para amostras de PLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Tabela 4 - Dados de DSC (Temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão) para amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação, 0, 1, 2, 4, 8 semanas.

Tabela 5 - Dados de DSC (Variação da entalpia de cristalização, fusão e grau de cristalinidade) de amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação, 0, 1, 2, 4, 8 semanas.

Tabela 6 - Absorbância das amostras de membrana densa e porosa de PLLA e PLGA submetidas ao ensaio de adesão celular.

NOMENCLATURA

Tg – Temperatura de transição vítrea	(° C)
Tc – Temperatura de cristalização	(° C)
Tf – Temperatura de fusão	(° C)
ΔH – Variação de entalpia	(J.g ⁻¹)

ABREVIATÓES

DSC – Calorimetria exploratória diferencial
FDA – Food and Drug Administration
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MO – Microscopia ótica
Mw – Massa molar ponderal média
PBS – Phosphate Buffer Solution
PDLLA - Poli(D, L-ácido láctico)
PGA – Poli(ácido glicólico)
PHA – Poli(α -hidroxi ácidos)
PLA – Poli(ácido láctico)
PLGA – Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLLA – Poli(L-ácido láctico)
SFB – Soro Fetal Bovino
TGA – Análise termogravimétrica
Ti – Temperatura de início de degradação térmica
Tmáx – Temperatura no qual a degradação térmica é máxima.

INTRODUÇÃO

Quando a estrutura biológica numa situação de trauma não pode ser reparada, a alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um outro material. São os chamados implantes, dispositivos médicos feitos de um biomaterial que são intencionalmente inseridos dentro do corpo humano, abaixo da superfície epitelial, na tentativa de restaurar a função perdida (WILLIANS, 1987).

Dentre os inúmeros materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos.

Em qualquer trabalho terapêutico com implantes, a mimetização das funções visa, fundamentalmente, a aproximação da estrutura sintética com a estrutura orgânica original. Idealmente, a melhor terapia é aquela em que o tecido, ou órgão, volte a desempenhar suas funções normais. Embora muitos dispositivos protéticos artificiais estejam disponíveis para substituir tecidos, como as próteses de junções (joelho, cotovelo etc), válvulas do coração etc, poucos podem substituir completamente todas as complexas funções da estrutura original. Em situações clínicas mais severas somente o transplante do órgão retoma as atividades orgânicas.

Nos anos 80 surge uma técnica terapêutica que busca a idealidade em reparos orgânicos: recriar *in vitro* tecidos e órgãos que possibilitem a sua reutilização no paciente e a retomada das características, funções e atividades normais.

A técnica, conhecida como Engenharia de Tecidos, consiste na cultura de células em suportes de materiais sintéticos, os quais, através da sua estrutura tridimensional adequada e das propriedades do material, permitem o crescimento, proliferação celular e formação de um novo tecido. A terapia envolve a retirada de material biológico do próprio paciente, expansão *in vitro* das células viáveis sob o suporte e subsequente implante no paciente.

Os desafios implicados na utilização da técnica envolvem desde o projeto e o processamento das estruturas tridimensionais, até o estudo da região doadora de células para

cultura *in vitro*. Atualmente, a forma/estrutura dos materiais utilizados como suporte na cultura estimulam e induzem o crescimento e a diferenciação celular de modo que o tecido formado seja o desejado, que a função original seja restabelecida e que o procedimento seja reprodutível e de baixos custos.

Embora as pesquisas envolvendo culturas de células primárias em substratos de polímeros bioreabsorvíveis mostrem um grande desenvolvimento nos últimos anos, a bibliografia dificilmente apresenta a caracterização morfológica e físico-química do material em relação ao crescimento de células e funções celulares. Compreender como a morfologia dos polímeros bioreabsorvíveis se alteram ao longo da cultura de células representa um avanço no entendimento da interação entre o material sintético e o crescimento e diferenciação celular.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a preparação de estruturas tridimensionais de polímeros bioreabsorvíveis (PLLA e PLGA), a caracterização morfológica e térmica da degradação *in vitro* em meio de cultura celular, e o estudo da adesão e morfologia de osteoblastos na superfície dos polímeros, visando estabelecer uma relação entre as propriedades do suporte/cultura celular.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

A perda de tecidos por traumas ou doenças acometem a população de uma maneira geral e irrestrita. Aliado à evolução dos exames clínicos e de diagnósticos, atualmente é uma prática comum identificar as causas e local da perda da função tecidual. Entretanto, identificá-la não é suficiente, torna-se necessário uma ação corretiva que permita a recuperação da função, restaurando ou mimetizando a original (BOSCHI, 1995).

A reposição total (ou parcial) é feita através de duas alternativas: *transplantes* e *implantes*. Em relação aos transplantes, os tecidos ou órgãos podem ser obtidos de doadores vivos, como por exemplo no caso do coração, rins etc, ou de cadáveres, como no caso de ossos liofilizados e congelados. Em ambos os casos, torna-se necessário a utilização de drogas imunossupressoras, para evitar a rejeição dos órgãos, e de outros medicamentos que neutralizem a possível contaminação microbiológica e viral (HENCH, 1998). A segunda alternativa é a utilização de um implante, dispositivo médico feito de um biomaterial que é intencionalmente inserido dentro do corpo, total ou parcialmente sepultado abaixo da superfície epitelial (definição do Consenso da Sociedade Européia de Biomateriais) (WILLIAMS, 1987). Nestes casos, o biomaterial pode ter origem distinta: biológica ou sintética. Na forma sintética os materiais devem ser produzidos com o intuito de serem biocompatíveis com o meio implantado, permitindo que a função de recuperação seja alcançada.

Para que um biomaterial possa ser utilizado como implante no corpo humano deve-se satisfazer uma série de exigências inerentes à ele: além de biocompatível (ter a capacidade e funcionar com um resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica), deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas, conveniente com o propósito da aplicação. De um modo geral, um material biocompatível não deve provocar reação inflamatória crônica ou aguda nos tecidos adjacentes (BOSCHI, 1995 e GRIFFITH, 2000).

Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação. Essa resposta à um corpo estranho é tipicamente benigna, mas pode conduzir à complicações clínicas mais severas como infecção ou contração do tecido. Dessa forma, estes são riscos a serem considerados e evitados em muitas aplicações. Por exemplo, em dispositivos de liberação controlada de drogas, é indesejável que o material permaneça no organismo após o término da sua função. Neste caso, terapeuticamente seria necessário uma segunda cirurgia para retirada do implante (GRIFFITH, 2000).

Com o advento e pesquisas de implantes temporários, confeccionados de polímeros sintéticos, e com os avanços em cultura de células *in vitro*, VACANTI e LANGER (1993) apresentaram uma alternativa aos materiais sintéticos tradicionalmente utilizados (com seus problemas e limitações inerentes): a regeneração de tecidos vivos do próprio paciente, produzidos fora do organismo através do recrutamento de células saudáveis, e cultivadas sobre estruturas de polímeros bioreabsorvíveis.

Desde então, a literatura científica especializada volta sua atenção à uma nova técnica, conhecida como Engenharia de Tecidos, que necessita de protocolos e regras bem definidas. A técnica consiste na fusão de trabalhos da área de engenharia e ciências da saúde no intuito de desenvolver dispositivos funcionais que interagem e atuam como os materiais orgânicos originários (DAVIS *et al.*, 1996).

Células isoladas não podem formar tecidos. Elas normalmente requerem um ambiente específico que inclui a presença de um material que age como matriz, servindo como suporte físico e substrato adesivo para o crescimento das células isoladas *in vitro*. O suporte, preparado de forma a mimetizar as condições do tecido original é produzido de material polimérico bioreabsorvível, que degrada à medida que o tecido se regenera (TEMENOFF *et al.*, 2000).

O transplante de células apresenta vantagens sobre o transplante de órgãos. Pelo fato da população de células isoladas expandirem *in vitro* com a utilização de técnicas de cultura celular, somente um pequeno número de células doadoras são necessárias para preparar o subsequente implante. O tecido é removido de um doador, dissociado em células, ou grupo delas, fixadas ou encapsuladas em um suporte polimérico e transplantadas ao paciente, sendo desnecessário a parte

doadora sacrificar um órgão todo. O uso de células isoladas também permite a remoção daquelas indesejáveis, as quais podem ser alvo de resposta imune, influenciando no processo de rejeição. Em adição, cirurgias entre doadores e receptores, e seus riscos inerentes, podem ser evitados e os custos dos procedimentos significativamente reduzidos (LAITINEN *et al.*, 1993 e MIKOS *et al.*, 1993).

A Figura 1 a seguir, ilustra a técnica da Engenharia de Tecidos aplicada em estudo *in vivo*. Atualmente, a figura do animal é substituída pelo próprio paciente em aplicações clínicas (BURKHART, 2000).

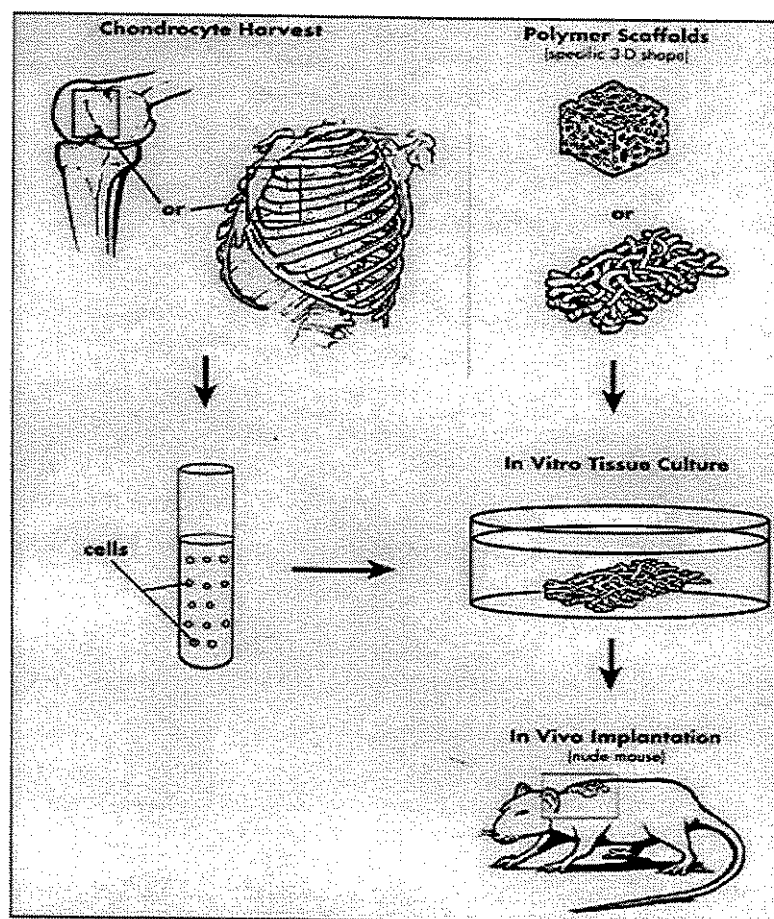


Figura 1 - Técnica da engenharia de tecidos (reproduzido de FREED *et al.*, 1993).

Na busca pela padronização da metodologia empregada na Engenharia de Tecidos, HUTMACHER (2000) estabelece as seguintes etapas de pesquisa e aplicação:

- A) Fabricação / seleção da estrutura de polímero bioreabsorvível
- B) Inoculação da população celular sobre o suporte polimérico em cultura celular estática (placa de Petri ou similar)
- C) Crescimento do tecido prematuro em sistema dinâmico
- D) Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (Bioreator)
- E) Transplante / Implante cirúrgico
- F) Assimilação do transplante de tecido.

Considerado de forma integrada, sob o aspecto da ciência dos materiais e do tipo de tecido e reparo necessário, a seleção do polímero, utilizado na Engenharia de Tecidos, segue basicamente duas estratégias:

Na primeira, representada pela Figura 2, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, desde a inoculação até o ponto de formação do tecido prematuro e implantação no organismo hospedeiro. Neste caso, o implante ocorre antes da formação *in vitro* de tecido maturado. No organismo, o polímero é degradado numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original, até a formação do novo tecido e sua bioreabsorção completa.

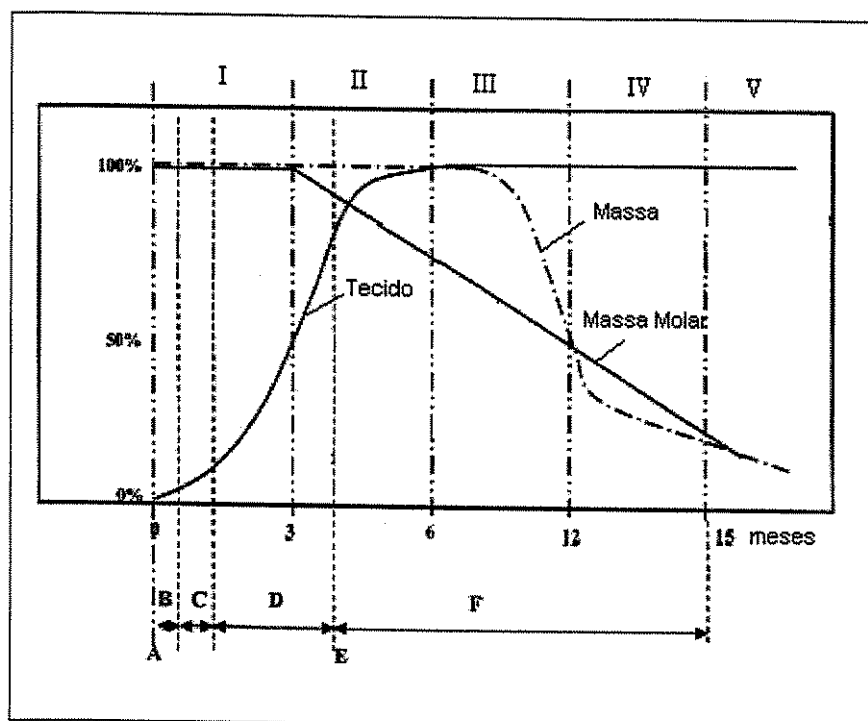


Figura 2 - Estratégia I utilizada na Engenharia de Tecidos (adaptado de HUTMACHER, 2000).
(A, B, C, D, E, F explicados no texto anterior. Etapas de biodegradação e bioabsorção: (I) Hidratação do suporte polimérico, (II) Hidratação e degradação, (III) Degradação e perda de massa, (IV) Absorção e metabolismo, (V) Metabolismo).

Na segunda estratégia, o implante ocorre com tecido maduro formado. O dispositivo polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorre a formação completa do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam-se e secretam matriz extracelular durante a cultura estática e/ou dinâmica, enquanto o polímero é degradado e absorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo. A Figura 3 exemplifica a estratégia II.

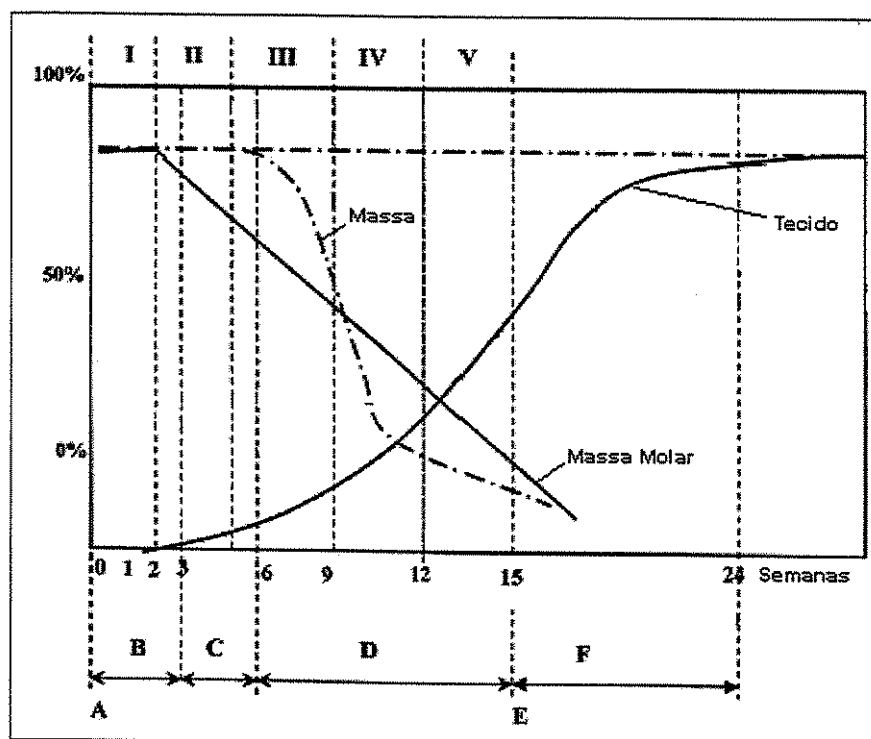


Figura 3 - Estratégia II em Engenharia de Tecidos (adaptado de HUTMACHER, 2000).

(A, B, C, D, E, F explicados no texto anterior. Etapas de biodegradação e bioabsorção: (I) Hidratação do suporte polimérico, (II) Hidratação e degradação, (III) Degradação e perda de massa, (IV) Absorção e metabolismo, (V) Metabolismo).

Ambas as estratégias podem ser utilizadas para reparos em tecidos ósseos e cartilagosos. Entretanto, o sucesso da técnica e da estratégia varia em função do tipo, local e extensão do tecido lesado, aliado ao conhecimento de propriedades específicas de biodegradação e bioreabsorção dos polímeros utilizados (BURG *et al.*, 2000).

1.2 POLÍMEROS BIOREABSORVÍVEIS - POLI(α -HIDRÓXI ÁCIDOS)

Definido e baseado nas estratégias anteriores, o primeiro estágio na Engenharia de Tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e preparação dos suportes tridimensionais.

Em aplicações na reconstrução de tecidos, o objetivo dos dispositivos temporários como suporte para a cultura de células é reparar o defeito até que o processo natural de recuperação tenha se completado. Nesse sentido, o estudo de implantes sintéticos de polímeros tem

direcionado suas pesquisas para materiais biocompatíveis, biofuncionais e, principalmente, para aqueles que são degradáveis e bioreabsorvíveis pelo corpo humano (DAVIS *et al.*, 1996).

HUTMACHER (2000) descreve três categorias de biomateriais utilizados, atualmente, na Engenharia de Tecidos:

- I) Polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis, regulamentados e aprovados pelo FDA americano, como o colágeno e PHA (PGA, PLLA, PDLA, policaprolactona etc).
- II) Polímeros em estudo, não aprovados e/ou regulamentados: poli(ortoésteres) (POE) e polianidridas.
- III) Polímeros híbridos, sintetizados com a adição de unidades de aminoácidos/proteínas, como o poli(ácido láctico-co-lisina), materiais específicos e que buscam a proliferação e diferenciação celular baseados nas características bioquímicas das células.

Neste trabalho, nosso enfoque de estudo é relacionado aos materiais da categoria I, regulamentados e aprovados.

1.3 BIODEGRADAÇÃO, BIOABSORÇÃO E BIOREABSORÇÃO

Os termos utilizados para os conceitos de biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção são controversos e distintos. Devido à falta de padronização para os conceitos, utiliza-se neste trabalho as definições fornecidas por VERT *et al.* (1993): Biodegradação refere-se ao processo de perda de massa, ou degradação das cadeias macromoleculares, *in vivo/vitro*, sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Bioabsorção, segundo o autor, é o conceito associado aos materiais que são dissolvidos, sem clivagem da cadeia polimérica, em fluidos orgânicos. Por último, polímeros bioreabsorvíveis são aqueles que implantados são degradados em produtos e subprodutos eliminados pelas vias metabólicas do corpo.

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres sintéticos, os quais fazem parte o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(dioxanona) (PD), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(β -hidroxibutirato) (PHB), e copolímeros destes (BOSTMAN *et al.*, 1991 e ALI *et al.*, 1993).

O processo de síntese desses materiais tem sido desenvolvido e aprimorado nas últimas décadas, e é utilizado em processos de produção em larga escala. No caso do PLA e PGA, a polimerização direta do ácido láctico e/ou ácido glicólico origina oligômeros de baixa massa molar, sendo necessário a síntese de um composto intermediário denominado na literatura como *lactide* e *glycolide*, respectivamente. Para a obtenção de estruturas poliméricas com massas moleculares maiores é necessário que a polimerização ocorra pela abertura das unidades de diésteres cíclicos, conforme ilustra as reações esquemáticas da Figura 4 (BENDIX, 1998 e MIDDLETON, 2000).

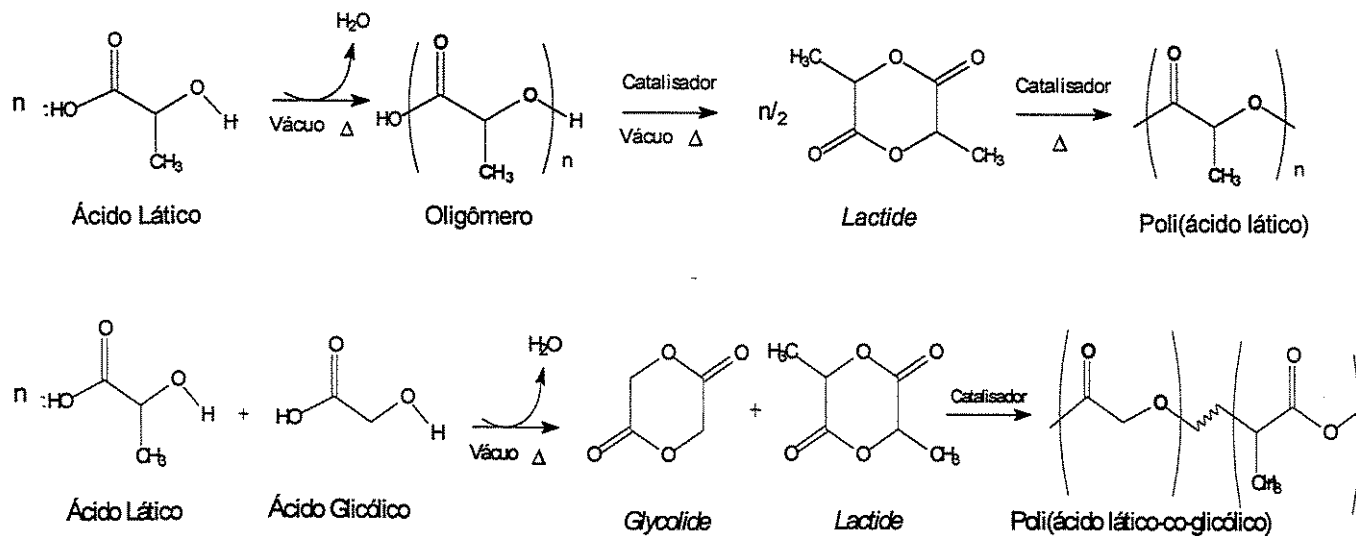


Figura 4 - Síntese das cadeias poliméricas de PLA e PLGA.

De uma maneira geral, o processo de biodegradação e bioreabsorção dos poli(α -hidróxi ácidos) é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos, o material sofre, inicialmente, hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de biodegradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres. O material sofre cisões

na cadeia principal, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação poderá prosseguir por um processo biologicamente ativo (por enzimas dos fluidos orgânicos) ou pela clivagem hidrolítica passiva (LI, 1999). A Figura 5 exemplifica a cisão hidrolítica. A degradação é caracterizada geralmente pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (Mw) ou em muitos casos, pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tensão (GRIZZIA *et al.*, 1995).

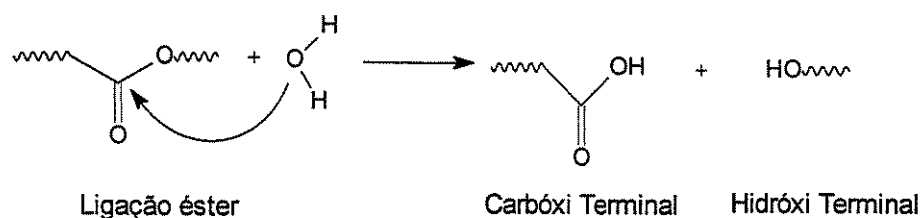


Figura 5 - Hidrólise da ligação éster originando terminal carbóxi e hidróxi na cadeia polimérica.

O mecanismo de degradação tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser heterogêneo. A presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. Inicialmente, o processo é homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro. É o chamado efeito autocatalítico dos PHA (LI, 1999).

A autocatálise foi avaliada inicialmente por LI¹ *et al.* (1990) estudando copolímeros amorfos de PDLA. Segundo os autores, após 12 semanas de degradação *in vitro* em tampão fosfato, o interior do material desaparece. Resultados semelhantes são obtidos nos estudos *in vivo*. A degradação heterogênea tem sido avaliada nos últimos anos e confirmada pelos estudos subsequentes (LI² *et al.*, 1990, LI³ *et al.*, 1990 e VERT *et al.*, 1991).

A bioreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs. Terminada a hidrólise do material, no Ciclo, a degradação segue o processo de oxidação à ácido láctico (para o PLA) e conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua

vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre a liberação de CO_2 e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, resultando na eliminação, novamente, de CO_2 e H_2O através da urina e da respiração. O material é reabsorvido e metabolizado (BOSTMAN, 1991 e ALI *et al.*, 1993).

A Figura 6 ilustra a rota metabólica da bioreabsorção dos poli(α -hidroxi ácidos):

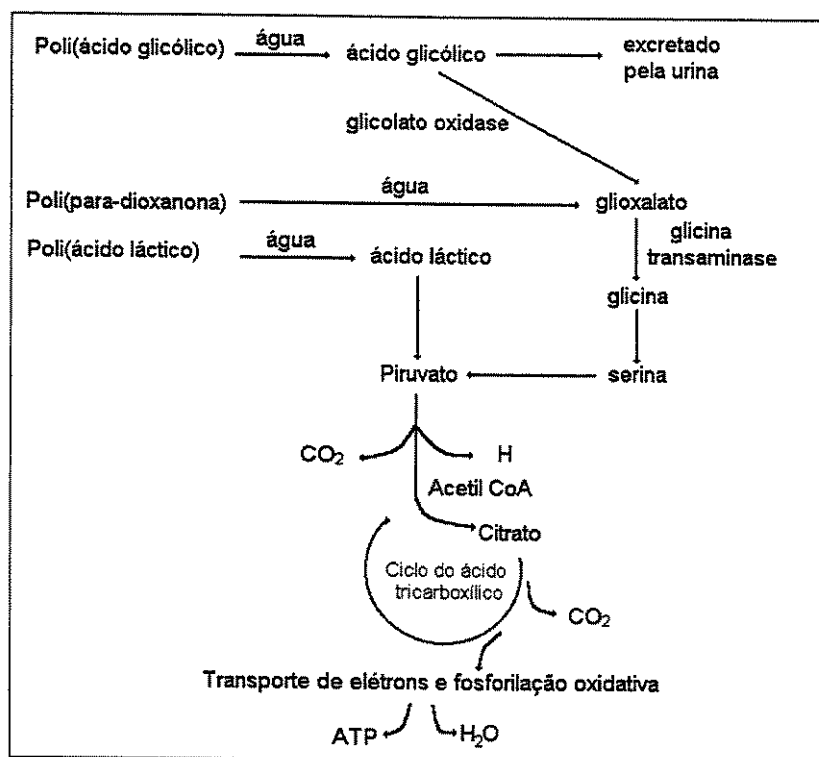


Figura 6 - Rota metabólica de degradação dos poli(α -hidroxi ácidos)

(adaptado de BÖSTMAN, 1991).

Na etapa de desenvolvimento e seleção de polímeros bioreabsorvíveis, o tempo de degradação (associado à taxa de hidrólise) é fundamental para o sucesso de biocompatibilidade e biofuncionalidade do suporte/implante. Caso o material degrade numa taxa mais elevada que a necessária, suas propriedades mecânicas ficam comprometidas; caso o tempo de degradação seja excessivamente longo, poderão ocorrer reações inflamatórias (ATHANASIOU *et al.*, 1996).

1.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A DEGRADAÇÃO

Neste sentido, os estudos de degradação são direcionados para as variáveis que influenciam o processo, mas que não podem ser consideradas isoladamente. Para MIDDLETON *et al.* (2000) os principais fatores relacionados à degradação são: local de implante, composição química / estereoisométrica (grupos ou monômeros hidrofílicos na cadeia polimérica), cristalinidade, e tamanho e geometria do dispositivo desenvolvido.

1.4.1 Localização do Implante

A localização do implante determina fundamentalmente a vascularização do local. Se um polímero bioreabsorvível é implantado num local de alta vascularização (grande atividade vital), sua velocidade de degradação será mais rápida em relação à uma região menos vascularizada, de funções passivas (HOLLINGER *et al.*, 1986).

1.4.2 Composição Química

No caso do poli(ácido láctico), a quiralidade do carbono α permite a síntese de compostos enantiômeros, levo (L-) e destro (D-) rotatórios, dando origem à uma família de polímeros: o poli(L-ácido láctico), poli(D,L-ácido láctico) e copolímeros em diferentes proporções. No caso do poli(ácido glicólico) (PGA) não é possível a síntese de composto enantiomérico devido a ausência de centros quirais. Segundo BENDIX (2000), devido à distribuição aleatória das unidades L- e D- na cadeia polimérica, o polímero racêmico não possui domínios cristalinos, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas significativamente menores quando comparado ao semicristalino PLLA.

Para copolímeros PLGA, a composição química das unidades de ácido láctico e ácido glicólico é avaliada como fator determinante na degradação por hidrólise. MILLER *et al.* (1977) avaliaram a degradação *in vivo*, durante 11 meses, para amostras de *pellets* de PLLA(100), PLGA(25:75), PLGA(50:50), PLGA(75:25) e PGA(100), através da inclusão de ^{14}C e ^3H na cadeia polimérica. Medindo-se a perda de radioatividade dos implantes em ratos, os autores

concluem que a meia-vida é menor para as estruturas de PLGA (50:50) (conforme a Figura 7) e está relacionada com a cristalinidade dos materiais.

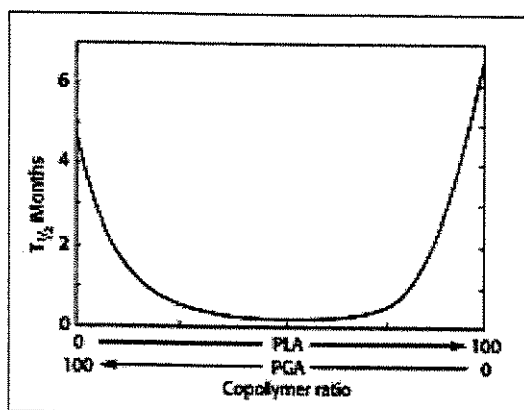


Figura 7 - Meia-vida (em meses) de razões entre unidades de ácido láctico e ácido glicólico em copolímeros PLGA implantados em ratos (reproduzida de MILLER *et al.*, 1977)

1.4.3 Cristalinidade

Polímeros podem existir em dois estados distintos de ordenamento das cadeias poliméricas: o amorfo, caracterizado por um arranjo desordenado das moléculas, ou no estado cristalino, com ordenação tridimensional. A cristalinidade pode ser conceituada como uma repetição regular das estruturas moleculares no espaço e quantificada e/ou avaliada pela técnica de difração de raios-X, elétrons, ou através de medidas indiretas de calorimetria, como por exemplo, DSC (MANO, 1988).

Copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico, quando sintetizados de forma aleatória não possuem domínios cristalinos e são consequentemente materiais amorfos. Homopolímeros são descritos pela literatura (REED *et al.*, 1981) como materiais cristalinos (semicristalinos) e seu grau percentual de cristalinidade diretamente relacionado com a velocidade de degradação (e vice-versa).

A primeira observação experimental foi relatada por FISCHER *et al.* (1973) através de distribuições trimodais de Mw utilizando dados de degradação *in vitro* para copolímeros de PDLLA. A degradação de polímeros semicristalinos ocorre, fundamentalmente, em duas etapas, conforme descrito a seguir.

Devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, o efeito da cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. O primeiro estágio de degradação consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. O segundo estágio se dá quando parte considerável da região amorfa está degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos (PISTNER *et al.*, 1993, LAM *et al.*, 1994 e LI, 1999).

Em relação aos polímeros semicristalinos de PLA e à degradação diferenciada das regiões amorfas e cristalinas, a literatura descreve um aumento no grau de cristalinidade durante o processo de degradação, seja pelo aumento percentual da porção cristalina, seja pela formação de novos cristais através do rearranjo das cadeias poliméricas de menor massa molar originadas no processo de degradação (DUEK *et al.*, 1999).

1.4.4 Morfologia

A influência da morfologia (tamanho, geometria e porosidade) do suporte polimérico é relatada como um dos fatores determinantes na velocidade de degradação e indução ao crescimento celular. Os desafios estão relacionados no desenvolvimento de técnicas de preparo do suporte e na manutenção da morfologia e das propriedades mecânicas durante a cultura de células (ATALA, 2000).

Na avaliação e compreensão dos polímeros bioreabsorvíveis, o estudo da degradação *in vitro* tem se mostrado como uma alternativa quando comparados aos *in vivo* (fundamentais e necessários). Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições do ensaio, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação, podem ser controlados e monitorados (GOGOLEWSKI *et al.*, 2000).

Segundo MIKOS *et al.* (1993) a taxa de penetração e crescimento celular, em estruturas porosas de polímeros bioreabsorvíveis, está diretamente relacionada com o tamanho e distribuição do tamanho dos poros no material. Os autores, num extenso estudo, prepararam réplicas porosas de PLLA (amorfo e cristalino) e PLGA 50:50 através da técnica de evaporação de solvente com adição de partículas de NaCl, variando entre 250 a 500 μm , obtendo estruturas que possuíam em média 85% de porosidade com tamanhos de poros variando entre 50 e 150 μm . O material foi implantado na região abdominal de ratos e avaliada a invasão celular em 25 dias de experimento. Os autores concluem que a invasão e o crescimento celular estão diretamente relacionados com o tamanho dos poros e a cristalinidade do material. Na faixa de 50-150 μm , em ambos os polímeros, quanto maior o tamanho do poro do material maior foi a taxa de crescimento celular, pois está relacionado com a difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais.

LU¹ *et al.* (2000) descreve o estudo da degradação *in vitro*, em tampão fosfato (pH=7,4), de estruturas porosas de PLLA preparadas pela adição de sal em diferentes granulometrias e concentrações. Os autores concluem que a influência da morfologia do poro (tamanho e distribuição do tamanho de poros) não tem influência na morfologia porosa durante 46 semanas de degradação. O efeito autocatalítico é também observado e descrito como sendo uma função da espessura da parede do poro. Quanto maior a espessura, menor a difusão dos produtos ácidos de degradação e consequentemente maior a velocidade de perda de massa.

Nosso grupo de pesquisa avaliou a degradação *in vitro* em tampão fosfato (pH=7,4) de membranas densas e porosas de PLLA durante 90 dias. O efeito autocatalítico é observado para as estruturas densas e o tamanho do poro não teve influência na morfologia durante o período de degradação (BARBANTI *et al.*, 2000).

Comumente, os fatores de influência são avaliados conjuntamente. A composição química x morfologia durante a degradação *in vitro* e *in vivo* de copolímeros de PLGA foi avaliada por LU² *et al.* (2000). Foram preparadas estruturas porosas de PLGA (85:15) e PLGA(50:50) através do processo de adição de sal e subsequente evaporação do solvente. Os autores concluem que a variação da concentração e tamanho dos poros não tem influência na degradação dos materiais e

que estruturas de PLGA(50:50) degradam mais rapidamente que as estruturas de PLGA(85:15), devido à maior porcentagem de unidades de ácido glicólico.

Diversas técnicas tem sido utilizadas na preparação de estruturas planas, porosas ou densas de PLA e PLGA com aplicações na Engenharia de Tecidos. Entre as técnicas destacam-se: o processo de evaporação de solvente, com ou sem adição de sal, inversão de fases, extrusão de fibras e o processo de injeção de gás e posterior expansão.

O processo de evaporação de solvente (*casting*) com adição de sal mostra-se útil na confecção de materiais porosos, com poros esféricos, variando entre 30-300µm. A técnica permite uma boa reprodutibilidade, entretanto a interconecção dos poros nem sempre é total e podem ainda reter partículas de sal no seu interior (MIKOS *et al.*, 1993).

Para HARRIS *et al.* (1998) existem desvantagens nos processos de preparação de amostras porosas que requerem o uso de solventes orgânicos. As técnicas de *casting* e inversão de fase podem deixar resíduos que influenciarão na cultura celular. No caso da fabricação de fibras por extrusão, altas temperaturas são requeridas e nem sempre é um processo “ameno” para polímeros amorfos. A alta temperatura também é um fator desvantajoso quando o material está incorporado de outros materiais orgânicos, como os fatores de crescimento.

Atualmente, nas técnicas empregadas em Engenharia de Tecidos não é somente considerado o tipo de material e a sua morfologia. Os fatores de crescimento são requeridos em algumas aplicações no intuito de promover a vascularização, o fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários para viabilizar ou não o sucesso da cultura de células e dos implantes. Introduzir fatores de crescimento nos materiais bioreabsorvíveis é uma técnica eficaz na indução da proliferação celular (TABATA, 2000).

1.5 CULTURA DE CÉLULAS

Diagnosticado o problema médico e estabelecida a estratégia para a seleção e preparação do suporte polimérico, a etapa subsequente é inocular, através de técnicas de cultura de células *in vitro*, células do paciente sobre o material. A interação entre material biológico e sintético não é completamente conhecida e representa um importante enfoque de estudo (ANSELME, 2000).

A utilização de cultura de células sobre materiais sintéticos é antiga e vem sendo utilizada em inúmeras áreas da engenharia biomédica. A cultura celular *in vitro* permite diagnosticar doenças, avaliar a citotoxicidade de um material, mutagenicidade, propagar vírus para a confecção de vacinas, assim como para a síntese específica de moléculas orgânicas de alta complexidade. O procedimento dos experimentos são atualmente padronizados e protocolados.

Aplicadas à Engenharia de Tecidos, a cultura celular além de fornecer dados relativos à citotoxicidade e à indução ao crescimento, representa o início da recomposição do tecido natural. É fundamental o conhecimento das características de adesão e diferenciação celular durante o processo (ANSELME, 2000).

Nas últimas décadas, avanços significativos foram obtidos no entendimento dos mecanismos de interação das células animais com o seu ambiente natural, a matriz extracelular. Esse conhecimento vem sendo utilizado para o desenvolvimento de polímeros que possam mimetizar as características da matriz extracelular natural, exercendo um papel ativo na restauração tecidual (HUBBELL, 1995).

Segundo BOYAN (1996), a interação entre material sintético e célula depende fundamentalmente das características da superfície do material. A topografia, propriedades químicas e energia de superfície determinam como as moléculas biológicas serão adsorvidas e subsequentemente as células do meio.

Atualmente, dois tipos de tecidos são priorizados em pesquisas aplicadas à Engenharia de Tecidos: o cartilagenoso e o ósseo. Em cartilagem, as aplicações terapêuticas em seres humanos começam a ser avaliadas nos últimos anos. Diversos autores relatam experimentos que visam a

reprodução total ou parcial de estruturas anatômicas em aplicações e terapias de reconstrução, como por exemplo: reconstrução da cartilagem na região nasal (PUELACHER *et al.*, 1994), crescimento de condrócitos em estruturas no formato de uma orelha humana (CAO *et al.*, 1997), mamilo feminino (CAO *et al.*, 1998), e válvulas e dutos urológicos (ATALA, 2000).

Em tecidos ósseos as aplicações terapêuticas envolvem principalmente os dispositivos ortopédicos (como os pinos, parafusos e placas de fixação), e os que promovem a regeneração do osso guiado (KELLOMAKI *et al.*, 2000 e AN *et al.*, 2000).

Neste trabalho enfocamos o estudo das duas primeiras etapas da técnica da Engenharia de Tecidos, que compreende a preparação e seleção de estruturas tridimensionais de polímeros bioreabsorvíveis e a avaliação da estrutura em cultura de células estática.

CAPÍTULO 2

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentado a metodologia de preparação das estruturas tridimensionais, as técnicas de caracterização e o procedimento da cultura de células de osteoblastos.

2.1 PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS

Para a preparação das estruturas tridimensionais dos polímeros bioabsorvíveis utilizou-se poli(L-ácido láctico) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (50:50), fornecidos pela PURAC (Groninger – Holanda) na forma de *pellets*.

A técnica de preparação é conhecida como *casting*, ou evaporação de solvente, a qual consiste na dissolução do polímero no solvente apropriado e posterior evaporação do mesmo num molde desejado. Foram confeccionados 3 tipos de estruturas: Membrana Densa, Membrana Porosa e Suporte Esférico, conforme descrito a seguir. O procedimento foi realizado separadamente para ambos os polímeros utilizados.

Membranas Densas: dissolveu-se o polímero sob agitação (aproximadamente 2h), na temperatura ambiente em cloreto de metileno (CH_2Cl_2) (MERCK) na concentração 10% (w/v). A solução foi vertida sobre placas de vidro previamente limpas com etanol (MERCK) e o solvente evaporado de forma controlada, numa cuba saturada de solvente e conectada à uma corrente de ar, por aproximadamente 24 h.

Membranas Porosas: foram preparadas de modo análogo às densas, com o mesmo solvente e mesma concentração em porcentagem em massa. Incluiu-se após a dissolução do polímero, citrato trissódico 2-hidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), na concentração de 50% (w/v) – em relação à solução polímero/solvente - com uma granulometria do sal previamente estabelecida na faixa de 180 a 250 μm . Após a secagem, as membranas porosas foram lavadas, sob agitação, em

água destilada por aproximadamente 20 h e em seguida em etanol por mais 2 h. O etanol foi seco à temperatura ambiente e as membranas secas, armazenadas sob vácuo.

Suporte Esférico: de maneira análoga, o polímero foi dissolvido e a solução foi vertida em tubos de ensaio de 10 mm de diâmetro.

Para padronização do processo de evaporação do solvente, placas de vidro e tubos de ensaio, contendo as soluções de polímero, foram acondicionadas em uma cuba saturada de solvente, conectadas à uma linha de ar comprimido (seco e filtrado por um sistema de sílica e lã de vidro) com vazão $0,01 \text{ nm}^3/\text{h}$. O controle da espessura pode ser obtido pela variação da porcentagem em massa da solução polímero-solvente. Os materiais foram acondicionadas num dessecador sob vácuo até o momento da sua utilização.

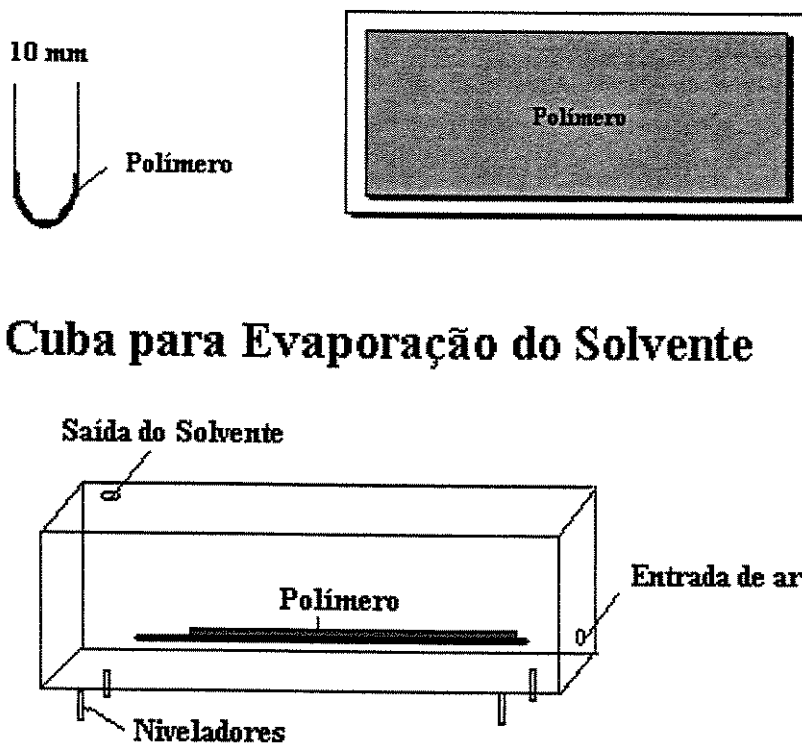


Figura 8 - Dispositivos para preparação das amostras de PLLA e PLGA (Tubo de ensaio, placa e cuba para evaporação do solvente).

2.2 DEGRADAÇÃO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA CELULAR

Após preparação e caracterização inicial, as amostras foram submetidas à degradação *in vitro*. O procedimento realizado para corte e acondicionamento em tubos de ensaio, contendo as amostras, seguiram normas de esterilidade, como uso de solução estéril e manuseio em capela de fluxo laminar.

Inicialmente as amostras foram esterilizadas em álcool 70% (*overnight*) e secas em estufa. Em seguida foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura HAM-F10 (NUTRIENTE), e mantidas a 37 °C. Após períodos de 1, 2, 4, e 8 semanas, o material foi retirado e lavado com água destilada e posteriormente com etanol. O acondicionamento seguiu o procedimento descrito na preparação do material.

2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.3.1 Microscopia Ótica (MO)

A caracterização morfológica do material foi realizada utilizando-se um estereoscópio Stereoscopio Olympus SZ 40 com sistema automático de fotografia.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Analisou-se a superfície superior, inferior e fratura das amostras de PLLA e PLGA utilizando-se microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL JXA 840A. As amostras foram fraturadas em N₂ líquido e recobertas com ouro-paládio com metalizador Sputer Coater BAL-TEC SCD 050 com corrente de 40 mA durante 200s. Em todas as análises a tensão utilizada no equipamento foi 10kV.

2.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Através da técnica de TGA é possível obtermos informações sobre a estabilidade térmica da amostra. As amostras foram aquecidas de 25 °C a 400 °C (na taxa de 10°C.min⁻¹) sob atmosfera de Hélio. Foi possível avaliarmos a temperatura de início da degradação térmica e a temperatura de máxima degradação para as amostras degradadas e não degradadas. Utilizou-se o equipamento STA 409C - NETZSCH - Gerätebau GmbH Thermal Analysis.

2.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A caracterização térmica foi realizada através de dois aquecimentos no intervalo de varredura de 25 a 200 °C (com taxa 10°C.min⁻¹), sob atmosfera de Hélio. Foram avaliados os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão (T_f), variação de entalpia na cristalização (ΔH_c) e variação da entalpia de fusão (ΔH_f). O equipamento utilizado foi o STA 409C da NETZSCH – Gerätebau GmbH Thermal Analysis.

Para o cálculo do grau de cristalinidade das amostras considerou-se a relação descrita por CAM *et al.* (1995):

$$\text{GrauCristalinidade(\%)} = \frac{\Delta H_{\text{fusão}} - \Delta H_{\text{cristalização}}}{\Delta H_{100\%}} \times 100\%$$

onde

ΔH_{fusão} = Entalpia de fusão experimental (J/g);

ΔH_{cristalização} = Entalpia de cristalização experimental (J/g);

ΔH_{100 %} = 93 J.g⁻¹ (*)

*Entalpia de fusão para um polímero teoricamente 100% cristalino (ALI *et al.*, 1993).

2.4 CULTURA DE CÉLULAS

Para a cultura de células utilizou-se osteoblastos de fêmur de camundongo (*Mus musculus*) fornecidas pelo Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.4.1 Adesão Celular

Foram inoculadas $1,0 \times 10^5$ células/mL em meio HAM F-10 (SIGMA) com 10% de SFB (NUTRICELL) sobre as membranas densas e porosas de PLLA e PLGA, previamente esterilizadas em álcool 70% (12h-*overnight*). Após 2 horas de cultivo, as amostras foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol/L, pH = 7,4 a 37°C, fixadas com formol 10%, lavadas novamente em PBS e coradas com cristal violeta 0,05% (em metanol 20%). Após a coloração, as amostras foram lavadas três vezes com PBS, tratadas com citrato de sódio 0,1 mol/L (em etanol 50% a pH 4,2) e analisadas em leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Versão 1.06 em comprimento 540nm. Como controle positivo para o crescimento celular foi utilizado a própria placa de cultura (polipropileno) e como controle negativo membranas de silicone. Foram medidas a absorbância de todos os diferentes substratos (controles positivo e negativo, membranas densas e porosas de PLLA e PLGA) em oito repetições.

2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – (MEV)

A inoculação seguiu o procedimento análogo ao teste de adesão ($1,0 \times 10^5$ células/mL sobre as membranas de PLLA e PLGA). As amostras foram fixadas com paraformaldeído/gluteraldeído (MERCK) 2,5% em solução de tampão fosfato 0.1 mol/L pH 7,4 por 2 horas. Posteriormente foram lavadas com tampão fosfato e fixadas com tetraóxido de ósmio (SIGMA) 1% e desidratadas com etanol. O material foi submetido à secagem no ponto crítico (Balzers CPD030) e metalizado com ouro (Balzers SCD 050). As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico JEOL JSM-5800 LV.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

A primeira caracterização morfológica das amostras de PLLA e PLGA foi realizada por microscopia ótica e nos forneceu dados qualitativos a respeito da morfologia das estruturas obtidas pelo processo de evaporação de solvente. As Figuras (9 a 11) no final deste item, representam um comportamento médio das amostras para tempo zero e após 8 semanas de degradação *in vitro*. A barra de escala, ou o aumento utilizado, estão indicados em cada figura.

A análise das amostras não degradadas dos polímeros bioreabsorvíveis permite diferenciarmos as estruturas de cada material em relação à sua coloração e formato (Figuras 9a, 10a). Membranas densas de PLLA são opacas enquanto membranas densas de PLGA são transparentes. A diferença de transparência entre os materiais densos sugere um arranjo distinto das cadeias poliméricas em cada tipo de material. Segundo MANO (1991) a presença de inclusões, descontinuidade do material ou de regiões cristalinas, promovem o espalhamento da luz, tornando-os opacos.

Membranas porosas dos materiais não apresentam diferenças macroscópicas pelas análises no estereoscópio (Figura 9a, 10a). Ambas são opacas, esbranquiçadas e com superfícies irregulares. A análise por MO não permite observarmos se há ou não resíduos de cristais de sal no interior do material.

Ao analisarmos a morfologia da superfície superior das amostras de membranas densas utilizando-se o microscópio ótico (Figura 11), confirmam-se algumas afirmações anteriores. A fotografia “a” refere-se à amostra da membrana densa de PLGA, apresentando a superfície superior lisa, compacta e transparente. A análise das amostras de PLLA foram dificultadas pela irregularidade da superfície, as imagens obtidas são de baixa resolução devido à diferença de

planos focais na amostra. A fotografia “ a’ “ indica irregularidades na superfície, com a existência de aglomerados esféricos sobrepostos e agrupados em toda a superfície do material.

Após 8 semanas de degradação *in vitro*, as modificações morfológicas foram distintas para os materiais. No período estudado (8 semanas), as estruturas de PLLA não sofreram alterações significativas na sua morfologia inicial (Figura 9a’). As estruturas possuem coloração semelhante à inicial, mantendo os aspectos macroscópicos inalterados, como é possível observamos pelo suporte esférico da Figura 9a’. A microscopia eletrônica de varredura permitirá uma análise mais detalhada das estruturas.

A Figura 10 relaciona as estruturas de PLGA não degradadas (Foto a) e após 8 semanas (Foto a’) de degradação *in vitro*. Os materiais sofrem alterações significativas macroscopicamente: o aspecto da membrana e a curva característica do suporte esférico deixam de existir, adquirindo uma forma coesa e aglomerada, não sendo possível distingui-los pela morfologia. As amostras de membranas porosas também se aglomeram, entretanto permanecem com a coloração esbranquiçada inicial.

No próximo item é apresentado a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que permitirá confirmar e detalhar os aspectos morfológicos das amostras de PLLA e PLGA.

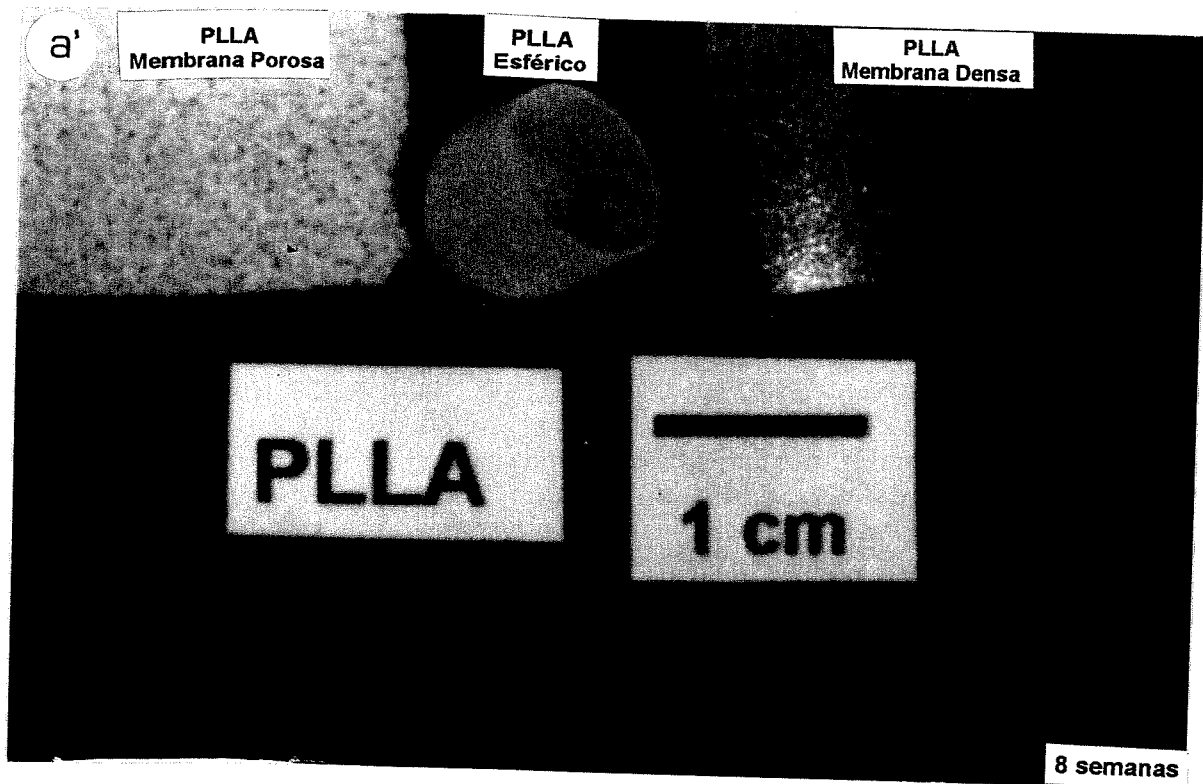
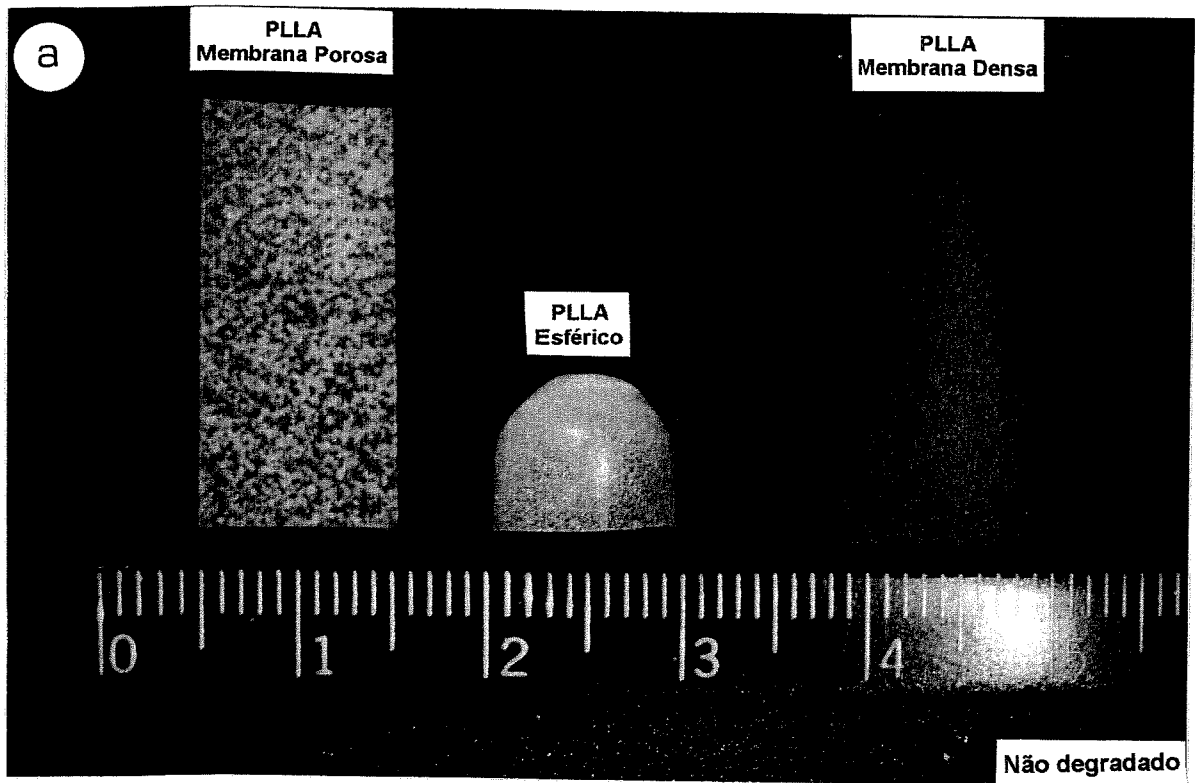


Figura 9 – Microscopia ótica de amostras de PLLA observadas no estereoscópio.
(a = não degradado, a' = 8 semanas de degradação *in vitro*).

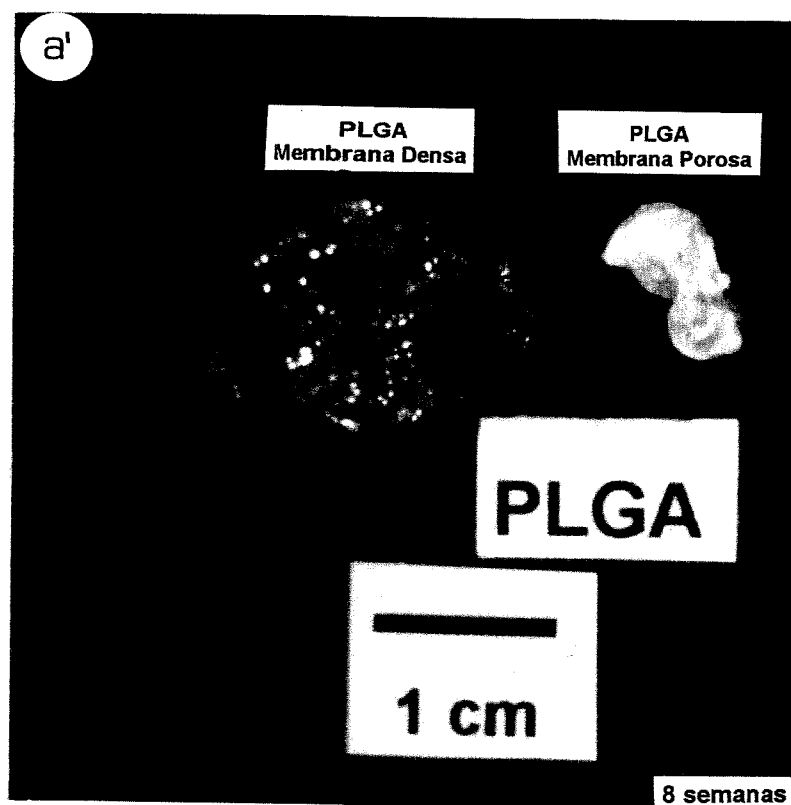
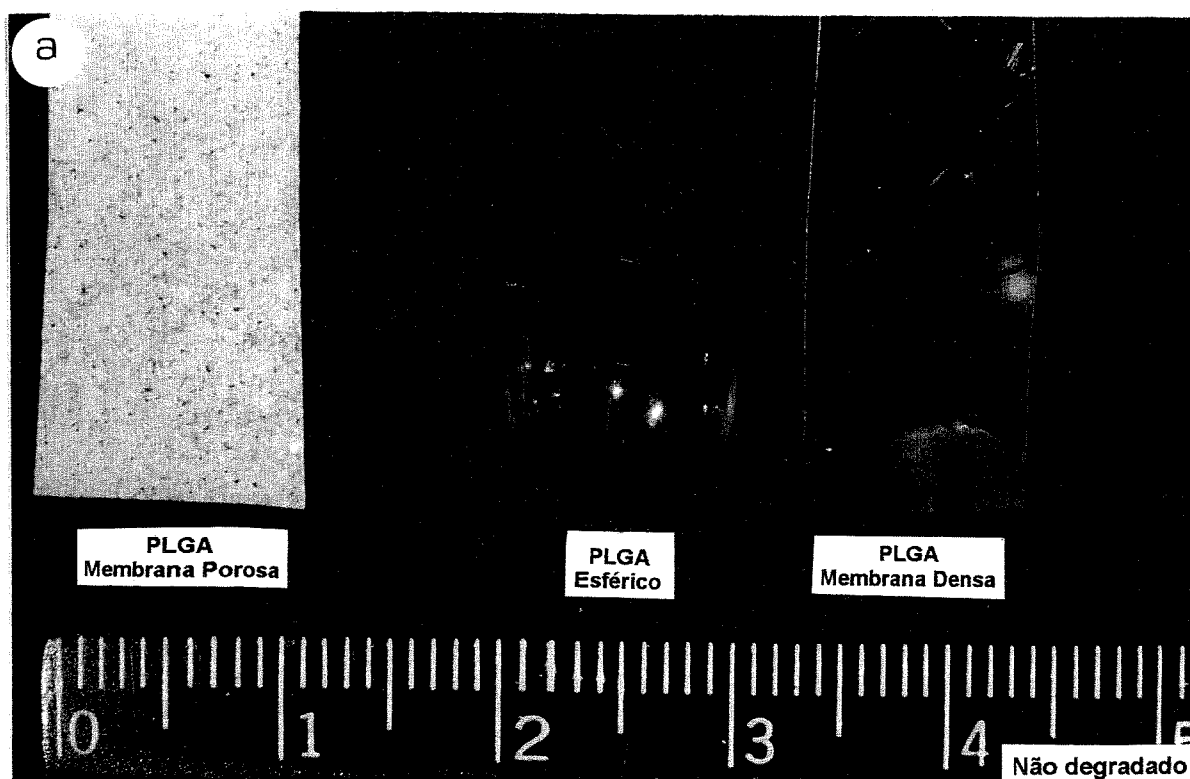


Figura 10 - Microscopia ótica de amostras de PLGA observadas no estereoscópio
(a = não degradado, a' = 8 semanas de degradação *in vitro*).

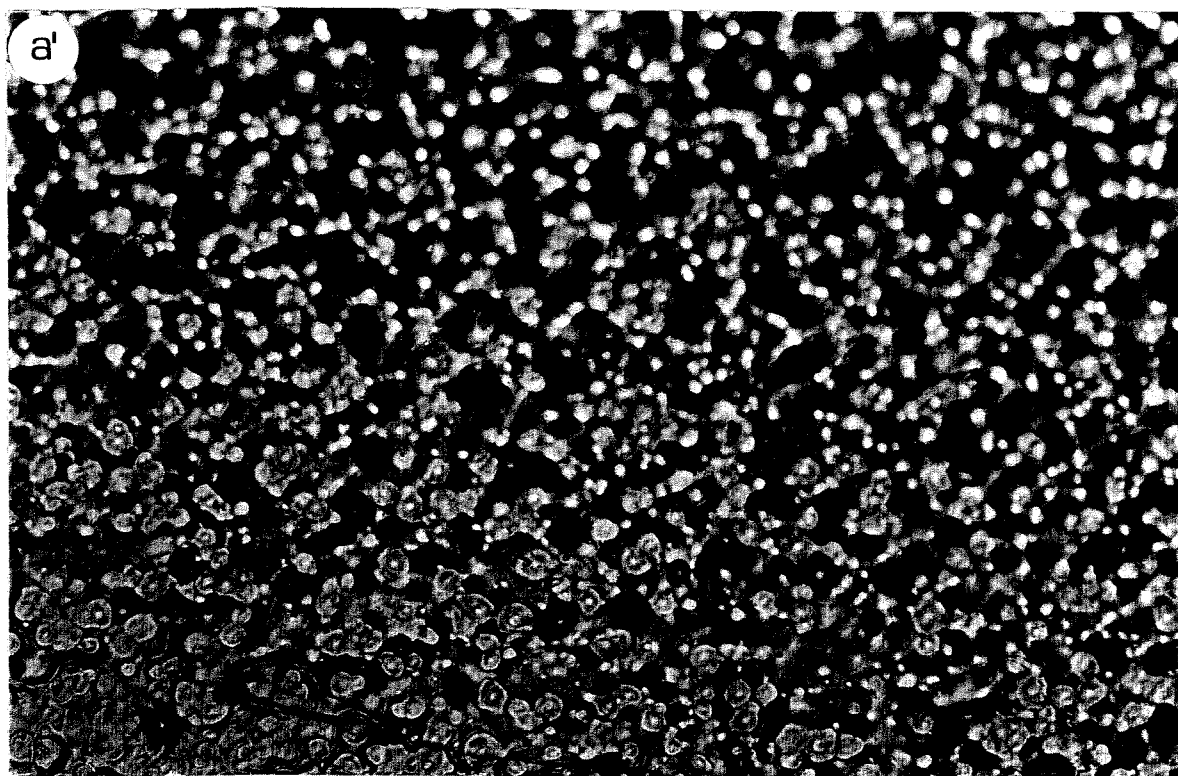
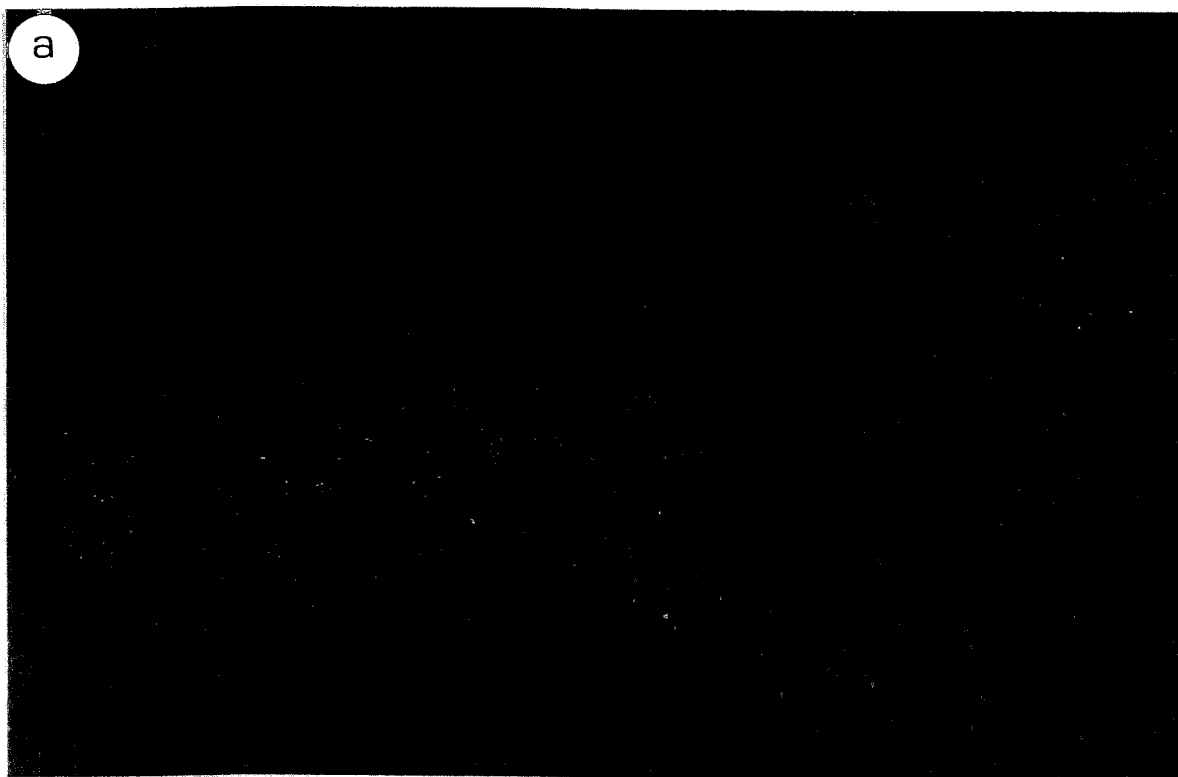


Figura 11 - Microscopia ótica / Superfície superior de amostras de membranas densas observadas no microscópio (a = PLGA, a' = PLLA) (Aumento 150 x)

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Na utilização de materiais poliméricos em aplicações na cultura de células para a Engenharia de Tecidos é fundamental o conhecimento das características de adesão e crescimento de células nas superfícies do polímero. O material utilizado como suporte deve apresentar as seguintes características: ser substrato adesivo, permitir o crescimento celular mantendo as formas e funções celulares, ser biocompatível, poroso, permitindo a penetração do meio de cultura e favorecendo a vascularização e difusão de nutrientes. Materiais hidrofílicos também favorecem o crescimento celular. Nesse sentido, a caracterização morfológica das amostras de polímeros bioreabsorvíveis é fundamental para compreender os fenômenos envolvidos.

Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura observando-se a morfologia das superfícies superior, inferior e da fratura das amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação *in vitro* em meio de cultura HAM-F10.

Os dados apresentados refletem um comportamento médio das estruturas preparadas divulgando-se apenas as que melhor indicaram esse resultado. A barra de escala é apresentada em cada figura e nas legendas são utilizadas as seguintes abreviações:

SS = Superfície Superior

SI = Superfície Inferior

FR = Superfície da Fratura

SInterna = Superfície interna

SExterna = Superfície Externa.

A seguir são apresentadas as figuras contendo as micrografias obtidas pela técnica.

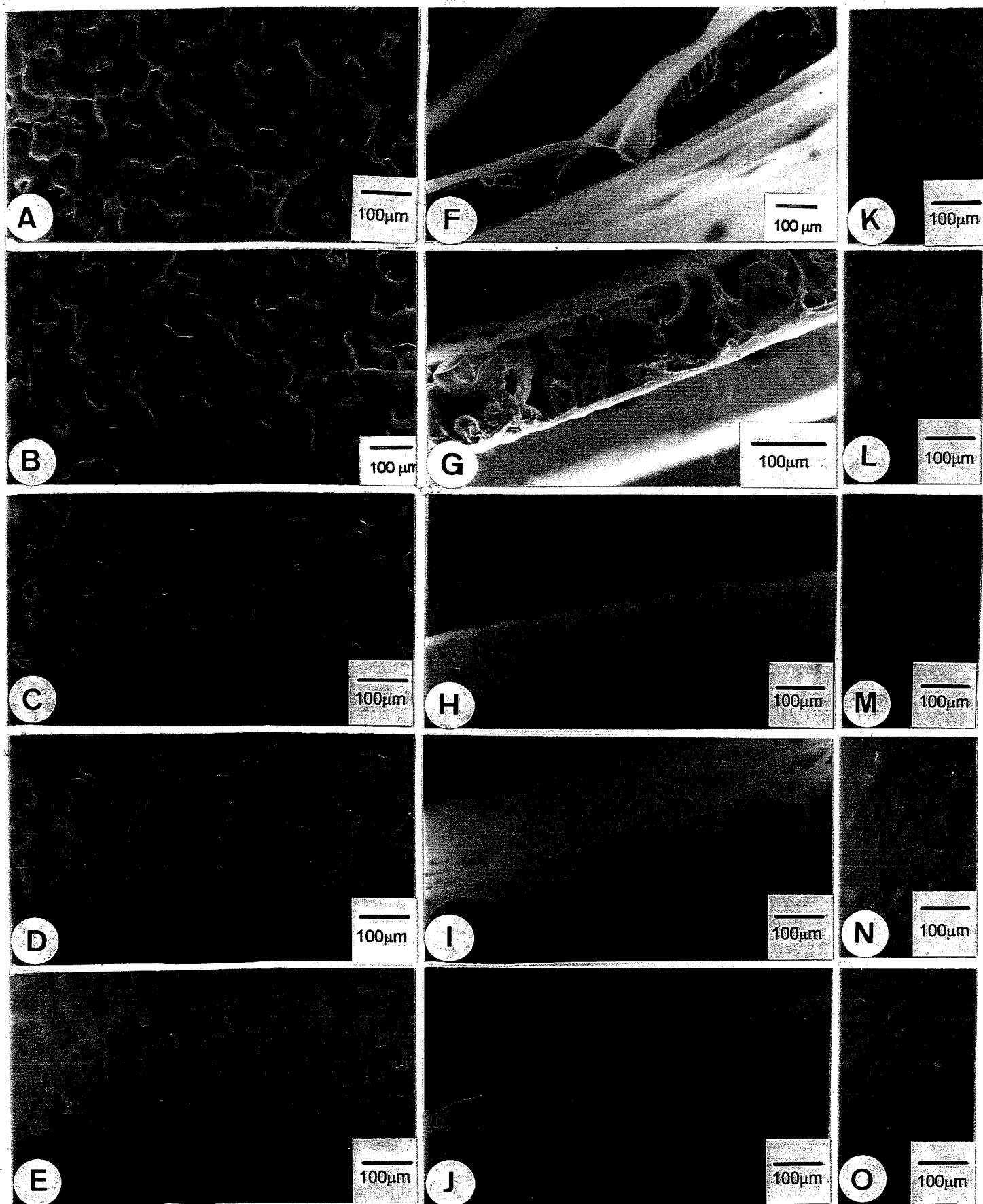


Figura 12 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana densa de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SS ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SI)

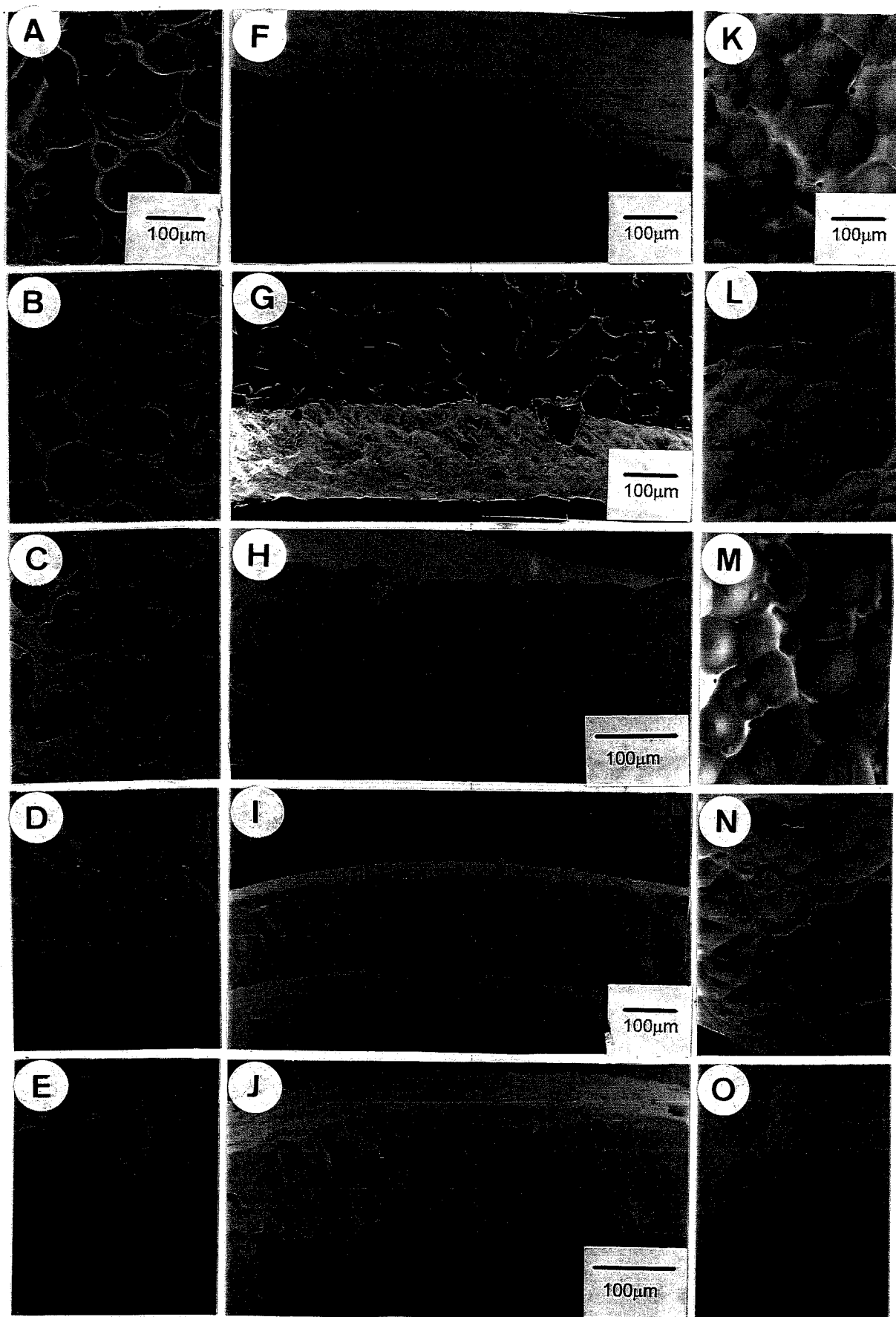


Figura 13 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de estrutura estérica de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SEExternal ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SEInternal).

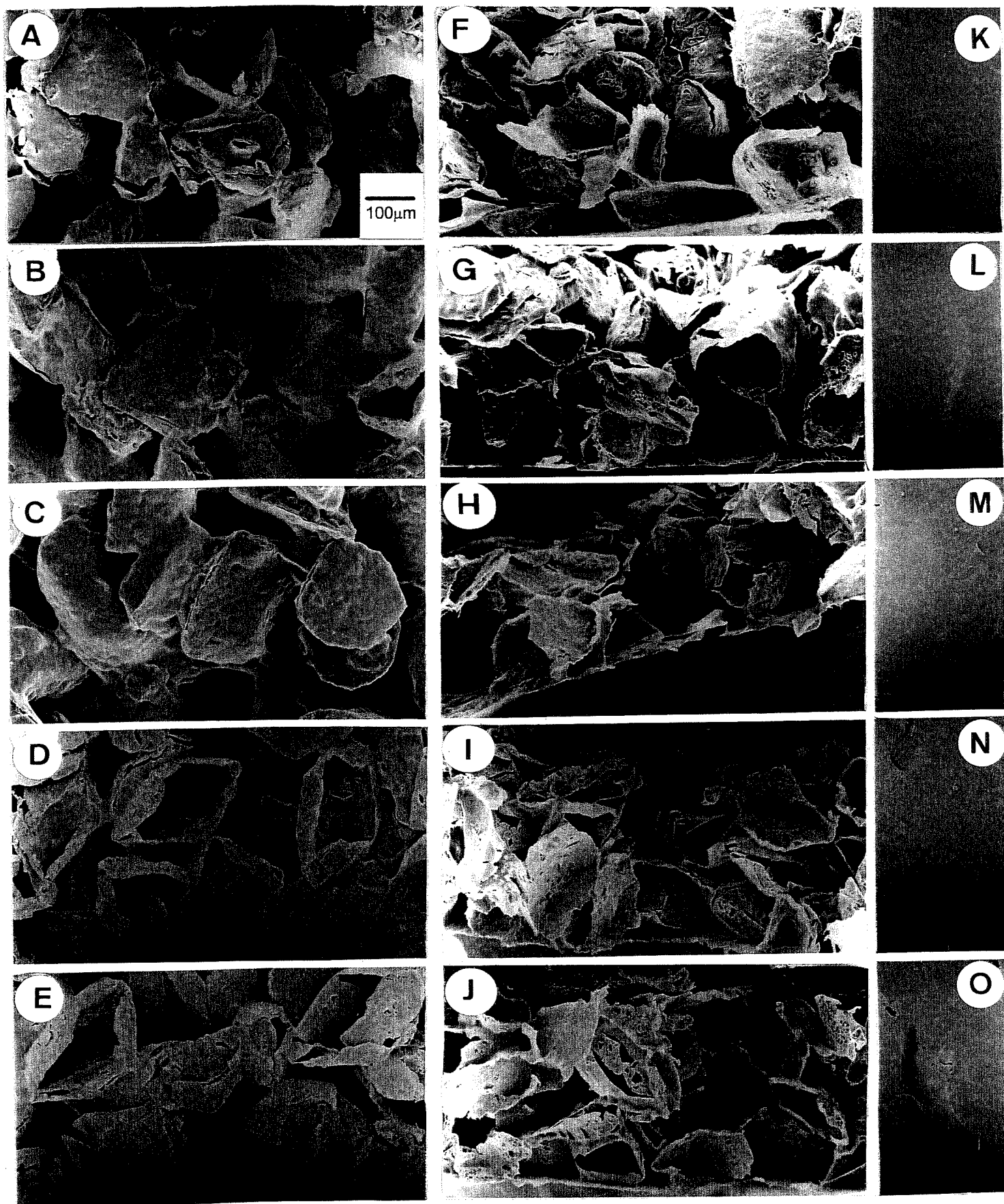


Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos A, F, K = 0 semanas ; B, G, L = 1 semana ; C, H, M = 2 semanas ; D, I, N = 4 semanas ; E, J, O = 8 semanas – A, B, C, D, E = SS ; F, G, H, I, J = FR ; K, L, M, N, O = SI)

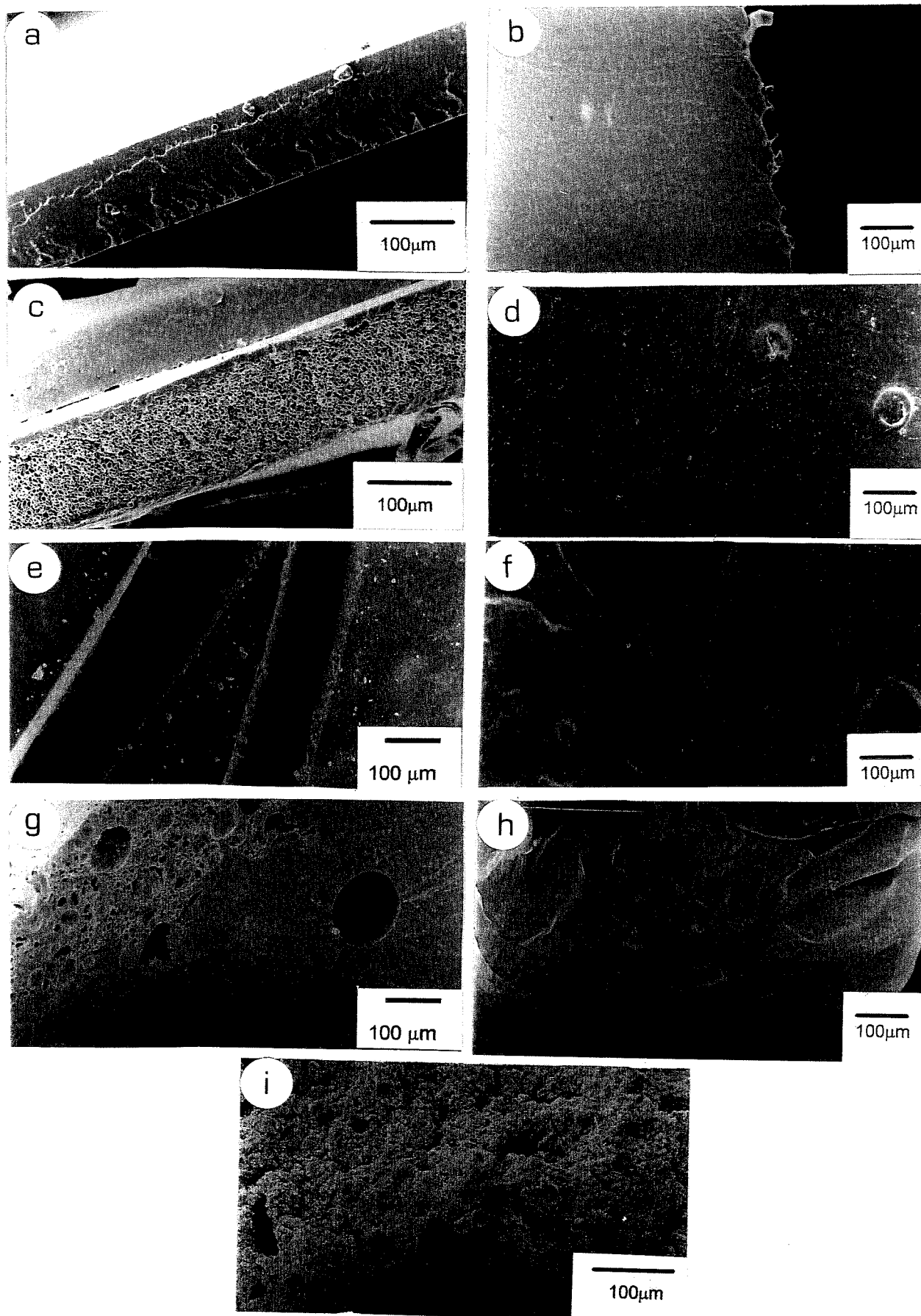


Figura 15 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana densa de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (FR), b = 0 sem. (superfície), c = 1 sem. (FR), d = 1 sem. (superfície), e = 2 sem. (superfície com fratura), f = 2 sem. (superfície), g = 4 sem. (FR), h = 4 sem. (superfície), i = 8 sem.)

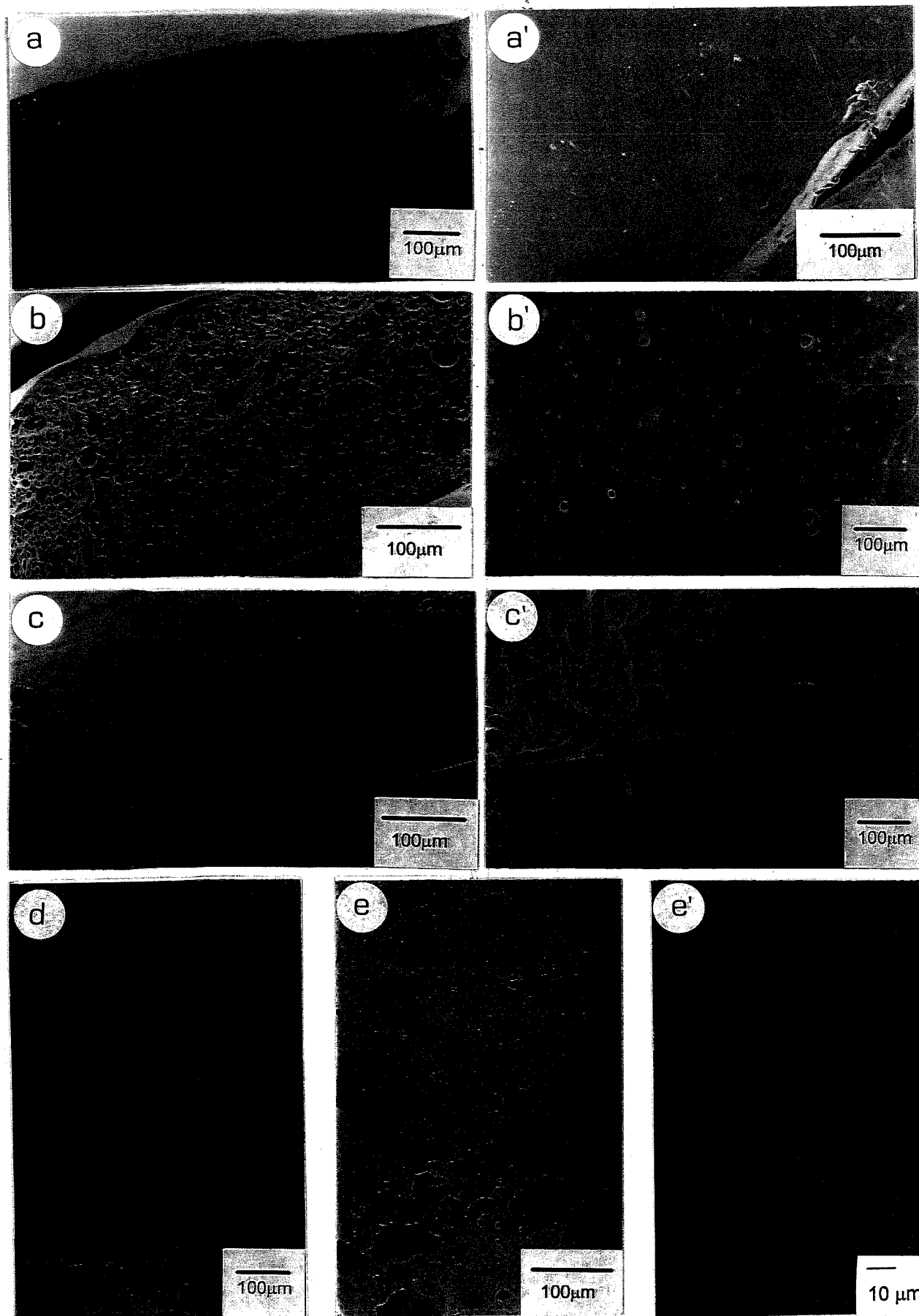


Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de estrutura esférica de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (FR), a' = 0 sem. (superfície), b = 1 sem. (FR), b' = 1 sem. (superfície), c = 2 sem. (FR), c' = 2 sem. (superfície), d = 4 sem. (superfície), e, e' = 8 sem.)

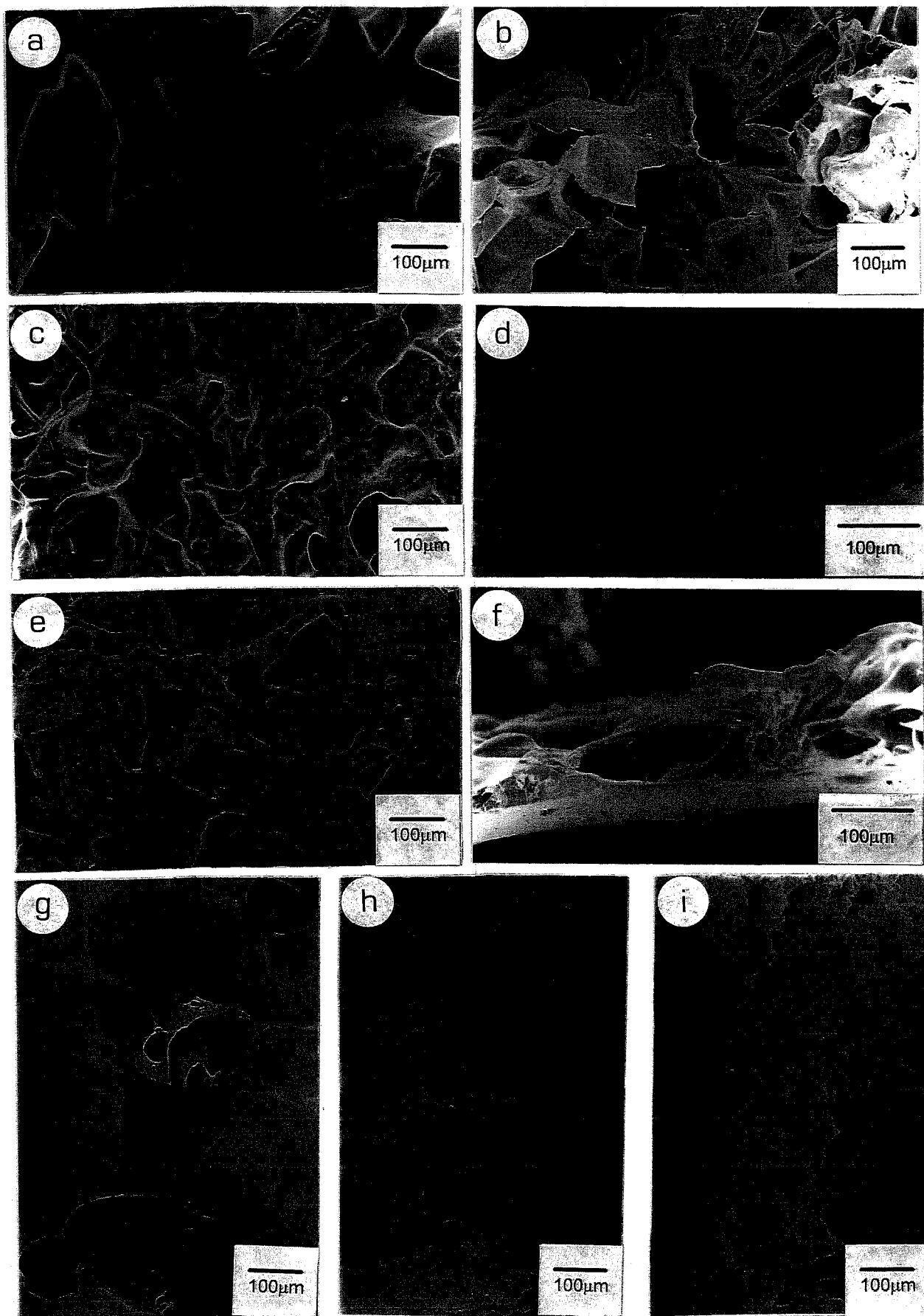


Figura 17 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de membrana porosa de PLGA em função do tempo (semanas) de degradação *in vitro*. (Fotos a = 0 sem. (SS), b = 0 sem. (FR), c = 1 sem. (SS), d = 1 sem. (FR), e = 2 sem. (SS), f = 2 sem. (FR), g = 0 sem. (SI), h = 4 sem., i = 8 sem.)

3.2.1 Poli(L-ácido láctico) (PLLA)

A Figura 12 mostra as micrografias obtidas das amostras de membranas de PLLA, sem a adição de sal. A análise das micrografias para tempo zero de degradação (Figuras 12A, 12F, 12K) indicam um material com estrutura densa. A superfície superior é irregular com pequenas concavidades (Figura 12A), estando o material aglomerado em pequenas regiões que se juntam em toda a sua extensão. A superfície inferior (Figura 12K) é lisa, plana e regular, sem a existência de poros, sugerindo que não há interconecção das superfícies superior e inferior. Esta morfologia do material deve-se ao contato com a placa de vidro durante o processo de evaporação do solvente. A análise da superfície da fratura (Figura 12F) confirma a existência dos aglomerados esféricos que geram concavidades na superfície, entretanto o material é internamente denso e compacto.

Suportes de PLLA com estruturas similares (densos com superfície irregular) foram obtidos por COOMBES¹ *et al.* (1992) pelo processo de evaporação de solvente. Segundo os autores, a morfologia final das estruturas é uma função do processo, das condições de evaporação do solvente, do grau de cristalinidade do material e da solubilidade do polímero no solvente utilizado.

Polímeros semicristalinos apresentam dois tipos fundamentais de formação cristalina: a lamelar, feita pela sobreposição de placas, e a formação esferulítica, caracterizada por glóbulos onde as cadeias estão dispostas radialmente. Experimentalmente, as regiões cristalinas esferulíticas podem ser observadas pela técnica de microscopia ótica com luz polarizada. A literatura (CAM *et al.*, 1995 e TSUJI *et al.*, 2000) descreve que o processo de evaporação do solvente é suficientemente lento para a formação de esferulitos de forma semelhante a observada na micrografia A da Figura 12.

Após serem submetidas ao processo de degradação *in vitro* por 8 semanas, as membranas densas não apresentaram alterações significativas em suas morfologias. A análise das micrografias em função do tempo de degradação indicam que a superfície superior (Figuras 12B, 12C, 12D, 12E) permanece irregular, com aglomerados de material, e a superfície inferior lisa, sem modificações (Figuras 12L, 12M, 12N, 12O). A superfície da fratura das amostras revelam

que o material permanece internamente compacto durante as 8 semanas de imersão no meio de cultura (Figuras 12G, 12H, 12I, 12J). A variação da espessura do material deve-se à região amostrada e não à perda de massa.

Suportes esféricos de PLLA (Figura 13) apresentaram morfologia semelhante às membranas densas (Figura 12). A análise da superfície da fratura para tempo zero de degradação (Figura 13F) indica um material compacto, sem poros no seu interior. A superfície em contato com o vidro é irregular (Figura 13A) sugerindo que o processo de evaporação de solvente ocorreu com o aprisionamento de bolhas de ar entre a solução e a parede do tubo de ensaio. Na superfície de difusão do solvente (superfície interna da amostra), a morfologia é semelhante à superior das membranas densas (Figura 13K). A estrutura formada possui também uma curvatura determinada pelo molde (tubo de ensaio) e a espessura é maior em relação à membrana densa (Tabela 1 adiante).

Durante o processo de degradação não é possível verificarmos alterações significativas em relação à morfologia do seu interior (Figuras 13G, 13H, 13I, 13J), das superfícies internas (Figuras 13L, 13M, 13N, 13O - barra de escala igual a micrografia K) e externas (Figuras 13B, 13C, 13D, 13E - barra de escala igual a micrografia A) em comparação à amostra não degradada.

A Figura 14 mostra as membranas de PLLA confeccionadas com a adição de sal. Para as amostras não degradadas (Figuras 14A, 14F, 14K - a barra de escala é igual a micrografia A para todas as fotos), a morfologia da superfície inferior é semelhante à membrana densa: lisa e compacta devido ao contato da solução do material com a placa de vidro (Figura 14K). A superfície superior (Figura 14A) é irregular, com concavidades geradas pelo encapsulamento das partículas de sal durante o processo de evaporação do solvente, apresentando abertura nos poros que indicam a região de penetração da água no processo de dissociação e retirada do sal adicionado na solução polímero-solvente. A superfície da fratura da amostra reafirma a presença e a interconexão de poros em toda a espessura do material (Figura 14F) verificando-se ainda que é heterogênea quanto ao seu formato e distribuição. O tamanho dos poros (100-200 μ m) e sua distribuição variaram com valores relativos abaixo da granulometria de sal utilizado (180-250 μ m). Pela análise da morfologia não observa-se partículas de sal presentes no material, indicando que o tempo de lavagem foi adequado.

Durante 8 semanas, o processo de degradação não altera a estrutura morfológica dos poros e a sua distribuição. O material permanece com a superfície superior irregular (Figuras 14B, 14C, 14D, 14E), com uma fragilização devido a presença de pontos de erosão na superfície dos poros, no período de 4 e 8 semanas (Figuras 14D, 14E). A superfície da fratura das amostras reafirma a manutenção da morfologia interna irregular e porosa de membranas porosas de PLLA (Figuras 14G, 14H, 14I, 14J). A superfície inferior do material se altera através de um comportamento semelhante ao descrito anteriormente: fragilização com a presença de trincas, e erosão em pontos da superfície (Figuras 14L, 14M, 14N, 14O). O tamanho e a distribuição do tamanho de poros se mantém semelhantes às das amostras não degradadas.

3.2.2 Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

A forma de análise dos resultados de MEV para as amostras de PLGA foi de forma semelhante às de PLLA, observando-se as superfícies do material. Confirmando os dados de microscopia ótica, as estruturas de PLGA são distintas morfológicamente das de PLLA antes e durante o processo de degradação *in vitro*.

A Figura 15 mostra as micrografias obtidas por MEV para as membranas de PLGA confeccionadas sem a adição de sal. Amostras para tempo zero de degradação (Figuras 15a, 15b) confirmam a morfologia observada na MO: as membranas são lisas nas superfícies superior, sem qualquer indício de poros (Figura 15b). A superfície inferior mostrou-se semelhante morfológicamente à superior. A superfície da fratura da amostra (Figura 15a) reafirma a compactação do material, sem poros no interior e com espessura regular, conforme mostra a Tabela 1 posteriormente.

Durante o processo de degradação *in vitro* as amostras de PLGA sofrem mudanças morfológicas significativas, ao contrário das de PLLA. Após 1 semana imerso em meio de cultura HAM F-10 o material apresenta poros no seu interior (Figura 15c), enquanto a morfologia das superfícies superior permanece lisa e regular (Figura 15d). A análise após 2 semanas de degradação é semelhante. A micrografia (e) indica a superfície superior fraturada da amostra, que permanece lisa e compacta (observado pela micrografia “f” também). As alterações quanto ao formato geométrico das amostras de membranas densas de PLGA são significativas a partir da

quarta semana de degradação. O material perde a forma de membrana, aglomerando-se numa estrutura representada pela micrografia “ a’ “ da Figura 10 do item da Microscopia Ótica. A imagem da superfície das amostras mostram uma fragilização do material (Figura 15h). A superfície da fratura (Figura 15g) apresenta regiões distintas: a região periférica possui poros distribuídos homogeneamente, enquanto o centro do material indica uma estrutura densa com poros não interconectados e distribuídos heterogeneamente. Após 8 semanas de degradação (Figura 15i) não é possível identificarmos as superfícies inferior ou superior do material. A superfície é irregular e apresenta pontos de erosão em toda a sua extensão.

As estruturas esféricas formadas através da evaporação do solvente em tubos de ensaio (Figuras 16a, 16a’) apresentaram semelhanças morfológicas em relação às membranas densas não degradadas (Figuras 15a, 15a’). De forma análoga às membranas densas, o suporte esférico é caracterizado inicialmente como um material liso nas superfícies superior e inferior e sem qualquer indício de poros no seu interior, entretanto mais espesso.

Após 1 semana de degradação o material apresenta poros no seu interior (Figura 16b) e superfície lisa (Figura 16b’), semelhante às membranas densas (Figuras 15c, 15d). As micrografias (c, c’) referem-se às amostras após 2 semanas de degradação, no qual pode-se verificar que o material é liso na superfície (Figura 16c’) e poroso no seu interior (Figura 16c). Com 4 semanas de degradação as amostras perdem a morfologia esférica, fragilizando-se (Figura 16d). As micrografias (e, e’) indicam características morfológicas semelhantes às membranas densas para tempos de degradação de 8 semanas (Figura 15i). A estrutura é irregular, com poros (pontos de erosão) e distribuição de tamanhos de poros heterogêneos.

Membranas porosas de PLGA (Figura 17) preparadas com a adição de sal possuem morfologia semelhante às membranas porosas de PLLA para tempo zero de degradação (Figura 14). A amostra possui superfície superior irregular (Figura 17a) com poros interconectados no seu interior (Figura 17b), variando entre 150-250 μm na região amostrada, e demonstram que não há cristais de sal aderidos no interior da amostra. A morfologia da superfície inferior não é uniforme e lisa, apresentando agora regiões de interconecção com o interior do material (Figura 17g).

Comparando-se as membranas porosas de PLLA às amostras de PLGA, verifica-se que as membranas de PLGA modificaram sua morfologia significativamente após 1 semana de degradação *in vitro* (Figura 17c, 17d). A superfície superior das membranas porosas (Figura 17c) permanece irregular, mas com concavidades menores em relação ao tempo zero. A análise da superfície da fratura (Figura 17d) confirma uma diminuição da espessura do material, entretanto com a presença de poros no seu interior. Após duas semanas de degradação a mudança é acentuada. Os poros achatam-se (Figura 17e) e o material sofre uma redução significativa na sua espessura (Figura 17f). Com quatro semanas, o material está fragilizado apresentando fissuras na sua superfície (Figura 18h). No período de 8 semanas a morfologia do material é semelhante as amostras de PLGA para membranas densa e estrutura esférica (micrografia i).

A espessura e a faixa de tamanho de poros das amostras foram avaliados durante a análise de microscopia eletrônica de varredura e as médias dos valores obtidos, com seu respectivo desvio padrão, são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 1 - Tamanho de poros e espessura de amostras para as diferentes estruturas de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Amostra	Tamanho de Poros (μm)		Espessura ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	
	Não degradado	8 semanas	Não Degradado	8 semanas
PLLA-Membrana Densa	-	-	90 ± 20	84 ± 20
PLLA-Suporte Esférico	-	-	105 ± 13	124 ± 30
PLLA-Membrana Porosa	100-200	100-200	375 ± 127	363 ± 144
PLGA-Membrana Densa	-	1-50	69 ± 03	-
PLGA-Suporte Esférico	-	1-50	304 ± 104	-
PLGA-Membrana Porosa	150-250	1-50	502 ± 122	-

Os dados da Tabela 1 refletem um comportamento médio das amostras de PLLA e PLGA. O tamanho dos poros de membranas porosas não degradadas é relativamente diferente entre os materiais. A faixa de granulometria de sal utilizada ($180\text{-}250 \mu\text{m}$) e o tamanho dos poros sugere ser mantida nas membranas de PLGA, entretanto menores nas de PLLA. Após 8 semanas de degradação *in vitro* o tamanho dos poros das amostras de PLGA diminuem significativamente, devido ao achatamento, enquanto os poros das amostras de PLLA mantém sua faixa inicial.

A espessura das amostras apresentou variações em função da região amostrada. Levando-se em consideração os respectivos desvios padrão, não é possível afirmarmos que existam diferenças significativas entre as amostras de membranas porosas e suporte esférico antes da degradação. Após o período de 8 semanas, a espessura das estruturas de PLLA se mantém e as de PLGA não mais possíveis de se determinar, devido às alterações morfológicas do material.

As micrografias obtidas por MEV demonstram uma nítida diferença entre a morfologia dos materiais (PLLA e PLGA) durante o processo de degradação *in vitro*. Enquanto membranas de PLLA mantêm sua estrutura densa ou porosa durante as 8 semanas imersas em meio de cultura, as estruturas de PLGA modificam-se e, após 8 semanas, são semelhantes entre si, com aparente intensa degradação.

A diferença na velocidade de degradação é inicialmente atribuído ao tipo de material e suas propriedades. Hopolímeros de ácido láctico são descritos na literatura como materiais semicristalinos (que será confirmado pelo dados de DSC deste trabalho) enquanto copolímeros aleatórios de ácido láctico / ácido glicólico são materiais amorfos. A diferença de compactação das cadeias poliméricas interfere diretamente na taxa de absorção de água pelos materiais, e consequentemente, na hidrólise e degradação do polímero. A literatura descreve que estruturas tridimensionais de PLGA degradam numa velocidade maior em relação às de PLLA (VERT *et al.*, 1994).

Quando os materiais são comparados isoladamente, e relacionando-se a morfologia inicial das estruturas tridimensionais (porosas ou densas) com o processo de degradação, observa-se que as amostras de PLLA não sofrem mudanças significativas. A alteração morfológica de estruturas densas de PLLA dependem das condições do meio utilizado (NaOH, tampão fosfato etc) e do formato das amostras (tamanho e espessura). É difícil a comparação do processo de degradação *in vitro* em meio de cultura celular com a literatura, pois os estudos são feitos com soluções que simulam as condições do meio, como o tampão fosfato.

Estudos com tempos de duração maiores indicam uma degradação por etapas e de forma heterogênea (LI, 1999). Conforme descrito no capítulo 1, a hidrólise é preferencial nas regiões amorfas e intensificada pela concentração dos produtos ácidos de degradação no seu interior.

Assim, para tempos maiores de degradação, é previsível que os glóbulos do material sejam evidenciados e que apresentem degradação na sua região central. Diversos estudos de degradação foram conduzidos nos últimos anos e em todos os experimentos o efeito autocatalítico do PLA é observado (CAM *et al.* 1995, BARBANTI *et al.*, 2000, LU¹ *et al.*, 2000).

A comparação entre estruturas densas e porosas de PLGA exemplificam a diferenciação descrita anteriormente. Amostras de estrutura esférica e de membrana densa apresentaram após 1 semana de imersão, degradação no interior, estando a superfície superior e inferior preservada. Quanto maior a área de difusão dos produtos de degradação, menor o efeito da concentração dos produtos ácidos. Dessa forma, na superfície de materiais densos o processo erosivo é menor. Membranas porosas possuem uma área superficial de exposição aos fluidos maior e não demonstram a degradação interna para o período de 2 semanas. Entretanto, os poros são gradativamente achatados tornando a membrana porosa semelhante morfologicamente às membranas densas e ao suporte esférico para o período de 8 semanas de degradação *in vitro*.

Matrizes porosas são materiais preferenciais na Engenharia de Tecidos (WINTERMANTEL *et al.*, 1996). A distribuição da uniformidade e interconecção dos poros na estrutura porosa é importante, pois facilita a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada. Segundo MIKOS *et al.* (1993) a taxa de penetração e crescimento celular em estruturas porosas de polímeros bioreabsorvíveis está diretamente relacionado com a porosidade e o tamanho dos poros no material.

O processo de obtenção de membranas por *casting* na presença de sal com granulometria controlada é um dos métodos adequados quando se deseja tamanho de poros maiores que 40 μm (HUTMACHER, 2000). Como descrito, a taxa de degradação e crescimento celular sob polímeros bioreabsorvíveis é influenciada pela morfologia do material. Porosidade geralmente facilita o ingresso de fluido através do material, expondo uma larga área superficial às cisões das cadeias por hidrólise. Essas características são importantes para aplicações como liberação controlada de medicamentos e materiais biofuncionais, as quais são funções do tamanho e densidade de poros.

Nesse sentido, o controle da morfologia dos poros pelo método de preparação, e a sua manutenção durante a degradação, são fundamentais na utilização de membranas como suporte para a cultura de células. Poros obtidos através da técnica de adição de sal e subsequente evaporação do solvente, podem ser controlados no formato através da sua composição química (estrutura cristalográfica), no tamanho pela granulometria do sal e na porosidade através quantidade de sal adicionada.

LU¹ *et al.* (2000) avaliaram membranas porosas de PLLA, obtidas pelo processo de evaporação do solvente com adição de sal, durante 46 semanas imersas em tampão fosfato (pH=7,4 – 37 °C). Os autores concluem que a variação do tamanho dos poros não tem influência no processo de degradação, mas quanto menor a espessura da parede do poro maior a perda de massa no período avaliado. O efeito autocatalítico é observado em materiais com maior espessura da parede dos poros.

O formato do suporte polimérico é outra variável importante na cultura de células. Segundo BRITT *et al.* (1998) o estudo da interação entre a morfologia e a taxa de crescimento de células mostra que a maior proliferação celular se dá no centro das amostras e decresce com as proximidades das bordas. Em reproduções anatômicas, a influência da morfologia, e consequentemente crescimento e funcionalidade celular, é um dos desafios atuais da Engenharia de Tecidos.

Como conclusão preliminar dos dados apresentados pode-se afirmar que as estruturas de PLLA são indicadas como suporte físico / estrutural no período de 8 semanas, pois não sofre alterações significativas na sua morfologia. As estruturas de PLGA demonstraram que a morfologia se altera, sendo mais acentuada nas amostras densas nas duas primeiras semanas, e semelhante para períodos maiores que 4 semanas. Ambos os materiais não apresentaram diferenças significativas entre as estruturas densas e os suportes esféricos quando comparados morfolologicamente.

3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica forneceu dados relativos a estabilidade térmica dos materiais durante o processo de degradação, avaliados pela temperatura de início de degradação térmica (T_i) e a temperatura na qual a perda de massa é máxima ($T_{máx}$). A seguir são apresentados os dados obtidos à partir dos termogramas da análise termogravimétrica para as amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação *in vitro* em meio de cultura.

Tabela 2 - Temperatura de início de degradação térmica para amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Tempo	T_i (°C)				
	0	1	2	4	8
PLLA – Membrana Densa	341	347	349	346	350
PLLA – Suporte Esférico	339	331	319	328	345
PLLA – Membrana Porosa	348	321	350	338	348
PLGA - Membrana Densa	322	302	311	290	281
PLGA - Suporte Esférico	323	308	315	298	287
PLGA - Membrana Porosa	328	309	311	283	282

Tabela 3 - Temperatura de máxima degradação térmica para amostras de PLA e PLGA em função do tempo de degradação.

Tempo	$T_{máx}$ (°C)				
	0	1	2	4	8
PLLA – Membrana Densa	365	369	370	370	372
PLLA – Suporte Esférico	363	356	345	365	369
PLLA – Membrana Porosa	369	347	371	352	371
PLGA - Membrana Densa	356	328	342	344	340
PLGA - Suporte Esférico	357	330	347	335	331
PLGA - Membrana Porosa	359	340	350	350	347

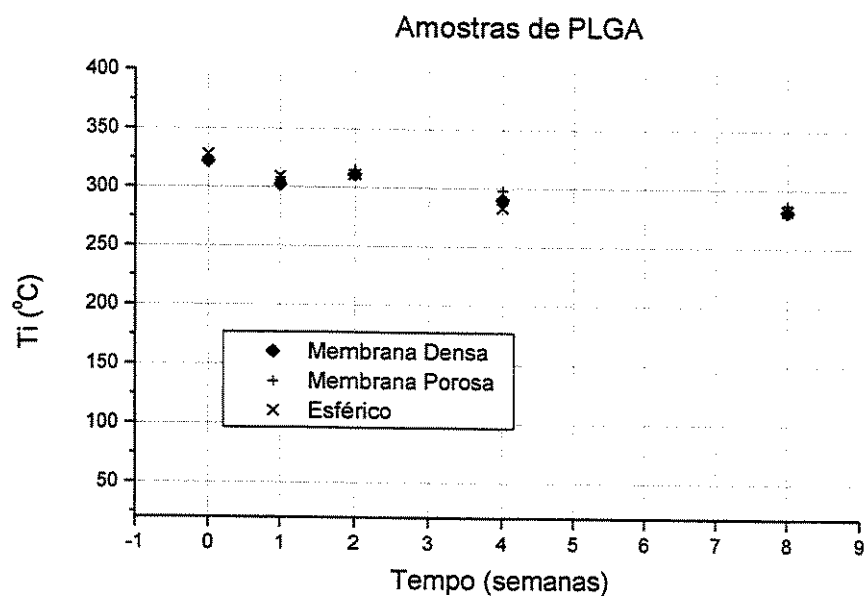


Figura 18 - Gráfico da temperatura de início de degradação térmica (T_i) em função do tempo de degradação *in vitro* para amostras de PLGA.

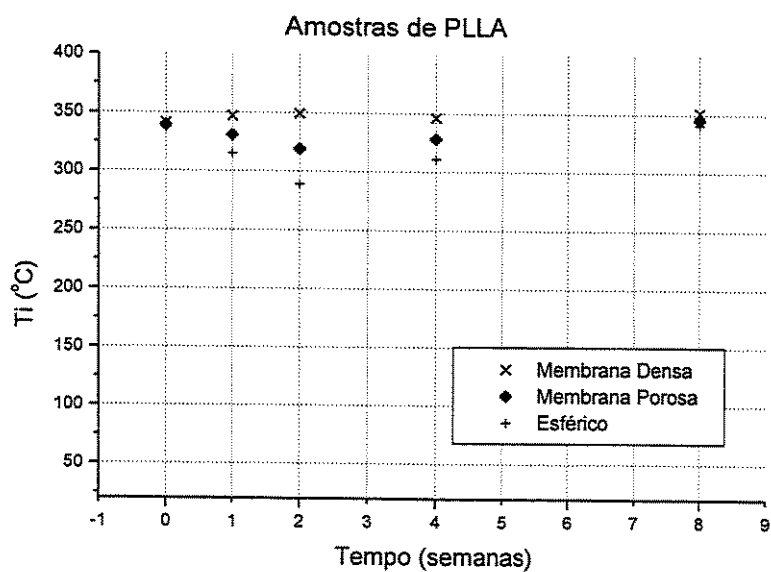


Figura 19 - Gráfico da temperatura de início de degradação térmica (T_i) em função do tempo de degradação *in vitro* para amostras de PLLA.

Comparando-se os dados apresentados na Tabela 2 e 3 para amostras de PLLA e PLGA separadamente, pode-se verificar que as amostras não degradadas apresentam diferenças em relação à temperatura de início de degradação. Os valores da Tabela 2 mostram que as amostras de PLLA iniciam a degradação térmica no intervalo de 339-348 °C, indicando serem mais estáveis termicamente que as de PLGA, que apresentaram início de degradação no intervalo 322-328 °C. Quando comparados em relação à um mesmo material polimérico, as amostras não degradadas não apresentaram diferenças significativas em relação à temperatura de início de degradação considerando as diferentes estruturas do material.

Durante o período de degradação *in vitro* em meio de cultura, as amostras de PLLA e PLGA demonstraram um comportamento distinto entre si. A análise das Figuras 18 e 19 e da Tabela 2, no intervalo de 0 a 8 semanas, sugere uma diminuição da estabilidade térmica para as estruturas de PLGA, e um aumento para o PLLA. Não há diferenças significativas entre os tipos de estruturas durante o processo de degradação.

Os dados apresentados não são conclusivos sobre a variação da estabilidade térmica em relação à degradação dos polímeros PLLA e PLGA. São necessários estudos com períodos maiores de imersão. A diferença térmica entre os materiais, através da técnica de TGA, foi avaliada por PENCO *et al.* (2000) em estudo envolvendo homopolímeros de ácido láctico, copolímero PLGA(50:50) e poli(ϵ -caprolactona). Segundo o autor, a diferença quantitativa das temperaturas de início de degradação estão diretamente relacionadas com a composição das unidades formadoras da cadeia polimérica: quanto maior a composição de unidades de ácido láctico, maior é a estabilidade térmica do material.

A variação descrita anteriormente relaciona-se diretamente com o processo de hidrólise do material e a cristalinidade das amostras. De uma maneira geral, para um mesmo material, quanto menor a cadeia do polímero, menor a estabilidade térmica. Comparando-se os domínios amorfos com os cristalinos, estes possuem maior estabilidade devido a proximidade e interação das cadeias poliméricas.

A diminuição da temperatura de início de degradação térmica das estruturas de PLGA (Figura 18) podem ser atribuídas à hidrólise e diminuição da massa molar, apesar de serem

verificados domínios cristalinos para o tempo de 8 semanas, conforme a análise posterior de DSC. A quantificação dos domínios cristalinos e a influência deles no conjunto das análises térmicas não foram avaliadas neste trabalho, mas sugerem que não são significativas na estabilidade térmica do material segundo os dados de TGA. A variação da temperatura na qual a degradação térmica é máxima (Tabela 3) apresentou qualitativamente o mesmo comportamento que a temperatura de início de degradação (Tabela 2).

A análise das amostras de PLLA é feita de modo análogo: a degradação inicial e preferencial nas regiões amorfas gera um aumento percentual relativo na cristalinidade e consequentemente um aumento estabilidade térmica (Figura 19). A partir dos dados de TGA não é possível avaliarmos se o aumento da cristalinidade é devido à degradação da parte amorfa e aumento relativo das regiões cristalinas, ou se há a formação de novos cristais a partir de cadeias de massas molares menor. Para esta avaliação utilizou-se a técnica de DSC, útil para quantificar o processo de fusão e cristalização dos materiais.

Em se tratando de aplicações em cultura de células, a degradação térmica em materiais bioreabsorvíveis é considerada como parâmetro de influência no processamento do material. O processo de bioreabsorção é feito na temperatura corpórea e nunca atinge os limites de degradação.

No processamento das amostras por calor (injeção por fusão, extrusão etc) a decomposição térmica interfere na composição química do material e consequentemente na biocompatibilidade e biofuncionalidade dos implantes. DUEK *et al.* (1999) avaliaram pinos bioreabsorvíveis de PLLA em processos de degradação *in vitro* e *in vivo* preparados pelo processo de injeção de material fundido. Neste caso, a avaliação das temperaturas de degradação e estabilidade térmica são fundamentais para que o material não seja degradado durante a moldagem, pois podem produzir subprodutos que propiciem reações inflamatórias ao organismo, ou alterar as características de biofuncionalidade do material.

Apesar da estabilidade térmica ser um parâmetro de influência no estudo do processamento dos materiais bioreabsorvíveis, é possível analisarmos os dados sob o aspecto da degradação do material. Embora útil, foi necessário quantificar o processo de degradação *in vitro* através da

análise de DSC, técnica mais sensível e que avalia outros parâmetros pertinentes ao trabalho, conforme exposto a seguir.

3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial é uma técnica útil para a quantificação de propriedades térmicas dos materiais. Usualmente, a técnica permite acompanhar transições associadas aos processos exotérmicos e endotérmicos, como a entalpia de fusão, cristalização e vaporização, como também a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de fusão (T_f). Aplicadas aos polímeros, a técnica pode também determinar o grau de cristalinidade do material, influência de aditivos, reações de polimerização e degradação oxidativa ou térmica (MACHADO, 1999).

Foram avaliados valores de temperatura de transição vítrea, de cristalização, fusão e as variações de entalpia de cristalização e fusão para amostras de PLLA e PLGA durante o processo de degradação *in vitro* em meio de cultura HAM-F10 nos tempos 0, 1, 2, 4 e 8 semanas.

Os termogramas obtidos para as amostras de PLLA, não degradadas e degradadas, são característicos de um polímero semicristalino, mostrando picos de fusão, temperatura de transição vítrea e pico de cristalização, sendo que o pico de cristalização aparece no segundo aquecimento, em função das condições de resfriamento das amostras (Figuras 20-27).

Por outro lado, os termogramas referentes às amostras de PLGA são típicos de um material amorfo, identificado pela temperatura de transição vítrea, tanto no primeiro como no segundo aquecimento. Dependendo do material, a medida que ocorre a degradação, picos de fusão e cristalização surgem em função do rearranjo das cadeias mais curtas, gerando regiões cristalinas no material (Figuras 28-31).

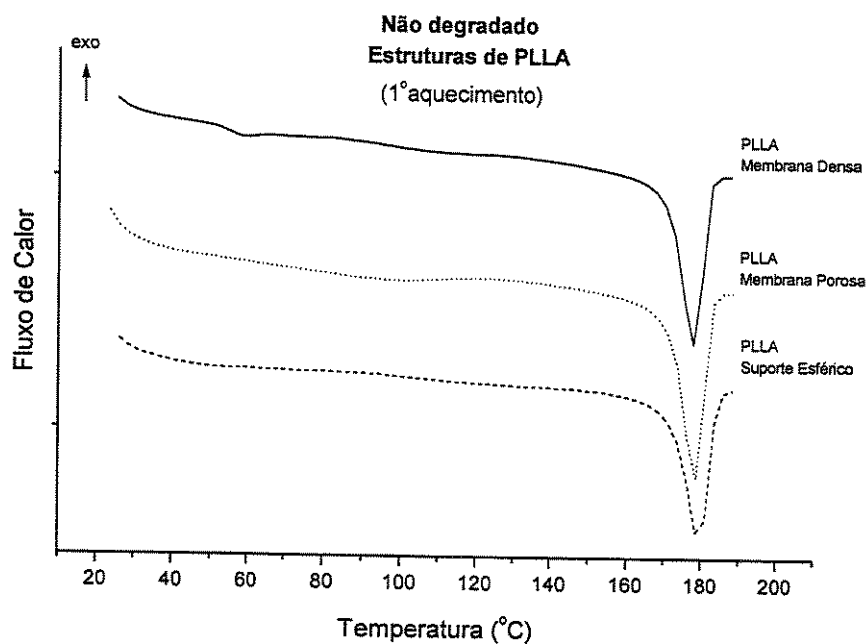


Figura 20 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de PLLA.

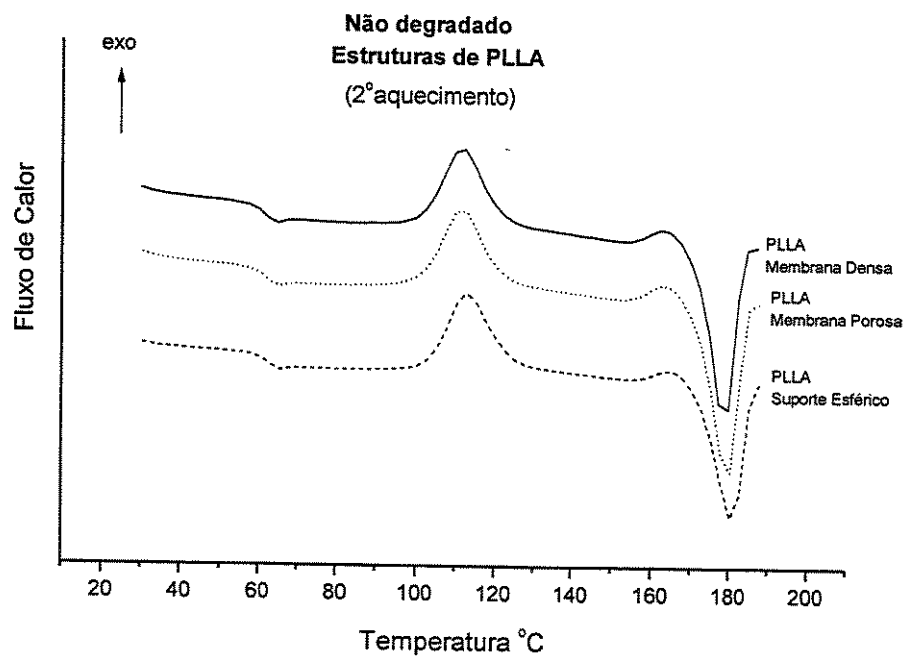


Figura 21 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de PLLA.

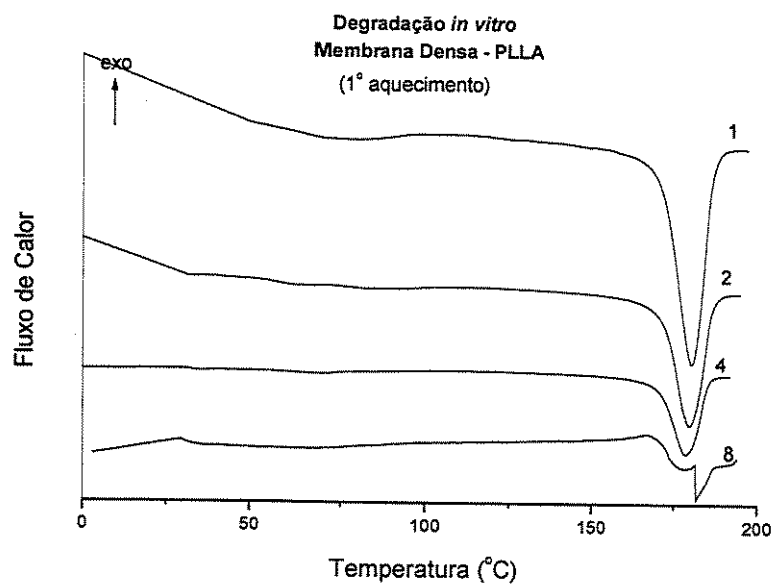


Figura 22 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de membranas densas de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

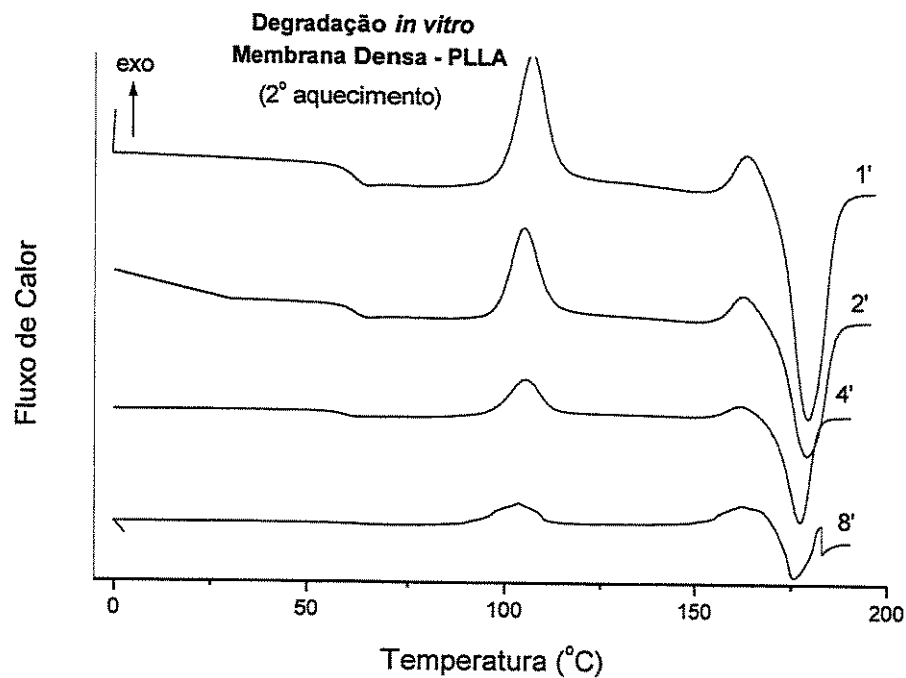


Figura 23 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membranas densas de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

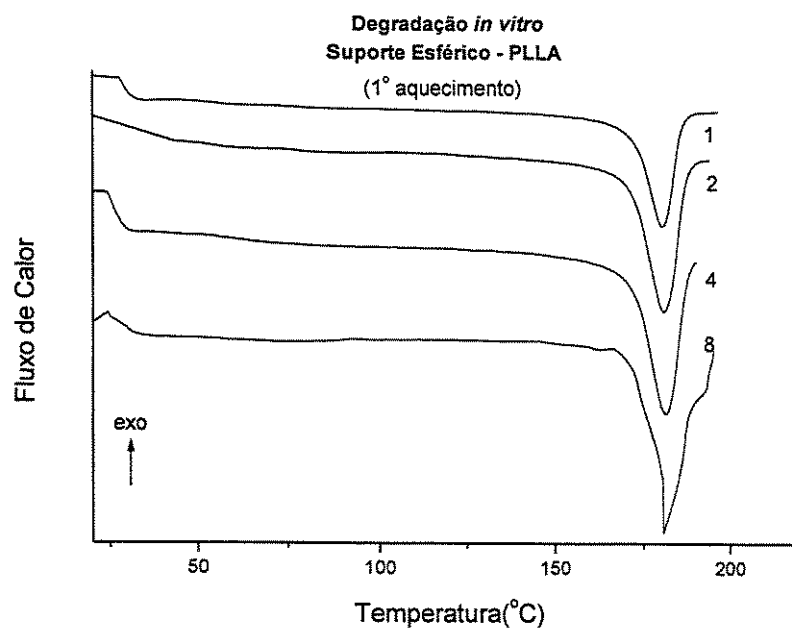


Figura 24 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

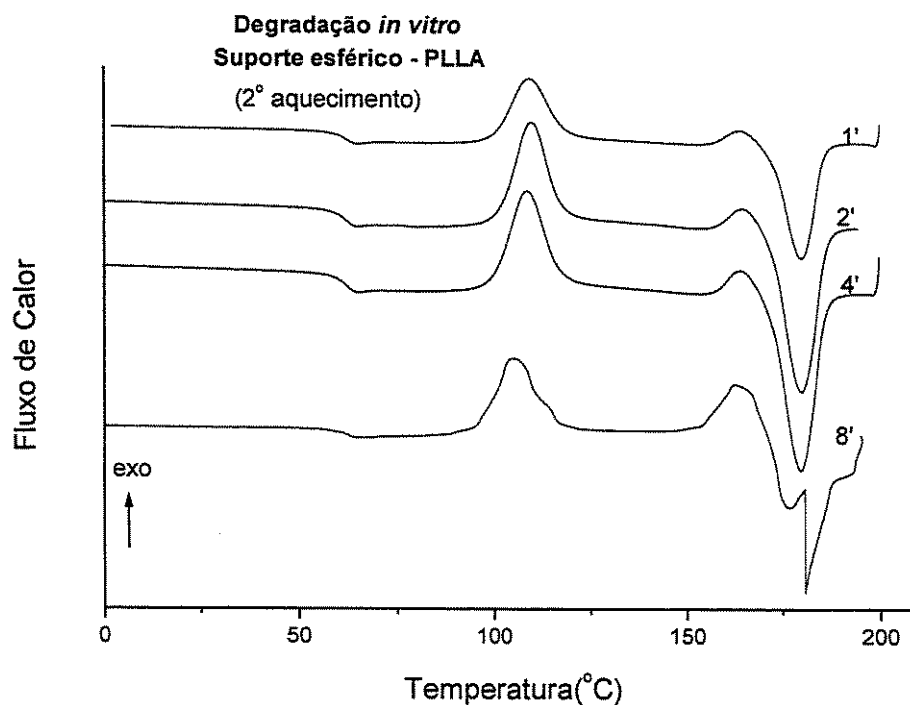


Figura 25 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

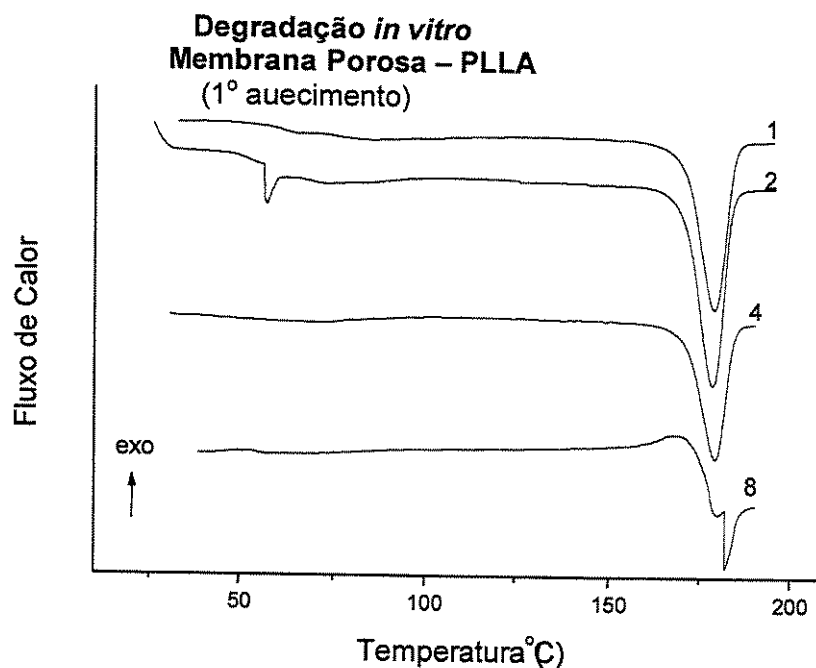


Figura 26 - Termogramas de DSC (1º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo de degradação (1, 2, 4, 8 = tempo em semanas).

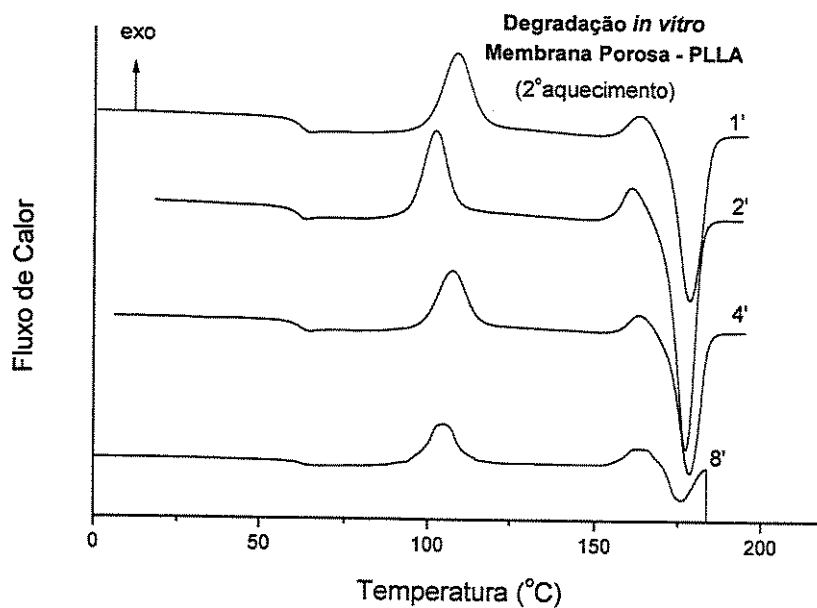


Figura 27 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLLA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

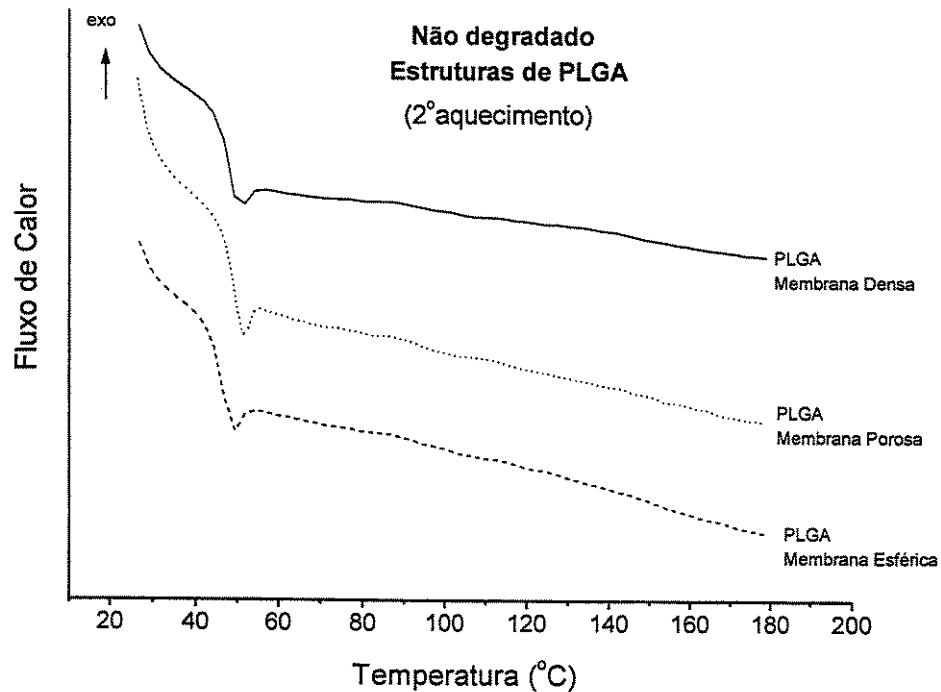


Figura 28 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de PLGA.

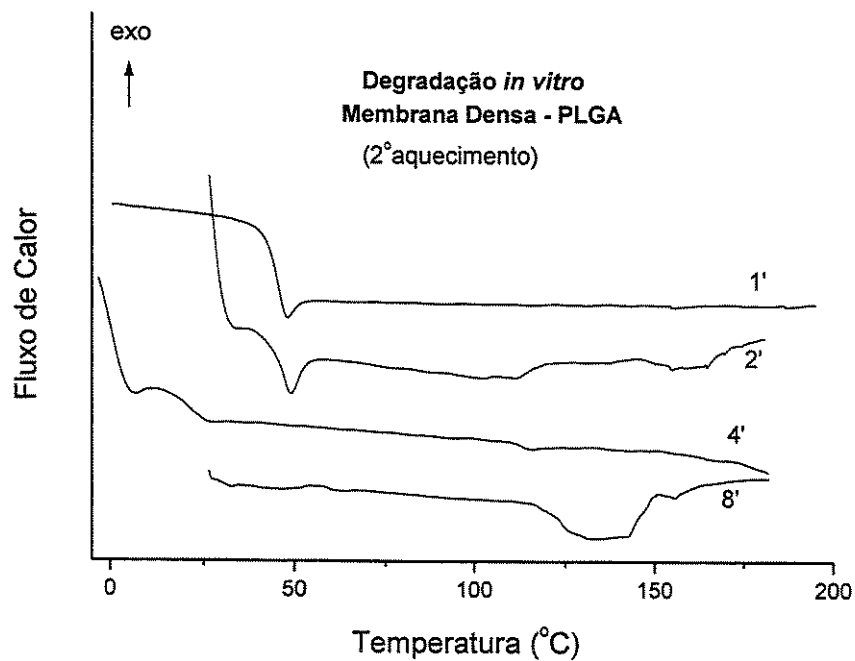


Figura 29 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana densa de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

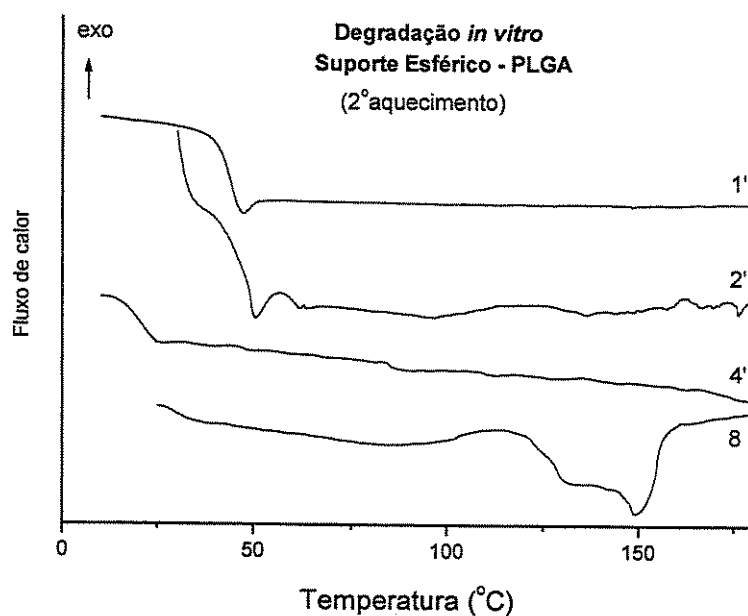


Figura 30 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de suporte esférico de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

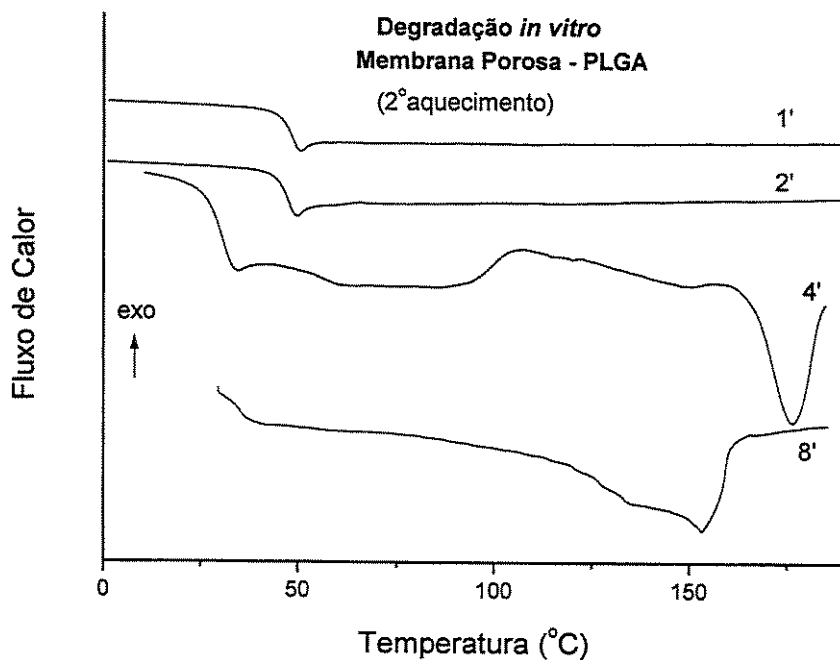


Figura 31 - Termogramas de DSC (2º aquecimento) para amostras de membrana porosa de PLGA em função do tempo de degradação (1', 2', 4', 8' = tempo em semanas).

Os dados de Tg, Tc e Tf, para amostras não degradadas, confirmam os citados pela literatura. A Tg de amostras de PLLA variam, segundo MIDDLETON *et al.* (2000) entre 60-65°C, Tc (obtidas no segundo aquecimento) em torno de 100 °C e Tf entre 173-181 °C (LI *et al.*, 1990). Para as estruturas preparadas a partir de PLGA, BENDIX (1998) caracteriza o material com Tg variando entre 40-50°C e, sendo o material amorfo, é também caracterizado pela ausência de picos de fusão.

Durante o processo de degradação *in vitro*, amostras de PLLA não mostraram modificações significativas em relação à Tg e Tf. Os valores oscilaram entre 60-63 °C para Tg e 178-181 para Tf, conforme mostrado na Tabela 4 adiante. Estudos de degradação *in vitro* de filmes de PLLA, em tampão fosfato (pH=7,4 - 37 °C) com longa duração (36 meses), demonstraram que a temperatura de fusão e de transição vítrea variam inversamente proporcional ao tempo de degradação, iniciando a queda após 12 meses de ensaio (TSUJI *et al.*, 2000).

O pico de cristalização presente somente no segundo aquecimento, sugere que a taxa de resfriamento do material (10 °C/min), após o primeiro aquecimento, foi rápida o suficiente para permitir a lenta nucleação e conseqüente formação de cristais do material. Pela Tabela 4 podemos observar que durante o processo de degradação que há uma tendência à diminuição de Tc. A diminuição tem sido atribuída, pela literatura, ao efeito de relaxação das cadeias do polímero. De uma maneira geral, cadeias poliméricas de menor massa molar requerem uma menor energia de cristalização. Dessa forma, a variação de Tc deve-se à degradação do material, pois gera cadeias de menor massa molar, necessitando de menor energia de cristalização para a formação de novos cristais (DUEK *et al.*, 1999).

Amostras de PLGA apresentaram decaimento na temperatura de transição vítrea a partir da segunda semana submetidas à degradação. Não se verifica diferença na variação dos valores de Tg comparando-se as diferentes estruturas de PLGA. A literatura tem atribuído à diminuição devido ao efeito plastificante da água, absorvida durante o processo de degradação (LI² *et al.*, 1990).

Por outro lado, durante a degradação das estruturas de PLGA verifica-se o aparecimento de um pico de fusão. Inicialmente, as estruturas preparadas são caracterizadas como materiais

amorfo, entretanto após 8 semanas de degradação *in vitro*, observa-se (Tabela 4) que o material possui regiões cristalinas, representadas pela presença de picos de fusão entre 146-158 °C. Somente para as membranas porosas de PLGA foi observado pico de fusão na 4ª semana, entretanto com valores discrepantes ao observado após 8 semanas.

Numa primeira abordagem, a comparação entre as estruturas de um mesmo material mostra não haver diferenças significativas com relação à T_g, T_c e T_f em função do método de preparação das amostras. COOMBES² *et al.* (1992) avaliaram as propriedades térmicas de membranas formadas pelo processo de evaporação de solvente e concluíram que na ausência de agentes plastificantes (presença de solvente, por exemplo), a técnica de preparação não influi nas suas propriedades térmicas. Os valores de T_g, T_c, T_f encontram-se nas tabelas 4 a seguir.

Tabela 4 - Dados de DSC (Temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão) para amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação, 0, 1, 2, 4, 8 semanas (a linha clara representa o 1º aquecimento e a escura o 2º).

DSC – Temperatura															
Amostra\Semanas	T _g (°C)					T _c (°C)					T _f (°C)				
	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
PLLA Membrana Densa	-	58	65	-	-	-	-	-	-	-	178	180	180	178	178
	62	62	62	61	60	111	105	106	105	102	179	179	179	177	176
PLLA Suporte Esférico	-	53	-	-	-	-	-	-	-	-	180	180	181	181	180
	63	62	62	62	61	113	109	109	108	-	181	180	180	180	181
PLLA Membrana Porosa	-	62	56	-	-	-	-	-	-	-	178	179	177	180	178
	63	62	61	62	61	111	108	102	107	105	180	178	179	179	177
PLGA Membrana Densa	-	46	47	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	146
	48	46	39	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	157
PLGA Suporte Esférico	-	47	48	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	147
	47	44	35	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158
PLA Membrana Porosa	-	48	47	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	179	146
	49	48	47	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	176	153

Outro dado obtido pela técnica de DSC é a variação da entalpia das amostras. Conforme descrito no Capítulo 2, a variação da entalpia de fusão para o PLLA pode ser relacionada com a entalpia do polímero, supondo-o 100% cristalino, fornecendo uma porcentagem de grau de cristalinidade do material. De maneira geral, amostras de homopolímeros de ácido láctico ou ácido glicólico preparadas pelo processo de evaporação de solvente, são cristalinas, pois a evaporação do solvente ocorre numa velocidade suficientemente lenta para formação de um arranjo organizado das cadeias poliméricas (LAM *et al.*, 1994).

Os dados da Tabela 5 adiante, indicam um aumento do grau de cristalinidade das amostras de PLLA, no período de duas semanas, para o primeiro aquecimento. A variação entre o período 0-8 semanas não é significativa. No segundo aquecimento, todas as amostras foram resfriadas sob uma taxa constante (10°C/min), controlando-se o processo de cristalização do material. Os dados relativos ao segundo aquecimento são mostrados na Tabela 5 pela linha escura e indicam um aumento significativo no período de 0 até 8 semanas de degradação. A variação para membranas densas, estrutura esférica e membrana porosas foram, respectivamente, 12%, 46% e 9%, sendo mais acentuado nas estruturas densas (suporte esférico e membrana densa) que em membranas porosas.

A literatura atribui o aumento do grau de cristalinidade do PLLA à dois fatores: o primeiro, segundo PISTNER *et al.* (1993), está relacionado ao fato de polímeros semicristalinos sofrerem ataque preferencial nas regiões amorfas do material, devido a maior susceptibilidade de penetração da água. Dessa forma, a porcentagem relativa de regiões cristalinas aumenta em função do tempo de degradação. O segundo fator está relacionado à cisão hidrolítica e consequentemente formação de cadeias poliméricas de menor massa molar, permitindo um rearranjo destas, que darão origem a novos cristais (DUEK *et al.*, 1999).

Para as amostras de PLGA observou-se um pico de fusão característico de estruturas cristalinas no tempo de 8 semanas de degradação. O aparecimento do pico de fusão pode ser explicado pelo rearranjo das cadeias poliméricas geradas durante o processo de degradação que se organizam e dão origem aos cristais, confirmando a segunda possibilidade para explicar o aumento do grau de cristalinidade. A porcentagem relativa do grau de cristalinidade das amostras

de PLGA não pode ser determinado por comparação com o valor teórico. A seguir são apresentados os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Dados de DSC (Variação da entalpia de cristalização, fusão e grau de cristalinidade) de amostras de PLLA e PLGA em função do tempo de degradação, 0, 1, 2, 4, 8 semanas (a linha clara representa o 1º aquecimento e a escura o 2º).

DSC – Variação de Entalpia e Grau de Cristalinidade															
Amostra \ Semanas	$\Delta H_{\text{cristalização}} \text{ (J/g)}$					$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J/g)}$					Cristalinidade (%)				
	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
PLLA Membrana Densa	-	-	-	-	-	35	48	72	32	32	37	51	77	34	34
	28	31	45	17	11	36	66	100	38	31	9	37	59	22	21
PLLA Suporte Esférico	-	-	-	-	-	33	43	62	58	33	35	46	66	62	37
	28	30	44	44	14	33	52	75	79	62	5	23	33	37	51
PLLA Membrana Porosa	-	-	-	-	-	37	37	40	30	28	39	39	43	32	30
	29	25	21	20	16	39	49	59	41	35	11	26	41	22	20
PLGA Membrana Densa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-
PLGA Suporte Esférico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-
PLA Membrana Porosa	-	-	-	-	-	-	-	-	18	81	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	20	39	-	-	-	-	-

Os dados da Tabela 5 mostram, também, uma degradação diferenciada entre as estruturas densas (membrana e suporte esférico) e porosas de PLLA. Geralmente, existe uma relação direta entre a velocidade de degradação e a área superficial do material. Neste caso, quanto maior a superfície de contato com o agente de degradação, maior é o seu efeito. Entretanto, no caso dos PHA, a literatura descreve um processo inverso. Durante a hidrólise das cadeias poliméricas são gerados terminais ácidos (subproduto da degradação), conforme exemplificado na revisão bibliográfica deste trabalho. A taxa de difusão dos ácidos é maior quando em contato com a água ou fluido orgânico, e facilitada quanto maior for a superfície de exposição. Em materiais densos,

a baixa taxa de difusão no interior do material causa um acúmulo dos ácidos que catalisa as reações de degradação (LI, 1999).

O efeito da concentração dos ácidos no interior do material é denominado como o processo autocatalítico dos PHA e tem sido descrito na literatura nos últimos anos. LAM *et al.* (1994) avaliaram a degradação *in vitro* de membranas densas e porosas de PLLA em tampão fosfato durante 180 dias, concluindo que membranas densas possuem uma velocidade de degradação maior que membranas porosas.

Quando materiais semicristalinos com diferentes graus de cristalinidade inicial são comparados em função do período de degradação, o aumento relativo é maior naqueles com o menor grau. A comparação entre estruturas amorfas e cristalinas mostra uma velocidade de degradação maior nas estruturas amorfas. A compactação das cadeias do polímero, determina a taxa de absorção de água e conseqüente hidrólise da estrutura (VERT *et al.*, 1991).

Na análise de DSC, a autocatálise das amostras de PLLA é verificada quando se compara a variação relativa entre o grau de cristalinidade inicial e final (8 semanas), do segundo aquecimento. As estruturas densas apresentaram maior variação, em relação à membrana porosa, e sendo o aumento maior no suporte esférico, devido à sua maior espessura e conseqüente dificuldade de difusão dos produtos de degradação.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS

As análises anteriores das amostras densas (suporte esférico e membrana densa) de PLLA e PLGA não mostraram diferenças significativas em função da sua morfologia e propriedades térmicas, antes e durante o período de degradação. Dessa forma, foram submetidas aos testes de adesão e morfologia celular somente as amostras de membrana densa e porosa de ambos os materiais.

3.5.1 Adesão Celular

O primeiro teste envolvendo a cultura de células foi relacionado à adesão dos osteoblastos em membranas densas e porosas de PLLA e PLGA. A Tabela 6 e a Figura 32 a seguir representam os dados obtidos no experimento.

Tabela 6 - Absorbância das amostras de membrana densa e porosa de PLLA e PLGA submetidas ao ensaio de adesão celular.

Amostras	Absorbância média (540 nm)			
	Substrato	Substrato + Células	Células	Desvio Padrão
Controle positivo	0,000	0,321	0,321	0,097
Controle negativo	2,004	2,034	0,030	0,046
PLLA Membrana densa	1,676	1,756	0,080	0,087
PLLA Membrana porosa	0,827	0,860	0,033	0,030
PGLA Membrana densa	1,299	1,650	0,351	0,121
PGLA Membrana porosa	1,815	2,133	0,318	0,159

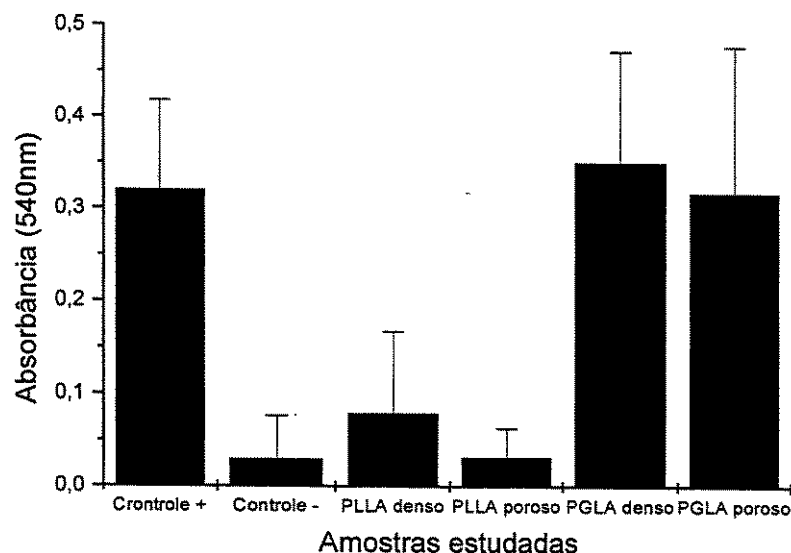


Figura 32 – Gráfico da adesão de osteoblastos em amostras de membranas densas e porosas de PLLA e PLGA.

Os resultados obtidos foram avaliados entre si, através do teste *t* com nível de significância 5%. Na primeira análise o controle positivo (polipropileno) mostrou-se significativamente diferente do controle negativo (silicone). A média do teste de adesão para membranas densas e porosas de PLGA não são estatisticamente diferentes do controle positivo, entretanto diferentes do controle negativo. Amostras de PLLA de membrana densa e porosa são estatisticamente iguais ao controle negativo.

Os resultados indicam uma adesão diferenciada nos polímeros bioreabsorvíveis estudados neste trabalho. Membranas densas e porosas de PLGA são considerados substratos adesivos para os osteoblastos, ao contrário das amostras de PLLA que se mostraram semelhantes ao controle negativo, indicando que nestes materiais há dificuldade de adesão.

A primeira interação entre a célula e o substrato sintético é a adesão celular. O termo *adesão* envolve duas etapas subsequentes, sendo a primeira relacionada com a aproximação e atração entre as células e o biomaterial. A etapa é breve, e as forças envolvidas são consideradas secundárias, como a iônica e as forças de van der Waals. A etapa seguinte é mais longa e estável, proteínas da matriz, ou da própria membrana plasmática, são depositadas e adsorvidas pelo material (ANSELME, 2000).

A interação entre os osteoblastos/material sintético depende, fundamentalmente, das características da superfície do material. A topografia, propriedades químicas e energia de superfície determinam como as moléculas biológicas serão adsorvidas pelo substrato, influenciando nas etapas subsequentes de espalhamento, proliferação e diferenciação celular.

A influência das características da superfície do substrato polimérico tem sido avaliada de forma integrada e interdependente. A topografia da superfície, lisa e rugosa (devido à porosidade superficial) mostra ter influência na adesão e proliferação das células. Em nosso experimento, a variação da topografia, avaliada através da porosidade superficial do material (membranas densas e porosas), não mostrou diferenças significativas no estudo da adesão celular para um mesmo material no período de 2 horas. Superfícies lisas, geralmente facilitam a adesão quando comparadas às rugosas, entretanto a invasão celular é maior nos substratos porosos (BOSTMAN *et al.*, 2000).

Nosso grupo de pesquisa avaliou a influência da porosidade de membranas de PLLA na adesão de células Vero (linhagem fibroblástica de células de rim de macacos). Membranas densas e porosas foram preparadas pelo processo de evaporação do solvente, com e sem adição de sal. Utilizou-se partículas de sal variando na faixa entre 250-350 μm , 180-250 μm e menores que 45 μm . Não foi observado influência significativa na variação da porosidade do material em relação à adesão celular. Estatisticamente o teste de adesão mostrou-se semelhante ao controle negativo de silicone e foi atribuído à característica hidrofóbica dos substratos (SANTOS JR. *et al.*, 2001).

A porosidade nos substratos sintéticos é considerada como morfologia preferencial em aplicações na Engenharia de Tecidos. Segundo MIKOS *et al.* (1993) a taxa de penetração e crescimento celular em estruturas porosas de polímeros bioreabsorvíveis está diretamente relacionada com o tamanho e distribuição do tamanho dos poros no material. Os poros aumentam a área superficial das amostras, promovendo espaço adequado para a invasão celular e facilitando a difusão dos fluidos orgânicos durante a cultura de célula e quando implantado no organismo hospedeiro. Os autores concluem que a invasão e o crescimento celular estão diretamente relacionados com o tamanho dos poros e a cristalinidade do material.

O aumento da porosidade diminui a resistência mecânica dos suportes poliméricos, e atualmente, os desafios relacionados à integração polímero/adesão e proliferação celular de osteoblastos, visam desenvolver estruturas porosas que possuam propriedades mecânicas adequadas para a manutenção do tecido e da estrutura óssea (WINTERMANTEL *et al.*, 1996).

Além da facilidade de difusão dos fluidos e do aumento da área superficial para cultura, a porosidade/rugosidade tem influência na energia de superfície dos materiais. O estudo da adesão celular em substratos de polimetilmetacrilato (PMMA), com diferentes rugosidades, demonstrou que os componentes apolares da superfície aumentam consideravelmente em amostras com maior rugosidade, facilitando a adsorção de proteínas e permitindo um arranjo espacial adequado para interação entre célula e biomaterial (LAMPIN *et al.*, 1997).

A adesão celular em membranas densas e porosas de PLLA tem sido relatada na literatura como uma função da composição química e conseqüente hidrofilicidade dos materiais (SANTOS JR *et al.*, 2001). A adesão é facilitada em substratos hidrofílicos, ou carregados eletricamente,

pois nesses casos a taxa de absorção de água pelo material é maior, aumentando a capacidade de adesão celular. Polímeros amorfos facilitam a penetração e absorção de água quando comparados aos materiais cristalinos e por isso apresentam invasão e vascularização tecidual elevada (MIKOS *et al.*, 1993). Os dados de DSC mostraram as diferenças de cristalinidade entre as amostras de PLGA e PLLA e podem ser utilizados para justificar a diferença dos dados de adesão de osteoblastos.

A literatura descreve dados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Osteoblastos cultivados sobre filmes de PGA e PLGA mostraram um padrão de adesão satisfatório quando comparados ao controle positivo, além de apresentarem a capacidade de crescer e proliferar sobre o substrato. As células demonstraram um aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação e atividade óssea, na síntese de colágeno (ISHAUG *et al.*, 1994). Resultados similares foram obtidos pela cultura de osteoblastos em dispositivos tridimensionais de PLGA com a mineralização da matriz óssea produzida (ISHAUG *et al.*, 1997; ISHAUG-RILEY *et al.*, 1998).

Atualmente, a abordagem no estudo da adesão de osteoblastos não leva em consideração somente a influência da morfologia e o tipo de material. COELHO *et al.* (2000) descreve a adesão e diferenciação celular em função da composição do meio de cultura utilizado. Outra abordagem relaciona a incorporação de fatores que estimulam a células a se diferenciarem. A adição de uma forma recombinante da *proteína morfogenética óssea humana-2* (rhBMP-2) à membranas bioreabsorvíveis aumenta a produção de matriz óssea em relação aos controles (WHANG *et al.*, 1998).

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura para Cultura de Células.

Conforme descrito no capítulo 2, a morfologia celular dos osteoblastos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura em amostras de membranas densas e porosas de PLLA e PLGA. A seguir são apresentadas as micrografias obtidas.

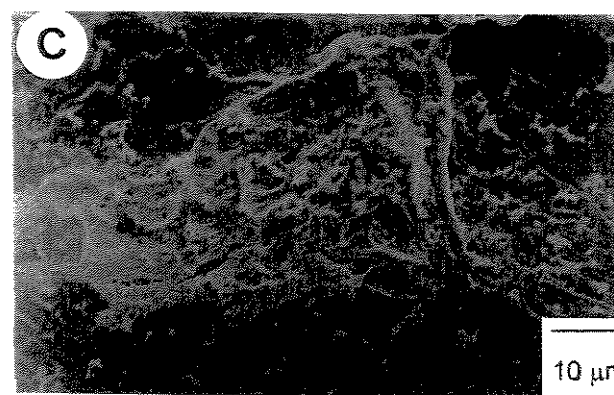
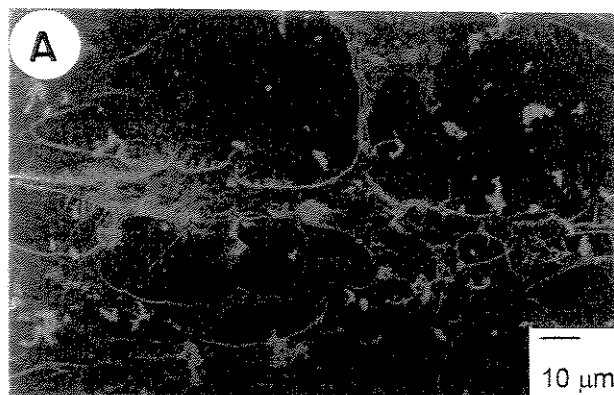


Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre lamínula de vidro (controle).

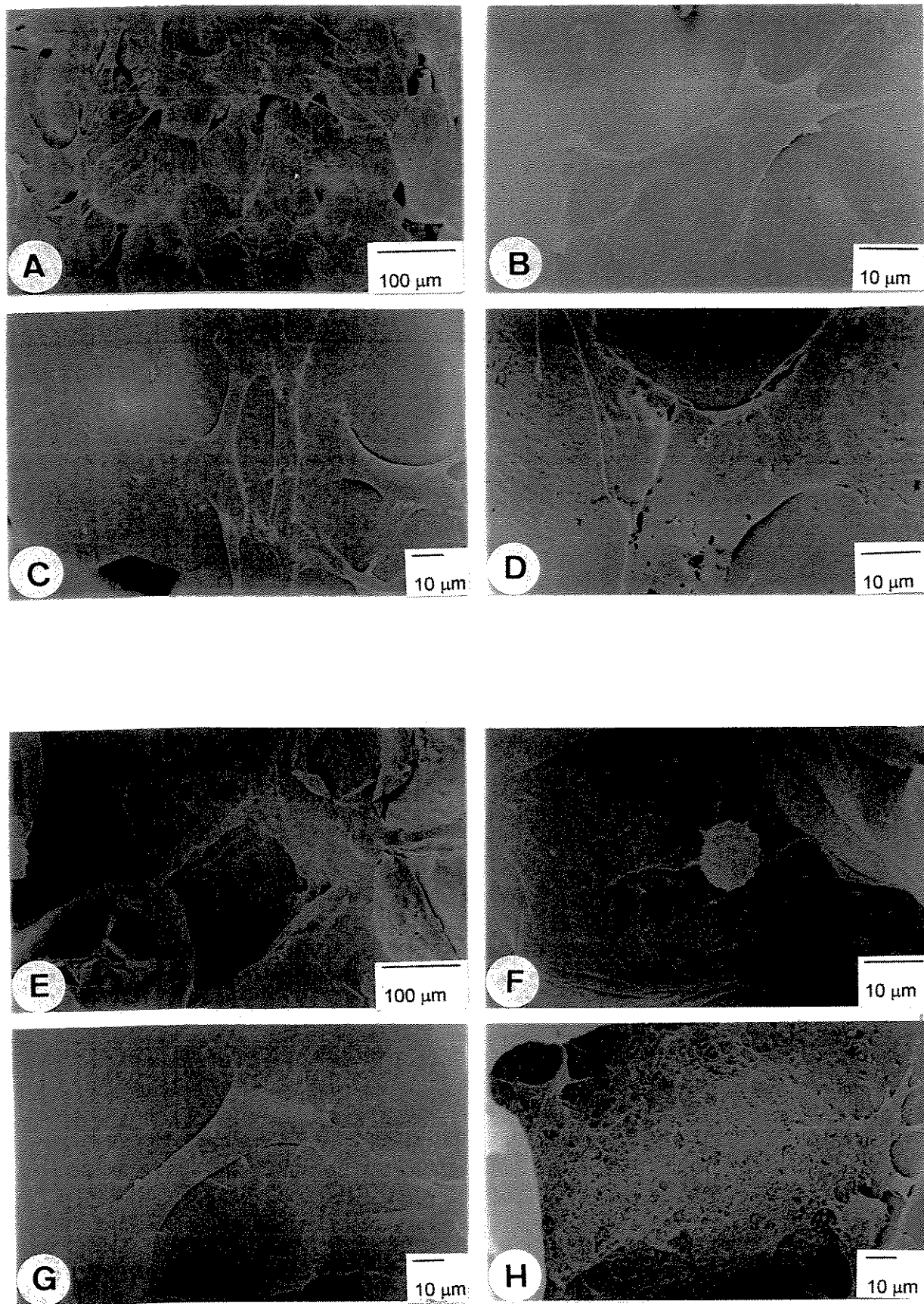


Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre amostras de PLLA (A, B, C, D = Superfície superior de membranas densas ; E, F, G, H = Superfície superior de membranas porosas).

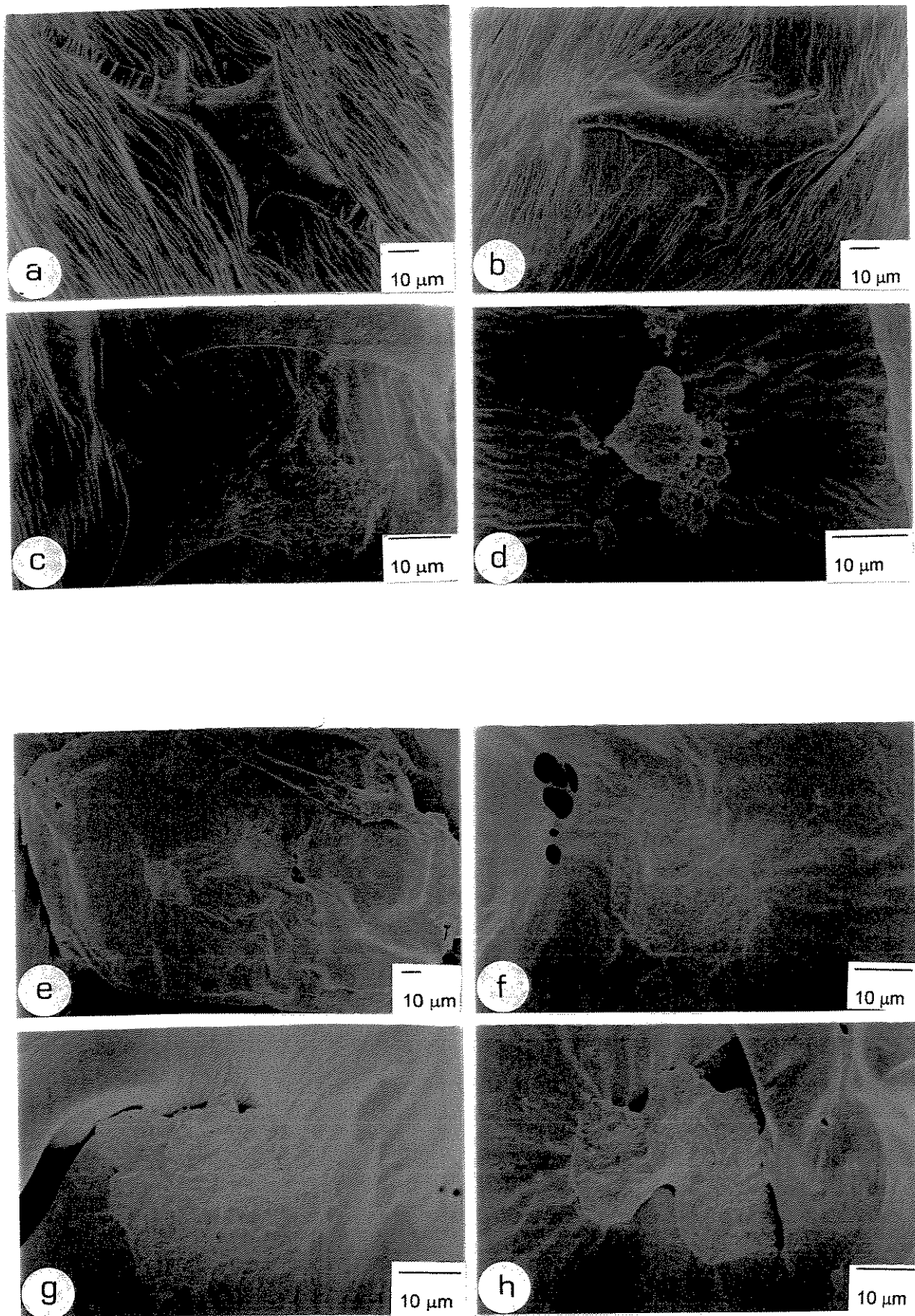


Figura 35 – Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células osteoblásticas sobre amostras de PLGA (a, b, c, d = Superfície superior de membranas densas ; e, f, g, h = Superfície superior de membranas porosas).

A Figura 33 mostra a cultura de osteoblastos sobre lamínulas de vidro, utilizada como controle morfológico do experimento. A análise inicial das micrografias (Figura 33A, 33B, 33C) mostra células aderidas em monocamada e espaçadas (tapete não confluyente). A morfologia celular é continua, bem espalhada, tipo fibroblástica. São observados prolongamentos emitidos pelas células que aderem ao vidro e à outras células. Os grânulos presentes sugerem serem do precipitado da solução de tampão fosfato utilizado no processamento de fixação.

Células cultivadas sobre amostras de membrana densa de PLLA (Figura 34A, 34B, 34C, 34D) apresentaram morfologia semelhante ao controle da lamínula, embora com maior quantidade de prolongamentos. Na Figura 34A é possível observarmos a superfície superior do material com células aderidas aos glóbulos (descrito no item de Microscopia Eletrônica de Varredura para a degradação *in vitro*), e com prolongamentos aderidos à superfície do material (Figura 34B, 34C, 34D).

Em amostras porosas de PLLA foi observado um comportamento morfológico distinto, sendo a densidade superficial de células menor em relação às membranas densas (Figura 34E). Foram observadas células com morfologia levemente alongada, com ausência de vesículas na superfície celular (Figuras 34G). Nas regiões de invaginação da superfície do material, geradas pela porosidade, observou-se um comportamento morfológico esférico, característico de uma célula em processo mitótico (Figura 34F). A Figura 34H mostra um conjunto de células aderidas no interior de um poro, com morfologia irregular e com a grande presença de vesículas na superfície, sugerindo a produção de matriz extracelular.

A análise das células cultivadas sobre amostras de PLGA apresentaram comportamento distinto em relação às amostras de PLLA. A Figura 35 mostra células aderidas à superfície superior de amostras de membranas densas e porosas. Em membranas densas, a superfície superior do material torna-se rugosa dificultando a observação das células aderidas. A comparação com as micrografias do processo de degradação *in vitro* sugere que esta deformação superficial foi ocasionada pelo processamento do material durante o ponto crítico. As células aderidas possuem vesículas em sua superfície, mas se mantém morfológicamente semelhante ao controle do experimento (Figuras 35a, 35b, 35c). A Figura 35d mostra células esféricas, semelhantes àquelas observadas na Figura 35F.

O comportamento morfológico das células em membranas porosas de PLGA foi intermediário à morfologia alongada e à esférica (Figura 35e, 35f, 35g, 35h). As células presentes são bem espalhadas, mas sem os prolongamentos característicos observados nas membranas densas de PLGA e nas amostras densas e porosas de PLLA. As células apresentaram ainda vesículas na sua superfície.

Células de osteoblastos cultivadas sobre os diferentes materiais mostraram-se morfológicamente mais semelhante aos osteócitos quando cultivadas sobre a superfície superior de membranas densas de PLLA. A comparação dos dados de morfologia e de adesão celular sugerem que os dados experimentais são conflitantes: substratos de PLLA são pouco adesivos quando comparados às amostras de PLGA, mas com morfologia e densidade celular superior ao PLGA.

Entretanto, a literatura descreve os fenômenos da adesão, proliferação e diferenciação celular, como eventos interrelacionados mas não exclusivamente dependentes (ANSELME, 2000). A baixa adesão celular não implica necessariamente numa baixa proliferação. Estudos recentes mostram que membranas de PLLA não são bons substratos adesivos, mas estimula a produção de matriz extracelular e subsequente proliferação (SANTOS JR. *et al.*, 2001).

As estruturas de polímeros bioreabsorvíveis são dimensionadas e projetadas em função do tipo de aplicação. Na estratégia II (descrito no Capítulo 1), ou em situações de trauma ósseo na qual a porção do tecido lesado é pequena, são sugeridos materiais com propriedades de degradação rápida e que permitam alta adesão celular, como as estruturas de PLGA obtidas neste trabalho. O defeito é reparado num intervalo pequeno de tempo e o material bioreabsorvido. Em se tratando de lesões mais profundas e extensas, a técnica da Engenharia de Tecidos é utilizada através de uma combinação de fatores: o material deve possuir propriedades de degradação para longos períodos, propriedades mecânicas semelhantes ao tecido vivo e, principalmente, a capacidade de induzir a proliferação e produção de matriz extracelular pelas células cultivadas, conforme a estratégia I (Capítulo 1). Materiais preparados a partir de PLLA são melhor indicadas para estes casos.

CAPÍTULO 4

4.1 CONCLUSÕES

- Dados da Microscopia Ótica mostraram uma degradação diferenciada entre as amostras de PLLA e PLGA. Enquanto as de PLLA mantiveram sua estrutura macroscópica inalterada, as de PLGA mostraram uma nítida alteração em sua morfologia, verificado através da compactação das amostras.
- A análise da Microscopia Eletrônica de Varredura confirma os resultados obtidos por MO. Comparando-se as estruturas densas (membrana densa e suporte esférico) e porosa de PLGA, verifica-se uma degradação mais acentuada nas densas, devido ao efeito autocatalítico dos PHA. Não foi observado diferenças morfológicas significativas entre membranas densas e suporte esférico para ambos os materiais. A morfologia dos poros (tamanho e distribuição do tamanho dos poros) é significativamente alterada somente para as amostras de PLGA.
- A estabilidade térmica dos materiais é adequada para aplicações como suporte para cultura de células. A variação de T_i em função do tempo de degradação indicou que as estruturas de PLGA perdem a estabilidade térmica, enquanto as de PLLA mostram um discreto aumento atribuído ao aumento do grau de cristalinidade do material, como verificado na análise por DSC.
- Os dados de DSC para as amostras de PLLA indicam um aumento relativo no grau de cristalinidade do material, sendo a variação maior para as estruturas densas e atribuído ao efeito autocatalítico dos PHA. Os valores de T_g , T_c e T_f permaneceram constantes no período. As amostras de PLGA apresentaram pico de fusão para o período de 8 semanas de degradação, característico de materiais semicristalinos, indicando a cristalização do material. A apresentou uma diminuição na T_g em função do tempo de degradação, atribuído ao efeito plastificante da absorção de água.

- A cultura de osteoblastos sobre membranas densas e porosas de PLLA e PLGA indicaram um melhor adesão nas amostras de PLGA. A análise da morfologia celular sugere um favorecimento da proliferação e diferenciação nas membranas densas de PLLA.

4.2 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

- Avaliação mecânica das estruturas de PLLA e PLGA.
- Análises complementares em cultura de células: crescimento celular e estudos citoquímicos para avaliação da diferenciação celular.
- Cultura de células dinâmica
- Estudo *in vivo* das amostras de PLLA e PLGA, variando a degradação do material e a cultura de células *in vitro*.

CAPÍTULO 5

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S. A. M., Doherty, P. J., Williams, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices, 2. Poly(DL-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.1409-18, 1993.
- An, Y. H., Woolf, S. K., Friedman, R. J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*, v.21, p. 2635-52, 2000.
- Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials: Review. *Biomaterials*, v.21, p. 667-81, 2000.
- Atala, A. Tissue engineering of artificial organs. *Journal of Endourology*, v.14, n.1, p.49-57, 2000.
- Athanasίου, K. A., Niederauer, G. G. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/poly glycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v.17, p.93-102, 1996.
- Barbanti, S. H., Duek, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) membranes: *in vitro* degradation. *Acta Microscopica*, v.9, 2000. Em impressão.
- Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, p.129-35, 1998.
- Boschi, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial?. *Anais do 50º Congresso Anual da ABM*, São Pedro, 1995.
- Böstman, O. M. Current concepts review, absorbable implants for the fixation of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.73, n.1, p.148-53, 1991.

- Böstman, O. M., Pihlajamäki, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, v.21, p. 2615-21, 2000.
- Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., Schwartz, Z. Role of materials surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, v.17, p.137-46, 1996.
- Britt, J. C., Park, S. S. Autogenous Tissue-Engineered Cartilage: Evaluation as an Implant Material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, v.124, p.671-77, 1998.
- Burg, K. J. L., Porter, S., Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 21, p. 2347-59, 2000.
- Burkhart, S. S. The evaluation of clinical applications of biodegradable implants in arthroscopic surgery, *Biomaterials*, v. 21, p. 2632-34, 2000.
- Cam, D., Hyon, S. H., Ikada, Y. Degradation of high molecular weight poly(l-lactide) in alkaline medium. *Biomaterials*, v. 16, n.11, p. 833-43, 1995.
- Cao, Y., Vacanti, J. P., Paige, K. T., Upton, J., Vacanti, C. A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v., p. 297-302, 1997.
- Cao, Y. L., Lach, E., Kim, T. H., Rodriguez, A., Arévalo, C. A., Vacanti, C. A. Tissue-engineered nipple reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.102, p. 2293-97, 1998.
- Coelho, M. J., Trigo Cabral, A., Fernandes, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials*, v.21, n.11, p. 1087-94, 2000.
- Coombs¹, A. G. A., Heckman, J. D. Gel casting of resorbable polymers. 1 Processing and applications. *Biomaterials*, v.13, p.217-24, 1992.

- Coombes², A. G. A., Heckman, J. D. Gel casting of resorbable polymers. 2 In-vitro degradation of bone graft substitutes. *Biomaterials*, v.13, n.5, p.297-307, 1992.
- Davis, M. W., Vacanti, J. P. Toward developemnt of an implantable tissue engineered liver. *Biomaterials*, v.17, p. 365-72 , 1996.
- Duek, E. A. R., Zavaglia, C. A. C., Belangero, W. D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v.40, p. 6465-73, 1999.
- Fisher, E. W. Sterzel, H. J., Wegner, G. *Kolloid-Zuz Polym*, p.251:980, 1973 citado em Li, 1999.
- Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A. G., Langer, R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.11-23, 1993.
- Gogolewski, S., Pineda, L., Busing, C. M. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV.Does the polymer chemical composition affect the healing process?. *Biomaterials*, v.21, p. 2513-20, 2000.
- Griffith, L. G. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, v.48, n.1, p. 263-77, 2000.
- Grizzia, I., Garreau, H., Li, S., Vert, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(lactic acid) size dependence. *Biomaterials*, v.16, n.4, p. 305-11, 1995.
- Harris, L. D., Kim, B., Mooney, D. J. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, p. 396-402, 1998.
- Hench, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, p.1419-23, 1998.
- Hollinger, J. O., Battistone, G. C. Biodegradable Bone Repair Materials. *Clinical Orthopedics and Related Reserch*, v.207, p. 290-305, 1986.

- Hubbell, J. A. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology*, v.13, p.565-76, 1995.
- Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p. 2529-43, 2000.
- Ishaug, S. L., Yaszemski, M. J., Brizios, R., Mikos, A. G. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.28, p.1445-53, 1994.
- Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradative polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, p.17-28, 1997.
- Ishaug-Riley, S. L., Crane, G. M., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, v19, p.1405-12, 1998.
- Kellomaki, M., Niiranen, H., Puumanen, K., Ashammakhi, N., Waris, T., Tormala, P., Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials*, v.21, p. 2495-2505, 2000.
- Laitinen, O., Alitalo, I., Toivonen, T., Vasenius, J., Tormala, P., Vainionpaa, S. Tissue response to a braided poly-L-lactide implant in an experimental reconstruction of anterior cruciate ligament. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.4, p.547-53, 1993.
- Lam, K. H., Nieuwenhuis, P., Esselbrugge, H., Feijen, J., Dijkstra, P. J., Schakeraad, J. M. Biodegradation of porous versus non porous poly(L-lactic acid) films, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.5, p. 181-93, 1994.
- Lampin, M., Warocquier-Clérout, R. Legris, C., Degrange, M., Sigot-Luizard, M. F. Correlations between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 36, p. 99-108, 1997 citado em Anselme *et al.*, 2000.

- Li¹, S., Garreu, H. Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1: poly(D,L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.1, p. 123-30, 1990.
- Li², S., Garreu, H. Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 2: Degradation of lactide-glycolide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.1, p. 342-53, 1990.
- Li³, S., Garreu, H. Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3: influence of morphology of poly(L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.1, p. 198-206, 1990.
- Li, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48, n.3, p. 342-53, 1999.
- Lu¹, L., Peter, S. J., Lyman, M. D., Lai, H., Leite, S. M., Tamada, J. A., Vacanti, J. P., Langer, R., Mikos, A. G. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials*, v.21, p. 1595-1605, 2000.
- Lu², L., Peter, S. J., Lyman, M. D., Lai, H., Leite, S. M., Tamada, J. A., Vacanti, J. P., Langer, R., Mikos, A. G. In vitro and in vivo degradation of porous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, v.21, p.1837-45, 2000.
- Machado, L. D. B. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) Aplicada ao Estudo de Polímeros, *Apostila Curso da ABPol*, 1999 citado em Bavaresco, Vanessa Petrilli. *Recobrimento de Substratos Rígidos com Hidrogel para utilização como superfície articular*, Campinas: Faculdade de Eng. Mecânica, Univ. Est. de Campinas, 2000. Tese (Mestrado).
- Mano, E. B. *Introdução a Polímeros*, São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda., Brasil, 1988.

- Mano, E. B. *Polímeros como materiais para engenharia*, São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda., Brasil, 1991.
- Middleton, J. C., Tipton, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.21, p.2335-46, 2000.
- Mikos, A. G., Sarakinos, G., Lyman, M. D., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., Langer, R. Prevascularization of Porous Biodegradable Polymers. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, p. 716-23, 1993.
- Miller, R. A., Brady, J. M., Cutright, D. E. Degradation Rates of Oral Resorbable Implants (Polylactates and Polyglycolates): Rate Modification with Changes in PLA/PGA Copolymer Ratios. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.11, p. 711-19, 1977.
- Penco, M., Sartore, L., Bignotti, F., D'antone, S., Landro, L. Thermal properties of a new class of block copolymers based on segments of poly(D,L-lactic-glycolic acid) and poly(ϵ -caprolactone). *European Polymer Journal*, v.36, p. 901-908, 2000.
- Pistner, H., Bendix, D. R., Muhling, J., Reuther, J. F. Poly(L-lactide): a long term degradation study in vivo, Part III: analytical characterization. *Biomaterials*, v.14, n.4, p.291, 1993.
- Puelacher, W. C., Mooney, D., Langer, R., Upton, J., Vacanti, J. P., Vacanti, C. A. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials*, v., p. 774-81, 1994.
- Reed, A. M., Gilding, D. K. Biodegradable Polymers for use in Surgery-Poly(Glycolic)-poly(Lactic Acid) Homo and Co-Polymers. 2 In Vitro Degradation. *Polymer*, v.22, n.4, p.494-98, 1981.
- Santos Jr., A. R., Barbanti, S. H. Duek, E. A. R., Dolder, H., Wada, R. S., Wada, M. L. F. Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. *Artificial Organs*, v.25, 2001. Em impressão.

- Tabata, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v.3, p. 80-89, 2000.
- Temenoff, J. S., Mikos, A. G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*, v. 21, p. 2405-12, 2000.
- Tsuji H. In vitro hydrolysis of blends from enantiomeric poly(lactide)s part 1. Well-stereo-complexed blend and non-blended films. *Polymer*, v. 41, p.3621-30, 2000.
- Tsuji H., Ikada, Y. Properties and morphology of poly(L-lactide) 4. Effects on structural parameters on long-term hydrolysis of poly(L-lactide) in phosphate-buffered solution. *Polymer Degradation and Stability*, v. 67, p. 179-89, 2000.
- Vacanti, J. P., Langer, R. Tissue engineering. *Science*, v.260, p.920-26, 1993.
- Vert, M., Li, S., Garreau, H. More about the degradation of LA/GA derived matrices in aqueous media. *J. Controlled Release*, v. 16, p. 15-26, 1991.
- Vert, M., Li, M. S., Spenlehauer, G., Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science*, v.3, p. 432-36, 1993.
- Vert, M., Mauduit, J., Li, S. Biodegradation of PLA/GA Polymers: Increasing Complexity. *Biomaterials*, v.15, p.1209-17, 1994.
- Whang, D. C., Nam, E. K., Aitken, M., Sprague, S. M., Patel, P. K., Healy, K. E. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, p. 491-99, 1998.
- Willians, D. F. (ed) *Definitions in Biomaterials, Proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials*, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier, 1987.

Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K. L., Luscher, P., Mathey, M. Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials*, v.17, p.83-91, 1996.